

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ХАРЕЧКИНА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**РЕГУЛЯЦИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (РТР) И ГЕНЕРАЦИИ СУПЕРОКСИД-АНИОНА
ПИРИДИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ СО СТОРОНЫ ЦИТОЗОЛЯ**

03.01.04 Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
А.Г. Круглов

Пущино – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ Ca^{2+} -ЗАВИСИМАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ПОРА (РТР).....	12
1.1. РТР: основные характеристики, физиологическая и патофизиологическая роли..	12
1.2. Модели РТР	15
1.3. Активаторы РТР	19
1.3.1. Ca^{2+} как ключевой регулятор РТР.	19
1.3.2. Механизмы входа кальция в митохондрии	22
1.3.3. Механизмы выхода кальция из митохондрий	22
1.3.4. Другие активаторы РТР.....	23
1.4. Ингибиторы РТР	25
1.4.1. рН, двухвалентные катионы, CsA, бензодиазепины.	25
1.4.2. Роль АНТ в ингибировании РТР адениновыми нуклеотидами	27
1.4.3. Регуляция Ca^{2+} -буферной емкости матрикса с помощью АН. Роль SCaMC...	29
1.4.4. Ингибирование РТР с помощью ПН.....	32
2. МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК ПРИ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН	36
2.1. Комплекс I дыхательной цепи митохондрий	36
2.2. Комплекс II дыхательной цепи митохондрий	38
2.3. Комплекс III дыхательной цепи митохондрий	41
2.4. Роль ПН в генерации АФК	42
2.5. Роль кальция в генерации АФК.....	43
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
1. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК	45
1.1. Выделение гепатоцитов крысы	45
1.2. Выделение кардиомиоцитов крысы	45
1.3. Культивирование клеточных линий.....	46
2. РАБОТА С МИТОХОНДРИЯМИ.....	46
2.1. Выделение интактных митохондрий из печени крыс.....	46
2.2. Оценка количества повреждённых митохондрий после выделения	47
2.3. Определение количества белка.....	48
2.4. Индукция пермеабилзации митохондриальных мембран	48

2.5. Определение размера пор во внутренней мембране митохондрий.....	48
3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ.....	49
3.1. Установка для одновременной регистрации скорости потребления кислорода митохондриями и изменения концентрации различных ионов в среде инкубации	49
3.1.1. Измерение трансмембранного потенциала изолированных митохондрий	49
3.1.2. Измерение максимальной кальциевой емкости митохондрий	50
3.1.3. Измерение потребления кислорода митохондриями	50
3.2. Регистрация высокоамплитудного набухания митохондрий	50
3.3. Измерение содержания АТФ в митохондриальной суспензии	51
3.4. Определение степени восстановленности ПН в митохондриальной суспензии	52
3.4.1. Контроль соотношения окисленных и восстановленных форм ПН в стоковых растворах	52
3.4.2. Определение редокс-потенциала ПН в митохондриальной суспензии.....	52
4. ИЗМЕРЕНИЕ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА	53
4.1. Измерение уровня пероксида водорода	53
4.2. Измерение уровня СА	53
4.3. Определение активности аконитазы	53
4.4. Генерация СА с помощью пероксида калия	53
5. ВЕСТЕРН-БЛОТТИНГ	54
6. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА.....	54
7. МАТЕРИАЛЫ	54
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
1. ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕННЫХ ПН НА ИНДУКЦИЮ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ ПОРЫ	55
1.1. Влияние ПН на индукцию неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры в изолированных митохондриях печени крыс.....	55
1.1.1. Способы определения индукции РТР в изолированных митохондриях.....	55
1.1.2. Сравнение эффекта добавленных ПН и АН на индукцию РТР в митохондриях печени крыс.....	56
1.2. Исследование механизма ингибирования индукции РТР внешним НАД(Н).....	58
1.2.1. Окисление/восстановление внешнего НАД(Н) не является необходимым условием подавления открывания РТР.....	58
1.2.2. Влияние Mg^{2+} на подавление открывания РТР с помощью НАД(Н).....	59

1.2.3. Сочетанный эффект добавленных НАД(Н), АН и CsA на индукцию РТР	61
1.2.4. Эффект НАДН на Ca^{2+} -емкость митохондрий пермеабилizованных клеток	65
1.2.5. Эффект ингибиторов АНТ на подавление открывания РТР внешними ПН	68
1.2.6. Активация выхода АТФ из митохондрий при действии НАД(Н)	71
2. РЕГУЛЯЦИЯ ВСПЫШЕК СА, ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН, ВНЕШНИМ НАД(Ф)Н	74
2.1. Активация продукции АФК при пермеабилзации митохондриальных мембран	75
2.2. Влияние осмотического набухания интактных митохондрий на хемоллюминесценцию MCLA	77
2.3. Эффект дыхательных субстратов и ингибиторов дыхательной цепи на продукцию СА в пермеабилзованных митохондриях	79
2.4. Генерация вспышек СА в пермеабилзованных митохондриях в присутствии НАДФН	81
2.5. Продукция СА в пермеабилзованных митохондриях в присутствии НАДН	83
2.6. Сравнение НАДН- и НАДФН-зависимой стимуляции продукции СА в интактных и пермеабилзованных митохондриях	86
2.7. Эффект дыхательных субстратов на способность НАД(Ф)Н поддерживать вспышки СА в пермеабилзованных митохондриях	88
2.8. Продукция СА при пермеабилзации митохондрий фузарицидином	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
АТР – аденозинтрифосфат
АН – адениновые нуклеотиды
АНТ – транслоказа адениновых нуклеотидов
АФК – активные формы кислорода
БК – бонгкрековая кислота
ВПМН – время полумаксимального набухания
КАТР – карбоксиатрактилозид
НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
ПН – пиридиновые нуклеотиды
ПЭГ – полиэтиленгликоль
СА – супероксид-анион
СОД – супероксиддисмутаза
Фн – неорганический фосфат
ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусной кислоты
ЭТЦ – дыхательная цепь переноса электронов
AIF – апоптоз-индуцирующий фактор
BSA – бычий сывороточный альбумин
CsA – циклоспорин А
CypD – циклофилин D
Cyb5R – цитохром-b5-редуктаза
DIDS – 4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновая кислота
ИММ – внутренняя мембрана митохондрий
IMS – межмембранное пространство митохондрий
I/R – ишемия-реперфузия
FCCP – карбонилцианид-4-трифтор метоксифенил-гидразон
НК – гексокиназа
НЕК293Т - почечные клетки эмбриона человека
HEp-2 – клетки эпидермоидной карциномы гортани человека
HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

MCLA – 3,7-дигидро -2-метил-6-(4-метоксифенил)имидазол[1,2-а]пирозин-3-один
MCU – митохондриальный кальциевый унипортер
MEF – мышинные эмбриональные фибробласты
NEM – N-этилмалеимид
NOS – синтаза оксида азота
NOX – НАДФН-оксидаза
OMM – внешняя мембрана митохондрий
OSCP – белок, придающий чувствительность F₀F₁-АТФ синтазы к олигомицину
P_iC – переносчик неорганического фосфата
PhAsO – фениларсин оксид
PolyP – полифосфат
PTP – Ca²⁺-зависимая неспецифическая митохондриальная пора
RLM – митохондрии печени крысы
RNS – активные формы азота
SCaMC – короткий Ca²⁺-связывающий митохондриальный переносчик
SPG7 – металлопротеиназа параплегин
TBH – тертобутилгидропероксид
THP-1 – клетки острой моноцитарной лейкемии
TPP⁺ - тетрафенилфосфоний
TSPO – 18-kDa транслокаторный белок
VDAC – потенциал-зависимый анионный канал

