

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА: ДЕСЯТЬ ЛЕТ СПУСТЯ

### Обзор

© 2015 А.Ю. Андреев<sup>1\*</sup>, Ю.Е. Кушнарева<sup>2</sup>, А.Н. Мерфи<sup>1</sup>,  
А.А. Старков<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, MC 0601,  
La Jolla, CA 92093-0601; E-mail: alex\_andreyev@mitoexperts.com

<sup>2</sup> La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 Athena Circle,  
La Jolla, CA 92037

<sup>3</sup> Cornell University, Weill Medical College, Brain and Mind Research  
Institute, 407 East 61<sup>st</sup> Street, 5th floor, New York, NY 10065;  
E-mail: ans2024@med.cornell.edu

Поступила в редакцию 01.02.15  
После доработки 08.02.15

Роль митохондрий в окислительном стрессе является общепризнанной, но многие вопросы все еще остаются без ответа. Цель данного обзора — описание прогресса в понимании митохондриального метаболизма активных форм кислорода (АФК) за последние 10 лет. Обсуждаются наиболее важные публикации, описывающие новые (или заново изученные) источники АФК в митохондриях, такие как сукцинатдегидрогеназа, дигидрооротатдегидрогеназа, белок р66<sup>shc</sup>, и недавно открытые свойства митохондриальной антиоксидантной системы. Обсуждаются основные противоречия, спорные и ложные концепции, осложняющие исследование митохондриального метаболизма АФК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондрии, активные формы кислорода, р66<sup>shc</sup>, сукцинатдегидрогеназа, дигидрооротатдегидрогеназа, детоксификация активных форм кислорода, окислительный стресс.

Использование окислительного фосфорилирования для получения энергии из питательных веществ является очень эффективным, но и потенциально опасным биохимическим механизмом. Миллиарды лет назад наши далекие предки позволили проникнуть в свои клетки захватчикам — существам с двойной мембраной, собственным геномом, аппаратом для трансляции и транскрипции, которые теперь известны

нам как митохондрии (см. недавний обзор теории эндосимбиоза [1]). Кто они — враги или друзья? Мы до сих пор ищем ответ на этот вопрос. Иногда они — убийцы, хотя и приносящие благо, с хирургической точностью уничтожая клетки в процессе апоптоза [2–5]. Они подарили клеткам способность синтезировать 36 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы (против двух молекул АТФ, производимых в гликолизе), но явились с арсеналом весьма опасных инструментов. Для достижения столь высокой эффективности митохондрии заставляют питательные вещества высвобождать энергию, условно говоря, по шагам — производя молекулу АТФ на каждом шаге. Отсюда наличие длинной цепи редокс-переносчиков для поэтапного транспорта восстанавливающих эквивалентов (т.е. электронов) с питательных веществ на кислород. Тот факт, что редокс-переносчики принимают на себя электрон для его последующей передачи, превращает их, по сути, в свободные радикалы, высокореакционные, как все свободные радикалы. Железосерные кластеры, семихинонные формы кофермента Q и флавина — для всех этих

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, SOD — супероксиддисмутаза 1, MnSOD — марганец-содержащая супероксиддисмутаза 2, ДЛД — дигидролипоамиддегидрогеназа, ДГО — дигидрооротат, ДГО ДГ — дигидрооротатдегидрогеназа, ХрП — пероксидаза хрена, ДХФ — дихлорофлуоресцин, р66<sup>shc</sup> — белок р66<sup>shc</sup>, НКЭ — насыщенный каломельный электрод, ЭР — эндоплазматический ретикулум, ДХФ-ДА — дихлорофлуоресцина диацетат, TRx2 — тиоредоксинредуктаза 2, GPx — глутатионпероксидаза, Prx — пероксиредоксин, ГКФИ — генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы, GSH — глутатион, GSSG — дисульфид глутатиона (продукт окисления глутатиона); ТТФА — теноилтрифтороацетон (TTFA, thenoyltrifluoroacetone, 4,4,4-trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione).

\* Адресат для корреспонденции.

компонентов вопрос состоит не в том, «а что, если», а скорее «как быстро» они примут участие в побочных реакциях с образованием повреждающих клетки продуктов (т.е. как быстро они реагируют с молекулярным кислородом, образуя радикал супероксида). Таким образом, генерация активных форм кислорода (АФК) — это неизбежное зло, имманентное свойство окислительного фосфорилирования — цена, которую мы платим за энергетическую эффективность.

В то же время митохондрии доблестно противостоят этому злу, выстроив лучшую защиту, разработанную эволюцией против наиболее смертоносного оружия живой природы. Являясь источником АФК, они одновременно имеют мощную антиоксидантную систему, обезвреживающую как собственные, так и внешние АФК. Несмотря на достигнутые успехи в понимании этой системы, многие вопросы остаются нерешенными.

В данном обзоре мы попытались осветить прогресс, достигнутый в понимании митохондриального метаболизма АФК за последние 10 лет. Не претендуя на всеохватность, мы обсуждаем публикации, описывающие новые источники АФК в митохондриях, а также недавно открытые свойства митохондриальной антиоксидантной системы. Читатель, ищущий сведения о более ранних исследованиях в данной области, может обратиться к нашему предыдущему обзору [6] и обзорам других исследователей [7–14], которые охватывают практически все аспекты метаболизма АФК в митохондриях, а также новые методики его изучения и подходы к его модификации. Нужно понимать, что многие проблемы в данной области не разрешены адекватно из-за отсутствия необходимых технологий или из-за неточностей в интерпретации экспериментальных данных. Мы попытались критически осмыслить некоторые из противоречий, диспутов и концепций, существующих в настоящее время в данной области исследований.

### **ПРОДУКЦИЯ АФК В МИТОХОНДРИЯХ**

**Химический подход к метаболизму АФК в митохондриях.** Реакции, генерирующие и метаболизирующие АФК [6, 15], взаимно переплетенные с основными процессами катаболизма, формируют сложную систему процессов, которая характеризуется многообразием и непредсказуемостью ответов на возмущения. Однако с точки зрения химии эти реакции не так уж и сложны. Базовый иницирующий шаг в продукции АФК — одноэлектронное восстановление

кислорода — вероятнее всего является простой бимолекулярной элементарной реакцией и подчиняется закону действующих масс, согласно которому скорость химической реакции пропорциональна концентрациям взаимодействующих веществ (см., однако, обсуждение возможных центров связывания кислорода ниже). По-видимому, данная реакция является лимитирующей стадией всего каскада реакций, т.к. несмотря на высокие скорости образования, ни один из последующих интермедиатов не накапливается в сколь-нибудь значительных количествах. Таким образом, кинетика первой реакции определяет все последующие процессы.

Химический подход позволяет решить некоторые из интенсивно обсуждаемых вопросов, например, о количественном соотношении между скоростями дыхания и продукции АФК. Ответ на этот вопрос: скорости этих двух процессов достаточно независимы друг от друга. В соответствии с законом действующих масс скорость реакции определяется концентрацией реагирующего вещества, а не скоростью другой реакции. При генерации АФК, когда одним из реагентов является восстановленная форма АФК-генерирующего центра, а другим — кислород, скорость реакции пропорциональна концентрации этой восстановленной формы (допуская, что концентрация кислорода постоянна). Повышение уровня восстановленности центра может являться следствием воздействия ряда факторов, которые или стимулируют дыхание (как, например, поступление дыхательного субстрата), или угнетают его (переключение митохондрий из активного состояния в состояние покоя или ингибирование транспорта электронов от генерирующего центра к последующим переносчикам). И наоборот, пониженный уровень восстановленности центра может быть вызван факторами как усиливающими дыхание (например, разобщением), так и подавляющими его (например, ингибированием поступления субстрата). Соответственно, продукция АФК и дыхание могут изменяться в одном и том же или противоположных направлениях в зависимости от редокс-состояния генерирующего центра.

**Существуют ли места связывания кислорода в центрах продукции АФК?** Этот кажущийся теоретическим вопрос может иметь важное терапевтическое значение. Существование высокоаффинных сайтов связывания кислорода в АФК-генерирующих центрах позволило бы картировать эти центры и разработать фармакологические препараты для избирательного ингибирования продукции АФК без нарушения нормального функционирования белков. Боверис и Чанс пришли к заключению, что в широком диа-

пазоне условий скорость генерации АФК митохондриями сердца и печени не достигает насыщения даже при гипербарических уровнях кислорода [16], что исключает участие специальных мест связывания кислорода в этих реакциях (однако возможное связывание кислорода с очень низким сродством ( $K_m \approx 0,7-0,8$  атм  $O_2$ , эквивалент  $\approx 900$  мкМ) было замечено при генерации АФК, индуцированной антимицином А) [16]. Данное заключение было недавно подтверждено для генерации АФК, опосредованной комплексом I и дигидролипоамиддегидрогеназой (ДЛД) [17–19]. С другой стороны, в работах Пола Брукса с соавт. сообщается, что практически любая известная модель продукции АФК может быть описана кинетикой типа Михаэлиса–Ментон со значениями  $K_m$  в микромолярном диапазоне (0,2–5 мкМ) [20, 21]. К сожалению, противоречия между этими данными и результатами работы Бовериса и Чанса не были объяснены, так что мы можем только констатировать, что данный вопрос остается нерешенным.

**Является ли супероксид первичной формой АФК?** Проблема наличия мест связывания кислорода непосредственно связана с другим важным механистическим вопросом – что является иницирующим шагом в продукции АФК? Таким процессом в основном считается одноэлектронное восстановление кислорода до супероксида. Однако для описания некоторых АФК-генерирующих процессов (например, с участием моноаминоксидазы и дигидрооротатдегидрогеназы – ДГО ДГ) была предложена модель непосредственного образования перекиси водорода (двухэлектронная реакция). На самом деле, трудно представить возможность переноса двух электронов с одноэлектронного носителя (железосерного кластера или семихинона) при случайном столкновении. Т.е. кислород должен оставаться связанным в центре генерации АФК в течение времени, достаточного для того, чтобы донор электрона смог передать первый электрон, а затем получить и передать второй электрон до высвобождения продукта, в данном случае – перекиси водорода.

Основной сложностью в различении реакций образования супероксида и перекиси водорода является высокая реактивность супероксида, который быстро дисмутирует в результате неферментативной или катализируемой супероксиддисмутазой (SOD) реакций. Эти реакции также ведут к появлению перекиси водорода, но опосредованно, а не напрямую. Прямые количественные измерения супероксида затруднены и требуют специальных систем детекции, способных эффективно конкурировать с процессом дисмутации.

Детальные исследования продукции АФК очищенным комплексом I показали, что и супероксид, и (в меньшей степени)  $H_2O_2$  могут образовываться в отсутствие природного акцептора электронов кофермента Q (убихинона). При насыщающих концентрациях способного к реакции с супероксидом ацетилированного цитохрома с остаточная генерация перекиси водорода составляет  $\sim 10\%$  от общей продукции, что представляется вкладом прямого образования перекиси [18].

