

УДК 577.112:577.152.1:636.2:616.34

АКТИВНІСТЬ РЕГУЛЯТОРНИХ ЕНЗИМІВ ЦТК У КЛІТИНІ ЗА РОЗЛАДУ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ

Л. Г. Калачнюк
lilkalachnyuk@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15; Київ, 03041, Україна

Раніше були виявлені значні порушення у функціонуванні реакцій анаеробного гліколітичного шляху і, зокрема на заключній його стадії, тобто при утворенні пірувату й лактату в гепатоцитах новонароджених телят за розладу процесів травлення. Метою наступних досліджень було продовжити вивчення впливу факторів розладу травної системи аліментарної природи на внутрішньоклітинний метаболізм і, передусім, на активність регуляторних ензимів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) у печінці новонароджених телят.

Для досліджень використовували 1–7-добові телята, які за принципом аналогів (рівнозначні за віком, породою, статтю, вагою) розділяли на дві групи ($n=5$) з масою тіла 28–36 кг. Телята першої (I, контрольної) групи були клінічно здоровими, а другої (II, дослідної) — з розладом травної системи аліментарного походження. Активність цитратсинтази (CS; КФ 4.1.3.7) і цитохром-с-оксидази (COX; КФ 1.9.3.1) в оброблених ультразвуком гомогенатах печінки визначали за загальноприйнятими методами (Shepherd D., Garland P.B., 1969; Smith L., Conrade H., 1956). При цьому враховували, що рівень активності CS віддзеркалює стан початкового етапу функціонування ЦТК, точніше — швидкість конденсації ацетил-КоА із оксалоацетатом. Він відтінює ефективність продукування лимонної кислоти та успішність подальших важливих реакцій циклу. В доповненні до цього COX (і O_2) є кінцевим пунктом постачання електронів, які надходять від окиснення поживних речовин, а також спрямовує транспорт протонів через внутрішню мембрану мітохондрій. Це в комплексі

забезпечує кінцевий ефект стадії біологічного окиснення, тобто відновлення електронами молекулярного кисню.

У результаті проведених досліджень виявлено, що за розладу травної системи аліментарної природи у клітинах печінки новонароджених телят вірогідно знижується активність CS, яка каталізує початкову стадію функціонування ЦТК, і, отже, швидкість та обсяги катаболізму й синтезу у ньому багатьох важливих інтермедіатів.

Порушення процесів травлення також вірогідно знижують активність COX, тобто інгібують заключну стадію окиснення-відновлення електронами молекулярного кисню. Слід зазначити, що прямим віддзеркаленням закономірностей виявлених змін можна вважати величину співвідношення COX:CS. Виявлені зміни пов'язуються з порушеннями структурно-функціонального стану мембран мітохондрій та інших компартментів клітин печінки через дефіцит надходжень поживних речовин із шлунково-кишкового тракту та інгібування багатьох важливих ланок внутрішньоклітинного й загального метаболізму.

Ключові слова: ЕНЗИМИ ЦТК, ЦИТРАТСИНТАЗА, ЦИТОХРОМ-С-ОКСИДАЗА, КЛІТИНИ ПЕЧІНКИ, СИСТЕМА ТРАВЛЕННЯ, НОВОНАРОДЖЕНІ ТЕЛЯТА

ACTIVITY OF REGULATORY ENZYMES OF THE TCA CYCLE IN THE CELL UNDER CONDITION OF DISORDER OF DIGESTIVE SYSTEM

L. G. Kalachnyuk
lilkalachnyuk@gmail.com

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Heroiv Oborony str., 15; Kyiv, 03041, Ukraine

It has been early discovered disturbance in the functioning of reactions of anaerobic-glycolytic pathway, especially at its final stage (during the formation of pyruvate and lactate) in hepatocytes of newborn calves under conditions of disorder of processes of digestion. The purpose of the following investigations was to continue the study of influence of factors of digestive system disorders of alimentary nature on intracellular metabolism, especially on activity of regulatory enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the liver of newborn calves.