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Неспецифическая Ca^{2+} -зависимая митохондриальная пора (РТР) представляет собой мегаканал во внутренней мембране митохондрий (ИММ), открывание которого увеличивает ее проницаемость для растворов массой менее 1500 Да. Данное явление вызывает падение мембранного потенциала, набухание митохондрий и разрыв их внешней мембраны. Установлено, что индукция РТР происходит при повышении концентрации кальция в матриксе, окислительном стрессе, истощении пула адениновых нуклеотидов (АН). Такие условия наблюдаются при многих патологических состояниях, включая ишемию с последующей реперфузией. Предполагается, что открывание поры является ключевым фактором, индуцирующим гибель клеток и необратимые повреждения органа. К настоящему моменту разработано лишь несколько препаратов для предотвращения постишемической гибели клеток, действие которых направлено на подавление РТР за счет связывания с ее предполагаемыми структурными элементами: (циклофилином D (CypD), транслокатором адениновых нуклеотидов (АНТ), 18-kDa транслокаторным белком (TSPO), потенциал-зависимым анионным каналом (VDAC)). Причем, только ингибитор CypD – циклоспорин А (CsA) – продемонстрировал существенный эффект в клинике. Разработать высокоэффективные лекарственные средства и полноценную терапевтическую стратегию не позволяет отсутствие полноценного знания о молекулярном строении РТР и точных механизмах ее регуляции.

Пиридиновые нуклеотиды (ПН), помимо участия в окислительно-восстановительных реакциях в качестве коэнзима, выполняют функцию сигнальных молекул широкого спектра действия. Являясь субстратами поли(АДФ-рибоза)полимераз, сиртуинов, синтаз циклической АДФ-рибозы (CD38 и CD157), НАД участвует в регуляции гомеостаза кальция, экспрессии генов в ответ на окислительный и генотоксический стресс, регуляции аутофагии, митохондриального биогенеза и клеточной гибели. Соответственно, изменение концентрации ПН и нарушение баланса НАД(Ф)/НАД(Ф)Н связаны со многими патологическими состояниями (сердечно-сосудистые, нейродегенеративные заболевания, диабет) и старением. Также известно, что ПН являются регуляторами РТР. К настоящему времени является общепринятым, что сайты их действия локализованы в матриксе митохондрий либо на матриксной стороне ИММ. Предполагается, что они оказывают аллостерический эффект, либо их защитное действие основано на восстановлении убихинона, который является регулятором поры, и глутатиона, поддерживающего восстановленное состояние критических тиолов. Однако в научной литературе данные о способности внешних (цитозольных) ПН регулировать РТР скудны и противоречивы.

Теоретически, внешние ПН могут ингибировать открывание РТР либо путем связывания с аллостерическими центрами белков, входящими в состав поры (или белков-регуляторов РТР), либо путем поддержания активности оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий (внешней мембраны митохондрий (ОММ) и межмембранного пространства), способных регулировать различные клеточные процессы: цитохром-b5-редуктаза, синтаза оксида азота (NOS), НАДФН-оксидаза (NOX), апоптоз-индуцирующий фактор (AIF) и др. При этом, наличие в структуре молекул ПН АДФ делает переносчики адениновых нуклеотидов (АНТ и короткий Ca^{2+} -связывающий митохондриальный переносчик (SCaMC)) еще одной группой потенциальных мишеней для цитозольных НАД(Н) и НАДФ(Н).

Другим аспектом данной проблемы является активация продукции активных форм кислорода (АФК) при пермеабиллизации ИММ. Показано, что в патологических условиях, например, при ишемии-реперфузии, и в физиологических, при кратковременном открывании РТР, происходят «вспышки» супероксид аниона, способные индуцировать открывание РТР в соседних митохондриях. Существует несколько гипотез возникновения вспышек: повреждение дыхательных комплексов I, II, III, усиление скорости работы АФК-генерирующих Ca^{2+} -активируемых дегидрогеназ матрикса, истощение антиоксидантной защиты в результате выхода глутатиона. Однако, роль ПН, поступающих в матрикс из цитозоля при пермеабиллизации митохондриальных мембран, в генерации АФК остается на данный момент неисследованной.

Таким образом, цели и задачи данного исследования были сформулированы следующим образом:

Цель: Исследовать механизмы регуляции РТР и вспышек генерации супероксид-аниона, индуцированных пермеабиллизацией митохондриальных мембран, пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля.

Задачи:

1. Выявить оптимальные для ингибирования РТР формы внешних пиридиновых нуклеотидов и условия ингибирования.
2. Исследовать роль VDAC в нуклеотид-зависимом ингибировании РТР.
3. Определить вклады переносчиков адениновых нуклеотидов АНТ и SCaMC в общий защитный эффект внешних пиридиновых нуклеотидов на митохондрии.
4. Оценить вклад НАД(Ф)Н в генерацию супероксид-аниона, вызванную пермеабиллизацией митохондриальных мембран.
5. Определить условия, способствующие продукции супероксид-аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

Научная новизна работы

В работе изучено влияние ПН, оказываемое на индукцию РТР со стороны цитозоля, а также исследована роль внешних НАД(Ф)Н в генерации вспышек супероксид-аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран. Впервые показано, что НАДН и, в меньшей степени, НАД дозозависимо подавляют открывание РТР в терминально дифференцированных клетках, действуя через аллостерический нуклеотид-связывающий сайт, локализованный во внешних отделах митохондрий (ОММ или внешняя сторона IMM). Обнаружено, что АНТ модулирует защитное действие НАД(Н). НАД(Н) усиливает АНТ-опосредованный выход АТР из митохондрий. Впервые показано участие НАД(Ф)Н матрикса и цитозоля в генерации вспышек супероксидного аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран. Обнаружено, что главный вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые системы матрикса. Впервые описаны условия, способствующие появлению вспышек: пермеабиллизация митохондриальных мембран, наличие цитозольного НАД(Ф)Н и снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов в матриксе.

Научно-практическая значимость

Полученные данные дают представление о ранее не известных механизмах участия пиридиновых нуклеотидов в регуляции жизнеспособности клеток при физиологических и патологических состояниях. Показано, что, с одной стороны, НАД(Н), наряду с адениновыми нуклеотидами, могут участвовать в цитопротекции путем ингибирования РТР. С другой стороны, в условиях, когда происходит пермеабиллизация митохондриальных мембран и падение уровня НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов в матриксе, НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н могут поддерживать генерацию вспышек супероксид-аниона. Результаты исследования могут служить основой для дальнейшей идентификации нуклеотид-связывающего регулятора РТР во внешних отделах митохондрий. Идентифицируемый белок может являться перспективной мишенью для фармакологического воздействия с целью коррекции патологий, в основе которых лежит запуск клеточной гибели в результате открывания поры (например, ишемия/реперфузия) или ее ингибирование (злокачественные образования). Кроме того, установленное участие НАД(Ф)Н в генерации вспышек супероксид-аниона поможет выяснению процесса передачи сигналов между соседними митохондриями, результатом которого является вторичная продукция АФК и индукция РТР.

Положения, выносимые на защиту

1. Цитозольные НАД(Н) являются аллостерическими ингибиторами РТР в терминально дифференцированных клетках. Сайт их действия расположен во внешних отделах митохондрий.

2. АНТ модулирует ингибиторное действие НАД(Н), оказываемое на РТР. Цитозольные НАД и НАДН усиливают АНТ-опосредованный выход АТР из митохондрий.

3. В пермеабелизованных митохондриях окисление НАДФН и НАДН до определенных значений редокс-потенциала сопровождается генерацией всплеск супероксид-аниона. Главный вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые системы матрикса.

