УДК 577.152.13

## РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА І В ПОВРЕЖДЕНИИ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

## Обзор

#### © 2019 А. Галкин\*

Division of Neonatology, Department of Pediatrics, Columbia University William Black Building, 10032 New York, NY USA; E-mail: ag4003@cumc.columbia.edu

> Поступила в редакцию 07.06.2019 После доработки 08.07.2019 Принята к публикации 09.07.2019

Ишемический инсульт и неонатальная гипоксически-ишемическая энцефалопатия являются одними из основных причин инвалидности у взрослых людей и новорожденных. Потребности клеток мозга в энергии обеспечиваются за счет механизма окислительного фосфорилирования, протекающего в митохондриях. Синдром ишемии/реперфузии характеризуется нарушением процесса образования АТР в митохондриях, что приводит к гибели клеток мозга из-за недостатка энергии. Митохондриальный комплекс I — ферментативный комплекс дыхательной цепи, характеризующийся наибольшей чувствительностью к ишемии/реперфузии. Механизмы ингибирования этого комплекса до сих пор не достаточно изучены. В настоящем обзоре рассмотрены данные литературы, касающиеся нарушения структуры и функций митохондрий во время ишемии/реперфузии, а также предложены два различных механизма повреждения комплекса I, основанные на результатах последних исследований в лаборатории автора. Одним из механизмов является обратимая диссоциация естественного кофактора фермента флавинмононуклеотида в условиях ишемии. Другой механизм предполагает модификацию ключевого остатка цистеина комплекса I после перехода фермента из активного конформационного состояния в деактивированное (А/Д переход). В представленном обзоре описано потенциальное влияние этих двух процессов на развитие нарушений функционирования митохондрий при ишемии/реперфузии и кратко обсуждаются возможные нейропротекторные стратегии, направленные на снижение степени повреждения клеток при ишемии/реперфузии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** инсульт, повреждение в результате ишемии/реперфузии, митохондрии, комплекс I, флавин, тиоловые группы, нитрозилирование.

DOI: 10.1134/S0320972519110150

Повреждение головного мозга в результате ишемии/реперфузии происходит в патологических условиях, таких как ишемический инсульт, остановка сердца, травматическое повреждение мозга или перинатальные гипоксически-ишемические травмы. Инсульт стоит на пятом месте среди самых распространенных причин смертности во всем мире. В течение жизни каждый шестой человек переносит инсульт различной степени тяжести. В связи с увеличением среднего возраста населения можно ожидать, что в ближайшем будущем частота инсультов будет только возрастать. Другим клиническим проявлением ишемии/реперфузии мозга являются перинатальные гипоксически-ишемические энцефалопатии, при которых смертность новорожденных в 2010 г. во всем мире составила 1,15 млн человек [1]. В целом, стоимость лечения и продления жизни выживших больных оценивается в триллионы долларов [2]. Несмотря на широкое распространение и разрушительные последствия ишемии мозга, до сих пор основными способами лечения инсульта остаются механические или фармакологические способы восстановления кровоснабжения или реперфузии. Также до сих пор нет полного понимания молекулярных механизмов критических повреждений ткани мозга при синдроме ишемии/реперфузии. В настоящее время активные научные исследования направлены на разработку способов терапевтического вмешательства,

Принятые сокращения: А-и Д-формы – активная и деактивированная формы комплекса I соответственно; А/Д переход – переход комплекса I из активного в деактивированное состояние; АФК – активные формы кислорода; ЭПФ – электронпереносящий флавопротеин  $\beta$ -окисления жирных кислот; MCAo – middle cerebral artery occlusion, окклюзия средней церебральной артерии; RET – reverse electron transfer, обратный перенос электронов; Q – убихинон.

<sup>\*</sup> Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

снижающего степень начального повреждения тканей во время ишемии/реперфузии. В представленном обзоре проанализированы недавние достижения в изучении роли митохондриального комплекса I во время острой первичной и вторичной энергетической недостаточности мозга при ишемии/реперфузии. В настоящей работе рассматриваются изменения в митохондриях, происходящие только в первые часы повреждения тканей во время острого энергодефицита; сведения о долговременных аспектах влияния ишемии/реперфузии на митохондриальный метаболизм читатель может найти в ранее опубликованных обзорах [3–6].

#### ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС I

Работа нашего мозга главным образом зависит от функционирования митохондрий, вырабатывающих энергию в результате совместной работы ферментов метаболизма, дыхательной цепи и АТР-синтазы (рис. 1). Углеводы, липиды и аминокислоты разлагаются до более простых универсальных промежуточных продуктов, которые могут окисляться с высвобождением энергии. Окислительный процесс начинается с переноса электронов от субстратов через систему переносчиков, образующих дыхательную цепь, расположенную во внутренней мембране митохондрий. Ферментные комплексы дыхательной цепи в несколько стадий переносят электроны на конечный акцептор электронов молекуляный кислород (рис. 1). Комплексы I, III и IV дыхательной цепи используют энергию, высвобождающуюся в ходе окислительно-восстановительных реакций, для векторного переноса протонов через мембрану и таким образом создают протондвижущую силу (Др) (рис. 1). Обратное движение протонов из межмембранного пространства в митохондриальный матрикс приводит к синтезу АТР из АDP и неорганического фосфата комплексом V. В ходе описанного выше процесса обеспечиваются потребности клеток мозга в энергии. Основная часть энергии, запасенная в виде АТР, необходима для осуществления ионного транспорта во время распространения потенциала действия по нервному волокну.

В отличие от схемы, изложенной в большинстве учебников биохимии, в которой электроны поставляются в дыхательную цепь только на уровне комплексов I и II, в этом процессе участвуют и другие ферменты. В головном мозге на внутренней митохондриальной мембране расположены две дополнительные дегидрогеназы, которые переносят электроны от своих субстратов к убихинону (Q): глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (GPDH), расположенная на внешней стороне [7], и дегидрогеназа электронпереносящего флавопротеина (ЭПФ:Q оксидоредуктаза), локализованная на внутренней стороне мембраны митохондрий и участвующая в процессе окисления жирных кислот [8] (рис. 1).

Комплекс I или протон-транслоцирующая NADH-дегидрогеназа (NADH:убихинон оксидоредуктаза) — это единственный фермент, отвечающий в матриксе митохондрий за окисление NADH и регенерацию NAD<sup>+</sup>, необходимого для стабильного протекания катаболических процессов (цикл трикарбоновых кислот, βокисление жирных кислот и процесс гликолиза). При переносе 2-х электронов от молекулы NADH на убихинон комплекс I переносит 4 протона через мембрану, таким образом, обладая наибольшим «коэффициентом полезного действия» по сравнению с остальными ферментами дыхательной цепи [9] (рис. 1).

Митохондриальный комплекс I представляет собой мембраносвязанный L-образный фермент, состоящий из гидрофобного мембранного и относительно гидрофильного периферийного домена, выступающего в митохондриальный матрикс. У млекопитающих этот фермент состоит из 45 субъединиц, и функции многих из них до сих пор не установлены. Из 14 консервативных субъединиц комплекса, составляющих каталитическую единицу бактериального фермента, 7 гомологичных мембранных полипептидов эукариот кодируются митохондриальной ДНК (ND субъединицы) [10]. Ферментативный комплекс можно подразделить на три функциональных модуля: периферический N-модуль, с которым связывается молекула NADH; центральный Q-модуль, где происходит восстановление убихинона; и расположенный в мембране Р-модуль, где происходит транслокация протонов через мембрану [11]. Все редокс-центры фермента локализованы в модулях N и Q. Комплекс I содержит одну молекулу прочно, но не ковалентно связанного флавинмононуклеотида (FMN) и восемь железо-серных кластеров. Флавин непосредственно принимает электроны, поступающие от NADH-матрикса, и далее передает их на цепочку последовательно расположенных железо-серных кластеров, обеспечивающих перенос электронов в примембранной области на молекулу убихинона. На конечном этапе восстановления убихинона, скорее всего, происходит образование промежуточного продукта - семихинона, участвующего в энергетическом сопряжении [12, 13]. Высвобождение энергии на последнем этапе переноса электро-



**Рис. 1.** Схема процесса окислительного фосфорилирования во внутренней мембране митохондрий. Несколько типов дегидрогеназ транспортируют электроны от субстратов на убихинон (Q) в мембране. ЭПФ:убихинон оксидоредуктаза (ETF:Q) переносит электроны, высвободившиеся на стадии дегидрирования различных ацил-КоА в процессе окисления жирных кислот в матриксе. На внешней стороне внутренней мембраны глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (GPDH) окисляет образующийся в процессе гликолиза глицерол-3-фосфат (G3P) с образованием дигидроксиацетонфосфата (DHAP). Комплекс II или сукцинатдегидрогеназа цикла трикарбоновых кислот окисляет янтарную кислоту (Suc) до фумаровой (Fum). Комплекс I (NADH:убихинон оксидоредуктаза) или NADH дегидрогеназа представлен в виде структурной модели (PDB 6G2J, атомы показаны в виде сфер). Комплекс I окисляет NADH, образующийся в процессе окисления жирных кислот, цикла трикарбоновых кислот и малат-аспартатного челночного механизма (Mal/Asp shuttle). Комплексы I, III и IV дыхательной цепи митохондрий транслоцируют протоны (H<sup>+</sup>) через мембрану (белые стрелки) создавая протондвижушую силу ( $\Delta p$ ), использующуюся комплексом V для синтеза ATP

нов приводит к конформационным изменениям, передающимся на Р-модуль фермента, где происходит трансмембранный перенос протонов ND-субъединицами [14].

