

## Роль активных форм кислорода в митохондриях

Л.М.Овсепян, Г.С.Казарян, Г.В.Захарян

*Институт молекулярной биологии НАН РА  
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

**Ключевые слова:** митохондрии, активные формы кислорода, окислительный стресс, антиоксиданты, апоптоз

Дыхательная цепь митохондрий (МХ) снабжает клетку энергией, трансформируя энергию окисления субстратов дыхания кислорода в форму трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода на сопрягающей мембране. Она состоит из четырех комплексов, представляющих собой встроенные в сопрягающую мембрану многоступенчатые ферменты, которые осуществляют перенос электронов от NADH на кислород и при этом откачивают из матрикса через мембрану протоны, создавая мембранный потенциал [6,9].

МХ концентрируют в себе большую часть окислительных метаболических путей и поэтому содержат многочисленные редокс-переносчики и центры, потенциально способные к одноэлектронному восстановлению кислорода до радикала супероксид-аниона, предшественника других активных форм кислорода (АФК). В атмосфере кислорода внутриклеточная генерация АФК является неизбежным, а иногда и физиологически важным процессом. Обладая способностью отдавать и принимать электроны, суперактивный радикал может выступать и как восстановитель, и как окислитель. В кислой среде он способен образовывать гидропероксильный радикал, являющийся гораздо более активным окислителем, чем супероксидный радикал [1]. Потенциально любой компонент дыхательной цепи в аэробных условиях может быть донором одноэлектронного восстановления кислорода. Не только внешняя мембрана, но и матрикс митохондрий содержат высокоактивные флавиновые ферменты (дегидрогеназы  $\alpha$ -кетокислот, редуктаза цитохрома  $b_5$ , моноаминоксидазы), потенциально способные реагировать с кислородом с образованием супероксид-радикала и перекиси водорода. Стандартный ингибиторный анализ показал, что генерация супероксидного анион-радикала происходит на уровне комплексов 1 и 3. Резуль-

таты экспериментов с изолированным комплексом 1 и субмитохондриальными частицами указывают на то, что АФК-генерирующий центр должен располагаться между флавином и ротенон-связывающим участком и что в этой области может быть более чем один супероксидгенерирующий центр [4,16]. АФК-генерирующим центром в комплексе 1 может быть флавин или его комплекс с радикалом NAD. Согласно данным авторов, комплекс 3 может генерировать значительное количество супероксида, который затем дисмутирует до  $H_2O_2$ ; считают, что источником супероксида в комплексе 3 является нестабильный радикал семинохинона [7,20].

АФК, продуцируемые МХ, рассматриваются в качестве одного из основных факторов, усиливающих внутриклеточный окислительный стресс. Окислительный стресс – это нарушение баланса между продукцией свободных радикалов и механизмами антиоксидантного контроля за их содержанием, которое сопровождается повышенной скоростью образования свободных радикалов и снижением антиоксидантной системы, которая приводит к гибели клетки [25]; полагают, что истинной причиной окислительного стресса является не продукция АФК как таковая, а нарушение баланса между генерацией и удалением.

Большое количество исследований митохондриального окислительного стресса направлено на исследования, касающиеся генерации АФК, без учета систем защиты от АФК. Среди компонентов антиоксидантной защиты в МХ можно выделить следующие группы: 1 – ферменты антиоксидантной защиты глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза (СОД), цитохром С, коэнзим Q; 2 – естественные антиоксиданты, поступающие в организм с пищей (аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -токоферол, рутин, церулоплазмин и т.д.); 3 – низкомолекулярные антиоксиданты, синтезируемые в организме (глутатион, мочева кислота, мелатонин, липоевая кислота и т.д.).

Глутатионпероксидаза гидроперекисей фосфолипидов – это селенсодержащий фермент, использующий глутатион как источник восстановительных эквивалентов. Глутатион представляет собой трипептид, образованный аминокислотами: цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Благодаря наличию в своем составе цистеина, он очень быстро переходит из окисленного состояния в восстановленное. МХ содержат примерно 10-12 % клеточного пула глутатиона, но в них отсутствуют ферменты для синтеза глутатиона; внутримитохондриальный пул глутатиона пополняется путем быстрой аккумуляции его из цитоплазмы [2,28]. Снижение содержания глутатиона приводит к повышению чувствительности МХ к окислительному стрессу.