For the research, 1–7 days old calves were used. Animals that are on the principle of unique (equivalent in age, breed, sex, weight) divided into two groups (n=5) with a body weight 28–36 kg. Calves of the first (I, control) group were clinically healthy, and the second (II, experimental) — a disorder of the digestive system of alimentary origin. The activity of citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7) and cytochrome c oxidase (COX, EC 1.9.3.1) in the ultrasound-treated liver homogenates were determined by the generally accepted methods (Shepherd D., Garland P.B., 1969; Smith L., Conrade H., 1956). It has been taken into account that the level of CS activity reflects the state of the initial phase of the TCA cycle functioning — more precisely, rate of condensation of acetyl-CoA with oxaloacetate. It reflects citric acid production efficiency and successfulness of subsequent series of important reactions. Additionally, the COX (and O₂) is the ultimate supply of electrons coming from oxidation of nutrients, as well as

direct transport of protons across the inner membrane of mitochondria. This in complex provides the ultimate effect of stage biological oxidation, ie recovery of molecular oxygen by electrons.

As a result, the research found that, under conditions of disorder of the digestive system of alimentary nature in hepatic cells of newborn calves, the activity of CS is significantly decreased. CS catalyzes the initial stage of the TCA cycle functioning and hence the rate and capacity of catabolism and synthesis of many important intermediates in it.

Disorders of the digestive processes also significantly reduces the activity of COX, ie, inhibits the final stage of oxidation-reduction of molecular oxygen by electrons. It should be noted that a direct reflection of the regularities of the detected changes can be considered as the value of the COX : CS ratio. The revealed changes are associated with disorders of structural and functional state of mitochondrial membranes and other compartment of hepatic cells due to deficiency of nutrients supplies from the gastrointestinal tract and inhibition of many important parts of the overall and intracellular metabolism.

Keywords: ENZYMES OF THE TCA CYCLE, CITRATE SYNTHASE, CYTOCHROM-C-OXIDASE, HEPATIC CELLS, SYSTEM OF DIGESTION, NEWBORN CALVES

АКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭНЗИМОВ ЦТК В КЛЕТКЕ ПРИ РАССТРОЙСТВЕ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Л. Г. Калачнюк
lilkalachnyuk@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборона, 15; Киев, 03041, Украина

Ранее были выявлены значительные нарушения в функционировании реакций анаэробного гликолитического пути и, в частности, на заключительной его стадии, то есть образовании пирувата и лактата в гепатоцитах новорожденных телят при расстройстве процессов пищеварения. Целью этой последующих исследований было — продолжить изучение действия факторов расстройства пищеварительной системы алиментарного происхождения на

внутриклеточный метаболизм и, прежде всего, на активность регуляторных энзимов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) в печени новорожденных телят.

Для исследований использовали 1–7-дневные телята, которые за принципом аналогов (равнозначные за возрастом, породой, статью, весом) разделяли на две группы (n=5) с массой тела 28–36 кг. Телята первой (I, контрольной) группы были

клинически здоровыми, а второй (II, опытной) — с нарушениями пищеварительной системы алиментарного происхождения. Активность цитратсинтазы (CS, КФ 4.1.3.7) и цитохром-с-оксидазы (COX, КФ 1.9.3.1) в обработанных ультразвуком гомогенатах печени определяли общепринятыми методами (Shepherd D., Garland P.B., 1969; Smith L., Conrade H., 1956). При этом учитывали, что уровень активности CS отражает состояние начального этапа функционирования ЦТК, точнее — скорость конденсации ацетил-КоА с оксалоацетатом, что отражает эффективность продукции лимонной кислоты и развитие дальнейших важных реакций цикла. Наряду с этим COX (и O_2) являются конечным пунктом снабжения электронов, которые поступают от окисления питательных веществ, а также направляет транспорт протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Это в комплексе обеспечивает конечный эффект стадии биологического окисления, то есть восстановления электронами молекулярного кислорода.

В результате проведенных исследований выявлено, что вследствие нарушения пищеварительной системы алиментарного происхождения в клетках печени новорожденных телят достоверно снижается активность CS, которая катализирует начальную стадию функционирования ЦТК, и, таким образом, скорость и объемы катаболизма и синтеза в нем многих важных интермедиатов.