Относительный вклад  $H_2O_2$  и супероксида в генерацию АФК связанным с мембраной комплексом I был исследован Гривенниковой и Виноградовой с использованием более интактной системы – субмитохондриальных частиц (вывернутых наизнанку фрагментов митохондриальной мембраны). Они показали, что образование супероксида и  $H_2O_2$  является двумя отдельными процессами с различной кинетикой и редокс-свойствами. Оптимальная концентрация NADH для образования супероксида варьировала в диапазоне 10–50 мкМ; ее повышение до миллимолярного уровня существенно ингибировало генерацию супероксида. Наоборот, непосредственное образование  $H_2O_2$  было относительно нечувствительно к высоким концентрациям, но практически отсутствовало при низких ( $< 3$  мкМ) концентрациях NADH. Основываясь на разнице в зависимости продукции супероксида и перекиси водорода от редокс-потенциала среды (зафиксированного концентрациями пары  $NAD^+/NADH$ ), авторы предположили, что супероксид и перекись водорода образуются на двух разных сайтах в составе комплекса I [22]. По-видимому, в отличие от экспериментов с изолированным белковым комплексом [18] относительный вклад супероксида в продукцию АФК мембранносвязанным комплексом I может не превышать 1/3 (или даже быть меньше при физиологически значимых миллимолярных концентрациях NADH [22]). Точность данных оценок, однако, будет зависеть от подтверждения полноты реакции при определении супероксида методами, использованными в этих исследованиях [18, 22].

Определение природы первичных АФК, генерируемых митохондриями, и их относительного вклада могут иметь столь же большое значение, как и идентификация АФК-генерирующих сайтов. С точки зрения терапевтического применения полученных данных, если перекись водорода действительно является основной формой АФК, непосредственно генерируемой митохондриями, эффективность миметиков SOD в борьбе с окислительным стрессом будет весьма ограниченной, а разработка миметиков каталазы окажется более перспективной.

**Являются ли митохондрии основным источником АФК?** Принято считать, что митохондрии являются одним из основных, если не главным, источником окислительного стресса в клетках. Такие представления были критически проанализированы в подробном обзоре Брауна и Бору-гайте [23], которые пришли к заключению, что в тканях печени митохондрии хоть и играют значительную роль в генерации АФК, но не являются их основным источником, и имеющихся данных недостаточно для однозначного утверждения о доле участия митохондрий в продукции АФК в других типах клеток и тканях. Необходимо отметить, что максимально достижимые скорости продукции АФК могут быть неадекватным параметром для подобной оценки. В отличие от индуцируемых источников АФК (например, ферментов семейства NADPH-оксидаз) продукция АФК в митохондриях является побочным процессом базового метаболизма клетки, который не может быть замедлен без нарушения других клеточных функций. Мы считаем, что не максимальная способность к продукции АФК, а постоянный характер этой продукции потенциально превращает митохондрии в один из важнейших источников эндогенных АФК в клетках.

Тот факт, что митохондрии могут функционировать как утилизаторы АФК, а не генераторы [15, 24], не полностью предотвращает негативный эффект АФК, производимых митохондриями. Механизмы утилизации АФК начинают работать при условии присутствия ненулевых концентраций АФК в клетке. В свою очередь, присутствие АФК в ненулевых концентрациях индуцирует спектр повреждающих клетку реакций. Более того, независимо от способности клетки к удалению АФК, любое повышение их продукции приведет к возрастанию концентраций АФК и степени повреждения клетки, если только не будет сопровождаться соответствующей активацией систем утилизации АФК.

Следует отметить, что, хотя продукция АФК митохондриями часто изучается в нефизиологических условиях (например, в присутствии ингибиторов), использование таких условий является просто экспериментальным подходом для усиления изучаемых ответов с целью исследования механизмов. После того, как природа механизма ясна, мы можем предсказать поведение системы в физиологических условиях, даже когда прямое измерение продукции АФК затруднено или невозможно. Например, из-за их резко отрицательного стандартного редокс-потенциала максимальная активность проксимальных центров продукции АФК (комплекс I, дигидро-липоамиддегидрогеназа) требует гипервосста-

новленного состояния митохондрий. Однако редокс-потенциал этих центров подчиняется закону Нернста. Это значит, что их редокс-состояние может только асимптотически приближаться к полному окислению, но никогда его не достигнет. Другими словами, данные центры способны в определенной степени генерировать АФК в физиологических, достаточно окисленных условиях. Такая активность находится на пределе обнаружения существующими методами, но может быть рассчитана исходя из редокс-характеристик этих центров. Кроме того, продукция АФК проксимальными центрами может быть дополнительно активирована в патофизиологических условиях. Недавнее исследование, проведенное в группе Майкла Мерфи, продемонстрировало, что генерация АФК, обусловленная обратным переносом электронов с сукцината на NADH, — один из классических случаев активации проксимальных центров, значительно повышается *in vivo* в условиях реперфузионного синдрома [25].

Мы можем вполне уверенно исключить возможность того, что продукция АФК в этих центрах является артефактом применения ингибиторов, которые «искажают» нормальную структуру переносчиков и вызывают «утечку» электронов на кислород. Прежде всего, продукция АФК может быть активирована в отсутствие ингибиторов путем перевода митохондрий в состояние 4, удалением цитохрома *c* [26] или, в случае выделенного фермента, удалением кофермента Q [18]. Кроме того, продукция АФК в проксимальных центрах может индуцироваться не только ингибиторами комплекса I, но и ингибиторами комплекса III (стигмателлином, миксотиазолом и антимицином А). Также концентрационная зависимость стимуляции продукции АФК роте-ноном в комплексе I сильно отличается от таковой для ингибирования дыхания (отражающей связывание ингибитора с белком) — ~90%-ное ингибирование комплекса I индуцирует всего лишь 10% продукции АФК (от уровня максимальной продукции) [26].

**О роли дыхательных комплексов I и III.** Бытует мнение, что комплексы I и III (рис. 1) вносят основной вклад в генерацию АФК. Однако привязка реакций генерации АФК к специфическим центрам в интактных митохондриях остается неоднозначной. Источником АФК, «генерируемых комплексом I», может быть не только непосредственно комплекс I, но и ряд NAD<sup>+</sup>-зависимых оксидоредуктаз в митохондриальном матриксе. Например, способность к значительной генерации АФК была убедительно продемонстрирована в нескольких лабораториях для ДЛД, входящей в состав  $\alpha$ -кетоглутаратдегидро-

геназного и пируватдегидрогеназного комплексов [27–34]. Для полной активации эти центры требуют сильно отрицательного редокс-потенциала, поэтому мы предпочитаем называть такой тип активности продукцией АФК, обусловленной гипервосстановленностью.

В некоторой степени эту неопределенность разрешают недавние исследования, убедительно доказывающие наличие мощного центра генерации АФК непосредственно в комплексе I. Было показано, что редокс-характеристики центра, производящего АФК как в выделенном ферменте [18], так и в мембранно-связанном ферменте субмитохондриальных частиц [22], сходны с параметрами центра, ранее охарактеризованного в интактных митохондриях [26]. Продукция АФК этим сайтом как при прямом, так и при обратном переносе электронов также была подтверждена [35, 36]. Обнаружение сходной активности в экспериментальных системах разной степени сложности рассеивает опасения артефактной активности, обусловленной использованием выделенного фермента, с одной стороны, и неопределенность локализации центра – с другой.

Несмотря на попытки создания объединяющей концепции [35] или консенсусной модели [37], научное сообщество до сих пор не пришло к согласию о природе центров генерации АФК в комплексе I. Мы считаем, что точкой опоры при анализе должны быть свойства центра генерации АФК в интактных митохондриях [26], как находящегося в условиях, наиболее приближенных к естественным. Анализ опубликованных данных привел нас к следующим заключениям.

Во-первых, флавосемихинон-радикал следовало бы исключить из рассмотрения, т.к. ни в одном из исследований [18, 22, 26, 35, 36] не наблюдалась характерная для него колоколообразная зависимость от фактического редокс-потенциала (рис. 1 в работе Следь с соавт. [38]).

Во-вторых, железосерный кластер N2 также следовало бы исключить из кандидатов из-за высокого потенциала полувосстановления (между  $-20$  мВ [39] и  $-50$  до  $-150$  мВ [40]). При таких значениях редокс-потенциала центр, идентифицированный в интактных митохондриях [26], мог бы генерировать менее 0,01% от максимальной наблюдаемой продукции АФК. Аналогично, этот потенциал не согласуется с редокс-свойствами изолированного [18] или мембранно-связанного [22] фермента. Кроме того, увеличение продукции АФК сопровождается сдвигом в сторону окисленного состояния сайта [37].

В-третьих, восстановленный флаavin [18, 35] обладает подходящим потенциалом полувосста-

новления, но является двухэлектронным переносчиком, что противоречит значению  $n = 1,18$ , полученному для интактных митохондрий [26]. Однако наклоны кривых редокс-титрования, как правило, трудно рассчитать точно [18, 22], поэтому восстановленный флаavin может в итоге оказаться подходящим кандидатом на роль центра генерации АФК.

В-четвертых, железосерные кластеры N-1 остаются наилучшими кандидатами на роль центра, производящего АФК. Ранее этот центр был отождествлен с железосерным кластером N-1a [26], основываясь на исходном описании этого кластера [39]. Однако данный кластер в ряде случаев не обнаруживается в спектрах электронного парамагнитного резонанса, очевидно, из-за еще более отрицательного потенциала полувосстановления, чем предполагалось ранее [40]. С другой стороны, в изолированном комплексе I кластер N-1b восстанавливается в правильном диапазоне редокс-потенциала [18] и, таким образом, может являться альтернативным кандидатом на роль центра генерации АФК.

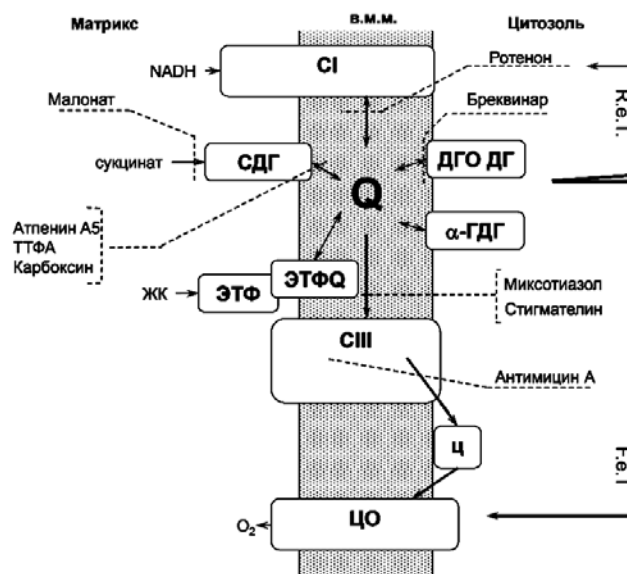
АФК-производящий центр, обычно называемый «центром в комплексе III», на самом деле представляет собой семихинонную форму кофермента Q. Была предложена [41] и широко принята гипотеза, что этот семихинон прочно связывается с так называемым «O»-центром в комплексе III. Напротив, на основании редокс-свойств этого центра мы предположили [6], что генерация АФК осуществляется свободным (или слабо связанным с любым доступным связывающим центром) семихиноном, находящимся в равновесии как с восстановленным, так и окисленным коферментом Q. Кроме того, принимая во внимание сходство структур всех трех редокс-форм хинона, кажется весьма маловероятным, что только одна из них (семихинон) находится в прочно связанном состоянии, в то время как две другие свободно обмениваются. Соответственно, мы предлагаем называть этот центр просто «Q-центром продукции АФК». Зависимость образования семихинона от редокс-потенциала имеет колоколообразную форму; следовательно, активация Q-центра может требовать либо восстановления, либо окисления в зависимости от начального редокс-состояния. Существует множество оксидоредуктаз, переносящих электроны на кофермент Q (комплекс I, сукцинатдегидрогеназа, глицерол – 3-фосфатдегидрогеназа, дигидрооротатдегидрогеназа, электрон-переносящий флавопротеин (ЭПФ), ЭПФ-убихиноноксидоредуктаза и др.). Все эти ферменты могут обладать способностью активировать Q-центр продукции АФК в дополне-

ние (или альтернативно) к их предполагаемой собственной АФК-генерирующей активности. Мы считаем, что изучение изменений редокс-состояния кофермента Q при ингибиторном анализе является необходимым для выявления способности убихинон-зависимых оксидоредуктаз к продукции АФК.