В физиологических условиях комплекс I окисляет NADH и переносит электроны на молекулу убихинона. В этот процесс вовлечены почти все редокс-центры фермента. NADH:убихинон-редуктазная реакция чувствительна к действию хиноноподобных ингибиторов фермента, таких как ротенон и пиерицидин. В то же время комплекс I способен катализировать и другие реакции [15]. NADH может быть окислен так называемыми искусственными акцепторами электронов (феррицианид, гексааминорутений), которые вступают в реакцию с ферментом на уровне FMN или первых железо-серных кластеров. Эта реакция протекает в N-модуле, на нее не действуют специфические гидрофобные ингибиторы, и она не зависит от генных модификаций субъединиц, входящих в состав Qили Р-модуля. Комплекс I может также восстанавливать молекулярный кислород и образовывать активные формы кислорода (АФК) в виде супероксид-аниона ( $O_2^{-}$ ) или пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). В физиологических условиях комплекс I, вероятно, является основным производителем АФК в митохондриальной дыхательной цепи.

Особо следует отметить, что прямая реакция окисления NADH убихиноном обратима. Комплекс I может окислять мембранный QH<sub>2</sub> и

15 БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

восстанавливать NAD<sup>+</sup> в реакции обратного переноса электронов (RET, reverse electron transfer). Во время обратного переноса электроны переходят от высокопотенциальных редоксцентров фермента на центры с более отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом по направлению к FMN. Эта энергопотребляющая реакция требует наличия высокого соотношения QH<sub>2</sub>/Q и протондвижущей силы на мембране. Эти условия выполняются при окислении сукцината, глицерол-3-фосфата или жирных кислот. Соответствующие дегидрогеназы образуют QH<sub>2</sub>, а протондвижущая сила возникает благодаря совместной работе комплексов III и IV. Впервые поддерживаемая сукцинатом реакция обратного переноса электронов в митохондриях была показана in vitro более 60 лет назад [16, 17]. Недавно этот процесс снова привлек внимание в связи с исследованиями in vivo, где было установлено значительное повышение уровня сукцината, приводящее к условиям, способствующим протеканию обратного переноса электронов в некоторых патологических ситуациях, например при ишемии в различных тканях [18-22]. Обратный перенос электронов также обеспечивает наиболее высокую скорость продукции АФК комплексом I в интактных митохондриях или субмитохондриальных частицах [23–29]. Следует отметить, что во время окисления сукцината интактными митохондриями, после восстановления всего пула NAD<sup>+</sup> в матриксе, реакция переходит в стационарные условия, где все редокс-центры комплекса I восстановлены и уровень обратного переноса электронов определяется скоростью одноэлектронного восстановления кислорода комплексом I (образование супероксид-аниона). Скорее всего, в этих условиях восстановленный или полувосстановленный флавин комплекса I напрямую реагирует с кислородом с образованием АФК [24, 30–34].

Комплекс I дыхательной цепи митохондрий млекопитающих может существовать в двух формах – активной (А-) и деактивированной (Д-), отличающихся друг от друга структурной организацией и кинетическими свойствами, что было впервые показано в лаборатории А.Д. Виноградова [35-38]. Эти две различные каталитические формы фермента были описаны в препаратах митохондрий in vitro [39-45] и в различных тканях *ex vivo* [46–52], что указывает на роль А/Д-перехода в физиологической регуляции активности фермента. В предыдущих обзорах были подробно рассмотрены различия в кинетике и структуре между А- и Д-формами фермента, а также были приведены диагностические тесты, позволяющие различать эти формы [53-55], и поэтому свойства А/Д-перехода будут рассмотрены только кратко.

Комплекс I в условиях *in situ* или *in vitro* представляет собой равновесную смесь А- и Д-форм [53, 55]. При физиологических температурах при отсутствии субстратов равновесие сдвигается в сторону каталитически неактивной (деактивированной) Д-формы. В присутствии обоих субстратов (NADH и убихинона) Д-форма способна медленно переходить в каталитически активную А-форму путем изменения конформации во время одного или нескольких медленных (1-4 мин<sup>-1</sup>) каталитических полуоборотов фермента [53, 55]. Активация может осуществляться только в прямой NADH:убихинон-редуктазной реакции, но не во время RET, так как в Д-форме перенос электронов от убихинола на терминальный железо-серный кластер заблокирован [31, 56]. Деактивация фермента in situ происходит при ишемии тканей или метаболической гипоксии, когда перенос электронов на уровне комплекса IV остановлен, что приводит к прекращению дыхания, почти полному восстановлению мембранного пула убихинона (повышению соотношения QH<sub>2</sub>/Q) [46-51]. При отсутствии субстратного убихинона комплекс І перестает функционировать, что при физиологических температурах вызывает А/Д-переход. Интересно, что после остановки кровообращения деактивация комплекса I происходит быстрее в головном мозге, чем в сердечной ткани [57]. При реоксигенации и понижении отношения QH<sub>2</sub>/Q (т.е. при наличии обоих субстратов: убихинона и NADH) Д-форма комплекса I превращается в Аформу в течение нескольких минут, хотя кинетика активации *in situ* определена не до конца. Физиологические эффекторы, такие как свободные жирные кислоты [58] и ионы кальция [56], могут значительно увеличивать время перехода из Д- в А-форму, в то время как ионы натрия немного увеличивают скорость активации [59].

С использованием метода ковалентных кросс-сшивок и флюоресцентных меток мы определили, что структурные изменения при А/Дпереходе происходят рядом с убихинон-связывающим участком вблизи границы раздела модулей Q и P [40, 44, 60]. Установлено, что критически важный тиоловый остаток (Cvs39) гибкой гидрофильной петли мембранной субъединицы ND3 доступен для модификации только в Д-, но не в А-форме [37, 40]. Согласно результатам дифференциального мечения, деактивация приводит к повышению доступности и других субъединиц, таких как мембранно-связанная ND1 и NADPH-связывающая субъединица NDUFA9 [44, 60]. Удивительно, но мы не обнаружили повышения доступности какой-либо из субъединиц в А-форме [55]. Таким образом, вероятно, что Д-форма соответствует «расслабленной», в то время как А-форма соответствует «напряженной» конформации фермента. В дальнейшем это предположение получило подтверждение после анализа данных криоэлектронной микроскопии фермента, выделенного из митохондрий сердца быка [61] и дрожжей [62]. Две различные конформационные формы комплекса I были также описаны для фермента, выделенного из сердечной мышцы мыши [63]. Было показано, что значительные изменения также происходят в трансмембранных спиралях двух ND-субъединиц, кодируемых митохондриальной ДНК. Во время деактивации фермента несколько критических аминокислотных остатков поворачиваются внутри липидного бислоя примерно на 90° вокруг оси α-спирали. Структуры обеих каталитических форм доступны в PDB-формате (PDB 6G2J и 6G72) [63].

Несмотря на то что комплекс І был объектом интенсивных исследований более 50 лет, его структура была расшифрована относительно недавно [64–66], а механизм регуляции активности фермента *in situ* до сих пор не выяснен. Нарушение функционирования этого фермента является одной из причин возникновения наследственных митохондриальных паталогий [67], процессов старения [68] и нейродегенеративных заболеваний [69]. Комплекс I также является основным источником и одновременно мишенью для действия АФК в патологических состояниях [55].

#### ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ВО ВРЕМЯ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ МОЗГА

Прежде чем детально обсудить влияние ишемии/реперфузии на митохондриальный комплекс I, следует кратко рассмотреть изменения процесса энергетического обмена в клетках мозга, происходящие после остановки церебрального кровообращения. Количество глюкозы и альтернативных субстратов, таких как гликоген, лактат и жирные кислоты, значительно превышает доступное количество кислорода, необходимое для их окисления [5]. В любой конкретный момент времени количество кислорода, связанного с гемоглобином и в растворенном виде, оценивается как ~250 мкмоль на один мозг [70]. При средней скорости потребления кислорода во время бодрствования около 1,88 ммоль/мин/мозг [71] этого количества достаточно для поддержания метаболизма в течение ~10 с, что примерно соответствует времени потери сознания после полной остановки мозгового кровообращения. У мышей кислород мозга истощается полностью в течение всего нескольких секунд после остановки сердца [72]. Более 75% кислорода, поступающего в мозг, потребляется нейронами и астроцитами [5], и поэтому эти клетки наиболее чувствительны к недостатку кислорода. Дефицит кислорода оказывает сильное влияние на метаболические процессы, происходящие в митохондриях, которые обеспечивают клетки АТР в результате окисления субстратов, образующихся в процессе гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и окисления жирных кислот (рис. 1). У мышей и крыс падение уровня АТР происходит в течение 2–5 с после прекращения мозгового кровообращения [3, 73]. Остановка работы дыхательной цепи митохондрий и образования АТР в результате ишемии определяется как первичная энергетическая недостаточность. При отсутствии кислорода останавливается процесс переноса электронов в комплексе IV. Это приводит к полному восстановлению всех подвижных переносчиков электронов (NAD(P)Н и убихинон), а также практически всех редокс-центров дыхательной цепи. Ввиду избытка метаболических субстратов происходит быстрое накопление интермедиатов катаболизма (сукцинат, свободные жирные кислоты, ацил-КоА и глицерол). В свою очередь, энергетический кризис, вызванный резким снижением скорости образования АТР, оказывает отрицательное влияние на ионный гомеостаз. Так, в физиологических условиях механизм ионного транспорта поддерживает внутри клетки 30× градиент ионов калия по сравнению с

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

внеклеточной жидкостью. При этом внутриклеточная концентрация ионов натрия в 7 раз меньше, а концентрация ионов кальция на пять порядков ниже их концентрации вне клеток. Отсутствие АТР приводит к остановке энергозависимых ионных насосов и нарушению ионного баланса. В итоге происходит падение потенциала на плазматической мембране и резкое увеличение концентрации ионов натрия внутри клеток. В результате активности Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> обменника плазматической мембраны происходит значительное повышение концентрации ионов кальция как в цитоплазме, так и внутри митохондрий, и развитие отека мозга [74, 75]. В то же время в ходе анаэробного гликолиза происходит переработка остаточных углеводов с образованием лактата и закисление цитоплазмы клеток. Степень закисления зависит от начальной концентрации глюкозы и гликогена в клетках мозга до возникновения ишемии и в дальнейшем влияет на степень нарушения ионного баланса клеток мозга. Кроме того, нейроны также исключительно чувствительны к так называемой глутаматной эксайтотоксичности. Повышение концентрации ионов кальция приводит к высвобождению из синаптических везикул нейротрансмиттера глутамата. В результате ишемического нарушения поглощения глутамата астроцитами, происходит активация глутаматных ионотропных рецепторов, повышающая энергозависимую электрическую активность нейронов. Это приводит к еще большему нарушению ионного баланса и дальнейшему снижению энергетического потенциала клетки, усиливающим процесс повреждения нейронов [5].