Нарушения процессов пищеварения также достоверно снижают активность COX, то есть ингибируют заключительную стадию окисления-восстановления электронами молекулярного кислорода. Следует отметить, что прямым отражением закономерностей выявленных изменений можно считать величину соотношения COX : CS. Выявленные изменения связаны с нарушениями структурно-функционального состояния мембран митохондрий и других компартментов клеток печени из-за дефицита поступления питательных веществ из желудочно-кишечного тракта и ингибирования многих важных звеньев внутриклеточного и общего метаболизма.

Ключевые слова: ЭНЗИМЫ ЦТК, ЦИТРАТСИНТАЗА, ЦИТОХРОМ-С-ОКСИДАЗА, КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ, СИСТЕМА ПИЩЕВАРЕНИЯ, НОВОРОЖДЕННЫЕ ТЕЛЯТА

У попередніх роботах [1–5] ми повідомляли, що в молекулярних механізмах регуляції обмінних процесів у клітинах печінки новонароджених телят за умов розладів травної системи, особливу роль відіграє анаеробний гліколіз і, передусім, його кінцева реакція, яка каталізується лактатдегідрогеназою (ЛДГ). Під впливом факторів порушень процесів травлення у тканині печінки неонатальних телят часто відмічається вірогідне зниження концентрацій лактату при паралельному підвищенні вмісту пірувату. Разом з цим у цитозоль-мікросомальній фракції клітин вірогідно зростає активність ЛДГ, суттєво змінюється і її спектр множинних молекулярних ізоформ. Молярні обсяги електрофоретично більш рухливих тетраметрів ($H_4 - \alpha_1$, $H_3M_1 - \alpha_2$, $H_2M_2 - \beta$, $H_1M_3 - \gamma_1$) знижуються за вказаних порушень при багатократному збільшенні моль-відсотку п'ятого тетрамеру $M_4 - \gamma_2$. Наведені зміни, очевидно, пов'язані із певними пошкодженнями структурно-функціонального стану клітин і, зокрема мембран.

Відомо, що в аеробних умовах молекула глюкози під час деградації гліколітичним шляхом дає 2 молекули АТФ і НАДН [3, 6]. А в анаеробних умовах піруват проходить подальші перетворення, які забезпечують регенерацію $НАД^+$ та утворення продуктів бродіння — лактат, етанол тощо. За таких умов гліколіз є єдиним способом отримання енергії для синтезу АТФ із АДФ та неорганічного фосфату. Зворотний шлях (за певних умов використання окремих обхідних реакцій) дозволяє синтезувати глюкозу *de novo*.

За вищенаведених змін особливий науково-фундаментальний і практичний інтерес викликає подальша доля

утвореного пірувату та стан рівнів активності ключових ензимів ЦТК і, зокрема цитратсинтази та маркера цілісності внутрішньої мембрани мітохондрій — цитохром-с-оксидази. Згадані ензими у значній мірі віддзеркалюють подальшу долю утворених пірувату й лактату. Тому саме на активності цих ензимів була зосереджена основна увага наших наступних досліджень.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували 1–7-добових новонароджених телят, яких за принципом аналогів (рівнозначні за віком, породою, статтю, вагою) розділяли на дві групи ($n=5$) з масою тіла 28–36 кг. Телята першої (І контрольної) групи були клінічно здоровими, а другої (ІІ дослідної) — з розладом травної системи аліментарного походження. Умови і методи досліджень були описані у попередніх роботах [1–5]. Активність цитратсинтази (CS; КФ 4.1.3.7) і цитохром-с-оксидази (COX; КФ 1.9.3.1) досліджували за загальноприйнятими методами [7, 8]. Активність CS в оброблених ультразвуком гомогенатах печінки визначали шляхом вимірювання початкової швидкості (V_0) реакції при 412 нм за методом фіксації ДТНБ-5,5'-дитіобіс (2-нітробензоату) [7]. Реакційна суміш містила 0,2 мМ ДТНБ, 50 мкМ ацетил-КоА, 100 мМ тріс-НСІ (рН 8,1), 100 мкМ оксалоацетату, об'єм проби становив 1 мл. Реакцію проводили при 25 °С та ініціювали її додаванням оксалоацетату. Активність COX вимірювали у заморожено-розморожених оброблених ультразвуком гомогенатах при 25 °С згідно з методикою [8] із 90 мкМ відновленого цитохрому с як субстрату і 50 мМ K_2HPO_4 (рН 7,4). Початкову швидкість обчислювали за формулою $V_0=k \cdot [S]$, в якій стала першого порядку k визначена експериментально; концентрація субстрату $[S]$ становила 90 мкМ. За одиницю активності CS і COX прийнято ту кількість ензиму, яка