**Сукцинатдегидрогеназа.** Способность сукцинатдегидрогеназы (комплекса II) генерировать АФК интенсивно обсуждалась в прошлом (см. [42] и ссылки в ней). МакЛеннон с соавт. пришли к заключению, что комплекс II может являться значительным источником АФК *in situ* (интактные клетки COS7) и *in vitro* (субмитохондриальные частицы из митохондрий сердца быка). Такой вывод был сделан на основании эффектов антимицина А и ингибиторов комплекса II на генерацию АФК в присутствии сукцината (рис. 1 показывает места действия ингибиторов электронного транспорта, упомянутых в данном обзоре). Предполагалось, что источником АФК является стабилизированный убисемихинон в центре связывания хинона в комплексе II. Образование этого типа убисемихинона в выделенном составном комплексе, содержащем комплексы II и III, парадоксально усиливается антимицином А (ингибитором комплекса III, инициирующем генерацию АФК, обычно приписываемую комплексу III, т.е. в Q-центре – см. выше), но подавляется ингибиторами комплекса II теноилтрифторацетоном и карбоксинами [43]. Соответственно, на основании подавления ингибиторами комплекса II генерации АФК был сделан вывод об участии этого связанного с комплексом II семихинона [42]. Следует отметить, однако, что ингибиторы комплекса II должны подавлять передачу электронов на кофермент Q вне зависимости от того, связан ли он с комплексом II или комплексом III, или нет. Авторы также обсуждали возможность того, что флавин комплекса II участвует в генерации АФК [42]. Однако полученные данные сложно интерпретировать из-за недостатков методики измерений. ДХФ-ДА использовался в отсутствие пероксидазы хрена (ХрП), несмотря на то, что последняя увеличивала наблюдаемую скорость продукции АФК в 7 раз. Следовательно, лимитирующей стадией в процессе измерения являлась пероксидазная активность, а не собственно скорость генерации АФК.

Более тщательное рассмотрение проблемы генерации АФК в комплексе II было проведено недавно группами Бранда [44] и Дрозе [45] в экспериментах с изолированными митохондриями мышц и субмитохондриальными частицами соответственно. В первой из этих работ был оп-

ределен специфический набор условий, в которых комплекс II выделенных митохондрий скелетных мышц крысы генерировал  $H_2O_2$  с высокой скоростью (~1 нмол/мин на 1 мг белка). Данные условия представляли собой комбинацию низких концентраций сукцината (с максимальной генерацией АФК при концентрации сукцината 0,4 мМ) и ингибирования дыхательной цепи в какой-либо точке после комплекса II. Ингибирование достигалось либо ингибиторами комплекса III [44, 45], либо атпенином А5, блокирующим поток электронов с комплекса II в убихиноновый пул [45]. Этот ингибитор проявляет высокую специфичность к комплексу II и является гораздо более сильным ингибитором ( $K_i \sim 0,004$  мкМ), чем ингибиторы, использованные ранее (теноилтрифторацетон, карбоксина). Предполагается, что атпенин А5 связывается с участком, частично перекрывающимся с центром связывания кофермента Q в комплексе II. При этом ингибирование реакции восстановления убихинона может быть 100%-ным, тогда как ингибирование «дегидрогеназной» активности,



**Рис. 1.** Общая схема дыхательной цепи и сайты действия ингибиторов электронного транспорта. в.м.м. – Внутренняя мембрана митохондрий; Re.T. («reverse electron transport») – обратный перенос электронов в дыхательной цепи, Fe.T. («forward electron transport») – перенос электронов в сторону конечного акцептора – кислорода; CI – комплекс I дыхательной цепи митохондрий, СIII – комплекс III дыхательной цепи митохондрий, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ЭТФ – электронпереносящий флавопротеин, ЭТФQ – электронпереносящий флавопротеин:хинонредуктаза, ЦО – цитохром c-оксидаза, ц – цитохром c, ДГО ДГ – дигидрооротатдегидрогеназа, α-ГДГ – α-глицерофосфатдегидрогеназа, ТТФА – теноилтрифторацетон, ЖК – жирные кислоты

измеренной по восстановлению искусственного акцептора, остается частичным даже при концентрации 10 мкМ [46].

Генерация АФК в присутствии ингибиторов комплекса III полностью подавляется малонатом, который конкурирует с сукцинатом за сайт связывания и предотвращает поток электронов в комплекс II [44]. При этом ингибирование атпенином А5 достигает 50% [44], что указывает на существование как минимум двух источников АФК: одного собственно в комплексе II и другого в пуле кофермента Q. Соответственно, ингибитор комплекса III стигмателлин вызывает значительно большую (примерно в 3 раза) сукцинат-зависимую генерацию АФК, чем атпенин А5 [45]. Это отражает значительно больший вклад убихинона в генерацию АФК по сравнению с комплексом II. Таким образом, ингибирующий эффект атпенина А5 в присутствии ингибиторов комплекса III является, по-видимому, суперпозицией значительного подавления генерации АФК в убихиноновом пуле и относительно меньшей стимуляции их генерации в комплексе II. Хотя Кинлан с соавт. и пришли к парадоксальному выводу, что вся сукцинат-зависимая генерация АФК происходит в комплексе II [44], множественность эффектов атпенина А5 делает их логику сомнительной, особенно в свете ингибирования атпенином А5 дегидрогеназной активности [46] комплекса II.

Ингибирование избытком сукцината позволяет предположить, что образование АФК происходит только когда центр связывания сукцината свободен [44]. Этот вывод был подтвержден в исследовании Сибелса и Дрозе [45], которое показало, что генерация АФК снижается всеми известными дикарбоксилатными лигандами центра связывания субстрата в комплексе II. С этим согласуется также неконкурентный по отношению к сукцинату характер ингибирования генерации АФК малонатом [44].

Комплекс II способен к генерации АФК и в обратной реакции, когда электроны поступают на него из восстановленного убихинонового пула [44]. Эта реакция равно чувствительна к малонату и атпенину А5, что указывает на восстановленный флаavin, расположенный вблизи центра связывания сукцината, как основной источник АФК в комплексе II [44].

Образование АФК в комплексе II само по себе не зависит от редокс-состояния убихинонового пула и активности иных участков дыхательной цепи. В этой реакции генерируется ~75%  $H_2O_2$  и 25% супероксида [45]. Однако надежность этой оценки будет зависеть от подтверждения полноты реакции при использованном методе измерения супероксида.

При всей ценности обсуждения тонких деталей механизма образования АФК в комплексе II наиболее важно подчеркнуть, что мощная генерация АФК этим ферментом происходит только в очень ограниченных и близких к взаимоисключающим условиям. Требуется в одно и то же время и большая степень восстановленности переносчиков в комплексе II, достигаемая присутствием ингибиторов, блокирующих перенос электронов далее по цепи, и низкая концентрация субстрата, который собственно и служит источником восстановительных эквивалентов. При исключении ингибиторов генерация АФК комплексом II сильно снижается [44] или вообще прекращается [45]. Также было показано, что в митохондриях, выделенных из сердца, мышц и печени крысы, комплекс II не продуцирует  $H_2O_2$  при «нормальных» условиях инкубации [47].

Таким образом, возникает вопрос, насколько такие жесткие ограничения соответствуют физиологии и метаболизму. Низкие концентрации сукцината являются физиологическими — содержание сукцината в тканях и клетках находится в диапазоне 0,1–0,4 мМ [15]. Сверхвосстановленное состояние комплекса II может достигаться при ишемии тканей, когда доступ кислорода ограничен. Однако при этом происходит значительное накопление сукцината (до 10–15 мМ) [15, 25], которое должно предотвращать генерацию АФК комплексом II. Аналогично, накопление сукцината может происходить при воспалительных процессах [48]. Даже в нормальных условиях в перфузируемом сердце наблюдаются флуктуации концентрации сукцината в несколько раз, в диапазоне 0,3–1 мМ. Сукцинат также аккумулируется в мышцах в условиях физической нагрузки [15]. Кроме того, данный источник АФК чувствителен к другим интермедиатам цикла трикарбоновых кислот, что должно еще более подавлять генерацию [45]. Эти интермедиаты будут также лимитировать поступление электронов в комплекс II, еще более снижая генерацию АФК.

С точки зрения механизма блокирование транспорта электронов по дыхательной цепи, необходимое для активной генерации АФК, создает условия, близкие к состоянию редокс-равновесия. Поэтому термодинамический контроль образования АФК в комплексе II должен играть существенную роль. К сожалению, термодинамические характеристики центра генерации АФК в комплексе II на данный момент отсутствуют, что значительно ограничивает понимание этого процесса.

**Дигидрооротатдегидрогеназа.** Существование центров генерации АФК в митохондриальном ферменте дигидрооротатдегидрогеназе (ДГО ДГ)

является предметом дискуссий на протяжении последних 30 лет. Первое предположение о возможности образования АФК при окислении дигидрооротата (ДГО) митохондриями печени крысы было сделано в 1974 г., исходя из SOD-зависимого ингибирования дегидрогеназной активности в присутствии искусственного акцептора [49]. Изначально генерацию супероксида относили напрямую к некоему центру в самой ДГО ДГ [49, 50], основываясь на факте ингибирования оротатом, продуктом и конкурентным ингибитором ДГО ДГ, но не ингибиторами дыхательной цепи антимицином А или ТТФА. Это предполагает существование центра, альтернативного известным центрам в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [50]. Однако в последующих экспериментах с использованием цитохрома *c* как акцептора [51] ТТФА и антимицин А устраняли эффект SOD. Эти данные были использованы для обоснования тезиса, что генерация супероксида происходит все же в ЭТЦ (преимущественно в комплексе III), а не в ДГО ДГ. Методические ограничения и отсутствие подходящих ингибиторов привели к неоднозначности этих выводов. Тем не менее гипотеза о продукции АФК ДГО ДГ оставалась актуальной и вновь возникла в исследованиях выделенного фермента. Оказалось, что в дополнение к дегидрогеназной ДГО ДГ обладает выраженной «ДГО-оксидазной» активностью, проявляющейся в отсутствие кофермента Q [52]. Было показано напрямую с использованием системы пероксидазы хрена (ХрП) + + дихлорофлуоресцин (ДХФ) (обсуждается ниже), что в данной реакции кислород восстанавливается до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и эта активность составляет ~10% активности ДГО ДГ [52]. Гистохимическая окраска образцов тканей на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> была положительна в присутствии ДГО [53]. Однако оставалось неясным, в какой степени данная активность проявляется в интактной внутренней мембране митохондрий и идентична ли она АФК-генерирующей активности интактных митохондрий.