Постоянная ишемия приводит в конечном счете к гибели мозговой ткани в результате повреждения нейронов и олигодендроцитов в области, в которую перекрытая артерия поставляла кислород и питательные вещества [76]. Необходимым условием для выживания клеток является восстановление снабжения кислородом или реоксигенация, поэтому кровоток должен быть восстановлен в течение 15-30 мин (реперфузия). Ткань, подвергшуюся воздействию ишемии, можно формально подразделить на «ядро», в котором наблюдается резкое снижение содержания кислорода, и окружающую его «пенумбру», в которой остаточный кровоток обеспечивает минимальную доставку кислорода. Клетки «ядра» и «пенумбры» отличаются друг от друга по динамике падения уровня АТР, степени увеличения содержания лактата, уровню закисления и концентрации ионов кальция в цитоплазме. Во время реперфузии «ядро» и «пенумбра» также различаются по динамике восстановления уровня кислорода и скорости его потребления, что отражает различия в степени повреждения клеток и состоянии микроциркуляторного русла. Необратимо поврежденные клетки в области «ядра» в конечном итоге умирают, и через несколько недель эта область превращается в очаг поражения, состоящий из некротизирующей ткани. Клетки «пенумбры», в которых поддерживается неполный уровень энергетического метаболизма, могут выжить в зависимости от длительности ишемии и интенсивности реоксигенации [77]. Реперфузия приводит к возобновлению функционирования дыхательной цепи митохондрий и восстановлению уровня АТР, отвечающего потребностям клеток в энергии. Ранние стадии реперфузии также ассоциируются с краткосрочным увеличением уровня АФК, которые, вероятно, образуются несколькими ферментативными системами, включая митохондрии. Это приводит к развитию окислительного стресса и дальнейшему повреждению ткани. В нескольких моделях ишемии/реперфузии мозга *in viv*о было показано, что уровень АТР и интенсивность окислительного фосфорилирования могут снова снижаться спустя несколько часов после реперфузии. Это явление принято называть вторичной энергетической недостаточностью, и природа его до сих пор не ясна [3-5].

#### ВЛИЯНИЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ТКАНИ МОЗГА НА СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА I

Ишемия/реперфузия мозга и митоходриальная дыхательная цепь. Еще в первых работах, выполненных с использованием электронной микроскопии и гистохимического анализа, были выявлены набухание митохондрий и разрушение их внутренней мембраны после долговременной ишемии [78, 79]. При окрашивании срезов постишемических тканей тетразолиевыми солями снижение активности NADH-зависимых дегидрогеназ происходило раньше, чем нарушение сукцинат-зависимой активности [78, 80]. Сейчас эти результаты можно интерпретировать как прямое доказательство наибольшей чувствительности комплекса I к действию ишемии по сравнению с другими компонентами дыхательной цепи. Впервые ингибирование дыхания митохондрий после кислородной депривации было продемонстрировано на модели глобальной ишемии обескровленных крыс [81, 82]. Уже после двухминутной ишемии скорость дыхания митохондрий при использовании в качестве субстрата глутамата составляла только 25% от уровня потребления кислорода образцами, полученными из контрольных животных. В модели компрессионной ишемии мозга кроликов было показано существенное снижение ADP-стимулируемого дыхания на малате и глутамате через 20—40 мин после увеличения внутричерепного давления [83, 84]. Аналогичные результаты были получены при изучении двусторонней ишемии мозга у монгольских песчанок. В этом случае было показано, что после 60 мин ишемии митохондриальное дыхание падало на 50% [85]. Уже исходя из ранних работ, можно сделать вывод, что ишемия мозга ингибирует митохондриальное дыхание только в случае использования субстратов NAD<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ, генерирующих NADH для комплекса I.

Патофизиология первичной энергетической недостаточности во время ишемии, продемонстрированная еще в ранних работах, усложняется тем, что при возобновлении кровоснабжения во время реперфузии или реоксигенации тяжесть исходного повреждения ткани затем усугубляется. Реперфузия, необходимая для выживания ткани, в то же время вызывает множественные непрямые или вторичные последствия, влияющие на жизнеспособность клеток в пораженной области. Результаты, полученные с использованием модели глобальной ишемии мозга у крыс, свидетельствуют о почти полном восстановлении дыхания с малатом и глутаматом или сукцинатом через 30 мин после возобновления кровотока, несмотря на то что в результате ишемии дыхание на всех субстратах было значительно снижено [86, 87]. В этих работах, выполненных с использованием моделей как полной, так и неполной ишемии, дыхание с малатом и глутаматом было нарушено в большей степени, чем в случае дыхания, поддерживаемого сукцинатом. Однако при неполной ишемии через 30 мин реперфузии наблюдали дальнейшее снижение интенсивности дыхания. Это свидетельствует о том, что тяжесть повреждения ткани определяют глубина ишемии и интенсивность реперфузии [86, 87]. Возможный сценарий развития поражения ткани в результате ишемии/реперфузии становится более сложным в связи с феноменом так называемой вторичной недостаточности энергии. Так, кратковременная локальная ишемия у крыс приводила к двухкратному падению ADP-стимулируемого дыхания с использованием малата и пирувата, которое сопровождалось полным восстановлением активности через 1 ч после реперфузии и постепенным вторичным снижением интенсивности дыхания в течение 3-24 ч [88]. Этот эффект зависел от участка ткани мозга, который был взят для проведения анализа. Анализ дыхания препарата интактных митохондрий в сходной модели [89] подтвердил изменения интенсивности

дыхания после ишемии/реперфузии, когда сначала происходило снижение комплекс І-зависимого дыхания после ишемии, реоксигенация вызывала быстрое восстановление дыхания, которое затем снова снижалось.

Практические аспекты. Есть несколько практических соображений, которые следует принимать во внимание при обсуждении данных по измерению митохондриального дыхания в образцах головного мозга при ишемии/реперфузии. Проблема в интерпретации результатов, полученных в более ранних работах, заключается в том, что лишь немногие исследования использовали одни и те же модели ишемии in vivo, применяли одни и те же анестетики или даже использовали одни и те же субрегионы мозга для отбора проб. Эти параметры влияют на результирующие физиологические последствия при использовании этих моделей, а также на биохимические характеристики полученных образцов. Измерение потребления кислорода препаратом интактных митохондрий, выделенных из пораженной области мозга после ишемии/реперфузии, действительно может служить удобным и физиологически значимым маркером функции митохондрий. Однако данные измерения дыхания должны интерпретироваться с осторожностью. Ткань мозга состоит из различных типов клеток: например, в кортексе мозга мыши имеется почти равное количество нейронов и глиальных клеток, тогда как в мозжечке соотношение глия/нейроны составляет 1:6 [90]. Поэтому препараты интактных митохондрий головного мозга, полученные стандартными методами дифференциального центрифугирования, скорее всего, представлены фракциями митохондрий из различных типов клеток, и вклад каждой фракции зависит от области мозга, взятой для выделения. Поскольку абсолютное содержание митохондрий и интенсивность окислительного фосфорилирования в нейронах и астроцитах различны и эти типы клеток по-разному реагируют на ишемию/реперфузию, то данные, полученные при использовании классического препарата интактных митохондрий мозга, трудно отнести исключительно к нейрональным митохондриям.

На практике для измерения потребления кислорода изолированными митохондриями используют несколько комбинаций субстратов для инициации дыхания различными убихинон-зависимыми дегидрогеназами дыхательной цепи. Например, для восстановления хинона может быть использован пальмитоилкарнитин, как субстрат мембраносвязанной ЭПФ:убихинон оксидоредуктазной системы окисления жирных кислот [91]. Цитоплазматический глицерол-3-фосфат является субстратом митохондриальной глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, которая переносит электроны на пул хинонов и далее на комплексы III-IV [92]. Пара сукцинат и глутамат обеспечивает дыхание через комплексы II-III-IV, в то время как пары малат и пируват или малат и глутамат используются для восстановления NAD<sup>+</sup> в матриксе, обеспечивая перенос электронов от комплекса I далее на комплексы III-IV. Эффект ишемии/реперфузии на митохондрии, определяемый как изменение интенсивности дыхания во время окисления митохондриями различных субстратов, не может отражать влияние только на ферменты дыхательной цепи (т.е. комплексы I-IV). Потребление кислорода митохондриями является функцией, определяемой несколькими параметрами, такими как состав и целостность мембраны, ее протонная проводимость, транспорт субстратов, активность NAD<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот, АТР-синтазы и в конечном итоге комплексов дыхательной цепи. Поэтому, чтобы выявить нарушения отдельных ферментов дыхательной цепи, оценку активности индивидуальных комплексов необходимо проводить, используя пермеабилизованые митохондрии или фрагменты внутренней мембраны. Можно предположить, что на ранних стадиях реперфузии (до 3-4 ч) содержание митохондрий в образце существенно не меняется [27, 74, 93]. Однако на более поздних стадиях некротическая и апоптотическая деградации, происходящие в тканях, могут привести к уменьшению количества живых клеток и, следовательно, к кажущемуся падению ферментативной активности, которое происходит из-за снижения количества митохондрий. Содержание митохондрий в образце обычно оценивают по специфической активности цитратсинтазы или путем измерения количества цитохромов на мг общего белка. Скорее всего, наблюдавшееся в некоторых ранних работах вторичное падение интенсивности дыхания после его восстановления во время реперфузии можно отнести на счет уменьшения содержания митохондрий вследствие лизиса ткани, иными словами, снижения количества живых клеток в участке, взятом для анализа. Так, снижение интенсивности митохондриального дыхания через 12-56 ч после возобновления кровотока в модели полной церебральной ишемии у кошек можно объяснить распадом ткани, а также относительно жесткими условиями протеолиза при выделении фракции митохондрий [94].