4. Условиями, способствующими генерации всплеск супероксид-аниона в митохондриях, являются: пермеабелизация мембран (по любому механизму), доступность цитозольного НАД(Ф)Н и снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов.

Личный вклад диссертанта

Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

Связь с государственными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 19-04-00327-а), РНФ (№ 17-75-10122), Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 14.Z50.31.0028).

Апробация диссертации

Основные результаты работы были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на следующих научных мероприятиях: Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пушино, Россия, 2017, 2018, 2019 гг.); 2-ая Международная научная конференция «Science of the Future» (Казань, Россия, 2016); EMBO/FEBS Course Mitochondria in Life, Death and Disease (Фазано (Бр.), Италия, 2017); 20th ISANH International conference on oxidative stress, redox homeostasis and АНТioxidАНТs Parix Redox (Париж, Франция, 2018); 10th World Congress on Targeting Mitochondria (Берлин, Германия, 2019).

Публикации

По результатам работы опубликовано 4 статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК, 3 из них входят в базы данных WoS, Scopus, РИНЦ и 1 – в РИНЦ. Кроме того, опубликована 1 монография и 7 публикаций в материалах всероссийских и международных конференций.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящем обзоре рассмотрены данные о структуре, свойствах и регуляции РТР. Приводятся данные, подтверждающие участие поры в развитии патологических состояний и выполнении клеточных функций, при этом особое внимание уделено вопросу ее регуляции. Обсуждаются современные модели РТР-комплекса. Также рассматриваются современные представления о механизмах, лежащих в основе генерации АФК при увеличении проницаемости мембран митохондрий. Обсуждается роль ионов Ca^{2+} , дыхательной комплексов, пиридиновых нуклеотидов и компонентов антиоксидантной системы в продукции АФК.

1. Неспецифическая Ca^{2+} -зависимая митохондриальная пора (РТР)

1.1. РТР: основные характеристики, физиологическая и патофизиологическая роли

Впервые способность кальция индуцировать обратимое увеличение проницаемости митохондриальных внутренних мембран была продемонстрирована на митохондриях бычьего сердца в 1976 году [1]. Авторы определили данное явление как « Ca^{2+} - induced membrane permeability transition (PT)», что на русский язык можно перевести как « Ca^{2+} - индуцированный переход мембран в состояние проницаемости». Было показано, что РТ является неспецифичным процессом, так как в ходе него и не имеющая заряда сахароза, и заряженные соли весом менее 1.5 кДа были способны проходить через митохондриальные мембраны. Работы Haworth и Hunter дали знания об основных характеристиках этого явления [1–4] и легли в основу современного представления об индукции РТ как о результате открывания канала в IMM, названного митохондриальная пора, обеспечивающая переход в состояние проницаемости (РТР). Гипотезу о существовании РТР подтверждают исследования, проведенные на митопластах млекопитающих, в ходе которых методом патч-клямпа было обнаружено наличие мегаканала, обладающего всеми базовыми характеристиками РТ [5, 6].

Использование частиц полиэтиленгликоля (ПЭГ) различного размера позволило установить, что пора пропускает вещества с молекулярной массой до 1.5 кДа и имеет радиус 1.4 нм [2, 7]. РТР может работать в различных режимах проводимости, максимум которой соответствует ~1.0–1.3 пСм [5, 6]. В результате такого открывания происходит набухание митохондрий из-за осмотического давления поступающих в матрикс растворов,

что приводит к разрыву ОММ, коллапсу мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), истощению пула АН и клеточной гибели [8, 9].

Кроме состояния высокой проводимости, приводящей к клеточной гибели, РТР может находиться в нескольких состояниях суб-проводимости ($\sim 200\text{--}700$ пСм), большинство которых находится в диапазоне $500\text{--}700$ пСм [5, 10, 11]. Предполагается, что, работая в таком режиме, РТР выполняет важные физиологические функции, а именно, осуществляет быстрый выброс избытков АФК и ионов Ca^{2+} , оказывающих влияние на работу электронной транспортной цепи [12, 13], а также позволяет растворам менее $300\text{--}600$ Да проникать через мембрану [14]. Такое кратковременное открывание РТР, не приводящее к повреждению митохондрий, называют транзиторным. В ходе транзиторного открывания наблюдается деполяризация митохондрий и выход Ca^{2+} , при этом не происходит потеря таких важных метаболитов, как нуклеотиды. Завершается процесс быстрой реполяризацией [15]. Способность РТР работать в различных режимах проводимости указывает на то, что пора, вероятно, является мульти-субъединичным комплексом, который может олигомеризоваться в различной степени, приводя к различию в диапазонах проводимости.

Известно, что открывание РТР приводит к генерации АФК в изолированных митохондриях [16–19]. Предполагается, что увеличение уровня цитозольного кальция и индукция РТР являются главными причинами активации образования АФК и запуска клеточной гибели при ишемии/реперфузии (I/R) [20–22]. Было показано, что транзиторные открывания РТР в интактных клетках, вызванные глутаматом [23], β -амилоидами [24], а также синергичным действием кальция и окислительного стресса [25], одновременно вызывают кратковременное усиление генерации супероксид-аниона (так называемые вспышки) митохондриями. Было показано, что вспышки АФК, генерируемые одной митохондрией, могут инициировать вспышки АФК и индукцию РТР в соседних митохондриях, таким образом способствуя распространению волны дисфункции [26].

РТР участвует в развитии большого количества заболеваний. В частности, РТР определяет степень повреждения при ишемии-реперфузии (I/R), когда в результате закупорки сосуда движение крови приостанавливается и впоследствии восстанавливается. Показано, что добавление фармакологических ингибиторов РТР CysA и санглиферина А при реперфузии миокарда крыс может уменьшать размера инфаркта до 50% [27]. В клинических испытаниях реперфузия с его добавлением снижала уровень сывороточной креатин киназы, которая является биомаркером размера инфаркта [28]. Также показана роль РТР в индуцировании повреждений, вызванных I/R мозга, печени, кишечника и почках [29–32]. При многих неврологических расстройствах наблюдаются нарушения регуляции

уровней Ca^{2+} и АФК, вызванные открыванием РТР. К таким расстройствам относятся эпилепсия [33], болезнь Хантингтона [34], болезнь Альцгеймера [35], болезнь Паркинсона [36], амиотрофический латеральный склероз [37], рассеянный склероз [38] и глутамат-индуцированная эксайтотоксичность [39]. И наоборот, вероятность открывания РТР снижается при многих видах рака, что приводит к устойчивости клеток. У крыс, подвергшихся воздействию канцерогенного вещества (например, 2-ацетиламинофлуорен), повышение устойчивости к открыванию РТР в гепатоцитах является одним из первых признаков, наблюдаемых до трансформации клеток [40]. Существует несколько стратегий, которыми пользуются опухолевые клетки для подавления индукции поры. Одной из них является понижение уровня внутримитохондриального кальция: в клетках рака кишечника человека происходит повышение уровня микроРНК miR-25, мишенью которого является митохондриальный кальциевый унипортер (MCU). Соответственно, значительно понижается экспрессия унипортера и падает уровень Ca^{2+} в матриксе [41]. Другой стратегией является усиление антиоксидантной защиты. Клетки миеломы RPMI8226/I характеризуются повышенным уровнем глутатиона [42]. Среди многочисленных видов рака человека, включая опухоли легкого, толстой кишки, шейки матки, печени и поджелудочной железы наблюдается повышение экспрессии тиоредоксина и митохондриальной супероксиддисмутазы (MnСОД) [43, 44]. Для многих видов рака показано увеличение экспрессии анти-апоптотических белков Bcl-xl и Mcl-1, которые ингибируют открывание РТР путем прямого взаимодействия с регулятором поры VDAC. В тоже время обнаружено, что в клетках рака желудка и толстой кишки про-апоптотические белки Вах и Вак, которые стимулируют открывание РТР, несут мутации, отменяющие выполнение их функций, а у клеток рака простаты наблюдается пониженный уровень белка Вах [45]. Клетки рака яичников и груди, взятые у пациентов с повышенной устойчивостью к химиотерапии, характеризуются пониженной экспрессией белка DnaJC15 – шаперона, который, совместно с белками теплового шока 70, является частью митохондриальной системы транспорта белков. Было обнаружено, что DnaJC15 регулирует активность РТР путем взаимодействия с СурD [46]. Также известно, что опухолевые клетки увеличивают потребление глюкозы и, соответственно, скорость гликолиза для поддержания высокого уровня АТФ. Это приводит к повышению уровня пирувата в цитозоле, накоплению лактата и, соответственно, к закислению цитозоля. Высокий уровень АТФ, АДФ и низкий рН могут синергично ингибировать открывание РТР [45]. Таким образом, разные виды рака используют разные стратегии ингибирования РТР: модулирование метаболизма, уровня Ca^{2+} , АФК и экспрессии модуляторов поры.