Недавно Бранд и его коллеги разделили два компонента генерации АФК, связанной с окислением ДГО. Они продемонстрировали ДГО-зависимое образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в митохондриях скелетных мышц, которые характеризуются настолько низким содержанием и активностью ДГО ДГ, что даже зависимое от ДГО дыхание не было зарегистрировано [54].

На основании чувствительности к специфическим ингибиторам малонату и атпенину А5 авторы заключили, что большая часть АФК генерировалась в комплексе II [54]. Скорость образования супероксида/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, отнесенная непосредственно к ДГО ДГ (~20 пмоль/мин на 1 мг белка), составляла менее 10% от общей скорости.

Основываясь на ингибиторном эффекте бреквинара, который блокирует перенос электронов между флавином и центром связывания убихинона в ДГО ДГ, было сделано заключение, что местом генерации АФК является центр связывания убихинона [54]. Однако было показано, что ингибитор ДГО ДГ бреквинар блокирует нормальную дегидрогеназную активность (перенос электронов с ДГО на кофермент Q), но не влияет на генерирующую АФК «ДГО-оксидазную» активность [52], что делает определение источника АФК неоднозначным. Т.к. уровень «ДГО-оксидазной» активности, производящей АФК, зависит от типа ткани [53], вклад АФК, предположительно образующейся в ДГО ДГ, в общую эмиссию АФК митохондриями требует более детального изучения.

Генерация АФК при окислении ДГО, осуществляемая ДГО ДГ непосредственно или опосредованная ее каталитической активностью, может иметь терапевтическое значение при заболеваниях, связанных с нарушениями регуляции апоптоза. Хэйл с соавт. [55] показали, что различные трансформированные клетки, экспрессирующие ДГО ДГ, склонны к апоптозу при обработке фенретинидом – потенциальным антираковым препаратом с прооксидантными свойствами, в то время как клетки с недетектируемой экспрессией ДГО ДГ (например, клетки рака прямой кишки SW480) были устойчивы к цитотоксическому действию этого препарата. Более того, снижение уровня или химическое ингибирование ДГО ДГ в раковых клетках понижало уровни индуцируемой фенретинидом генерации АФК и апоптоза, в то время как эффект на митохондриальное дыхание был незначительным [55].

**p66<sup>shc</sup>**. В последнее десятилетие был обнаружен новый и интригующий потенциальный источник АФК в митохондриях – белок-ускоритель старения p66<sup>shc</sup>. Это первый прецедент, когда источник АФК импортировался бы в митохондрии с последующей активацией. Считается, что этот, обычно цитоплазматический, белок транслоцируется в митохондрии в результате вызываемого окислительным стрессом фосфорилирования протеинкиназой Сβ по остатку Ser36 и распознавания пролилизомеразой Pin1 [56]. Соответственно, активность p66<sup>shc</sup>, производящая АФК, не детектируется в митохондриях из контрольных животных, но индуцируется инъекцией CCl<sub>4</sub> [57]. Мутация Ser36 в аспарагиновую кислоту (Ser36Asp), имитирующая его фосфорилирование, приводит к способности генерировать АФК в интактных митохондриях [58], в отличие от белка дикого типа, который взаимодействует с митопластами, т.е. митохонд-



риями, лишенными внешней мембраны [57]. Активность, ассоциированная с  $\text{p66}^{\text{shc}}$ , сравнима по величине с активностью наиболее мощного классического механизма генерации АФК (Q-центра) и может достигать 10 нмол/мин на 1 мг белка [57].

Исходная работа содержит некоторые данные в пользу того, что в модельных системах  $\text{p66}^{\text{shc}}$  может взаимодействовать с цитохромом *c*, принимать с него электроны и отдавать их на кислород, таким образом, функционируя как центр генерации АФК [57]. Данный сайт обладает достаточно высоким потенциалом полувосстановления  $-35$  мВ [57]. Следует отметить, что это значение получено по отношению к насыщенному каломельному электроду (НКЭ), используемому в качестве электрода сравнения, и потенциал цитохрома *c*, измеренный в том же самом эксперименте, был равен  $+17$  мВ. Учитывая, что принятая величина потенциала полувосстановления НКЭ равна  $+244$  мВ [59], стандартный потенциал полувосстановления  $\text{p66}^{\text{shc}}$  может быть рассчитан как  $+209$  мВ (относительно стандартного водородного электрода, обычно используемого в исследованиях биоэнергетики митохондрий). Этот центр с редокс-потенциалом, намного превосходящим все остальные известные центры, должен быть способен к генерации АФК практически независимо от редокс-состояния митохондрий, задаваемого основными процессами метаболизма, т.е. как в условиях наибольшей восстановленности, так и наибольшей окисленности.

Удивительно, но за 10 лет, прошедших после опубликования статьи, было получено очень мало прямых подтверждений выдвинутой теории, несмотря на тот факт, что исходное исследование оставило много открытых вопросов.

Во-первых, не была убедительно показана необходимая для взаимодействия с цитохромом *c* локализация белка в митохондриальном межмембранном пространстве. Большая часть белка обнаруживается в микросомальной фракции (представляющей в основном эндоплазматический ретикулум – ЭР), и его распределение между фракциями при дифференциальном центрифугировании полностью совпадало с распределением маркера ЭР калнексина [57]. Таким образом, сложно утверждать, что  $\text{p66}^{\text{shc}}$ , обнаруженный в митохондриальных фракциях, находится в митохондриях, а не в примесном ЭР. Увеличение содержания  $\text{p66}^{\text{shc}}$  в митохондриальной фракции при окислительном стрессе [57] может происходить не только в результате транслокации, но и в результате общего повышения уровня белка за счет биосинтеза (очевидного на рис. 4, E в работе Пинтон с соавт. [56])

или усиления взаимодействия ЭР с митохондриями. Не было предпринято попыток очистить митохондриальную фракцию с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Обработка дигитонином, обычно приводящая к освобождению белков межмембранного пространства, практически не дала результатов. С другой стороны, очень быстрый (за десятки секунд) ответ митохондрий с интактной внешней мембраной на добавление мутанта Ser36Asp [58] может указывать на то, что взаимодействующий партнер  $\text{p66}^{\text{shc}}$  находится снаружи митохондрий.

Во-вторых, продукция АФК в митохондриях/митопластах измерялась с использованием дихлорофлуоресцин диацетата (ДХФ-ДА). Данный зонд обычно используется при работе с интактными клетками, а не митохондриями, т.к. его способность реагировать с перекисью водорода критически зависит от двух типов каталитической активности в клетках (см. ниже обсуждение ДХФ). Наблюдавшиеся нетипично нелинейные ответы этого зонда указывают на некоторые проблемы с системой измерения.

В-третьих, остается неясным, какая простетическая группа (если она существует) обеспечивает редокс-свойства  $\text{p66}^{\text{shc}}$ . Это не может быть гем, т.к. его присутствие не проявляется в спектрах поглощения (рис. 3, C в работе Джорджио с соавт. [57]). В последовательности предполагаемого редокс-центра  $\text{p66}^{\text{shc}}$  содержится всего один остаток цистеина (Cys81), что недостаточно для формирования железосерного кластера. Кроме того, высокий редокс-потенциал белка плохо совместим с предположением о реактивности самой тиоловой группы цистеина.

В-четвертых, в предложенной модели утверждается, что  $\text{p66}^{\text{shc}}$  принимает электроны с восстановленного цитохрома *c* и отдает их на кислород. Однако из приведенных в статье данных очевидно, что этот механизм не функционирует, если имеются в наличии только два этих белка, и для его работы дополнительно требуются ионы меди [57]. Ионы меди также необходимы для прохождения реакции в присутствии интактных митохондрий и Ser36Asp мутанта  $\text{p66}^{\text{shc}}$  [58].

В-пятых, в предложенном центре связывания цитохрома *c* больше катионных, чем анионных остатков, и, таким образом, он, скорее всего, является положительно заряженным. Это должно приводить к отталкиванию (а не связыванию) положительно заряженного цитохрома *c* и находится в жестком противоречии с общепринятыми моделями связывания цитохрома *c*, которые базируются на электростатическом взаимодействии положительно заряженной поверхности цитохрома *c* с отрицательно заряженными местами связывания на белке-партнере (см.,

например, [60] и ссылки в ней). Следует отметить, что разница между вольтамперметрическими кривыми для  $\text{p66}^{\text{shc}}$  и его комбинации с цитохромом  $c$  (рис. 3, А и В в работе Джорджио с соавт. [57]) может быть объяснена вытеснением  $\text{p66}^{\text{shc}}$  цитохромом  $c$ , а не связыванием между этими белками. В самом деле, кривая  $\text{p66}^{\text{shc}} + \text{цитохром } c$  весьма схожа с кривой, полученной в присутствии одного цитохрома  $c$ ; маленькая разница в измеряемом редокс-потенциале находится в пределах вариабельности метода (ср. кривые на рис. 3, А и В и рис. 5, А и В в работе Джорджио с соавт. [57]).

С другой стороны, в большом количестве публикаций описываются явления, наблюдаемые *in vivo* и в культурах клеток, которые согласуются с предлагаемым прооксидантным действием  $\text{p66}^{\text{shc}}$  [61, 62]. Роль митохондриального компонента окислительного стресса в общем ответе клетки была оценена с использованием митохондриально-направленных антиоксидантов, так называемых SkQ («хинонов Скулачева»), которые обеспечивали 20–40%-ный защитный эффект [63]. Мы считаем, что это представляет собой предельно возможный вклад митохондрий в окислительный стресс, опосредованный  $\text{p66}^{\text{shc}}$ . Учитывая значительную роль  $\text{p66}^{\text{shc}}$  в контроле продолжительности жизни и восприимчивости к таким болезням, как рак и диабет, представляется важным разрешить остающиеся нерешенными проблемы, связанные с митохондриальными механизмами прооксидантного действия этого белка.