за умов експерименту каталізувала виділення 1 мкмоля коензиму А або окиснення 1 мкмоля цитохрому с відповідно за 1 хв при 25 °С. Питомі активності виражено в одиницях на 1 г тканини сирі маси (У/г сирі тканини).

Вміст білка визначали за Лоурі та ін. [9] з використанням в якості стандарту альбуміну сироватки крові бика. Статистичне опрацювання отриманих цифрових даних виконували за допомогою програми Microcal Origin (Version: 5,0) з використанням критерію Стюдента t .

Результати й обговорення

Одержані результати досліджень наведено на рисунках 1–3. Однак, перед тим, як перейти до оцінки результатів, слід нагадати, що завдяки аналізу стану окиснення жирних кислот (ЖК) [1] у гепатоцитах і рівня активності ключових ензимів у мітохондріях можна стверджувати, що матрикс їх знаходиться у вигляді гелеподібної фази тонкої структури із вмістом близько 50 % білків. На неї суттєво впливають зміни конформації внутрішньої мембрани, що відбуваються під час дихання. Матрикс містить рибосоми, ензими ЦТК, а також ензими, які каталізують окиснення ЖК у β -положенні, синтез порфобіліногену та беруть участь у біосинтезі білків, РНК, ДНК. Серед них функціонує CS, що належить до регуляторних ензимів. Цитратсинтазу інгібують АТФ (кінцевий продукт, у вигляді якого запасється енергія, вивільнена в процесі дихання) та НАД (кінцевий продукт реакції циклу, що пов'язаний із дегідруванням) [6, 10, 11].

До наведеного слід додати, що маркером для виявлення стану внутрішньої мембрани мітохондрій є ензим цитохром-с-оксидаза, яка має 162 кДа і > 10 субодиниць. Серед його простетичних груп є гем а, гем а₃, Cu_A , Cu_B . Безпосередньо у міжмембранному просторі, на внутрішній мембрані мітохондрій розміщений сайт зв'язування ензиму (cytC). Поряд з цим відомо [6], що

O₂ і цитохром-с-оксидаза є кінцевим пунктом постачання електронів, які надходять від окиснення поживних речовин. Паралельно й узгоджено з цим процесом СОХ також спрямовує транспорт протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану. Вказані

важливі функції виконує вищезгаданий трансмембранний протеїновий комплекс, у який входить більше 10 субодиниць. Звідси цей ензимний комплекс забезпечує кінцеву стадію біологічного окиснення, тобто відновлення електронами молекулярного кисню.

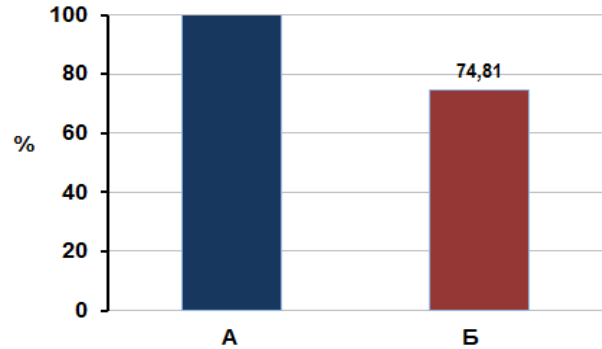
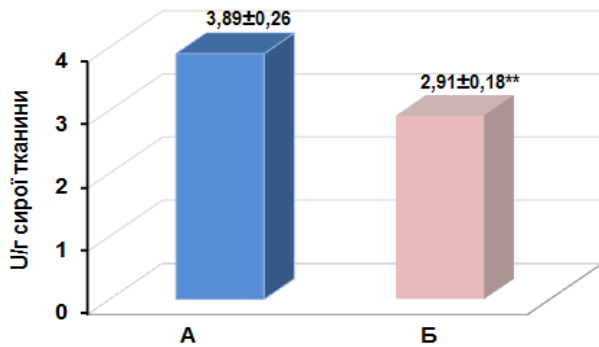