Высокий уровень защиты от АФК в МХ обеспечивает СОД, находящаяся исключительно в митохондриальном матриксе, и ее единственная функция состоит в ускорении дисмутации радикала супероксида в  $H_2O_2$  [22]. Особенностью функционирования СОД является то

обстоятельство, что в присутствии избыточного количества  $H_2O_2$  она может образовывать высокореакционный гидроксильный радикал, который атакует белковую молекулу СОД, приводя к ее фрагментации и потере активности. Одним из ферментов детоксикации  $H_2O_2$  является каталаза, катализирующая превращение  $H_2O_2$  в  $O_2$  и  $H_2O$  [14]. Это железосодержащий протопорфирин с молекулярной массой около 250 кДа, обладающий двойной функцией – каталазной и пероксидазной. При высоких концентрациях  $H_2O_2$  в клетке преобладает каталазная активность фермента, а при низких – пероксидазный путь расщепления перекиси водорода.

В межмембранном пространстве МХ содержится примерно 0,7 мМ цитохрома С, который способен эффективно удалять супероксид. Окисленный цитохром С может восстанавливаться как дыхательной цепью, так и супероксидом и регенерироваться путем окисления его естественным акцептором электронов – митохондриальной цитохром С оксидазой. Антиоксидантные свойства цитохрома С были подтверждены в лаборатории В.П. Скулачева [19].

Обнаружено, что в митохондриях коэнзим Q является как одним из основных прооксидантов, так и главным антиоксидантом [26]. Периодически окисляясь и восстанавливаясь в процессе транспорта электронов, коэнзим Q может образовывать суперактивный анион-радикал, т.е. являться прооксидантом; в восстановленном же состоянии убихинон обладает способностью снижать уровень радикалов, являясь антиоксидантом.

Особое место занимает  $\alpha$ -токоферол, представляющий липидрастворимый антиоксидант – ловушку свободных радикалов, повсеместно присутствующий в митохондриальных мембранах. Он обладает способностью восстанавливать радикалы липидов и в свою очередь регенерируется восстановленным убихиноном в митохондриальных мембранах [15]. Механизм действия антиоксидантов связан с нейтрализацией неспаренных электронов высокоактивных гидроксильных, пероксильных, алкоксильных радикалов, превращая их в химически достаточно инертные соединения.

АФК образуются при самых разных воздействиях на клетку. Стресс, гипоксия, воспаление, высокие и низкие температуры, физическая нагрузка, практически все патологические состояния сопровождаются, помимо специфического ответа, повышением уровня АФК. До последнего времени, внимание исследователей было сосредоточено в основном на повреждающем действии избыточного уровня АФК, роли окислительного стресса в развитии различных патологий и применении антиоксидантов с целью коррекции высокого уровня свободнорадикальных процессов. Однако значение АФК этим далеко не исчерпывается. Можно выделить по крайней мере три основные функции свободнорадикального окисления в организме: во-первых, образование АФК и

свободнорадикальное окисление как естественный физиологический процесс; во вторых, АФК как повреждающий фактор при чрезмерной интенсификации свободнорадикального окисления; в-третьих, АФК как сигнальная система, участвующая в регуляции иммунных процессов, экспрессии генов, работе кровеносной, эндокринной и других физиологических систем [5,30]. Доказательство того, что АФК играют важную роль в передаче сигналов внутри клетки, нашло подтверждение за последние 10 лет. Митогенетические сигналы, опосредованные образованием АФК, активируют факторы транскрипции, включая NF-kB, Bcl-2 и др. NF-kB регулирует индуцибельную экспрессию ряда генов, участвующих в выживании и удалении клеток [18]. Установлено, что прежде всего АФК действуют на чувствительный к окислению белок. На роль такого сенсора АФК претендуют несколько белков: тиоредоксин, цитозольная тиоредоксин-редуктаза, NADPH-редуктаза, NADPH- и NADH-оксидазы [24]. В любом случае основным инициатором этой сигнальной цепи является переход из восстановленного в окисленное состояние белковых сульфгидрильных групп, окисление которых происходит благодаря генерации АФК снаружи или внутри клетки. Затем сигнал передается по уже известным регуляторным каскадам, работающим при активации специфических рецепторов, которые индуцируют митоген-активируемые протеинкиназы – MAPK, SAPK [10,11].