## УДАЛЕНИЕ АФК

За последние десять лет значительный прогресс был достигнут в изучении ферментативной системы защиты от АФК в митохондриях. Компоненты этой системы достаточно хорошо изучены и могут быть разделены на три группы (рис. 2, а). К первой группе относятся ферменты, не нуждающиеся в восстановительных эквивалентах для утилизации АФК, такие как супероксиддисмутаза 2 (Mn-SOD) и каталаза. Компоненты второй группы зависят от тиоредоксина (Trx) и тиоредоксинредуктазы (TRx2) для регенерации после взаимодействия с АФК. Ко второй группе относятся пероксиредоксины 3 и 5 (Prx3 и Prx5), локализованные в митохондриальном матриксе. Активность третьей группы зависит от глутатиона (GSH) и необходимой для его регенерации/восстановления глутатионредуктазы (GR). Данная группа включает в себя глутатионпероксидазу 1 (GPx1), глутатионпероксидазу 4 (GPx4) и глутатиредоксины (не включенные в настоящий обзор и

рис. 2, а) [6, 15]. Активность двух последних групп зависит от NADPH (рис 2, а), который, в свою очередь, регенерируется тремя ферментами митохондриального матрикса — NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназой, NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназой («malic enzyme») и трансгидрогеназой (рис. 2, а) [6, 15]. Неизвестно, какой из этих трех ферментов является основным в регенерации NADPH в митохондриях. Вероятно, вклад индивидуальных ферментов тканеспецифичен и зависит от уровней их экспрессии и особенностей метаболизма конкретных тканей [64]. Фармакологическое ингибирование трансгидрогеназы в выделенных митохондриях мозга (но не печени) крыс значительно снижало их способность к утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии (но не в отсутствие) субстратов дыхания [65]. С другой стороны, мыши, генетически лишённые трансгидрогеназы в результате естественной мутации (линия C57Bl/6J [66, 67]), не проявляют каких-либо признаков окислительного стресса, тем самым уменьшая значимость трансгидрогеназы как источника NADPH. Стоит отметить, что данная линия мышей наиболее часто используется в различных исследованиях для создания трансгенных животных, при этом отсутствие одного из трех митохондриальных ферментов, регенирирующих NADPH, не принимается во внимание.

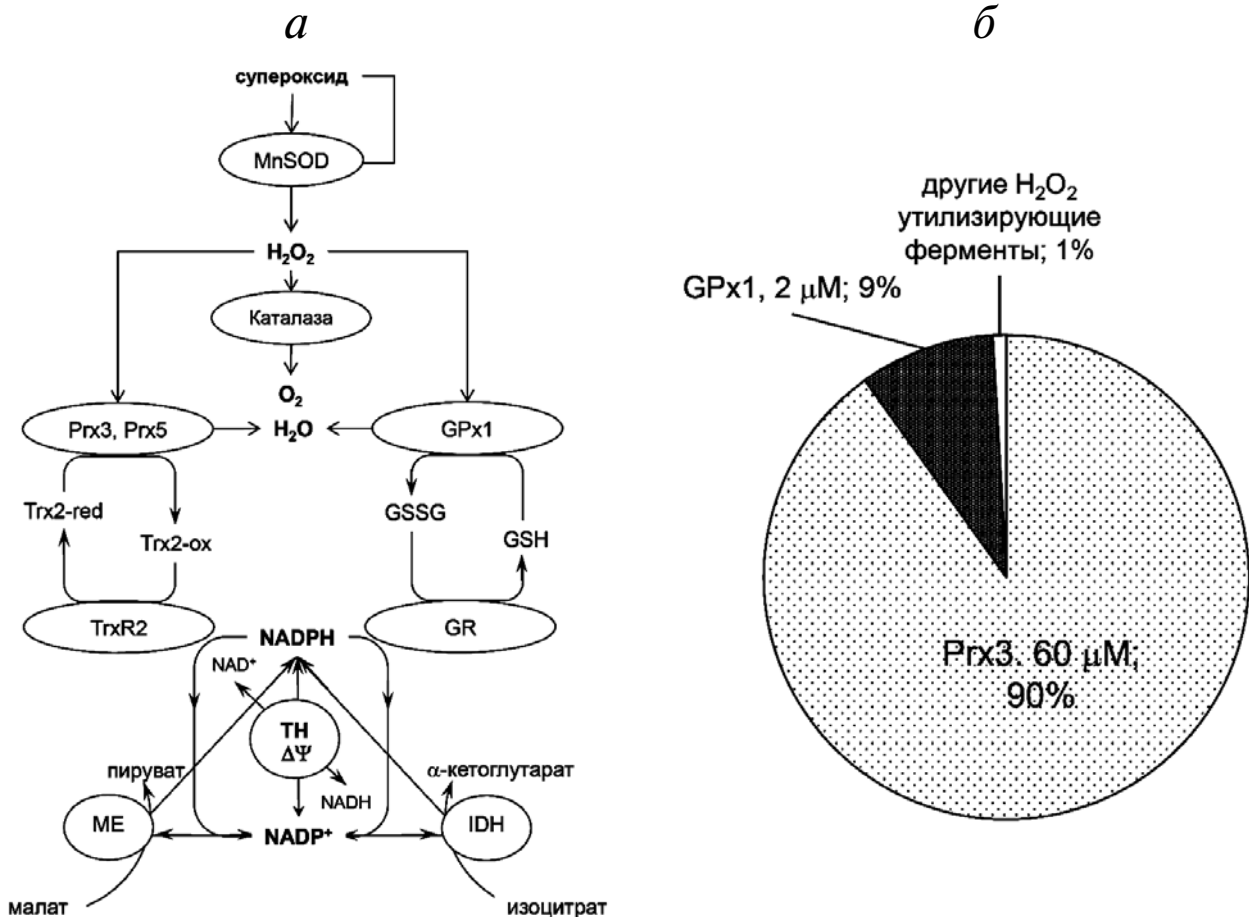
**MnSOD.** Долгое время считалось, что этот фермент осуществляет нерегулируемую дисмутацию супероксида в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Однако было показано, что активность MnSOD модулируется сиртуином SIRT3, также локализованном в митохондриальном матриксе. SIRT3 значительно увеличивает активность MnSOD путем деацетилирования эволюционно консервативного остатка Lys122 [68–70].

**Каталаза.** Наличие незначительных количеств каталазы было продемонстрировано в митохондриях сердца грызунов (~20 ед/мг белка [71]). Кроме того, фермент был найден в матриксе митохондрий печени (~825 ед/мг белка [72]; ~1100 ед/мг белка или 80 мкг/мг белка в митохондриях печени мыши, очищенных в градиенте плотности препарата Перколл, неопубликованные данные — А.А. Старков). Следовые количества каталазы были обнаружены в митохондриях мозга мыши (~1,8 ед/мг или 72 нг/мг митохондрий, очищенных в градиенте плотности [24]). При таком низком уровне сколько-нибудь значительная роль каталазы в утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в митохондриях сердца и мозга маловероятна. Однако в митохондриях печени роль этого фермента может быть значительной [72].

**Глутатионпероксидаза 1 и пероксиредоксины.** Долгое время глутатионпероксидаза 1 (GPx1)

считалась одним из основных ферментов, утилизирующих  $H_2O_2$ , несмотря на расчеты, указывавшие, что только 15% генерированной в митохондриях  $H_2O_2$  удаляется за счет активности этого фермента [73]. Ряд недавних работ подверг серьезным сомнениям важность GPx1 в утилизации  $H_2O_2$  и сдвинул фокус исследований на роль «оксисов» (пероксиредоксинов, тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы) в этом процессе. Митохондрии почти всех тканей млекопитающих содержат два пероксиредоксина (Prx3 и Prx5), тиоредоксин (Trx2) и тиоредоксинредуктазу 2 (TrxR2) (рис. 2, а). Предполагается, что Prx3 является одним из основных ферментов, утилизирующих  $H_2O_2$  [74], т.к. обладает высокой константой скорости реакции с  $H_2O_2$  (сравни-

мой с константой скорости реакции каталазы) и содержится в митохондриальном матриксе в больших количествах (~60 мкМ). Расчеты Кокса с соавт., основанные на известных константах скорости реакций и уровнях белков, показывают, что 99,9%  $H_2O_2$  в митохондриальном матриксе может перерабатываться всего четырьмя ферментами: Prx3 (~60 мкМ, константа скорости  $k = 2 \times 10^7 M^{-1} c^{-1}$ ,  $K_m$  для  $H_2O_2 < 20$  мкМ, 90%), GPx1 (2 мкМ,  $k = 6 \times 10^7 M^{-1} c^{-1}$ , 9%), Prx5 (20 мкМ,  $k = 7 \times 10^7 M^{-1} c^{-1}$ , 0,45%) и глутатионпероксидазой 4 (Gpx4, не показана на рис. 2; 2 мкМ,  $k = 3 \times 10^6 M^{-1} c^{-1}$ , 0,45%) [74]. Типичные 2-цис-пероксиредоксины, такие как Prx3, катализируют двухстадийную реакцию восстановления  $H_2O_2$ . Сначала  $H_2O_2$  реагирует с так назы-



**Рис. 2.** Система утилизации АФК в митохондриях. а – Общая схема ферментативной утилизации АФК в митохондриях; б – вклад индивидуальных ферментов в утилизацию АФК (см. текст). MnSOD – марганец-содержащая супероксиддисмутаза 2; Prx3 – пероксиредоксин 3; Prx5 – пероксиредоксин 5; GPx1 – глутатионпероксидаза 1; GSH – глутатион; GSSG – дисульфид глутатиона (продукт окисления глутатиона); Trx2-red – тиоредоксин 2, восстановленный; Trx2-ox – тиоредоксин 2, окисленный; TrxR2 – тиоредоксинредуктаза 2; TH – трансгидрогеназа; GR – глутатионредуктаза; ME –  $NADP^+$ -зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа («malic enzyme»); IDH – изоцитратдегидрогеназа,  $NADP^+$ -зависимая;  $\Delta\psi$  – мембранный потенциал. Характеристики отдельных ферментов и детальное описание системы представлены ранее [6, 15, 74]

ваемым пероксидазным остатком цистеина в белке с образованием сульфеновой кислоты ( $\text{Cys}_p\text{-SOH}$ ), которая затем вступает в реакцию конденсации с другим («разрешающим») цистеином во второй субъединице белка, формируя внутримолекулярную дисульфидную связь. На второй стадии получившаяся окисленная форма митохондриального Prx восстанавливается до нативного состояния с помощью Trx2, который, в свою очередь, восстанавливается TrxR2 (рис. 2, а). Следует отметить, что константы скорости реакции пероксиредоксинов с Trx2 не были определены [74], но, скорее всего, они значительно ниже, чем для взаимодействия с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Кроме того, Trx2 присутствует в митохондриях в гораздо меньших количествах/концентрациях, чем Prx3 (см. ссылки в работе Кокс с соавт. [74]). Другой важной особенностью Prx3 (но не Prx5) является его высокая чувствительность к окислительной инактивации («гиперокислению») в присутствии избыточных количеств  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Инактивация происходит при окислении  $\text{Cys}_p\text{-SOH}$  второй молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$  до производного сульфеновой кислоты ( $\text{Cys}_p\text{-SO}_2\text{H}$ ), которое каталитически неактивно [74]. Гиперокисленные пероксиредоксины восстанавливаются с помощью АТФ-зависимого сульфоредаксина, но очень медленно ( $k_{\text{кат}} = 0,18 \text{ мин}^{-1}$ ).