Рис. 1. Активність цитрат-синтази (U/г сирової тканини; %) у клітинах печінки нормальних (А) новонароджених телят та з розладами травної системи (Б), ** — $P < 0,01$ ($M \pm m$; $n=5$)

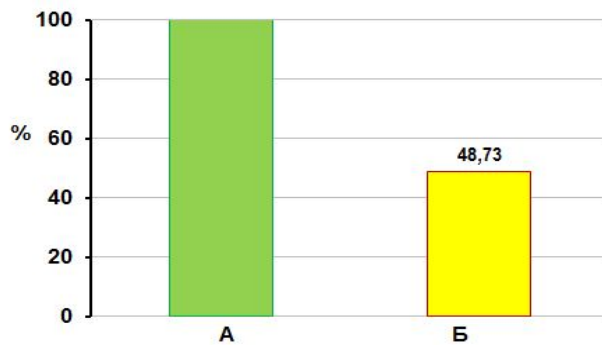
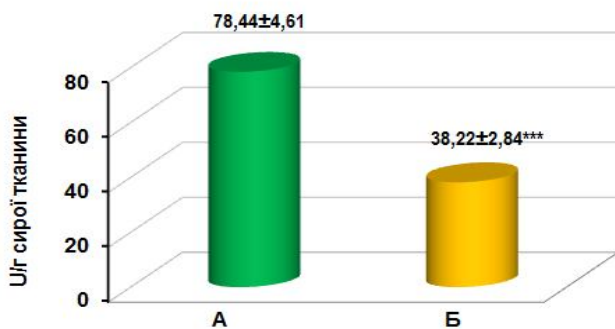


Рис. 2. Активність цитохром-с-оксидази (U/г сирової тканини; %) у клітинах печінки нормальних (А) новонароджених телят та з розладами травної системи (Б), *** — $P < 0,001$ ($M \pm m$; $n=5$)

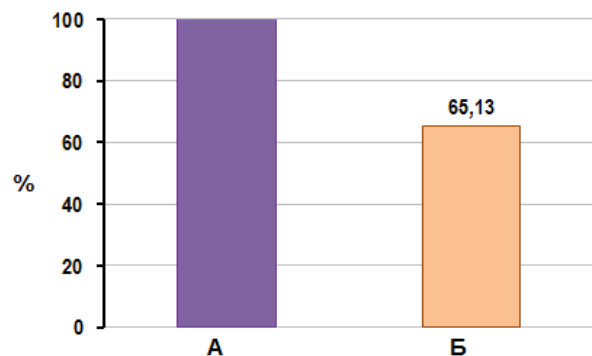
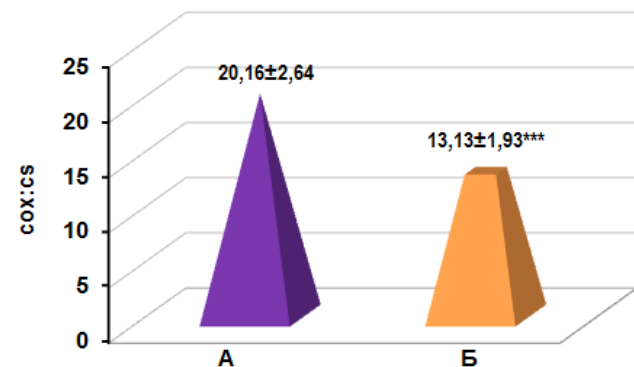