В последнее время, накопилось большое количество биохимических исследований, доказывающих роль МХ во внутриклеточных сигнальных путях, ведущих к апоптозу клетки [27,31]. Повышение продукции АФК в МХ при недостатке антиоксидантов приводит к повреждению электрон-транспортной цепи МХ, к снижению синтеза АТФ и связанному с этим понижению активности АТФ-зависимых ферментов, в частности, Na, K-АТФ-аз, ответственных за поддержание мембранного потенциала клетки. Как результат этого, происходит деполяризация мембраны клеток, усиливается интенсивность ионных потоков через мембрану и массивное поступление  $Ca^{2+}$  во внутреннее пространство МХ, запускающих весь каскад внутриклеточных катаболических реакций. Вследствие недостатка АТФ, нарушается также работа Са-насоса, откачивающего  $Ca^{2+}$  из клетки [8,17]. Внутриклеточное накопление  $Ca^{2+}$  создает перегрузку МХ с разобщением окислительного фосфорилирования и набуханием МХ. Кроме того, образование АФК и увеличение  $Ca^{2+}$  в митохондриях приводит к активации фосфолипаз, отщепляющих жирные кислоты из фосфолипидов. Известно, что жирные кислоты приводят к разобщению окислительного фосфорилирования, характеризующегося набуханием митохондрий, изменениям проницаемости митохондриальной мембраны с образованием митохондриальной поры [23].

Возникновение проницаемости, индуцированное  $Ca^{2+}$  перегруз-

кой, связано с открытием неспецифичной поры во внутренней мембране МХ – явление, получившее название «permeability transition pore» (РТР). Пора проницаема для веществ с молекулярной массой <1,5 кДа, и при ее открытии нуклеотиды уходят из матрикса и дыхание на NAD-зависимых субстратах ингибируется и МХ при этом набухают. РТР может вызываться прооксидантами, свободными радикалами, снижением мембранного потенциала, жирными кислотами. Снижение мембранного потенциала часто используют как индикатор клеточной гибели.

Митохондриальные механизмы апоптоза привлекают в последнее время пристальное внимание исследователей. МХ состоят из двух мембран, внешней и внутренней, которые разделены межмембранным пространством. В нем собраны белки, которые индуцируют гибель клеток, после того, как они высвобождаются в цитоплазму. К этим белкам относятся как активаторы каспаз, так и ряд белков, цитохром С, А1F (апоптозиндуцирующий фактор), эндонуклеаза G, S<sub>mac</sub>/DIABLO и т.д., попадание которых в цитоплазму приводит к запуску апоптоза [12,21]. Цитохром С – один из ключевых ферментов дыхательной цепи в МХ и одновременно один из важнейших белков в реализации митохондриального пути апоптоза. В обычных условиях он удерживается в МХ кардиолипином. При активации свободнорадикального окисления в МХ кардиолипин окисляется, что освобождает цитохром С и создает возможность для его перемещения в цитоплазму. После выхода в цитоплазму он образует комплекс с фактором активации апоптоза (Араf-1), прокаспазой-9, активирующей нижестоящие каспазы, которые осуществляют апоптотическую гибель клетки [11,29].