1.2. Модели РТР

После обнаружения РТР было приложено много усилий к выяснению ее молекулярной природы. В начале 1990-х было обнаружено, что некоторые лиганды TSPO были способны модулировать открывание РТР [47]. Также было продемонстрировано, что выделенный TSPO ассоциирован с VDAC и АНТ [48, 49]. Эти результаты легли в основу гипотезы локализации РТР на контактных сайтах между ОММ и IMM. Впоследствии было проведено выделение комплекса, включающего гексокиназу (HK) II, митохондриальную креатинкиназу, VDAC и АНТ. Этот комплекс имел режимы проводимости, сходные с РТР, а также обладал чувствительностью к ингибиторам поры АДФ и N-метил-4Val-циклоспорину [50]. Позже было показано, что данный комплекс также содержит белки Vcl-2 семейства [51]. Из-за невозможности выборочного реконструирования каждого белка было сложно отличить ключевые порообразующие субъединицы от тех, которые выполняли лишь регуляторную роль. Тем не менее данные исследования легли в основу гипотезы о том, что белок Вах, НКII, VDAC, креатинкиназа, TSPO, АНТ, СурD формируют комплекс РТР на мембранных контактных сайтах, где VDAC и АНТ формируют центр поры в ОММ и IMM, соответственно [52] (Рис.1). Однако, последующие генетические исследования, проведенные на нокаутных мышах, поставили достоверность этой модели под вопрос. Изолированные из гепатоцитов митохондрии с генетически удаленными АНТ1 и 2 по-прежнему демонстрировали открывание РТР, хотя устойчивость к перегрузке Ca^{2+} увеличивалась, и терялась чувствительность к модуляторам поры АДФ, бонгкрековой кислоте и атрактилозиду [53]. Нокаут VDAC в клетках MEF не защищал от индуцированного Ca^{2+} открывания РТР [54]. Нокаут TSPO также не вызвал резистентности к открыванию РТР. Интересно, что данная манипуляция не отменила чувствительность к бензодиазепину, что предполагает наличие добавочных сайтов действия ранее используемых лигандов TSPO [55]. Генетическое удаление СурD вызвало сильную устойчивость к Ca^{2+} -индуцированному открыванию РТР, однако пора все равно была способна открываться и обладала чувствительностью к окислительному стрессу.

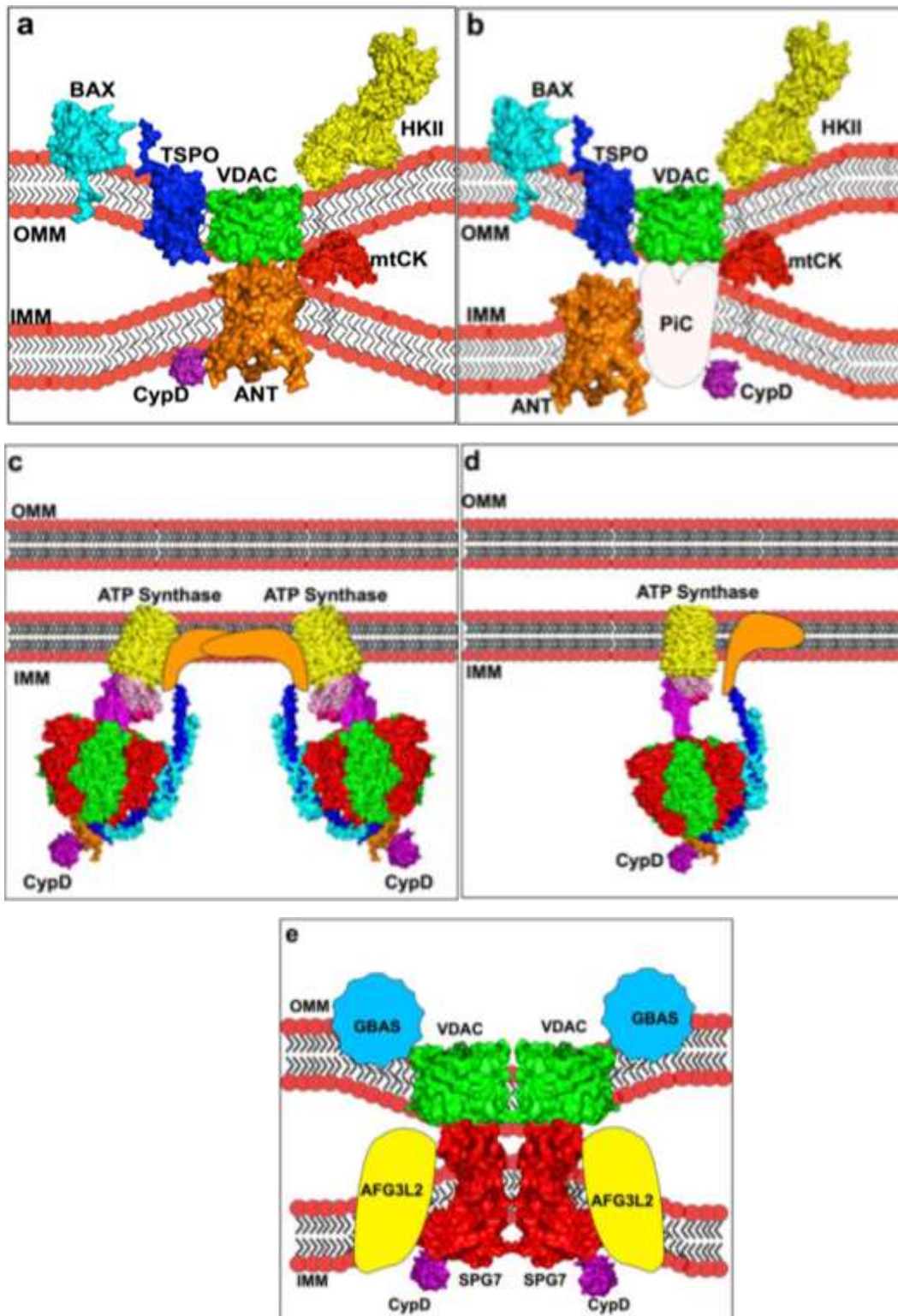


Рис. 1. Модели РТР. **а.** Классическая модель, в состав которой входят BAX, VDAC, TSPO, НКII во внешней мембране, mtCK в межмембранном пространстве, АНТ во внутренней мембране и CypD, соединенный с АНТ в матриксе **б.** Модель, представляющая собой BAX, VDAC, TSPO, НКII, mtCK, АНТ, CypD, связанные с PiC **в.** Димеры F₀F₁-АТФ синтазы **д.** Мономер F₀F₁-АТФ синтазы **е.** Модель, в состав которой входят VDAC, глиобластомная амплифицированная последовательность (GBAS) во внешней мембране, SPG7 в межмембранном пространстве и CypD в матриксе, соединенный с SPG7. (Рисунок взят из [56])