Рис. 3. Співвідношення рівнів активності цитохром-с-оксидази (COX) і цитратсинтази (CS, од. акт; %) у клітинах печінки нормальних (А) новонароджених телят та з розладами травної системи (Б), *** — $P < 0,001$ ($M \pm m$; $n=5$)

Дані рисунків 1 і 2 дають підстави вважати, що в разі розладів травної системи у клітинах печінки вірогідно знижується активність обох ключових

ензимів ($P < 0,01-0,001$) і, зокрема їхнє співвідношення (рис. 3; $P < 0,001$). Такі зміни вказують, що у клітинах відбувається суттєве інгібування реакцій

ЦТК вже на початкових етапах його функціонування, а точніше під час конденсації ацетил-КоА із оксалоацетатом, що призводить до зниження продукування циклом цитрату. Саме на цьому етапі сповільнюється приєднання метильної групи ацетил-КоА із подальшим зниженням гідролізу тіоефірного зв'язку і утворення вільного КоА-SH. А оскільки за умов норми гідроліз високоенергетичного тіоефірного зв'язку завжди пов'язаний зі значним зменшенням стандартної вільної енергії ($\Delta G = -7,7$ ккал), то за умов розладів травної системи цей процес, можливо, спрямований у протилежний бік [1, 6].

Поряд з наведеним слід зазначити, що цитратсинтаза здатна каталізувати утворення монофторцитрату із монофторацетил-КоА. Фторцитрат вважається потенційним інгібітором аконітази, що каталізує наступну реакцію циклу трикарбонових кислот. Це дає підстави вважати, що порушення, які сталися з першою реакцією ЦТК у результаті зниження надходження необхідних субстратів (в тому числі із-за значної блокади β -окиснення та інших перетворень ЖК), про що повідомлялось раніше [1]. Звідси за умов розладів травної системи, можливо, гальмуються і всі наступні реакції ЦТК, у тому числі й транспорт протонів через внутрішню мембрану мітохондрій. Це узгоджується також із тими змінами метаболічних процесів у клітинах печінки, що наведені у роботах [1–5] та з даними активності СОХ (рис. 2). Очевидно, за розладів процесів травлення цей ензим функціонує тільки за рахунок використання наявних резервів у клітині та в її органелах, а не від надходження із шлунково-кишкового тракту (ШКТ) й крові. Прямим відображенням такого стану можна вважати співвідношення $\text{COX}:\text{CS}$, що наведено на рисунку 3.

Загалом, наведені у цій роботі та інших джерелах літератури дані [1, 6, 10, 11] дають підстави вважати, що за розладів травної системи у новонароджених телят

виявляються глибокі порушення метаболічних процесів у клітинах печінки і, зокрема на рівні функціонування мітохондрій. Це підтверджується вірогідним інгібуванням активності ключових ензимів, від яких суттєво залежить весь каскад перетворень, що проходить через ЦТК (активність CS) і дихальний ланцюг (активність СОХ). Активність досліджуваних ензимів знаходиться у прямій залежності від обсягів окиснення всіх поживних речовин, у тому числі глюкози і ЖК, та від цілісності внутрішніх і зовнішніх мембран мітохондрій і багатьох важливих компартментів клітини, включаючи їхні постійні взаємозв'язки з інтермедіарним й загальним обміном речовин організму.

Висновки

1. За розладу травної системи аліментарної природи у клітинах печінки новонароджених телят вірогідно знижується активність цитратсинтази, що каталізує початкову стадію реакцій циклу трикарбонових кислот, а, отже, швидкість та обсяги катаболізму і синтезу в ньому багатьох важливих сполук.

2. Порушення процесів травлення також вірогідно понижує активність цитохром-с-оксидази, тобто інгібує кінцеву стадію біологічного окиснення-відновлення електронами молекулярного кисню.

3. Виявлені зміни пов'язуються з структурно-функціональними порушеннями мембран мітохондрій й інших компартментів клітин печінки через нестачу надходжень поживних речовин із шлунково-кишкового тракту та інгібування, передусім, багатьох основних ланок внутрішньоклітинного метаболізму.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно продовжити дослідження у напрямку вивчення екзогенного впливу біологічно активних речовин з протекторними й

відновлюваними властивостями за умов порушень травної системи у неонатальних телят.