Образование АФК с участием МХ играет важную роль в индукции апоптоза в процессе старения и при многих патофизиологических процессах в нейронах, кардиомиоцитах и других клетках. При инсульте, травме головного и спинного мозга, инфаркте миокарда основной причиной гибели клеток является апоптоз, развитие которого опосредовано нарушением функционирования МХ в условиях окислительного стресса [3]. В очаге поражения при окклюзии или повреждении сосудов часть клеток головного мозга (нейронов) погибает в результате развития некроза. Между очагом ишемии и нормальной тканью мозга находится периинфарктная зона (пенумбра), которая характеризуется частично сохраненным энергетическим метаболизмом и остается жизнеспособной. В ткани, окружающей зону поражения, основная масса клеток умирает более медленно в результате развития апоптоза, поэтому на объем гибели этих клеток теоретически уже могут оказывать влияние модуляторы апоптоза и фармакологические препараты. Пусковым событием в индукции апоптоза в этих условиях чаще всего является изменение мембраны МХ, связанное с образованием РТР. Апоптоз, опосредованный образованием РТР в МХ, может играть важную роль в патогенезе таких заболеваний, как инсульт, травма мозга, болезнь Альцгеймера,

болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона [13]. Апоптоз при этих заболеваниях развивается в результате тех нарушений, которые лежат в основе болезни (повреждение МХ, формирование окислительного стресса), поэтому фармакологическая коррекция для лечения должна быть направлена на блокирование как процессов апоптоза, так и первичных повреждений, лежащих в основе патогенеза указанных болезней.

*Поступила 22.01.09*

### **Թթվածնի ակտիվ ձևերի դերը միտոքոնդրիումներում**

**Լ.Մ. Հովսեփյան, Գ.Ս. Ղազարյան, Գ.Վ. Չաքարյան**

Օքսիդատիվ սթրեսը, համարվելով օրգանիզմում տարրեր պաթոլոգիաների զարգացման հիմնական գործոններից մեկը, մասնակցում է օրգանիզմի ծերացման պրոցեսին: Թթվածնի ակտիվ ձևերը գլխավոր գործոն են հանդիսանում միտոքոնդրիումներում ներթրջջային օքսիդատիվ սթրեսի զարգացման համար:

Ուսումնասիրվել են թթվածնի և նրա ակտիվ ձևերի ֆիզիկաքիմիական հատկությունները, գոյություն ունեցող հավասարակշռությունը պրո- և հակաօքսիդանտների միջև, կյանքի համար անհրաժեշտ ադենոզին ֆոսֆորական թթվի մակարդակը միտոքոնդրիումներում և բջիզներում:

Հայտնաբերվել է, որ միտոքոնդրիումներում ընթացող փոփոխությունները, մասնավորապես՝ մի քանի միտոքոնդրիալ սպիտակուցների առկայությունը արգելակում են ԱԵՖ-ի սինթեզը, խաթանում էլեկտրոնների շղթայական շարժը, ակտիվացնելով օրգանիզմում ապոպտոզի զարգացման պրոցեսը:

### **Reactive oxygen species in mitochondria**

**L. M. Hovsepyan, G.S.Kazaryan, G.V.Zakaryan**

Oxidative stress is considered to be a major contributor to etiology of both normal senescence and severe pathologies with serious public health implications. Mitochondrially derived reactive oxygen species (ROS) are thought to be a major factor augmenting intracellular oxidative stress. Chemical and physiological functions of ROS as well as the existing dynamic equilibrium between the antioxidant and prooxidant pools, which gives the steady state level of ROS necessary for normal mitochondrial and cell functioning are reviewed. Mitochondrial alterations, such as the release of sequestered apoptogenic proteins, loss of transmembrane potential, production of ROS disruption of electron transport chain and decrease in ATP synthesis, have been shown to be involved in and possibly responsible for different manifestations of cell death.