Таким образом, свойства митохондриальных пероксиредоксинов не позволяют утверждать с уверенностью, что эти белки способны стабильно утилизировать  $\text{H}_2\text{O}_2$  при значительном и постоянном эндогенном (или экзогенном) образовании  $\text{H}_2\text{O}_2$ , т.е. в условиях, когда скорости регенерации ферментов становятся определяющим фактором [74]. Тем не менее несколько недавних исследований подтверждают, что «оксинны» играют более важную роль, чем GPx1, в утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , генерируемой в митохондриях. Так, группа Патель [75] показала высокие скорости утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$  митохондриями мозга порядка 9–12 нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин на 1 мг белка, что примерно в 100 раз выше, чем максимальная скорость генерации АФК митохондриями мозга, окисляющими  $\text{NAD}^+$ -зависимые (физиологические) субстраты (0,06–0,1 нмоль/мин на 1 мг) [15]. Ингибирование GPx1 не влияет на скорость утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в то время как ингибирование TrxR2 или окисление Prx3 значительно ее снижает (на 80 и 50% соответственно) [75]. Было также показано, что митохондрии, выделенные из мозга трансгенных мышей, лишенных GPx1 [76], утилизуют  $\text{H}_2\text{O}_2$  с той же скоростью, что и митохондрии из мозга мышей дикого типа [15]. Дополнительным аргументом в пользу ограниченного вклада GPx1 в защиту организма от АФК является тот факт, что мыши, лишенные GPx1,

здоровы, способны к размножению, не проявляют повышенной чувствительности к гипероксии и повышенного содержания маркеров окислительного стресса [76]. Таким образом, можно рассматривать митохондриальные «оксинны» в качестве основного механизма утилизации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в то время как GSH-зависимые системы, скорее всего, необходимы для других процессов, например, для предотвращения гиперокисления «оксиннов» или удаления низкомолекулярных органических гидроперекисей (хотя Prx5 также может разлагать такие гидроперекиси и даже более эффективно, чем  $\text{H}_2\text{O}_2$  [77, 78]).

### ЭМИССИЯ АФК МИТОХОНДРИЯМИ. ПРИНЦИП НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ

Понимание того, что митохондрии являются одновременно источниками и утилизаторами АФК, становится практически всеобщим. С другой стороны, стало укореняться упрощенное представление об эмиссии АФК как простой разнице между генерацией АФК и их утилизацией, подразумевающее «вывод» в окружающую среду избежавших утилизации АФК. В действительности АФК удаляются настолько эффективно, что митохондрии функционируют преимущественно как утилизатор, а не источник АФК ([24] и ссылки в ней), и накопления измеримых количеств АФК в интактных изолированных митохондриях не наблюдается [6].

Конечно, кажущаяся эмиссия АФК изолированными митохондриями легко регистрируется с помощью различных зондов (например, Amplex Red в присутствии ХрП и т.п.). Однако важно понимать, что любая эффективная система измерения АФК вносит возмущение в их метаболизм, т.к. сама является по сути «антиоксидантом», активно конкурирующим за субстрат с механизмами утилизации АФК. Это приводит к резко завышенной оценке эмиссии АФК митохондриями. Другими словами, кажущаяся эмиссия АФК почти целиком является артефактом, создаваемым системой измерения. Тем не менее она удобна в практических целях как легко измеримый интегральный показатель — результирующая процессов образования и утилизации АФК. Этот показатель представляет собой количественную и относительную меру различий между различными состояниями одного и того же образца или между различными образцами митохондрий. При этом получаемые значения имеют смысл только при условии постоянства активности измеряющей системы.

С физиологической точки зрения «эмиссия АФК» митохондриями представляет собой ту

часть АФК, которая избежала утилизации и может вызывать повреждение клеточных компонентов. С точки зрения физической химии процессы повреждения клетки – это конкурирующие химические реакции, которые отбирают часть АФК из процессов их утилизации подобно тому, как это делают вышеописанные системы детекции АФК. Проблема в том, что измерить количественно эту часть АФК современными методами невозможно, не изменив ее (см. выше). Это составляет то, что мы предлагаем называть *принципом неопределенности* эмиссии АФК (заимствуя термин из квантовой физики и используя его в схожем смысле). Отметим, что невозможность измерения эмиссии АФК не устраняет возможность раздельного измерения генерации АФК и способности митохондрий (или других органелл) к утилизации АФК (обсуждается ниже).

Химический подход, с другой стороны, предполагает, что измерение стационарного уровня (а не скорости изменений) АФК могло бы быть более адекватной мерой физиологической «эмиссии АФК». Действительно, закон действующих масс говорит о том, что скорость элементарной реакции (включая отдельные стадии в реакциях «повреждения») пропорциональна концентрации реагирующего вещества. Таким образом, знание концентрации АФК позволило бы сделать оценку скоростей повреждающих процессов. Для этого необходимы методы измерения, практически полностью лишенные активностей, утилизирующих АФК. Иначе говоря, эти методы должны быть основаны на обратимом связывании АФК. Идеальный реагент должен иметь низкое сродство к АФК и высокую интенсивность ответа (высокую яркость в случае оптических зондов).

Знания физиологической «эмиссии АФК» самой по себе, однако, недостаточно для идентификации мишеней окислительных повреждений и оценки степени их повреждения. Также не очевидно, достигнут ли порог биологического эффекта. Для этого необходимы измерения вторичных показателей в виде уровней модификации клеточных компонентов и изменений сигнальных процессов и биологических функций в клетке.

Пространственно-временная сложность окислительного стресса в клетках слабо разрешается общепринятыми методами исследования. Генерация АФК происходит в определенных локусах в клетке, а системы измерения нацелены на средние или валовые показатели эмиссии АФК. Определение местоположения источников АФК требует измерительных систем, которые могут быть направлены в различ-

ные внутриклеточные компартменты. Генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы (ГКФИ) соответствуют этим требованиям (обсуждается в следующем разделе).

### ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРЕШЕНИЮ ПРОСТРАНСТВЕННО- ВРЕМЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ $H_2O_2$ *in situ* И *in vivo*

Хотя целью данной статьи является обзор последних достижений в изучении метаболизма АФК в митохондриях, она была бы неполной без хотя бы краткого взгляда на инструментарий исследователя. На сегодняшний день флюорогенные зонды являются основными реагентами для рутинных исследований АФК.

Количественное измерение супероксида весьма затруднительно из-за его быстрого полураспада и компартментализации. Более стабильная и способная к проникновению через мембраны перекись водорода может быть легко измерена с использованием специфического к  $H_2O_2$  фермента ХрП и набора соответствующих флюорогенных субстратов [79]. Необходимо отметить, что оценка продукции АФК в таких измерениях требует внутренней калибровки [80]. Утилизация АФК может быть измерена отдельно [24] или определена по результатам той же самой калибровки. В настоящее время наилучшими зондами для определения  $H_2O_2$ , основанного на реакции, катализируемой ХрП, являются Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксибензол) и его недавно появившееся более стабильное производное Amplex UltraRed [79, 81]. Другим широко используемым зондом для измерения АФК является ДХФ-ДА. Однако его адекватное применение требует особых условий. ДХФ-ДА был изначально разработан Кестоном и Брандтом в 1965 г. как улучшенный субстрат для ХрП, который не реагирует с перекисью водорода в отсутствие фермента [82, 83]. Для проведения измерений диацетилованное соединение должно было быть превращено в нефлуоресцентный активный зонд ДХФ путем щелочного гидролиза [82–85]. Дальнейшие исследования показали, что ХрП может быть заменена железосодержащим порфирином гематином [84], хотя это приводит к изменению стехиометрии ДХФ :  $H_2O_2$  с 2 : 1 [86] до 1 : 1 [84] при чрезвычайно медленном ответе. Точная кинетика катализируемой гематином реакции не была описана, но превращение 500 пМ перекиси водорода требовало ~40 мин при 50° [84]. Реакция проходила с постоянной скоростью ~12,5 пМ/мин, что значительно ниже скоростей большинства

реакций, генерирующих АФК. Замена ХрП ионами двухвалентного железа улучшило время ответа (завершение реакции требовало «всего» 5–15 мин при 37°) [85], но за счет значительного снижения специфичности по отношению к  $H_2O_2$  [85].

Следует отметить, что в подавляющем большинстве современных работ ДХФ-ДА применяется в отсутствие катализатора пероксидазного типа (ХрП, гематина или железа) и не подвергается предварительному деацетилированию, т.е. используется, полагаясь на неизвестные эндогенные активности для катализа этих двух необходимых реакций. Только при условии, что эти (неизвестные) каталитические активности значительно превышают скорость генерации АФК, сигнал ДХФ-ДА будет отражать уровень продукции АФК, а не собственную активность этих двух каталитических компонентов. Например, многократное увеличение наблюдаемой (кажущейся) скорости генерации АФК при добавлении ХрП было обнаружено в субмитохондриальных частицах [42]. Это означает, что эндогенная пероксидазная активность недостаточна, чтобы метаболизировать все формирующиеся АФК, и что использование ДХФ-ДА в отсутствие ХрП в этом случае необоснованно. Более того, если эндогенные каталитические активности изменяются во времени или различаются в обработанных и контрольных образцах, это может привести к регистрации ложного «окислительного стресса».

Недавний методологический прогресс в исследовании АФК был достигнут благодаря продвижению в разработке ГКФИ. Целый ряд таких индикаторов, чувствительных к АФК, доступен коммерчески, но мы хотим сфокусировать внимание только на одном классе белков — НуРег. Эти белки были разработаны одними из первых и, по нашему мнению, остаются наиболее изученными, селективными и универсальными сенсорами АФК.

Дизайн белковых сенсоров семейства НуРег основан на транскрипционном регуляторе ОхуR бактерии *E. coli*, регуляторный домен которого (ОхуR-RD) способен к селективному распознаванию малых количеств  $H_2O_2$  [87]. ОхуR-RD содержит несколько остатков цистеина, два из которых критичны для чувствительности к  $H_2O_2$ . Cys199 имеет низкую  $pK_a$  и расположен в гидрофобном окружении [88]. Низкая  $pK_a$  позволяет Cys199 быстро реагировать  $H_2O_2$  с константой скорости  $10^5$ – $10^7$   $M^{-1} s^{-1}$  [89, 90]. Гидрофобный карман ограничивает проникновение заряженных окислителей (например, аниона супероксида), в то же время допуская проникновение амфифильной  $H_2O_2$ . При реакции с перекисью

Cys199 окисляется до сульфеновой кислоты и выталкивается из гидрофобного окружения благодаря приобретению электростатического заряда. Это позволяет Cys199 приблизиться к Cys208 и образовать дисульфидную связь с этим остатком [88], что, в свою очередь, приводит к значительным конформационным изменениям в третичной структуре ОхуR-RD. Исходный НуРег был создан путем вставки сrYFP в подверженный конформационным изменениям участок ОхуR-RD между остатками 205 и 206 [91]. Он имеет два пика возбуждения (420 и 500 нм) и один пик эмиссии (516 нм). Окисление НуРег перекисью водорода приводит к снижению пика поглощения на 420 нм и пропорциональному увеличению пика на 500 нм, что делает НуРег ратиометрическим индикатором. Это является огромным преимуществом НуРег, т.к. ратиометрические измерения предотвращают многие артефакты, вызываемые, например, движением объектов или разными уровнями экспрессии ГКФИ в клетках или клеточных компартментах. Другим преимуществом НуРег является обратимость — подобно окисленному ОхуR он может быть восстановлен клеточными системами, восстанавливающими тиолы. Высокая чувствительность к  $H_2O_2$  (от низких до средних наномолярных концентраций) [91], высокая константа скорости реакции ( $10^5$   $M^{-1} s^{-1}$ ) [92] и обратимость [91] делают НуРег универсальным инструментом для оценки динамики уровня  $H_2O_2$  в живых клетках в реальном времени.