Ишемия/реперфузия мозга и митохондриальный комплекс I. В ранних работах было показано прямое влияние ишемии/реперфузии на митохондриальное дыхание с использованием субстратов NAD<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ (малат и пируват или малат и глутамат). Сейчас эти результаты можно интерпретировать как явные признаки повреждения комплекса I после ишемии/реперфузии. Насколько известно автору, повреждения митохондриального комплекса I, индуцированные ишемией/реперфузией, были впервые продемонстрированы с использованием модели ишемии головного мозга песчанок, у которых так же, как и у человека, имеется Виллизиев артериальный круг. Это наилучшая модель общей или локальной ишемии ткани мозга человека, по сравнению с обычно используемыми крысиными и мышиными моделями. Церебральная ишемия достигалась в результате окклюзии внутренней сонной артерии в течение 30 мин. Через различные промежутки времени после реперфузии выделяли митохондрии из свежей ткани и подвергали их анализу [95, 96]. Ишемия вызывала снижение комплекс І-зависимого дыхания (малат и пируват или малат и глутамат в качестве субстратов дыхания) на ~25%, затем оно постепенно восстанавливалось в течение первых 30 мин реперфузии и через 2 ч снова снижалось. Проведенный анализ отдельных компонентов дыхательной цепи показал, что ингибирование дыхания при ишемии было вызвано снижением NADH:убихинон-редуктазной активности комплекса І. При этом не было выявлено существенных изменений в скорости окисления сукцината (комплексы II-III-IV) и активности цитратсинтазы. На модели краткосрочной локальной ишемии у крыс также было показано, что после реперфузии митохондриальное дыхание с использованием малата и глутамата сначала восстанавливалось, а затем через 4 ч происходило его повторное снижение [97]. Результаты, полученные на моделях повреждений при ишемии/реперфузии у взрослых животных, сопоставимы с данными, полученными при использовании неонатальной модели гипоксииишемии (модель Rice–Vannucci) [27]. Дефицит кислорода в течение 15 мин снижал поддерживаемое малатом и глутаматом дыхание почти в два раза. Реоксигенация приводила к почти полному восстановлению дыхания после 4 ч реперфузии, а затем интенсивность дыхания снова начинала снижаться. Ишемия/реперфузия не оказывали видимого влияния на окисление сукцината [27]. Недавно с помощью метода позитронно-эмиссионной томографии in situ было продемонстрировано ишемическое подавление активности митохондрий вследствие ингибирования комплекса I после 3 ч окклюзии средней церебральной артерии мозга приматов (МСАо) [98].

Если снижение активности митохондриального комплекса I было показано в нескольких работах по изучению последствий ишемии/реперфузии мозга, то механизм инактивации фермента до сих пор не был определен. Поэтому недавно мы снова исследовали временную динамику потери активности фермента во время ишемии/реперфузии с использованием двух моделей, а именно: МСАо модели инсульта у взрослых мышей [93] и неонатальной модели гипоксии-ишемии мозга [49, 50, 99]. Нами было подтверждено, что ишемия/реперфузия мозга вызывает ингибирование митохондриального дыхания вследствие инактивации комплекса I. Динамика падения активности носила многофазный характер в модели МСАо у взрослых мышей [93] и в то же время была двухфазной в неонатальной модели гипоксии-ишемии [99]. В обеих моделях ишемия вызывала сильное ингибирование комплекса І. Этот результат согласуется с результатами предыдущих работ Almeida et al. [95], Yoshimoto et al. [97] и Niatsetskaya et al. [27]. После 10–15 мин реоксигенации активность комплекса I почти полностью восстанавливалась, а затем снова снижалась после 4 ч. Нами были определены по крайней мере два не описанных ранее различных механизма нарушения функционирования комплекса I, происходящих в различные моменты времени после реперфузии. Один из них заключается в диссоциации FMN, эндогенного кофактора комплекса I [34, 93, 99], а другой механизм представляет собой модификацию критически важной SHгрупп(ы) после конформационного А/Д-перехода фермента [49, 50, 53, 55]. Эти механизмы более подробно обсуждаются ниже.

Высвобождение флавина. С помощью *in vivo* модели неонатальной гипоксии-ишемии [99] и МСАо-модели ишемического инсульта у взрослых мышей [93] мы обнаружили, что ишемия/реперфузия индуцировала инактивацию комплекса I. Снижение активности в препарате было ассоциировано со снижением содержания FMN в ферменте. Одна молекула FMN нековалентно связана с NDUFV1 субъединицей (51 кДа) N-модуля комплекса I и непосредственно взаимодействует с субстратами – NADH или NAD<sup>+</sup> [64, 65, 100]. Мы определили механизм высвобождения FMN из фермента во время ишемии/реперфузии. В наших исследованиях [34, 93, 99] ишемия индуцировала диссоциацию FMN вследствие стимуляции обратного переноса электронов через комплекс I. На различных моделях *in vivo* было показано, что недостаток кислорода вызывает значительное увеличение содержания сукцината, одного из субстратов реакции обратного переноса [18, 20-22]. В неонатальной модели ишемии/реперфузии [22] было обнаружено 30× увеличение уровня сукцината, который возвраща-

ется к исходным значения только после 30 мин реперфузии. При ишемии также происходит полное ингибирование β-окисления жирных кислот, что приводит к быстрому накоплению в ткани различных неэтерифицированных жирных кислот и ацил-КоА [101, 102]. Кроме того, во время ишемии мозга также наблюдается накопление глицерол-3-фосфата, еще одного субстрата, поддерживающего обратный перенос [103]. Во время ишемии, когда уровень кислорода в тканях очень низок (но не равен нулю), или после реперфузии эти субстраты вместе с сукцинатом могут восстанавливать убихинон и поддерживать условия обратного переноса, когда электроны от убихинола переносятся к нуклеотид-связывающему центру комплекса I. В стационарных условиях этот процесс поддерживает высокий уровень восстановленности FMN в комплексе I, что и вызывает диссоциацию кофактора [29, 34]. Апофермент, лишенный FMN, не способен катализировать физиологическое окисление NADH, снижая эффективность дыхательной цепи и образования АТР.

Последствия диссоциации FMN не ограничиваются только нарушением функционирования комплекса І. Свободный восстановленный флавин в водной среде быстро реагирует с молекулярным кислородом с образованием радикала супероксид-аниона и пероксида водорода (константа скорости равна 250 М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>) [104, 105]. Содержание комплекса I в препаратах митохондрий мозга мыши, выделяемых по стандартной методике [29], составляет около 20-50 пкмоль на 1 мг белка (Stepanova и Galkin, неопубликованные результаты), а степень инактивации комплекса I составляет около 25-35% [93, 99]. Следовательно, после индуцированной ишемией диссоциации FMNH<sub>2</sub> концентрация свободного флавина в матриксе может достигать 15-30 мкМ (учитывая объем митохондриального матрикса, составляющего не более 1 мкл на мг белка). При такой высокой концентрации пара FMN/FMNH<sub>2</sub> может быть вовлечена в реакцию дисмутации, приводящую к образованию полувосстановленных радикалов флавина [105]. Кроме того, флавин может служить в качестве редокс-медиатора между донорами электронов, такими как NADH, и доступными акцепторами электронов в матриксе. Образование радикала супероксид-аниона и пероксида водорода в результате неферментативной реакции восстановленного флавина с кислородом может способствовать кратковременному повышению уровня АФК на начальных стадиях реперфузии. Дальнейшие превращения окисленного свободного флавина предсказать трудно. Часть FMN связывается с апоформой комплекса I, другая часть флавина может быть

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

дефосфорилирована с образованием рибофлавина или превратиться в FAD с помощью ATP-зависимой FAD-пирофосфатазы [106].

Еще с самых первых попыток выделения комплекса I стало ясно, что FMN легко теряется в ходе очистки или диализа препаратов митохондриальной NADH-дегидрогеназы [100]. Индуцированная восстановлением фермента обратимая диссоциация FMN показана ранее для трехсубъединичного фрагмента [107] и мембраносвязанного препарата [108] комплекса І млекопитающих in vitro и недавно - для бактериального фермента [109]. Комплекс I, восстановленный NADH, быстро теряет FMN. Добавленный экзогенно флавин предотвращает диссоциацию, а также восстанавливает активность фермента. Нами было показано, что в условиях in vitro добавление FMN во время инкубации интактных митохондрий клеток мозга в условиях обратного переноса электронов частично предотвращает инактивацию комплекса I [99]. Следует также особо отметить, что введение предшественника FMN, рибофлавина (витамина  $B_2$ ), перед неонатальной ишемией/реперфузией мозга in vivo на 50% снижает величину церебрального инфаркта, повышает активность комплекса I и уменьшает неврологический дефицит по сравнению с контрольными животными. Следует отметить, что анализ крови, проведенный у пациентов сразу после инсульта, показал дефицит рибофлавина у значительной части больных, хотя клиническая значимость этих результатов неясна [110]. Наши данные [34, 93, 99] дают механистическое объяснение показанного в недавних клинических работах нейропротекторного действия препаратов рибофлавина у пациентов с ишемическим инсультом [111]. Профилактическое введение рибофлавина беременным женщинам может быть потенциально использовано в качестве дополнения к терапии против ишемического повреждения некоторых патологических состояний плода при опасности ишемии мозга.