Таким образом, CypD является критическим регулятором поры, но не ее структурным компонентом [55, 57, 58]. CypD представляет собой пептидил-пролил цис-транс изомеразу, кодируемую геном PPIF. Его связывание стимулирует РТР к открыванию, вызывая конформационное изменение в комплексе РТР, которое увеличивает чувствительность к Ca^{2+} по сравнению с другими двухвалентными катионами [55, 59]. Было показано, что увеличение Φ_n в митохондриях повышает вероятность открывания РТР [1, 60, 61]. При этом в митохондриях печени $ppif^{-/-}$ мышей Φ_n ингибирует открывание РТР, следовательно, его активирующая роль может быть вызвана эффектами CypD [62]. Подтверждением этой гипотезы является способность Φ_n увеличивать ко-иммунопреципитацию между белком, придающим чувствительность F_0F_1 -АТФ синтазы к олигомицину (OSCP) и CypD, что предполагает участие Φ_n в модуляции связывания CypD [63, 64].

НКII является ингибитором открывания РТР. Гидрофобный N-конец гексокиназ I и II входит в ОММ и связывает их с внешней поверхностью митохондрий [65–67]. Связывание НКII с ОММ частично регулируется Akt (Ser/Thr киназа или протеин киназа B) путем фосфорилирования НКII по Thr 463 и опосредованным GSK-3 β фосфорилированием Thr 51 его связывающего партнера VDAC1 [68–71]. Связывание НКII с митохондриями в значительной степени защищает их от открывания РТР, уменьшая проницаемость ОММ и тем самым предотвращая высвобождение компонентов IMS. Присутствие глюкозо-6-фосфата, связанного с закислением среды во время ишемии, индуцирует диссоциацию НКII от ОММ [72]. Это увеличивает доступность VDAC для связывания и стабилизации белков Вах и Вак на ОММ [73]. НКII может также регулировать проницаемость ОММ для цитохрома c путем модуляции морфологии крист митохондрий, стабилизируя контактные места [72].

Интерес к фосфатному переносчику (P_iC) как к основному компоненту комплекса РТР возрос, когда появилось доказательство того, что CypD связывается с P_iC и CsA предотвращает данное взаимодействие. Восприимчивость P_iC к сульфгидрильным реагентам, таким как N-этилmaleимид (NEM) и диамид, также сделало его многообещающим кандидатом на роль структурного компонента РТР [74]. Однако последующий патч-кламп P_iC установил проводимость переносчика, равную 20-30 пСм, что является слишком низким показателем для рассмотрения белка в качестве порообразующего компонента РТР. Кроме того, генетическая сверхэкспрессия или нокдаун переносчика не влияли на кальциевую емкость митохондрий [75, 76].

В последнее время появились доказательства того, что F_0F_1 -АТФ синтаза является главным компонентом РТР. Giorgio et al. показали, что CsA снижает связывание CypD с

синтазой, а Φ_n , напротив, увеличивает [64]. Позже они продемонстрировали, что прямым связывающим партнером CypD с F_0F_1 -АТФ синтазой является OSCP и что это взаимодействие может быть также заблокировано агонистом бензодиазепинового рецептора Vz-423. Ресуспендируя в липидных бислоях очищенные на геле комплексы, они показали, что только димеры обладают проводимостью, активируемой Ca^{2+} , Vz-423 и фенил арсином (PhAsO) и равной приблизительно 500 пСм, что соответствует состоянию полупроводимости РТР [63]. Вероятность открывания канала значительно снижалась в присутствии АДФ, а также Mg^{2+} . Модель предполагает, что связывание CypD с OSCP вызывает конформационные изменения в боковом стебле F_0F_1 -АТФ синтазы. Это увеличивает сродство сайта связывания дивалентных катионов, обычно занятых Mg^{2+} , к Ca^{2+} [59]. Удаление субъединиц e (TIM) и g (АТФ20), необходимых для димеризации, увеличивало кальциевую емкость митохондрий дрожжей [77].

Alavian et al. также идентифицировали F_0F_1 -АТФ синтазу как пороформирующую единицу РТР; однако предполагаемый механизм действия модели отличается. В очищенных олигомерах с-субъединиц авторы наблюдали чувствительный к напряжению ток около 100 пСм, достигающий пиковой проводимости 1,5-2 нСм, аналогичной РТР. Антитела для с-субъединицы блокировали этот ток. В отличие от исследований Bernardi et al., очищенные мономеры с-субъединицы показали редкую проводимость канала, которая значительно усиливалась при добавлении рекомбинантного CypD или Ca^{2+} . Добавление экзогенной F_1 β -субъединицы блокировало проводимость очищенной с-субъединицы, поэтому предполагается, что критическим событием для образования пор является отщепление F_1 от F_0 комплекса F_0F_1 -АТФ синтазы [78]. Нокдаун с-субъединицы увеличивал устойчивость к открыванию РТР, тогда как сверхэкспрессия, наоборот, снижала [79]. Однако в другой работе нокдаун с-субъединицы или PiC не вызывал устойчивости к открыванию РТР [80].

Совсем недавно, Shanmugapriya et al. идентифицировал металлопротеиназу параплегин SPG7 как кандидат в компонент РТР [80]. Используя ко-иммунопреципитацию и двухгибридный анализ дрожжей с различными мутантами SPG7, было показано, что с-концевая область SPG7 является существенной для CsA-чувствительного CypD-связывания. Авторы индуцировали мутацию CsA-связывающего домена CypD и показали, что он не может связывать SPG7 и придает устойчивость к открыванию РТР. Однако данный CsA-чувствительный мутант также содержал мутацию R97G, что делает ее изомераза-дефицитным мутантом, и затрудняет толкование полученных результатов [55]. CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут и реинтродукция нефункционального мутанта SPG7 показали, что ферментативная активность SPG7 не требуется для защиты от открывания

РТР. Клетки с нокаутом SPG7 по-прежнему подвержены индукции РТР, следовательно, SPG7 функционирует как регуляторный белок, но не является основным порообразующим компонентом. К настоящему моменту не была определена проводимость SPG7-содержащего комплекса поры в липидном бислое, а также влияние Ca^{2+} , Φ_n , АДФ/АТФ и других модуляторов РТР [56].

Альтернативная модель предполагает, что повреждения, вызванные, например, химическими реактивами, окислительным стрессом и сшиванием тиолов, приводят к неправильному сворачиванию (мисфолдингу) интегральных белков. Мисфолдинг создает гидрофильные поверхности, которые обращены к липидному бислою, что является термодинамически неблагоприятным состоянием. В результате неправильно свернутые белки агрегируют на этих гидрофобных поверхностях и формируют водные трансмембранные каналы, которые являются зарождающимися РТР-порами. Для того, чтобы предотвратить катастрофическую проницаемость и разобщение окислительного фосфорилирования, SurD и другие молекулярные шапероны, действующие с обеих сторон внутренней мембраны, блокируют проводимость пор [81]. SurD, как и другие циклофилины, является цис-транс пептидил пролин изомеразой, а именно, фолдазой, которая может участвовать в стимулировании рефолдинга неправильно свернутых белков [82]. Однако, связывание SurD также делает пору чувствительной к Ca^{2+} -индуцированному открыванию. Когда содержание зарождающихся пор превышает содержание шаперонов, доступных для блокирования проводимости, происходит нерегулируемое открывание РТР [81].