Наиболее важным свойством НуРег (и других ГКФИ) является их белковая природа и, следовательно, возможность генноинженерной модификации. Добавка специальных адресных последовательностей обеспечивает направленную доставку этих зондов в выбранные компартменты клетки, такие как ядро, митохондрии, пероксисомы и т.д. [93]. Более того, присоединение ГКФИ к конкретным исследуемым белкам позволяет проводить измерение  $H_2O_2$  на уровне субкомпарментов [94].

Недавно были разработаны две усовершенствованные версии НуРег: НуРег-2 [95] и НуРег-3 [92]. Также уже существует и красная флуоресцентная версия НуРег, которая была применена недавно для обнаружения в режиме реального времени генерации АФК митохондриями при ингибировании  $Ca^{2+}$  АТФазы ЭР [96].

Следует отметить, что НуРег обладает некоторыми недостатками, ограничивающими его применение. Прежде всего, потенциал полувосстановления редокс-активной цистеиновой пары в домене ОхуR составляет  $-185$  мВ [87]. Это означает, что НуРег может применяться только в относительно восстанавливающем окружении,

характерном для ядерно-цитоплазматического компартмента [91, 93, 94], митохондрий [91, 93] и пероксисом [93, 97, 98], но не подходит для относительно окисляющего окружения в цистернах ЭР. Во-вторых, хромофор wtGFP содержит остаток тирозина, который может быть либо в протонированном (нейтральном), либо депротонированном (анионном) состоянии [99–101]. Окружение хромофора в рН-чувствительных белках устроено таким образом, что оно позволяет осуществлять перенос протона с хромофора тирозина в окружающую среду [100]. Таким образом, изменения рН приводят к изменениям в степени протонирования хромофора. В большинстве srYFP хромофор экспонирован во внешнюю среду, что делает эти зонды рН-чувствительными. НуPer не является исключением из этого правила. Пики возбуждения на 420 и 500 нм относятся к протонированной и анионной формам его хромофора соответственно. Закисление окружения белка приводит к увеличению содержания протонированной формы (420 нм) и снижению содержания депротонированной формы (500 нм), таким образом, имитируя восстановление зонда [91]. Напротив, защелачивание среды будет имитировать окисление НуPer. Такая чувствительность к рН может приводить к возникновению артефактов, особенно в матриксе митохондрий, где значения рН близки к  $pK_a$  сенсора, а их флуктуации велики. Для решения этой проблемы было создано несколько новых версий НуPer на основе рН-нечувствительных белков (голубая, зеленая и красная) (д-р Белоусов, неопубликованные данные). По рН-стабильности все три зонда намного превосходят предыдущие версии НуPer. Более того, красный и зеленый сенсоры обладают высокой яркостью (140 и 80% соответственно по сравнению с EGFP), что делает их наиболее чувствительными среди всех имеющихся на настоящий момент ГКФИ. Это новое поколение сенсоров представляется нам наиболее подходящими инструментами для оценки пространственно-временных взаимоотношений между внутриклеточными источниками АФК и их мишенями, необходимыми для более полного понимания роли митохондрий в окислительном стрессе.

В этом обзоре мы описали основные достижения в исследованиях источников и механизмов продукции АФК в митохондриях, достигнутые за последнее десятилетие. Но это далеко не

конец истории. До сих пор недостаточно разработаны технологии для оценки активности и значимости источников АФК в клетках и тканях. Все еще непонятна роль митохондриальных АФК в процессах жизнедеятельности. Что является значимыми источниками АФК в физиологических условиях? Каковы скорости генерации АФК? Какие повреждения или физиологические ответы они вызывают? Ответы на эти вопросы должны быть получены в будущих исследованиях.

Эндогенные антиоксидантные системы митохондрий эффективны, мощны и достаточно хорошо изучены. Остается «лишь» выяснить истинные активности этих систем в реальных условиях, как они регулируются, и как способность к утилизации эндогенных и экзогенных АФК определяет роль митохондрий в передаче сигналов в клетке и развитии патологических процессов. Новые интересные методические подходы, разработанные в последние годы (например, описанные выше ГКФИ), помогут продвинуть эти исследования за пределы изучения гомогенизированных тканей и изолированных митохондрий *in vitro* на более физиологический уровень и тем самым улучшить понимание метаболизма АФК *in situ*. Новые поколения митохондриально-направленных антиоксидантов, аналогичных разработанным группами Майкла Мерфи [12] и Скулачева [13], обещают стать незаменимым инструментом для исследования роли митохондриального метаболизма АФК на уровне живых организмов. Это предоставит возможность фармакологического подхода к лечению патологий, связанных с окислительным стрессом.

Когда же наступит рассвет? Картина понемногу проясняется... Но не пропустили ли мы каких-то угроз? Так ли страшен враг на самом деле? Близка ли победа? Сможем ли мы когда-нибудь постичь митохондриальный метаболизм АФК?

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов NIH NS087611, DK094352, DK054441 (А.Н. Мерфи и А.Ю. Андреев) и NIH AG/NIA P0 AG014930 (А.А. Старков).

Авторы выражают признательность д-ру Всеволоду Белоусову за всестороннюю помощь в написании раздела о ГКФИ и д-ру Наталье Старковой за перевод текста статьи на русский язык.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F., and Gould, S.B. (2014) Endosymbiotic theory for organelle origins, *Curr. Opin. Microbiol.*, **22**, 38–48.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., and Kroemer, G. (2014) Organelle-specific initiation of cell death, *Nature Cell Biol.*, **16**, 728–736.
- Skulachev, V.P. (2000) Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: «it is better to die than to be wrong», *IUBMB Life*, **49**, 365–373.
- Kushnareva, Y., and Newmeyer, D.D. (2010) Bioenergetics and cell death, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1201**, 50–57.
- Tait, S.W., and Green, D.R. (2012) Mitochondria and cell signalling, *J. Cell Sci.*, **125**, 807–815.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., and Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 200–214.
- Drose, S., Brandt, U., and Wittig, I. (2014) Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1344–1354.
- Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2013) Mitochondrial production of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1490–1511.
- Kaludercic, N., Deshwal, S., and Di Lisa, F. (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization, *Front Physiol.*, **5**, 285.
- Lambert, A.J., and Brand, M.D. (2009) Reactive oxygen species production by mitochondria, *Methods Mol. Biol.*, **554**, 165–181.
- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.*, **417**, 1–13.
- Murphy, M.P. (2014) Antioxidants as therapies: can we improve on nature, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 20–23.
- Skulachev, V.P. (2013) Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **441**, 275–279.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.*, **94**, 909–950.
- Starkov, A.A. (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1147**, 37–52.
- Boveris, A., and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen, *Biochem. J.*, **134**, 707–716.
- Kareyeva, A.V., Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2012) Mitochondrial hydrogen peroxide production as determined by the pyridine nucleotide pool and its redox state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1879–1885.
- Kussmaul, L., and Hirst, J. (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7607–7612.
- Vinogradov, A.D., and Grivennikova, V.G. (2005) Generation of superoxide-radical by the NADH: ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 120–127.
- Hoffman, D.L., and Brookes, P.S. (2009) Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions, *J. Biol. Chem.*, **284**, 16236–16245.
- Hoffman, D.L., Salter, J.D., and Brookes, P.S. (2007) Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, 101–108.
- Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2013) Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 446–454.
- Brown, G.C., and Borutaite, V. (2012) There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells, *Mitochondrion*, **12**, 1–4.
- Starkov, A.A., Andreyev, A.Y., Zhang, S.F., Starkova, N.N., Korneeva, M., Syromyatnikov, M., and Popov, V.N. (2014) Scavenging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mouse brain mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **46**, 471–477.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., and Murphy, M.P. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature*, **515**, 431–435.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., and Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state, *Biochem. J.*, **368**, 545–553.
- Ambrus, A., and Adam-Vizi, V. (2013) Molecular dynamics study of the structural basis of dysfunction and the modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic mutants of human dihydroliipoamide dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **538**, 145–155.
- Ambrus, A., Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid, *J. Neurochem.*, **109**, Suppl. 1, 222–229.
- Kareyeva, A.V., Grivennikova, V.G., Cecchini, G., and Vinogradov, A.D. (2011) Molecular identification of the enzyme responsible for the mitochondrial NADH-supported ammonium-dependent hydrogen peroxide production, *FEBS Lett.*, **585**, 385–389.
- Quinlan, C.L., Goncalves, R.L., Hey-Mogensen, M., Yadava, N., Bunik, V.I., and Brand, M.D. (2014) The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I, *J. Biol. Chem.*, **289**, 8312–8325.
- Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., and Beal, M.F. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species, *J. Neurosci.*, **24**, 7779–7788.
- Tahara, E.B., Barros, M.H., Oliveira, G.A., Netto, L.E., and Kowaltowski, A.J. (2007) Dihydroliipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging, *FASEB J.*, **21**, 274–283.
- Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase, *J. Neurosci.*, **24**, 7771–7778.
- Zundorf, G., Kahlert, S., Bunik, V.I., and Reiser, G. (2009) alpha-Ketoglutarate dehydrogenase contributes to production of reactive oxygen species in glutamate-stimulated hippocampal neurons in situ, *Neuroscience*, **158**, 610–616.
- Pryde, K.R., and Hirst, J. (2011) Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer, *J. Biol. Chem.*, **286**, 18056–18065.
- Treberg, J.R., Quinlan, C.L., and Brand, M.D. (2011) Evidence for two sites of superoxide production by mito-



- chondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), *J. Biol. Chem.*, **286**, 27103–27110.
37. Ohnishi, S.T., Shinzawa-Itoh, K., Ohta, K., Yoshikawa, S., and Ohnishi, T. (2010) New insights into the superoxide generation sites in bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I): the significance of protein-associated ubiquinone and the dynamic shifting of generation sites between semiflavin and semiquinone radicals, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1901–1909.
  38. Sled, V.D., Rudnitsky, N.I., Hatefi, Y., and Ohnishi, T. (1994) Thermodynamic analysis of flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), *Biochemistry*, **33**, 10069–10075.
  39. Ohnishi, T. (1975) Thermodynamic and EPR characterization of iron-sulfur centers in the NADH-ubiquinone segment of the mitochondrial respiratory chain in pigeon heart, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 475–490.
  40. Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 186–206.
  41. Ksenzenko, M., Konstantinov, A.A., Khomutov, G.B., Tikhonov, A.N., and Ruuge, E.K. (1983) Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bcl site of the mitochondrial respiratory chain, *FEBS Lett.*, **155**, 19–24.
  42. McLennan, H.R., and Degli Esposti, M. (2000) The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**, 153–162.
  43. Ohnishi, T., and Trumpower, B.L. (1980) Differential effects of antimycin on ubisemiquinone bound in different environments in isolated succinate cytochrome *c* reductase complex, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3278–3284.
  44. Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., and Brand, M.D. (2012) Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions, *J. Biol. Chem.*, **287**, 27255–27264.
  45. Siebels, I., and Drose, S. (2013) Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1156–1164.
  46. Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Miyoshi, H., Osanai, A., Kita, K., and Omura, S. (2003) Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 473–477.
  47. St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand, M.D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, *J. Biol. Chem.*, **277**, 44784–44790.
  48. Mills, E., and O'Neill, L.A. (2014) Succinate: a metabolic signal in inflammation, *Trends Cell Biol.*, **24**, 313–320.
  49. Forman, H.J., and Kennedy, J.A. (1974) Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1044–1050.
  50. Forman, H.J., and Kennedy, J. (1975) Superoxide production and electron transport in mitochondrial oxidation of dihydroorotic acid, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4322–4326.
  51. Dileepan, K.N., and Kennedy, J. (1985) Complete inhibition of dihydro-orotate oxidation and superoxide production by 1,1,1-trifluoro-3-thenoylacetone in rat liver mitochondria, *Biochem. J.*, **225**, 189–194.
  52. Lakaschus, G., and Loffler, M. (1992) Differential susceptibility of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase to Brequinar Sodium (NSC 368 390) *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1025–1030.
  53. Loffler, M., Becker, C., Wegerle, E., and Schuster, G. (1996) Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria, *Histochem. Cell Biol.*, **105**, 119–128.
  54. Hey-Mogensen, M., Goncalves, R.L., Orr, A.L., and Brand, M.D. (2014) Production of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by dihydroorotate dehydrogenase in rat skeletal muscle mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.*, **72**, 149–155.
  55. Hail, N., Jr., Chen, P., Kepa, J.J., Bushman, L.R., and Shearn, C. (2010) Dihydroorotate dehydrogenase is required for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced reactive oxygen species production and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 109–116.
  56. Pinton, P., Rimessi, A., Marchi, S., Orsini, F., Migliaccio, E., Giorgio, M., Contursi, C., Minucci, S., Mantovani, F., Wieckowski, M.R., Del Sal, G., Pelicci, P.G., and Rizzuto, R. (2007) Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc, *Science*, **315**, 659–663.
  57. Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F., and Pelicci, P.G. (2005) Electron transfer between cytochrome *c* and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis, *Cell*, **122**, 221–233.
  58. Gertz, M., Fischer, F., Leipelt, M., Wolters, D., and Steegborn, C. (2009) Identification of Peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc, *Aging (Albany, N.Y.)*, **1**, 254–265.
  59. Banus, M.G. (1941) A design for a saturated calomel electrode, *Science*, **93**, 601–602.
  60. Zhen, Y., Hoganson, C.W., Babcock, G.T., and Ferguson-Miller, S. (1999) Definition of the interaction domain for cytochrome *c* on cytochrome *c* oxidase. I. Biochemical, spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit ii of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome aa(3), *J. Biol. Chem.*, **274**, 38032–38041.
  61. Gertz, M., and Steegborn, C. (2010) The Lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor, *Antioxid. Redox Signal.*, **13**, 1417–1428.
  62. Galimov, E.R. (2010) The role of p66shc in oxidative stress and apoptosis, *Acta Naturae*, **2**, 44–51.
  63. Galimov, E.R., Chernyak, B.V., Sidorenko, A.S., Tereshkova, A.V., and Chumakov, P.M. (2014) Prooxidant properties of p66shc are mediated by mitochondria in human cells, *PLoS One*, **9**, e86521.
  64. Vogel, R., Wiesinger, H., Hamprecht, B., and Dringen, R. (1999) The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required, *Neurosci. Lett.*, **275**, 97–100.
  65. Lopert, P., and Patel, M. (2014) Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) links the substrate requirement in brain mitochondria for hydrogen peroxide removal to the thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system, *J. Biol. Chem.*, **289**, 15611–15620.
  66. Freeman, H.C., Hugill, A., Dear, N.T., Ashcroft, F.M., and Cox, R.D. (2006) Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice, *Diabetes*, **55**, 2153–2156.
  67. Huang, T.T., Naeemuddin, M., Elchuri, S., Yamaguchi, M., Kozy, H.M., Carlson, E.J., and Epstein, C.J. (2006) Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1187–1194.
  68. Chen, Y., Zhang, J., Lin, Y., Lei, Q., Guan, K.L., Zhao, S., and Xiong, Y. (2011) Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS, *EMBO Rep.*, **12**, 534–541.

69. Tao, R., Coleman, M.C., Pennington, J.D., Ozden, O., Park, S.H., Jiang, H., Kim, H.S., Flynn, C.R., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, A.K., Spitz, D.R., and Gius, D. (2010) Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress, *Mol. Cell*, **40**, 893–904.
70. Tao, R., Vassilopoulos, A., Parisiadou, L., Yan, Y., and Gius, D. (2014) Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 1646–1654.
71. Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., and Freeman, B.A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **266**, 22028–22034.
72. Salvi, M., Battaglia, V., Brunati, A.M., La Rocca, N., Tibaldi, E., Pietrangeli, P., Marcocci, L., Mondovi, B., Rossi, C.A., and Toninello, A. (2007) Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense, *J. Biol. Chem.*, **282**, 24407–24415.
73. Cadenas, E. (2004) Mitochondrial free radical production and cell signaling, *Mol. Aspects Med.*, **25**, 17–26.
74. Cox, A.G., Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B. (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling, *Biochem. J.*, **425**, 313–325.
75. Drechsel, D.A., and Patel, M. (2010) Respiration-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system, *J. Biol. Chem.*, **285**, 27850–27858.
76. Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., and Funk, C.D. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, *J. Biol. Chem.*, **272**, 16644–16651.
77. Cao, Z., Bhella, D., and Lindsay, J.G. (2007) Reconstitution of the mitochondrial PrxIII antioxidant defence pathway: general properties and factors affecting PrxIII activity and oligomeric state, *J. Mol. Biol.*, **372**, 1022–1033.
78. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J.P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **467**, 95–106.
79. Starkov, A.A. (2014) Measuring mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production. In *Systems biology of free radicals and antioxidants* (Laher, I., ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, p. 265–278.
80. Starkov, A.A. (2010) Measurement of mitochondrial ROS production, *Methods Mol. Biol.*, **648**, 245–255.
81. Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., and Haugland, R.P. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Anal. Biochem.*, **253**, 162–168.
82. Brandt, R., and Keston, A.S. (1965) Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: a stable reagent for fluorometric analysis, *Anal. Biochem.*, **11**, 6–9.
83. Keston, A.S., and Brandt, R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide, *Anal. Biochem.*, **11**, 1–5.
84. Cathcart, R., Schwiers, E., and Ames, B.N. (1983) Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay, *Anal. Biochem.*, **134**, 111–116.
85. LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 227–31.
86. Black, M.J., and Brandt, R.B. (1974) Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide, *Anal. Biochem.*, **58**, 246–254.
87. Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science*, **279**, 1718–1721.
88. Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S.E. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor, *Cell*, **105**, 103–113.
89. Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6161–6165.
90. Lee, C., Lee, S.M., Mukhopadhyay, P., Kim, S.J., Lee, S.C., Ahn, W.S., Yu, M.H., Storz, G., and Ryu, S.E. (2004) Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1179–1185.
91. Belousov, V.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Staroverov, D.B., Shakhbazov, K.S., Terskikh, A.V., and Lukyanov, S. (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, *Nature Methods*, **3**, 281–286.
92. Bilan, D.S., Pase, L., Joosen, L., Gorokhovatsky, A.Y., Ermakova, Y.G., Gadella, T.W., Grabher, C., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2013) HyPer-3: a genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 535–542.
93. Malinouski, M., Zhou, Y., Belousov, V.V., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2011) Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments, *PLoS One*, **6**, e14564.
94. Mishina, N.M., Tyurin-Kuzmin, P.A., Markvicheva, K.N., Vorotnikov, A.V., Tkachuk, V.A., Laketa, V., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2011) Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally, *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 1–7.
95. Markvicheva, K.N., Bilan, D.S., Mishina, N.M., Gorokhovatsky, A.Y., Vinokurov, L.M., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2011) A genetically encoded sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with expanded dynamic range, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 1079–1084.
96. Ermakova, Y.G., Bilan, D.S., Matlashov, M.E., Mishina, N.M., Markvicheva, K.N., Subach, O.M., Subach, F.V., Bogeski, I., Hoth, M., Enikolopov, G., and Belousov, V.V. (2014) Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide, *Nature Commun.*, **5**, 5222.
97. Costa, A., Drago, I., Behera, S., Zottini, M., Pizzo, P., Schroeder, J.I., Pozzan, T., and Lo Schiavo, F. (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plant peroxisomes: an *in vivo* analysis uncovers a Ca<sup>2+</sup>-dependent scavenging system, *Plant J.*, **62**, 760–772.
98. Elsner, M., Gehrman, W., and Lenzen, S. (2011) Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells, *Diabetes*, **60**, 200–208.
99. Brejc, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormo, M., and Remington, S.J. (1997) Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2306–2311.
100. Elsliger, M.A., Wachter, R.M., Hanson, G.T., Kallio, K., and Remington, S.J. (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH, *Biochemistry*, **38**, 5296–5301.
101. Hanson, G.T., McAnaney, T.B., Park, E.S., Rendell, M.E., Yarbrough, D.K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S.G., Montrose, M.H., and Remington, S.J. (2002) Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. I. Structural characterization and preliminary application, *Biochemistry*, **41**, 15477–15488.

**MITOCHONDRIAL ROS METABOLISM:  
10 YEARS LATER****A. Y. Andreyev<sup>1\*</sup>, Y. E. Kushnareva<sup>2</sup>, A. N. Murphy<sup>1</sup>,  
A. A. Starkov<sup>3\*</sup>**<sup>1</sup> *University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, MC 0601,  
La Jolla, CA 92093-0601; E-mail: alex\_andreyev@mitoexperts.com*<sup>2</sup> *La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 Athena Circle,  
La Jolla, CA 92037*<sup>3</sup> *Cornell University, Weill Medical College, Brain and Mind Research  
Institute, 407 East 61<sup>st</sup> Street, 5th floor, New York, NY 10065;  
E-mail: ans2024@med.cornell.edu*

Received February 1, 2015

Revision received February 8, 2015

The role of mitochondria in oxidative stress is well recognized, but many questions are still to be answered. This article is intended to update our comprehensive review of 2005 by highlighting progress in our understanding of mitochondrial ROS metabolism over the past 10 years. We review the recently identified or reappraised sources of ROS generation in mitochondria, such as p66<sup>shc</sup> protein, succinate dehydrogenase, and recently discovered properties of the mitochondrial antioxidant system. We also reflect upon some controversies, disputes, and misconceptions that confound the field.

*Key words:* mitochondria, reactive oxygen species, p66<sup>shc</sup>, succinate dehydrogenase, dihydroorotate dehydrogenase, ROS scavenging, oxidative stress