Окисление тиоловых групп. Многочисленные исследования показали, что окислительный стресс, вызванный реоксигенацией после реперфузии, является одним из основных факторов повреждения тканей при ишемии/реперфузии мозга [112, 113] и что эндогенный глутатион является основным компонентом поддержания окислительно-восстановительного баланса в митохондриях. Вероятно, во время ишемии/реперфузии восстановленный глутатион и другие системы тиол-зависимых редуктаз предотвращают окисление или восстанавливают поврежденные в результате окислительного стресса SH-группы белков [6, 114, 115]. На нескольких моделях *in*  *vivo* была подтверждена нейропротекторная роль введения различных антиоксидантов [116–118], но механизмы их действия до конца не изучены.

Используя МСАо модель инсульта [93], мы обнаружили, что после восстановления активности митохондриального комплекса I в результате реоксигенации дополнительные 30 мин рециркуляции приводили к повторному снижению активности фермента. Инкубация митохондриальных мембран, выделенных из этих образцов, с восстановленным глутатионом частично реактивировала комплекс І. Поэтому нами было предположено, что вторичная инактивация фермента, вероятно, была вызвана окислительной модификацией критически важных тиоловых групп комплекса I [93]. Нами было показано, что локальная ишемия в течение 20 мин приводила к снижению общего содержания глутатиона в поврежденной области мозга [93]. Введение проницаемого для клеток этилового эфира глутатиона на начальном этапе фазы реоксигенации восстанавливало содержание глутатиона, предотвращало снижение активности комплекса I, было ассоциировано с меньшими размерами инфаркта, а также снижало неврологический дефицит [93]. Похожие результаты были продемонстрированы ранее в крысиной модели инсульта, но механизм нейропротекции не был определен [118].

Какие остатки цистеина определяют чувствительность фермента к окислительному стрессу? Учитывая результаты наших ранних работ [41, 47] и работ группы Murphy [48, 119], было бы разумным ожидать, что модификация ключевой тиоловой группы комплекса I, вовлеченной в конформационный А/Д-переход, может способствовать окислительному повреждению ткани мозга при ишемии/реперфузии. В различных работах было показано, что отсутствие кислорода in vivo стимулирует изменение конформации комплекса I и способствовует его превращению в деактивированную Д-форму [45-48, 51]. Необходимо подчеркнуть, что Дформа является как бы «спящим» состоянием комплекса I, а не инактивированным или модифицированным ферментом; Д-форма может быть быстро «реактивирована» в присутствии субстрата [41, 54]. Исторически термин «деактивация» был использован для того, чтобы подчеркнуть разницу в кинетических характеристиках двух форм *in vitro*. В то же время Д-форма фермента in situ может рассматриваться как «находящаяся в состоянии покоя», но не инактивированный фермент. Если специально это не указано, то при проведении стандартной оценки активности комплекса I фермент предварительно активируется, и обе формы вносят вклад в измеряемую скорость ферментативной реакции [54].

Конформационный А/Д-переход приводит к экспонированию наружу остатка Cys39 субъединицы ND3 [40, 55]. Ковалентная модификация этой ключевой SH-группы блокирует процесс реактивации фермента. Окислительные агенты, такие как АФК и пероксинитрит, вызывают необратимое ингибирование фермента, в то время как модификация цистеина с помощью низкомолекулярных нитрозотиолов обратима [41, 47]. А-форма фермента не чувствительна к обработке подобными SH-реагентами. Следовательно, чувствительность митохондриального комплекса I к окислительному стрессу, вызванному реперфузией, может быть определена степенью экспонирования ключевого остатка цистеина, вовлеченного в процесс А/Д-перехода, индуцированного ишемией.

Недавно нами были получены подтверждения существования конформационного А/Д-перехода комплекса I митохондрий мозга. Было показано, что комбинация ишемии и гипоксии в неонатальной модели ишемии/реперфузии, предложенной Rice-Vannucci, приводит к повышению содержания Д-формы от базового уровня в 10% до 35% у крыс [49] и от 5 до 40% у мышей [50]. Была обнаружена лишь частичная деактивация фермента, что неудивительно из-за погрешностей экстракции потенциально поврежденной ткани в моделях локальной ишемии, которая выполнялась еще до развития видимого повреждения кортекса мозга. Видимо поэтому в модели глобальной ишемии мозга в течение 15 мин после остановки сердца у мышей фракция Д-формы в мозге увеличивалась почти до 90% [120].

Следовательно, после ишемии значительная часть молекул фермента находится в Д-форме, и критически важная SH-группа субъединицы ND3 экспонирована наружу и доступна для модификации. Реперфузия способствует реактивации Д-формы и образованию А-формы. Также реперфузия индуцирует окислительный стресс, приводящий к необратимому ингибированию фермента. Мы обнаружили, что обратимая защитная модификация критически важного остатка цистеина в Д-форме путем введения во время реперфузии митохондриально-направленного нитрозилирующего areнта MitoSNO [48, 119] приводит к снижению уровня окислительного стресса и способствует повышению выживаемости нейронов при ишемии/реперфузии в неонатальной модели [50]. Благотворное действие MitoSNO можно объяснить с помощью двух возможных механизмов. Один заключается в отмеченной ранее защите тиоловой группы критического остатка цистеина от необратимой окислительной модификации и тем самым от инактивации комплекса І. Другим механизмом

является задержка реперфузионно-индуцированного Д/А перехода, ограничивающая продукцию АФК А-формой комплекса I [49, 50].

На основании недавно полученных результатов нами был предложен следующий сценарий для описания механизма повреждения комплекса I во время ишемии/реперфузии (рис. 2). В условиях нормоксии фермент в основном находится в А-форме и катализирует физиологическое окисление NADH убихиноном, способствуя образованию протондвижущей силы. При этом критически важный остаток Cys39 субъединицы ND3 не экспонирован наружу и степень восстановления фермента не максимальна (рис. 2, *a*). Недостаток кислорода вызывает накопление сукцината и глицерол-3фосфата, которые могут диффундировать из лишенного кислорода «ядра» и становятся доступными для митохондрий, находящихся в более оксигенированной «пенумбре». Эти субстраты

могут окисляться митохондриями в реакции обратного переноса электронов, что резко увеличивает восстановленность комплекса І. Обратный перенос, вероятно, также приводит к значительному повышению генерации АФК комплексом I (рис. 2, б). Поддержание фермента в восстановленном состоянии индуцирует диссоциацию FMNH<sub>2</sub> (рис. 2,  $\delta$ ). Во время реперфузии высвободившийся кофактор может подвергаться автоокислению, приводя к неферментативному образованию АФК, и после этого, возможно, снова связываться с апоферментом (рис. 2, в). В то же самое время недостаточный поток электронов через фермент во время ишемии ткани может вызывать А/Д конформационный переход комплекса І. В результате изменения конформации белка происходит экспонирование ключевого остатка Cys39 субъединицы ND3 (рис. 2, г). Деактивация комплекса I приводит к блокировке обратного переноса элек-



**Рис. 2.** Схематическое представление предполагаемых эффектов ишемии/реперфузии на митохондриальный комплекс I. *a* – В присутствии кислорода комплекс I катализирует окисление NADH убихиноном (Q) в прямой реакции, и большая часть комплекса I находится в каталитически активной A-форме, когда критический остаток Cys39 субъединицы ND3 недоступен;  $\delta$  – в условиях ишемии уровень сукцината повышается, и поэтому активная фракция фермента способна катализировать реакцию обратного переноса электронов (RET, reverse electron transfer) от убихинола на флавин (FMN), находящийся в нуклеотид-связывающем центре комплекса I. Обратный перенос электронов поддерживает наиболее высокую скорость образования AФK (ROS) в комплексе I. Восстановление флавина (FMNH<sub>2</sub>) в условиях обратного переноса приводит к его диссоциации и инактивации фермента; *a* – свободный FMNH<sub>2</sub> может неферментативно реагировать с молекулярным кислородом с образованием AФК и окисленного флавина, который может снова связаться с апо-комплексом I; *a* – длительная ишемия приводит к изменению конформации комплекса I, образованию Д-формы и экспонированьо наружу остатка Cys39 в ND3 субъединице; *d* – этот остаток цистеина является мишенью для необратимой окислительной модификации под действием АФК или пероксинитрита во время реоксигенации, но может быть защищен путем временной модификации митохондриально-направленным нитирозилирующим агентом MitoSNO

тронов ферментом [35], что, в свою очередь, предотвращает образование АФК и диссоциацию FMN. Степень диссоциации FMN и превращения А-формы фермента в Д-форму зависят от времени и глубины ишемии («ядро» и «пенумбра») и метаболического статуса клетки.

Реперфузия ишемической ткани вызывает реактивацию комплекса I за промежуток времени от нескольких секунд до нескольких минут. Такая задержка активации фермента на ранних стадиях реперфузии препятствует резкому окислению накопившихся молекул NADH в прямой или сукцината в обратной реакции, что может служить в качестве внутреннего защитного механизма, направленного против повышенной генерации АФК (рис. 2, г). В то же время индуреперфузией окислительный цированный стресс может привести к модификации SHгрупп(ы) в Д-форме комплекса I и потере активности фермента. Если во время реперфузии присутствует MitoSNO, то тогда часть Д-формы фермента подвергается нитрозилированию по экспонированному ключевому остатку Cys39 ND3 субъединицы (рис. 2,  $\partial$ ). Это временно блокирует комплекс I в Д-форме, снижая образование АФК на ранних стадиях реоксигенации. Более того, нитрозилирование защищает эту ключевую SH-группу от необратимой модификации во время окислительного стресса, вызванного реоксигенацией. Ѕ-нитрозилированный комплекс I может постепенно восстанавливаться тиол-редуктазами митохондриального матрикса [48] с образованием Д-формы и в конечном итоге превращаться в каталитически активную Аформу фермента.