Учитывая сложный характер явления и противоречивые данные о молекулярных компонентах РТР, не исключено, что комплекс поры может представлять собой объединение всех вышеперечисленных компонентов как частей АТФ-синаптосомы [83, 84]. Также существует гипотеза, согласно которой РТР возникает из взаимодействия и ассоциирования PolyP с белковыми компонентами, благодаря чему обеспечивается чувствительность к Ca^{2+} и к потенциалу, а также селективность поры [85].

1.3. Активаторы РТР

1.3.1. Ca^{2+} как ключевой регулятор РТР

Известно, что Ca^{2+} является главным регулятором РТР и к настоящему времени в литературе накопилось большое количество данных, подтверждающих, что он модулирует состояние поры прямо и опосредованно: путем регулирования баланса АДФ/АТФ, уровня митохондриального $\Delta\Psi_m$, АФК, активных форм азота (RNS) и протеолитических процессов.

Перегрузка митохондриального матрикса кальцием является первичной причиной открывания РТР. Концентрация цитозольного кальция обычно не превышает 1 мкМ. Однако, в областях локализации ассоциированных с митохондриями мембран эндоплазматического ретикулума, сформированных VDAC, GRP75 и инозитол 1,4,5-трифосфатным рецепторами, она может временно достигать ≥ 10 мкМ [86, 87]. Такая концентрация является достаточной для активации MCU [87, 88]. Показано, что для индукции РТР в митохондриях бычьего сердца требуется как минимум 100-200 нмоль Ca^{2+} /мг белка [1, 89]. Хелатирование Ca^{2+} или блокирование его входа в матрикс митохондрий с помощью рутениевого красного, либо лантана, предотвращает набухание митохондрий, индуцируемое фосфатом, арсенатом и олеиновой кислотой [1]. Эксперименты по изменению порядка добавки Ca^{2+} и ингибиторов набухания, таких как ингибитор фосфатного переносчика NEM, Sr^{2+} и Mg^{2+} позволили предположить, что данные реагенты оказывают свое действие либо путем предотвращения накопления Ca^{2+} в митохондриях (MalNEt и Sr^{2+}), либо путем вытеснения Ca^{2+} из сайтов связывания с комплексом РТР (Mg^{2+}).

Также подтверждением главенствующей роли Ca^{2+} в регуляции открывания РТР является наличие Ca^{2+} -связывающих сайтов внутри комплекса РТР. Тщательные исследования Haworth и Hunter впервые показали, что скорость индукции открывания РТР кальцием имеет коэффициент Хилла 1.85, а K_m для Ca^{2+} и V_{\max} открывания РТР независимо модулируются Mg^{2+} , АДФ и НАДН [2].

Одним из механизмов регуляции РТР Ca^{2+} является модулирование катионом баланса АТФ/АДФ, которое он может осуществлять двумя способами. Во-первых, Ca^{2+} может регулировать активность цикла Кребса, увеличивая активность пируватдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы [90]. Повышенная активность этих ферментов, в конечном счете, увеличивает митохондриальный НАДН, являющийся субстратом комплекса I дыхательной цепи переноса электронов (ЭТЦ). Повышение количества субстрата приводит к увеличению протондвижущей силы и продукции АТФ комплексом V [91].

Во-вторых, Ca^{2+} может регулировать комплекс V непосредственно. Показано, что Ca^{2+} может активировать F_0F_1 -АТРаза-зависимый гидролиз АТФ до АДФ и P_i , который не связан с генерацией протонного градиента [92]. Учитывая гомологию последовательности с тропонином Т, субъединица F_0 -e, которая лежит между кольцом F_0 и ротором F_1 , должна иметь мотив связывания Ca^{2+} , который состоит из аминокислотных остатков 34-65. Обработка антителами против пептида, состав которого соответствует этому мотиву, увеличивала активность АТФазы в митопластах, но не в субмитохондриальных везикулах

(ИММ-везикулы с матриксной стороной, обращенной наружу). Таким образом, Ca^{2+} -связывающий сайт расположен на внешней стороне ИММ [93]. В другом исследовании с помощью меченого $^{45}\text{Ca}^{2+}$ и SDS PAGE было определено, что Ca^{2+} может связываться с той частью F-с-субъединицы, которая обращена к IMS, при этом у бактерий связывание Ca^{2+} блокировало транслокацию протонов [94].

АФК являются известными активаторами РТР. Поскольку их генерация тесно связана с активностью ЭТЦ, Ca^{2+} также может модулировать их продукцию [95, 96]. Кроме того, результаты некоторых исследований указывают на то, что Ca^{2+} может конкурировать с цитохромом *c* за сайты связывания с кардиолипином на ИММ [97, 98]. Открепление цитохрома *c* может вызвать респираторный блок в комплексе III, приводя к образованию АФК [99].

Совсем недавно стало понятно, что протеолиз митохондриальных белков является важным механизмом модуляции митохондриальной энергетики и запуска митохондриальной дисфункции. Крупным семейством протеолических белков являются Ca^{2+} -зависимые цистеиновые протеазы кальпаины, которые, как предполагается, частично локализованы в митохондриях [100–102]. Как правило, для активации *in vitro* им требуется от 10 мкМ (кальпаин I) до 1 мМ (кальпаин II) Ca^{2+} . Предполагается, что близость плазматической и эндосомальных мембран создает благоприятные условия для активации протеаз *in vivo*, поскольку в экспериментах *in vitro* фосфолипиды снижали концентрацию кальция, требуемую для активации [103]. Было показано, что повышение уровня Ca^{2+} при реперфузии сердец крыс индуцирует транслокацию кальпаинов к сарколемме, а последующая нормализация pH среды приводит к активации кальпаинов (при этом кислый pH ингибирует протеазы) [104]. Было также установлено, что при реперфузии кальпаины отделяют субъединицу ND6 комплекса I митохондрий [82, 100, 102]. Повышенная экспрессия митохондриального кальпаина I или кальпастина может значительно увеличить и уменьшить продукцию АФК и транзитное открывание РТР, соответственно [105].

На миоблестах H9c2 показано, что кальпаин I при активации способен расщеплять киназу гликоген синтазы-3 β в митохондриальном матриксе. Возможно, гиперактивация киназы при усечении может способствовать фосфорилированию CypD и его связыванию с РТР для индукции устойчивого открывания поры [14].

1.3.2. Механизмы входа кальция в митохондрии

Ca^{2+} преодолевают ОММ через канал VDAC. VDAC осуществляет транспорт малых ионов (например, Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+), больших анионов, таких как глутамат, АТФ, АДФ, и больших катионов, таких как ацетилхолин и дофамин [106, 107]. Реконструированные в планарных липидных бислоях каналы характеризуются симметричной колоколообразной потенциал-зависимой проводимостью. Низкий потенциал (-20 – +20 мВ) вызывает состояние высокой проводимости (~ 4 нСм в 1 М КСl), при котором VDAC предпочтительно транспортирует анионы (открытое состояние). При высоком потенциале (> 40 мВ), VDAC переходит в режим низкой проводимости, характеризующийся катионной, либо менее анионной, чем при открытом состоянии, селективностью [106–108].