## Литература

1. *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И.* Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. М., 1991, т. 29, серия биофизика.
2. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Обмен глутатиона. Успехи биологической химии, 1990 т. 31, с. 157-179.
3. *Скворцова В.И., Боцина А.Ю., Кольцова К.В.* Артериальная гипертония и головной мозг. Журн. неврологии и психиатрии, 2006, т. 10 с. 68-77.
4. *Скулачев В.П.* Снижение внутриклеточной концентрации  $O_2$  как особая функция дыхательных систем клетки. Биохимия, 1994, т. 59, вып. 11, с. 1910-1912.
5. *Турпаев К.Т.* Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. Биохимия, 2002, т. 67, вып. 3, с. 339-352.
6. *Attardi C., Schatz C. T.* The biogenesis of mitochondria, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 1988, 4, p.289-333.
7. *Barja G., Cadenas S., Rojas C. et al.* Low mitochondrial free radical production mitochondria per unit  $O_2$  consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds, *Free Rad. Res.*, 1994, 21, p. 317-328.
8. *Boudreault F., Grygorczyk R.* Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J.Physiol.*, 2004, 197, p. 205-213.
9. *Davey G.P., Peuchen S., Clark J.B.* Energy threshold in brain mitochondria, *J.Biol. Chem.*, 1998, v. 273, p. 12753-12757.
10. *Davis R.I.* Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development. *Cell. Biol.*, 1998, v. 10, p. 205-219.
11. *Diehl N.L., Enslin H., Fortner K.A., Merritt C. et al.* Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo. *J.Exp.Med.*, 2000, v.191, p. 324-334
12. *Du C., Fang M., Li Y., Wang X.* S mac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell*, 2000, v. 102, p. 33-42
13. *Friberg H., Wieloch T.* Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration *Biochim.*, 2002, v. 84, p. 241-250.
14. *Guaragnella N., Antonacci L., Giannattasio S. et al.* Catalase and Cu,Zn-superoxide dismutase in the acetic acid-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, 2008, v.582, p. 210-214
15. *Halliwell B., Gutteridge J.M.* *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, 1999.
16. *Herrero A., Baria G.* Localization of the site of oxygen radical generation inside the mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2000, v. 32, p.609-615.
17. *Ichas F., Jouaville L.S., Mazai J.P.* Mitochondria are excitable organelles capable of generation and converting electrical and calcium signals. *Cell*, 1997, v. 89, p.1145-1153.
18. *Karin M., Lin A.* NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death, *Nature Immunol.*, 2002, v.3, p. 221-227.
19. *Korshunov S.S., Krasnikov B.F., Pereverzev M.O., Skulachev V.P.* *FEBS Lett.*, 1999, v. 462, p. 192-198.
20. *Ku H.H., Brunk U.T., Sohal R.S.* Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species, *Free Rad. Biol. Med.*, 1993, v.15, p. 621-627.
21. *Liu X, Kim N.S., Yang J. et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c, *Cell*, 1996, v. 86, p. 147-157
22. *Mao G.D., Thomas P.D., Lopasghuk G.D., Poznansky M.J.* Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of Hydroperoxide and the Fenton reaction in SOD toxicity, *J. Biol. Chem.*, 1993, v.268, p.416-420.
23. *Marchetti P., Castedo M., Susin S.A. et al.* Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J.Exp.Med.*, 1996, v.184, p. 1155-1160.

24. *Nakashima I., Kato M., Akhand A.A., Suzuki H. et al.* Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation, *Antioxid. Redox. Signal*, 2002, v. 4(2), p. 517-531.
25. *Richter C., Schwejzer M.* Oxidative stress in mitochondria. N.Y., 1997.
26. *Schnurr K., Hellwin M., Seidemann B. et al.* Oxygenation of biomembranes by mammalian lipoxygenases: the role of ubiquinol, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, 20(1), p. 11-21.
27. *Skulachev V.P.* Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "It is better to die than to be wrong". *IUBMB Life*, 2000, v. 49, p. 365-373.
28. *Stone W., Drats E.* Increased glutathione-S-transferase activity in antioxidant-deficient rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, v. 631, p. 503-506.
29. *Susin S.A., Lorenzo N.K., Zamzami N., Marzo I. et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. 1999, *Nature*, 1999, v. 397, p. 441-446.
30. *Wolin M.S.* Interaction of oxidant with vascular signaling systems *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, v. 20, p. 1430-1442.
31. *Zoratti M., Szabo J.* The mitochondrial permeability transition, *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, v. 1241, p. 39.