Данные, приведенные в этом обзоре, позволяют разработать экспериментальные подходы, чтобы определить, защищают ли А/Д-переход и потеря FMN комплексом I ткань мозга во время ишемии/реперфузии или, наоборот, способствуют ее повреждению. В зависимости от доступности кислорода и продолжительности ишемии диссоциация флавина и А/Д-переход могут быть как вредными, так и полезными для восстановления ткани после ишемии/реперфузии. С одной стороны, высвобождение FMN из комплекса I и обратимый переход из активного в неактивное состояние приводят к снижению образования ферментом АФК на ранних стадиях реоксигенации. С другой стороны, восстановленный флавин в свободном состоянии может неэнзиматически реагировать с кислородом, приводя к кратковременной генерации АФК, в то время как комплекс І не функционален. То же самое верно и для А/Д-перехода: обратимая деактивация замедляет продукцию АФК при реоксигенации, но делает фермент уязвимым для окислительного повреждения в результате модификации остатка Cys39 АФК или пероксинитритом.

#### ПЕРСПЕКТИВЫ

Повреждение митохондрий во время ишемии мозга скорее всего происходит путем различных механизмов. Нарушение функционирования комплекса I во время ишемии и последующей реоксигенации мозга хорошо известно, хотя механизм повреждения до сих пор не был установлен. Нами было предложены два различных механизма инактивации фермента: диссоциация флавинового кофактора, индуцированная обратным переносом электронов при восстановлении комплекса I, и специфическая модификация критически важной SH-группы одной из субъединиц фермента. Аспект нашей работы, имеющий наибольшее значение, – это определение специфичности этих механизмов для различных типов клеток. Необходимо с помощью признанных *in vivo* моделей выяснить степень повреждения митохондрий нейронов и астроцитов в результате ишемии/реперфузии мозга. Чтобы определить аминокислотные остатки, подвергающиеся окислительной модификации, приводящей к потере функции фермента, необходимо провести протеомные исследования посттрансляционных модификаций аминокислотных остатков митохондриального комплекса I после ишемии/реперфузии [121]. С более широкой точки зрения, для того чтобы в дальнейшем использовать полученные результаты в рамках трансляционной медицины, необходимо выяснить происходят ли эти процессы у людей во время ишемического инсульта или неонатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии.

Финансирование. Выполнение работы в лаборатории автора было поддержано грантом NS-100850 (NIH USA) и грантами G1100051 и MR/L007339/1 (MRC UK).

Благодарности. Автор работы искренне благодарен своим коллегам Вадиму Тену и Анне Степановой за ценные замечания при подготовке данной работы. Автор выражает благодарность Вере Георгиевне Гривенниковой за помощь в переводе данного обзора на русский язык.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee, A.C., Kozuki, N., Blencowe, H., Vos, T., Bahalim, A., Darmstadt, G.L., Niermeyer, S., Ellis, M., Robertson, N.J., Cousens, S., and Lawn, J.E. (2013) Intrapartumrelated neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990, *Pediatr. Res.*, 74, 50–72, doi: 10.1038/pr.2013.206.
  Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J.,
- Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., et al. (2012) Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association, *Circulation*, **125**, e2–e220, doi: 10.1161/CIR. 0b013e31823ac046.
- Siesjo, B.K., Elmer, E., Janelidze, S., Keep, M., Kristian, T., Ouyang, Y.B., and Uchino, H. (1999) Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure, *Acta Neurochir*. *Suppl.*, **73**, 7–13.
- Vannucci, R.C., Towfighi, J., and Vannucci, S.J. (2004) Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat, J. Cereb. Blood Flow Metab., 24, 1090–1097.
- 5. Hertz, L. (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective, *Neuropharmacology*, **55**, 289–309, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023.
- Sims, N.R., and Muyderman, H. (2010) Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke, *Biochim. Biophys. Acta*, 1802, 80–91, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.003.
- Mracek, T., Drahota, Z., and Houstek, J. (2013) The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, 1827, 401–410, doi: 10.1016/j.bbabio.2012.11.014.
- 8. Watmough, N.J., and Frerman, F.E. (2010) The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1910–1916, doi: 10.1016/j.bbabio.2010.10.007.
- Galkin, A.S., Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (1999) H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles, *FEBS Lett.*, 451, 157–161.
- Hirst, J. (2013) Mitochondrial complex I, Annu. Rev. Biochem., 82, 551–575.
- Brandt, U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductases, *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 69–92.
- Burbaev, D.S., Moroz, I.A., Kotlyar, A.B., Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1989) Ubisemiquinone in the NADHubiquinone reductase region of the mitochondrial respiratory chain, *FEBS Lett.*, **254**, 47–51.
- De Jong, A.M., and Albracht, S.P. (1994) Ubisemiquinones as obligatory intermediates in the electron transfer from NADH to ubiquinone, *Eur. J. Biochem.*, 222, 975–982.
- Cabrera-Orefice, A., Yoga, E.G., Wirth, C., Siegmund, K., Zwicker, K., Guerrero-Castillo, S., Zickermann, V., Hunte, C., and Brandt, U. (2018) Locking loop movement in the ubiquinone pocket of complex I disengages the proton pumps, *Nat. Commun.*, 9, 4500, doi: 10.1038/s41467-018-06955-y.
- Vinogradov, A.D., Gavrikova, E.V., Grivennikova, V.G., Zharova, T.V., and Zakharova, N.V. (1999) Catalytic properties of mitochondrial NADH-ubiquinone reductase (Complex I), *Biochemistry (Moscow)*, 64, 136–152.
- Chance, B., and Hollunger, G. (1960) Energy-linked reduction of mitochondrial pyridine nucleotide, *Nature*, 185, 666–672.
- 17. Klingenberg, M., and Slenczka, W. (1959) Pyridine nucleotide in liver mitochondria. An analysis of their redox relationships, *Biochemische Zeitschrift*, **331**, 486–517.
- Folbergrova, J., Ljunggren, B., Norberg, K., and Siesjo, B.K. (1974) Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex, *Brain Res.*, 80, 265–279, doi: 10.1016/0006-8993(74)90690-8.
- 19. Solberg, R., Enot, D., Deigner, H.P., Koal, T., Scholl-Burgi, S., Saugstad, O.D., and Keller, M. (2010)

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

Metabolomic analyses of plasma reveals new insights into asphyxia and resuscitation in pigs, *PLoS One*, **5**, e9606, doi: 10.1371/journal.pone.0009606.

- Benzi, G., Arrigoni, E., Marzatico, F., and Villa, R.F. (1979) Influence of some biological pyrimidines on the succinate cycle during and after cerebral ischemia, *Biochem. Pharmacol.*, 28, 2545–2550.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S.Y., et al. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature*, 515, 431–435.
- Sahni, P.V., Zhang, J., Sosunov, S., Galkin, A., Niatsetskaya, Z., Starkov, A., Brookes, P. S., and Ten, V.S. (2017) Krebs cycle metabolites and preferential succinate oxidation following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice, *Pediatr. Res.*, 83, 491–497, doi: 10.1038/pr.2017.277.
- Hinkle, P.C., Butow, R.A., Racker, E., and Chance, B. (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavincytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles, *J. Biol. Chem.*, 242, 5169–5173.
- 24. Turrens, J.F., and Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria, *Biochem. J.*, **191**, 421–427.
- Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial complex I, Biochim. Biophys. Acta, 1757, 553-561.
- 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.
- Niatsetskaya, Z.V., Sosunov, S.A., Matsiukevich, D., Utkina-Sosunova, I.V., Ratner, V.I., Starkov, A.A., and Ten, V.S. (2012) The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice, J. Neusorci., 32, 3235–3244.
- 29. Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Hey-Mogensen, M., Orr, A.L., and Brand, M.D. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates, *Redox. Biol.*, **1**, 304–312.
- Stepanova, A., Konrad, C., Manfredi, G., Springett, R., Ten, V., and Galkin, A. (2018) The dependence of brain mitochondria reactive oxygen species production on oxygen level is linear, except when inhibited by antimycin A, *J. Neurochem.*, doi: 10.1111/jnc.14654.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., and Kunz, W.S. (2004) Characterization of superoxideproducing sites in isolated brain mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 279, 4127–4135.
- 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.
- Galkin, A., and Brandt, U. (2005) Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*, J. Biol. Chem., 280, 30129–30135.
- 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.
- Stepanova, A., Kahl, A., Konrad, C., Ten, V., Starkov, A.S., and Galkin, A. (2017) Reverse electron transfer results in a loss of flavin from mitochondrial complex I: potential mechanism for brain ischemia reperfusion injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 37, 3649–3658, doi: 10.1177/0271678X17730242.
- Kotlyar, A.B., and Vinogradov, A.D. (1990) Slow active/ inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1019, 151–158.