1. Kalachnyuk L., Melnychuk D., Kalachnyuk G. Aktyvnist mitokhondrialnykh enzymiv u razi porushen' lipidnoho metabolizmu v hepatotsytakh [Activity of mitochondrial enzymes under condition of lipid metabolism breach in hepatocytes] *Visnyk Lvivskoho universytetu, Seriya biologichna — Visnyk of the Lviv University, Series Biology*, 2005, Issue 39, pp. 40–46 (in Ukrainian).

2. Kalachnyuk L. G., Basarab I. M., Melnychuk D. O., Melnychuk S. D., Kalachnyuk M. S., Koshman O. V., Kalachnyuk G. I. Molekuliarni izoformy ta aktyvnist laktatdehidrogenazy u substrukturakh klityny za diii ekzohennykh faktoriv. [Molecular isoforms and activity of lactate dehydrogenase in substructures of cell under effect of exogenous factors]. *Biologia tvaryn — The Animal Biology*, 2011, vol. 13, no 1–2, pp. 103–108 (in Ukrainian).

3. Kalachnyuk M. S., Basarab I. M., Kalachnyuk L. G., Melnychuk D. O., Melnychuk S. D., Kalachnyuk G. I. Rol kintsevoi reaktsii anaerobnoho glikolizu v molekuliarnykh mekaniizmakh rehuliatcii obminnykh protsesiv u hepatotsytakh neonatal'nykh teliat za diareii [Role of the final reaction of anaerobic glycolysis in molecular mechanisms of regulation of metabolic processes in hepatocytes in the neonatal calves under conditions of diarrhea]. *Biologia tvaryn — The Animal Biology*, 2012, vol. 14, no 1–2, pp. 121–127 (in Ukrainian).

4. Kalachnyuk L. G., Basarab I. M., Melnychuk D. O., Melnychuk S. D., Kalachnyuk M. S., Koshman O. V., Kalachnyuk G. I. Okysnennia laktatu ta lokalizatsiia LDH u substrukturakh klityny za umov diii ekzohennykh faktoriv. [Oxidation of lactate and LDH localization in the substructures of cell under effect of exogenous factors]. *Naukovy visnyk LNUVMtaBT im. S.Z. Gzhytskoho — Scientific*

Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj, 2011, vol. 13, no 4(50), part 2, pp. 80–86 (in Ukrainian).

5. Kalachnyuk L. G., Basarab I. M., Melnychuk D. O., Melnychuk S. D., Kalachnyuk M. S., Kalachnyuk G. I. Izozym LDH₅(M₄ – γ₂) — kluchovyy molekuliarnyy marker poshkodzhen' substruktur hepatotsytiv u novonarodzhenykh teliat za alimentarnoi diareii. [LDH₅ (M₄ – γ₂) isozyme — key molecular marker of hepatocytes damages in the newborn calves under conditions of alimentary diarrhea]. *Naukovy visnyk LNUVMtaBT im. S. Z. Gzhytskoho — Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj*, 2012, vol. 14, no 2 (52), part 2, pp. 39–44 (in Ukrainian).

6. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. *Biochemistry*, New York, W H Freeman Publ., 2002. 1515 p.

7. Shepherd D., Garland P. B. Citrate synthase from rat liver. *Meth. Enzymol.*, 1969, vol. 13, pp. 11–13.

8. Smith L., Conrade H. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome-c by cytochrome-c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, vol. 63, pp. 403–413.

9. Lowry O. H., Rosenbroudh N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.

10. Ferguson-Miller S., Hiser C., Liu J. Gating and Regulation of the Cytochrome c Oxidase Proton Pump. *Biochim Biophys Acta*, 2012, vol. 1817(4), pp. 489–494.

11. Hüttemanna M., Lee I., Grossmana L. I., Doana J. W., Sandersonb T. H. Chapter X. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol.*, 2012, vol. 748, pp. 237–264.