Наиболее изученным белком, осуществляющим транспорт кальция через IMM, является кальциевый митохондриальный унипортер (MCU) [109, 110]. Ингибиторами данного белка являются рутениевый красный и лантаниды [61]. Работа MCU регулируется как пост-трансляционной модификацией, так и ассоциацией со вспомогательными субъединицами – основным регулятором MCU (EMRE), митохондриальными регуляторами входа кальция (MICU) 1-3, и регулятором MCU1 (MCUR1) [111–115]. Как только внемитохондриальная $[\text{Ca}^{2+}]$ превышает заданную величину, Ca^{2+} транспортируется унипортером в матрикс даже при сильной деполяризации митохондрий [116]. Нокаут порформирующей субъединицы белка MCU (Mcu) в клеточных культурах и *in vivo* в мышцах сильно ухудшает вход Ca^{2+} в матрикс митохондрий, при этом потребление кислорода и мембранный потенциал не изменяются [109]. В другом исследовании кардиомиоциты мышечной с нокаутом Mcu были устойчивы к активации РТР. Такие мышцы не обладали сократительной чувствительностью к стимуляции β -адренергических рецепторов и активность их пируватдегидрогеназ матрикса была снижена на ~50%. При моделировании ишемия-реперфузионных повреждений *in vivo* у животных наблюдалось ~45%-ое снижение размера инфаркта миокарда [117]. Кроме MCU существует другие еще менее исследованные механизмы входа кальция: митохондриальный рианодинновый рецептор типа 1, трансмембранный белок, содержащий лейциновый замок-EF-руку (Letm1) mCa1&2 [118–121].

1.3.3. Механизмы выхода кальция из митохондрий

Учитывая, что $\Delta\Psi_m$ обеспечивает вход Ca^{2+} , можно ожидать, что митохондрии в конечном итоге достигнут состояния равновесия с $\Delta\Psi_m$; однако это привело бы к концентрации свободного Ca^{2+} 10^{-1} М, что несовместимо с митохондриальными функциями [122]. В настоящее время известно о существовании двух путей выхода кальция из

митохондрий: 1) электронейтральный H^+/Ca^{2+} антипортер; и 2) Na^+/Ca^{2+} обмен [123, 124]. Первый, по-видимому, преобладает в невозбудимых тканях (печень и почки), второй – в возбудимых (сердце и мозг). Молекулярное строение H^+/Ca^{2+} обменника до сих пор не установлено. Na^+/Ca^{2+} обмен осуществляет $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ -проводящий транспортер (NCLX), который работает со стехиометрией 3 или 4 $Na^+/1 Ca^{2+}$, приводя к импорту 1-2 положительных зарядов в матрикс [125]. Предполагается, что NCLX может работать в прямом или обратном направлении в зависимости от величины $\Delta\Psi_m$ и концентрации Na^+ в цитозоле. Согласно данной модели, для того, чтобы произошел выход кальция из матрикса хорошо поляризованных митохондрий ($\Delta\Psi_m = 170$ мВ), концентрация Na^+ должна подняться выше 36 мМ. Без такого увеличения $[Na^+]$ для выхода Ca^{2+} необходимо кратковременное падение потенциала, которое наблюдается при открытии низкопроводящих пор [126].

1.3.4. Другие активаторы РТР

Кроме кальция, существует еще несколько мощных активаторов РТР. Одним из них является гликозид атрактилозид и его родственный ингибитор карбоксиатрактилозид (КАТР), регулирующие работу транспортера АНТ, который является предполагаемым компонентом и регулятором РТР. Данный переносчик располагается во внутренней мембране митохондрий и осуществляет обмен одной молекулы АДФ, имеющей три отрицательных заряда, на одну молекулу АТФ, несущую четыре отрицательных заряда; активность переносчика регулируется трансмембранным потенциалом. Атрактилозид и КАТР блокируют транспортер в его цитозольной «с» - конформации, когда субстратсвязывающий сайт ориентирован в межмембранное пространство. Предполагается, что переход из «с»- в «т»-конформацию вызывает открепление положительно заряженного пептидного сегмента от анионных поверхностных фосфолипидов (в особенности, кардиолипина), взаимодействующих с траслокатором. Ингибирование белка в «с»-конформации, по-видимому, приводит к накоплению положительного заряда на матриксной поверхности ИММ. Такие условия могут способствовать снижению скорости диссоциации катиона от обращенной к матриксу стороне ИММ, приводя к увеличению микродоменов кальция, взаимодействующих с триггерным сайтом РТР, на поверхности мембран [3, 127].

Морфология митохондрий также влияет на открывание РТР. Разделение (fission) митохондрий, которое регулируется динамин-подобным белком 1 (Drp1), может увеличивать вероятность открывания РТР. В модели ишемии-реперфузии сердца сверхэкспрессия белка митохондриального слияния (fusion) митофузина 2 (MFN2), либо

обработка mdivi (фармакологический ингибитор Drp1) были способны индуцировать вытягивание митохондрий, уменьшать размер инфаркта и замедлять начало открывания РТР [128]. С использованием модели гипергликемии было обнаружено, что при фрагментации митохондрий запускаются процессы повышенной генерации АФК, открывание РТР и клеточная гибель [129]. Увеличение концентрации кальция в цитозоле может индуцировать транслокацию Drp1 в митохондрии [130, 131], а наличие кальция в матриксе необходимо для процесса fission, происходящего после транслокации Drp1 [132, 133].

Окислительный стресс и тиоловые реагенты также модулируют РТР [134]. Короткоцепочечный гидропероксид тертобутилгидропероксид (ТВН), который является аналогом гидроперекисей липидов, в изолированных митохондриях и клеточных культурах вызывает открывание РТР [135]. Обработка ТВН приводит к окислению митохондриального НАД(Ф)Н, увеличению уровня свободного кальция в матриксе, генерации АФК, деполяризации и пермеабиллизации внутренней мембраны [45, 136]. Хелатирование внутримитохондриального Ca^{2+} с помощью ВАРТА-АМ предотвращает увеличение уровня свободного Ca^{2+} и блокирует формирование АФК, но не окисление НАД(Ф)Н. Напротив, ингибирование генерации АФК с помощью десферала или дифенил-п-фенилендиамина тормозит, но не блокирует увеличение уровня Ca^{2+} . Таким образом, окисление НАД(Ф)Н приводит к росту митохондриального Ca^{2+} , что, в свою очередь, стимулирует формирование АФК и индукцию РТР. Ca^{2+} и АФК синергично увеличивают вероятность открывания РТР [135]. После реперфузии сердечных миоцитов, подвергшихся ишемии, наблюдается открывание РТР, которому предшествует генерация АФК. Антиоксиданты предотвращают данное явление [136].

Окислительный и нитрозилирующий стресс могут вызывать посттрансляционные модификации белков. К таким модификациям относятся обратимые изменения цистеина, тирозина, метионина, гистидина, триптофана и необратимое карбонилирование белков [137]. Тиоловые группы могут подвергаться S-нитрозилированию оксидом азота или обратимому окислению АФК с последующим формированием дисульфидных связей или сульфеновой кислоты, последняя далее может быть окислена до сульфиновой или сульфоновой кислот [138]. Сульфеновая кислота также может восстанавливаться глутатионом. Остатки тирозина взаимодействуют с пероксинитритом, в результате чего образуется 3-нитротирозин.

Использование окислителей тиолов (диамид, анион мышьяка (AsO), PhAsO, о-фенантролин меди) и модификаторов тиолов (NEM и монобромобиман) позволило установить наличие АФК-чувствительных регуляторных тиоловых групп на матриксной

стороне РТР [139–142]. В результате исследований было предположено существование двух сайтов регуляции РТР окислительно-восстановительными модуляторами. Первый сайт, названный «Р сайт», регулируется окислительно-восстановительным состоянием пиридиновых нуклеотидов, в том числе, когда глутатион полностью восстановлен. Другой сайт («S сайт») несет чувствительными к окислению/восстановлению дитиолами, он может быть активирован AsO и PhAsO, и вероятно, находится в равновесии с глутатионом [140]. В результате обработки митохондрий сердца быка мечеными NEM и дитиобис(нитробензоатом) данные соединения были обнаружены связанными с Cys118 OSCP [143]. Предполагается, что OSCP является сайтом связывания CypD с АТФ-синазой [63]. Важной для регуляции РТР мишенью S-нитрозилирования является Cys203 CypD, его конформационные модификации в результате окисления могут стимулировать РТР [144].