- Maklashina, E.O., Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1994) Hysteresis behavior of complex I from bovine heart mitochondria: kinetic and thermodynamic parameters of retarded reverse transition from the inactive to active state, *Biochemistry (Moscow)*, **59**, 946–957.
- Gavrikova, E.V., and Vinogradov, A.D. (1999) Active/deactive state transition of the mitochondrial complex I as revealed by specific sulfhydryl group labeling, *FEBS Lett.*, 455, 36–40.
- Grivennikova, V.G., Kapustin, A.N., and Vinogradov, A.D. (2001) Catalytic activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in intact mitochondria. Evidence for the slow active/inactive transition, *J. Biol. Chem.*, 276, 9038–9044.
- 39. Roberts, P.G., and Hirst, J. (2012) The deactive form of respiratory complex I from mammalian mitochondria is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, *J. Biol. Chem.*, **287**, 34743–34751.
- Galkin, A., Meyer, B., Wittig, I., Karas, M., Schagger, H., Vinogradov, A., and Brandt, U. (2008) Identification of the mitochondrial ND3 subunit as a structural component involved in the active/deactive enzyme transition of respiratory complex I, J. Biol. Chem., 283, 20907–20913.
- 41. Galkin, A., and Moncada, S. (2007) S-nitrosation of mitochondrial complex I depends on its structural conformation, *J. Biol. Chem.*, **282**, 37448–37453.
- 42. Maklashina, E., Kotlyar, A.B., and Cecchini, G. (2003) Active/de-active transition of respiratory complex I in bacteria, fungi, and animals, *Biochim. Biophys. Acta*, **1606**, 95–103.
- Matsuzaki, S., and Humphries, K.M. (2015) Selective inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides, *Biochemistry*, 54, 2011–2021.
  Babot, M., Labarbuta, P., Birch, A., Kee, S., Fuszard, M.,
- 44. Babot, M., Labarbuta, P., Birch, A., Kee, S., Fuszard, M., Botting, C.H., Wittig, I., Heide, H., and Galkin, A. (2014) ND3, ND1 and 39kDa subunits are more exposed in the de-active form of bovine mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 929–939.
- Galkin, A., Abramov, A.Y., Frakich, N., Duchen, M.R., and Moncada, S. (2009) Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.*, 284, 36055–36061.
  Maklashina, E., Sher, Y., Zhou, H.Z., Gray, M.O.,
- 46. Maklashina, E., Sher, Y., Zhou, H.Z., Gray, M.O., Karliner, J.S., and Cecchini, G. (2002) Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart, *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 6–12.
- Gorenkova, N., Robinson, E., Grieve, D., and Galkin, A. (2013) Conformational change of mitochondrial complex I increases ROS sensitivity during ischaemia, *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 1459–1468.
- Chouchani, E.T., Methner, C., Nadtochiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., James, A.M., Cocheme, H.M., Reinhold, J., Lilley, K.S., Partridge, L., Fearnley, I.M., Robinson, A.J., Hartley, R.C., Smith, R.A., Krieg, T., Brookes, P.S., and Murphy, M.P. (2013) Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I, *Nat. Med.*, **19**, 753–759.
- Stepanova, A., Konrad, C., Guerrero-Castillo, S., Manfredi, G., Vannucci, S., Arnold, S., and Galkin, A. (2018) Deactivation of mitochondrial complex I after hypoxiaischemia in the immature brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 39, 1790–1802, doi: 10.1177/0271678X18770331.
- Kim, M., Stepanova, A., Niatsetskaya, Z., Sosunov, S., Arndt, S., Murphy, M.P., Galkin, A., and Ten, V.S. (2018) Attenuation of oxidative damage by targeting mitochondrial complex I in neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *Free Radic. Biol. Med.*, **124**, 517–524, doi: 10.1016/ j.freeradbiomed.2018.06.040.
- Hernansanz-Agustin, P., Ramos, E., Navarro, E., Parada, E., Sanchez-Lopez, N., Pelaez-Aguado, L., Cabrera-Garcia, J.D.,

Tello, D., Buendia, I., Marina, A., Egea, J., Lopez, M.G., Bogdanova, A., and Martinez-Ruiz, A. (2017) Mitochondrial complex I deactivation is related to superoxide production in acute hypoxia, *Redox Biol.*, **12**, 1040–1051, doi: 10.1016/j.redox.2017.04.025.

- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A.M., Bonvento, G., Murphy, M.P., Almeida, A., and Bolanos, J.P. (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13063–13068, doi: 10.1073/pnas.1613701113.
- 53. Vinogradov, A.D., and Grivennikova, V.G. (2001) The mitochondrial complex I: progress in understanding of catalytic properties, *IUBMB Life*, **52**, 129–134.
- Babot, M., Birch, A., Labarbuta, P., and Galkin, A. (2014) Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1083–1092, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.02.018.
- 55. Dröse, S., Stepanova, A., and Galkin, A. (2016) Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 946–957, doi: 10.1016/j.bbabio.2015.12.013.
- Kotlyar, A.B., Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1992) Effect of Ca<sup>2+</sup> ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 144–150.
- 57. Babot, M., and Galkin, A. (2013) Molecular mechanism and physiological role of active-deactive transition of mitochondrial complex I, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1325–1330.
- 58. Loskovich, M.V., Grivennikova, V.G., Cecchini, G., and Vinogradov, A.D. (2005) Inhibitory effect of palmitate on the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) as related to the active-de-active enzyme transition, *Biochem. J.*, **387**, 677–683.
- Stepanova, A., Valls, A., and Galkin, A. (2015) Effect of monovalent cations on the kinetics of hypoxic conformational change of mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1847, 1085–1092, doi: 10.1016/j.bbabio.2015.05.012.
- Ciano, M., Fuszard, M., Heide, H., Botting, C.H., and Galkin, A. (2013) Conformation-specific crosslinking of mitochondrial complex I, *FEBS Lett.*, 587, 867–872.
- 61. Blaza, J.N., Vinothkumar, K.R., and Hirst, J. (2018) Structure of the deactive state of mammalian respiratory complex I, *Structure*, **26**, 312–319, e3, doi: 10.1016/j.str.2017.12.014.
- Parey, K., Brandt, U., Xie, H., Mills, D.J., Siegmund, K., Vonck, J., Kuhlbrandt, W., and Zickermann, V. (2018) Cryo-EM structure of respiratory complex I at work, *Elife*, 7, doi: 10.7554/eLife.39213.
- Agip, A.A., Blaza, J.N., Bridges, H.R., Viscomi, C., Rawson, S., Muench, S.P., and Hirst, J. (2018) Cryo-EM structures of complex I from mouse heart mitochondria in two biochemically defined states, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 25, 548–556, doi: 10.1038/s41594-018-0073-1.
- Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., and Sazanov, L.A. (2016) Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I, *Nature*, 537, 644–648, doi: 10.1038/nature19794.
- 65. Zhu, J., Vinothkumar, K.R., and Hirst, J. (2016) Structure of mammalian respiratory complex I, *Nature*, **536**, 354–358, doi: 10.1038/nature19095.
- Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C., and Brandt, U. (2015) Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I, *Science*, 347, 44–49.
- Koopman, W.J., Willems, P.H., and Smeitink, J.A. (2012) Monogenic mitochondrial disorders, *N. Engl. J. Med.*, 366, 1132–1141, doi: 10.1056/NEJMra1012478.
- 68. Stefanatos, R., and Sanz, A. (2011) Mitochondrial complex I: a central regulator of the aging process, *Cell Cycle*, **10**, 1528–1532.

- Breuer, M.E., Koopman, W.J., Koene, S., Nooteboom, M., Rodenburg, R.J., Willems, P. H., and Smeitink, J.A. (2013) The role of mitochondrial OXPHOS dysfunction in the development of neurologic diseases, *Neurobiol. Dis.*, 51, 27–34, doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.007.
- Ndubuizu, O., and LaManna, J.C. (2007) Brain tissue oxygen concentration measurements, *Antioxid. Redox Signal.*, 9, 1207–1219.
- Madsen, P.L., Holm, S., Herning, M., and Lassen, N.A. (1993) Average blood flow and oxygen uptake in the human brain during resting wakefulness: a critical appraisal of the Kety-Schmidt technique, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13, 646–655, doi: 10.1038/jcbfm.1993.83.
- 72. Reneau, D.D., Guilbeau, E.J., and Null, R.E. (1977) Oxygen dynamics in brain, *Microvasc. Res.*, **13**, 337–344.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X., and Schulz, D.W. (1964) Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain, *J. Biol. Chem.*, 239, 18–30.
  Hillered, L., Siesjo, B.K., and Arfors, K.E. (1984)
- Hillered, L., Siesjo, B.K., and Arfors, K.E. (1984) Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 4, 438–446, doi: 10.1038/jcbfm.1984.63.
- Kristian, T. (2004) Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage, *Cell Calcium*, 36, 221–233, doi: 10.1016/j.ceca.2004.02.016.
- Sugawara, T., Lewen, A., Noshita, N., Gasche, Y., and Chan, P.H. (2002) Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats, *J. Neurotrauma*, 19, 85–98, doi: 10.1089/089771502753460268.
- Astrup, J., Siesjo, B.K., and Symon, L. (1981) Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra, *Stroke*, 12, 723–725.
- Becker, N.H. (1961) The cytochemistry of anoxic and anoxioischemic encephalopathy in rats. II. Alterations in neuronal mitochondria indentified by diphosphopyridine and triphosphopyridine nucleotide diaphorases, *Am. J. Pathol.*, 38, 587–597.
- Def Webster, H., and Ames, A. (1965) Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation, *J. Cell Biol.*, 26, 885–909.
- Zeman, W. (1963) Histochemical and metabolic changes in brain tissue after hypoxaemia. in Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxemia (Schade, J. P., and McMenemey, W. H. eds) Blackwell Publishing Co, London, pp. 327–348.
- Ozawa, K., Seta, K., Araki, H., and Handa, H. (1967) The effect of ischemia on mitochondrial metabolism, *J. Biochem.*, 61, 512–514.
- Ozawa, K., Itada, N., Kuno, S., Seta, K., and Handa, H. (1966) Biochemical studies on brain swelling. II. Influence of brain swelling and ischemia on the formation of an endogenous inhibitor in mitochondria, *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.*, 20, 73–84.
- Schutz, H., Silverstein, P.R., Vapalahti, M., Bruce, D.A., Mela, L., and Langfitt, T.W. (1973) Brain mitochondrial function after ischemia and hypoxia. I. Ischemia induced by increased intracranial pressure, *Arch. Neurol.*, 29, 408–416.
- Ljunggren, B., Schutz, H., and Siesjo, B.K. (1974) Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia, *Brain Res.*, 73, 277–289, doi: 10.1016/0006-8993(74)91049-X.
- Ginsberg, M.D., Mela, L., Wrobel-Kuhl, K., and Reivich, M. (1977) Mitochondrial metabolism following bilateral cerebral ischemia in the gerbil, *Ann. Neurol.*, 1, 519–527, doi: 10.1002/ana.410010603.
- Rehncrona, S., Mela, L., and Siesjo, B.K. (1979) Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia, *Stroke*, 10, 437–446.

- 87. Nordstrom, C.H., Rehncrona, S., and Siesjo, B.K. (1978) Effects of phenobarbital in cerebral ischemia. Part II: restitution of cerebral energy state, as well as of glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids after pronounced incomplete ischemia, *Stroke*, 9, 335–343.
- Sims, N.R., and Pulsinelli, W.A. (1987) Altered mitochondrial respiration in selectively vulnerable brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat, *J. Neurochem.*, 49, 1367–1374.
- 89. Sims, N.R. (1991) Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat, *J. Neurochem.*, **56**, 1836–1844.
- Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Valotta da Silva, A., Torres, L.B., Catania, K.C., and Kaas, J.H. (2011) Updated neuronal scaling rules for the brains of Glires (rodents/lagomorphs), *Brain Behav. Evol.*, 78, 302–314, doi: 10.1159/000330825.
- Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., and Lyakhovich, V. (2014) Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 472459, doi: 10.1155/2014/472459.
- Tretter, L., Takacs, K., Hegedus, V., and Adam-Vizi, V. (2007) Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H2O2 generation in brain mitochondria, *J. Neurochem.*, **100**, 650–663.
- 93. Kahl, A., Stepanova, A., Konrad, C., Anderson, C., Manfredi, G., Zhou, P., Iadecola, C., and Galkin, A. (2018) Critical role of flavin and glutathione in complex Imediated bioenergetic failure in brain ischemia/reperfusion injury, *Stroke*, **49**, 1223–1231, doi: 10.1161/ STROKEAHA.117.019687.
- Linn, F., Paschen, W., Ophoff, B.G., and Hossmann, K.A. (1987) Mitochondrial respiration during recirculation after prolonged ischemia in cat brain, *Exp. Neurol.*, 96, 321–333.
- 95. Almeida, A., Allen, K.L., Bates, T.E., and Clark, J.B. (1995) Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain, *J. Neurochem.*, **65**, 1698–1703.
- 96. Allen, K.L., Almeida, A., Bates, T.E., and Clark, J.B. (1995) Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia, *J. Neurochem.*, 64, 2222–2229.
- 97. Yoshimoto, T., Kristian, T., Hu, B., Ouyang, Y.B., and Siesjo, B.K. (2002) Effect of NXY-059 on secondary mitochondrial dysfunction after transient focal ischemia; comparison with cyclosporin A, *Brain Res.*, **932**, 99–109.
- Tsukada, H., Ohba, H., Nishiyama, S., Kanazawa, M., Kakiuchi, T., and Harada, N. (2014) PET imaging of ischemia-induced impairment of mitochondrial complex I function in monkey brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 34, 708–714, doi: 10.1038/jcbfm.2014.5.
- Stepanova, A., Sosunov, S., Niatsetskaya, Z., Konrad, C., Starkov, A.A., Manfredi, G., Wittig, I., Ten, V., and Galkin, A. (2019) Redox-dependent loss of flavin by mitochondrial complex I in brain ischemia/reperfusion injury, *Antioxid. Redox Signal.*, doi: 10.1089/ars.2018.7693.
  Rao, N.A., Felton, S.P., Huennekens, F.M., and Mackler, B.
- 100. Rao, N.A., Felton, S.P., Huennekens, F.M., and Mackler, B. (1963) Flavin mononucleotide: the coenzyme of reduced diphosphopyridine nucleotide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 238, 449–455.
- 101. Yoshida, S., Abe, K., Busto, R., Watson, B.D., Kogure, K., and Ginsberg, M.D. (1982) Influence of transient ischemia on lipid-soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain, *Brain Res.*, 245, 307–316.
- Deutsch, J., Kalderon, B., Purdon, A.D., and Rapoport, S.I. (2000) Evaluation of brain long-chain acylcarnitines during cerebral ischemia, *Lipids*, 35, 693–696.

- 103. Nguyen, N.H., Gonzalez, S.V., and Hassel, B. (2007) Formation of glycerol from glucose in rat brain and cultured brain cells. Augmentation with kainate or ischemia, *J. Neurochem.*, **101**, 1694–1700, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04433.x.
- Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins, *J. Biol. Chem.*, 269, 22459–22462.
- 105. Gibson, Q.H., Massey, V., and Atherton, N.M. (1962) The nature of compounds present in mixtures of oxidized and reduced flavin mononucleotides, *Biochem. J.*, 85, 369–383.
- 106. Barile, M., Brizio, C., Valenti, D., De Virgilio, C., and Passarella, S. (2000) The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, 267, 4888–4900.
- 107. Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1993) Reductive inactivation of the mitochondrial three subunit NADH dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 199–203.
- Gostimskaya, I.S., Grivennikova, V.G., Cecchini, G., and Vinogradov, A.D. (2007) Reversible dissociation of flavin mononucleotide from the mammalian membrane-bound NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), *FEBS Lett.*, 581, 5803–5806.
- 109. Holt, P.J., Efremov, R.G., Nakamaru-Ogiso, E., and Sazanov, L.A. (2016) Reversible FMN dissociation from *Escherichia coli* respiratory complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 1777–1785, doi: 10.1016/j.bbabio.2016.08.008.
- Gariballa, S., and Ullegaddi, R. (2007) Riboflavin status in acute ischaemic stroke, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **61**, 1237–1240, doi: 10.1038/sj.ejcn.1602666.
- 111. da Silva-Candal, A., Perez-Diaz, A., Santamaria, M., Correa-Paz, C., Rodriguez-Yanez, M., Arda, A., Perez-Mato, M., Iglesias-Rey, R., Brea, J., Azuaje, J., Sotelo, E., Sobrino, T., Loza, M. I., Castillo, J., and Campos, F. (2018) Clinical validation of blood/brain glutamate grabbing in acute ischemic stroke, *Ann. Neurol.*, doi: 10.1002/ana.25286.
- 112. Kalogeris, T., Bao, Y., and Korthuis, R.J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning, *Redox Biol.*, 2, 702–714, doi: 10.1016/j.redox.2014.05.006.
- 113. Cao, W., Carney, J.M., Duchon, A., Floyd, R.A., and Chevion, M. (1988) Oxygen free radical involvement in

ischemia and reperfusion injury to brain, *Neurosci. Lett.*, **88**, 233–238.

- 114. Anderson, M.F., and Sims, N.R. (2002) The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions, *J. Neurochem.*, 81, 541–549.
- Mizui, T., Kinouchi, H., and Chan, P.H. (1992) Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats, *Am. J. Physiol.*, 262, H313–H317.
- 116. Folbergrova, J., Zhao, Q., Katsura, K., and Siesjo, B.K. (1995) N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5057–5061.
- 117. Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., Giri, S., Gilg, A.G., Sekhon, C., Singh, I., and Singh, A.K. (2004) Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke, J. Neurosci. Res., 76, 519–527, doi: 10.1002/jnr.20087.
- Anderson, M.F., Nilsson, M., Eriksson, P.S., and Sims, N.R. (2004) Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke, *Neurosci. Lett.*, 354, 163–165.
- Prime, T.A., Blaikie, F.H., Evans, C., Nadtochiy, S.M., James, A.M., Dahm, C.C., Vitturi, D.A., Patel, R.P., Hiley, C.R., Abakumova, I., Requejo, R., Chouchani, E.T., Hurd, T.R., Garvey, J.F., Taylor, C.T., Brookes, P.S., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2009) A mitochondriatargeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 10764–10769.
  Stepanova, A., Shurubor, Y., Valsecchi, F., Manfredi, G.,
- 120. Stepanova, A., Shurubor, Y., Valsecchi, F., Manfredi, G., and Galkin, A. (2016) Differential susceptibility of mitochondrial complex II to inhibition by oxaloacetate in brain and heart, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1561–1568, doi: 10.1016/j.bbabio.2016.06.002.
- 121. Kang, P.T., Chen, C.L., Lin, P., Zhang, L., Zweier, J.L., and Chen, Y.R. (2018) Mitochondrial complex I in the post-ischemic heart: reperfusion-mediated oxidative injury and protein cysteine sulfonation, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **121**, 190–204, doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.07.244.

# BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY AND MITOCHONDRIAL COMPLEX I DAMAGE

### Review

#### A. Galkin\*

Division of Neonatology, Department of Pediatrics, Columbia University William Black Building, 10032 New York, NY, USA; E-mail: ag4003@cumc.columbia.edu

> Received June 7, 2019 Revised July 8, 2019 Accepted July 9, 2019

Ischemic stroke and neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy are two of the leading causes of disability in adults and infants. The energy demands of the brain are provided by mitochondrial oxidative phosphorylation. Ischemia/reperfusion (I/R) affects production of ATP in brain mitochondria leading to energy failure and death of the affected tissue. Among the enzymes of the mitochondrial respiratory chain mitochondrial complex I is the most sensitive to I/R, however the mechanisms of inhibition are poorly understood. This article reviews some of the existing data on mitochondria impairment during I/R and also proposes two distinct mechanisms of complex I damage emerging from recent studies. One mechanism is a reversible dissociation of natural flavin mononucleotide (FMN) cofactor from the enzyme I after ischemia. Another mechanism is a modification of critical cysteine residue of complex I involved into the active/deactive (A/D) conformational transition of the enzyme. Here I describe the potential effect of these two processes in the development of mitochondrial I/R injury and briefly discuss possible neuroprotective strategies to ameliorate I/R brain injury.

Keywords: stroke, ischemia-reperfusion injury, mitochondria, complex I, flavin, thiols, nitrosation