Помимо прямого влияния на РТР, АФК и RNS могут оказывать косвенное действие на пору. Было показано, что NO[•] может ингибировать комплекс IV, что приводит к увеличению продукции АФК [42]. Высокие уровни Ca²⁺ и NO[•] в матриксе вызывают ингибирование комплекса I путем стимулирования продукции O₂^{•-} и ONOO⁻, который, в свою очередь, возможно, вызывает S-нитрозилирование и Fe-нитрозилирование комплекса I [92]. ONOO⁻ в митохондриях также может ингибировать комплексы III и V, что может привести к дыхательному блоку и дополнительной продукции АФК [145]. Также показано, что АФК могут активировать митохондриальную киназу гликоген синтазы 3, которая фосфорилирует CypD и вызывает индукцию РТР [146, 147].

Фосфат (Ф_n) способен увеличивать вероятность открывания РТР через механизм, который еще не полностью изучен [61, 148]. Его предполагаемая сенсibiliзирующая роль, вероятно, обусловлена образованием полимерных форм фосфата (polyP) - индуктора РТР и разрушителя матриксной системы забуферивания Ca²⁺ [149, 150].

1.4. Ингибиторы РТР

1.4.1. рН, двухвалентные катионы, CsA, бензодиазипины

На сегодняшний день точная молекулярная структура РТР не известна и это затрудняет поиск блокаторов поры. Одним из наиболее изученных ингибиторов является CsA - циклический полипептид, продуцируемый грибами *Tolyocladium inflatum*. CsA является лигандом белков семейства циклофилинов, которые являются пептидил-пролил цис-транс изомеразы [151]. В концентрации 60 пмоль/мг белка он почти полностью блокирует открывание РТР в изолированных митохондриях сердца крыс [152]. Нокаут гена Ppif, кодирующего матриксный CypD, приводило к потере чувствительности РТР к CsA, следовательно, CypD является мишенью ингибирующего действия CsA на пору [153].

Другим классом химических ингибиторов поры являются бензодиазипины [47]. Исследования показали, что чувствительность РТР к бензоадизипинам и ее индукция не зависит от работы периферических митохондриальных бензоадизипиновых рецепторов, что предполагает вторичный сайт действия [154], возможно, OSCP [63].

Другими ингибиторами РТР являются дивалентные катионы Sr^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . Sr^{2+} и Mn^{2+} конкурируют с ионами Ca^{2+} за вход в матрикс через митохондриальный кальциевый унипортер MCU [56, 155, 156]. Mg^{2+} , предположительно, вытесняет Ca^{2+} из сайтов связывания с комплексом РТР со стороны матрикса ($K_m \sim 10^{-5}\text{M}$) [56, 156–158]. Также было предложено существование внешнего Ca^{2+} -связывающего ингибиторного сайта: добавка катиона к митохондриям, предварительно загруженных Ca^{2+} и затем обработанных рутениевым красным, понижала скорость набухания, индуцированного разобщением с помощью карбонилцианид-4-трифтор метоксифенил-гидразона (FCCP) ($\text{IC}_{50} \sim 0.2 \text{ мМ}$) [158].

Принято считать, что низкий рН ингибирует открывание РТР путем вытеснения ионов Ca^{2+} из сайтов связывания с РТР. Впервые данная регуляция была исследована в работе [2]. Авторы использовали деэнергизованные митохондрии сердца быка, предварительно подвергнутые Ca^{2+} -индуцированному набуханию для удаления эндогенных ионов и нуклеотидов. При построении графиков зависимости наклона кривых абсорбции ($\lambda = 520 \text{ нм}$) от концентрации Ca^{2+} , авторы обнаружили уменьшение значения K_m при увеличении значения рН среды (были проверены среды с рН 6.7, 6.8, 6.9, 7.05 и 7.2). Впоследствии было показано, что снижение рН несколько ингибирует вход Ca^{2+} в митохондрии. Однако, защитный эффект низкого рН был связан, по-видимому, непосредственно с регулированием индукции поры, поскольку разница в набухании митохондрий в среде с рН 6.2 и 7.2 при добавке 500 и 250 мкМ Ca^{2+} , соответственно, была весьма существенна, хотя количество вошедших в матрикс катионов было одинаковым [159]. Проводимость пор митопластов печени крыс, измеренная методом пэтч-кламп, также ингибируется закислением среды, при этом данный эффект можно отменить, увеличивая концентрацию кальция, и затем восстановить, понижая рН, что указывает на конкурентное действие H^+ и Ca^{2+} [156]. Эксперименты с использованием внутримитохондриального индикатора рН 2',7'-бис-(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеина показали, что падение рН матрикса ниже 7.0 тормозит открывание поры, индуцируемое PhAsO [157]. Возможно, механизм ингибирования низким рН связан с протонированием гистидиновых остатков комплекса РТР, так как обработка митохондрий гистидин-селективным реагентом диэтил пирокарбонатом вызывает индукцию РТР при кислом рН матрикса (6.5) и увеличивает ее даже при рН 7.0-7.4 [160].

1.4.2. Роль АНТ в ингибировании РТР адениновыми нуклеотидами

Адениновые нуклеотиды уже долгое время известны как сильные ингибиторы РТР [3]. В пермеабелизованных митохондриях в отсутствие дыхательных субстратов АДФ закрывает предварительно открытую РТР в 20-раз более эффективно, чем АТФ [3, 134, 161]. Деокси-АДФ менее эффективен, чем АДФ, тогда как АМФ, сАМФ и ГДФ не ингибируют пору [134, 162]. Отношение АДФ/АТР является важным, поскольку может влиять на конформацию транслокатора адениновых нуклеотидов, предполагаемого компонента и/или регулятора РТР [163].

АНТ является одним из наиболее многочисленных митохондриальных белков, в сердце его содержание составляет около 10% от количества белков внутренней мембраны, в печени – одна треть [164, 165]. Транслокатор осуществляет электрогенный обмен ATP^{4-} на ADP^{3-} , направление определяется концентрационным градиентом нуклеотидов и мембранным потенциалом: сильный отрицательный заряд внутренней мембраны митохондрий (около -180 мВ) способствует движению АТФ в цитозоль и АДФ в матрикс. В результате отношение АТФ/АДФ в цитозоле намного выше (до 50 раз), чем в митохондриях, что крайне важно для клеточного метаболизма [165]. При ингибировании дыхания транспортер может работать в обратном режиме, перенося АТФ внутрь митохондрий, где гидролиз нуклеотида, осуществляемый F_0F_1 -АТР-азой, будет поддерживать мембранный потенциал [166].

Митохондрии человека содержат три изоформы АНТ, последовательности которых идентичны примерно на 90% [164]. АНТ1 экспрессируется преимущественно в сердце и скелетных мышцах, АНТ3 – во всех тканях на уровне, отражающем потребности в окислительном фосфорилировании [167]. АНТ2 экспрессируется в быстро пролиферирующих клетках, например, в миобластах и раковых клетках [168, 169, 170]. Крысы и мыши содержат только две изоформы переносчика, эквивалентные АНТ1 и АНТ2, последняя присутствует во всех тканях.

АНТ принадлежит к большому семейству митохондриальных переносчиков, кодируемых ядерной ДНК. Все члены семейства содержат три гомологичных повтора последовательности примерно в 100 аминокислотных остатков и 6 α -спиралей (по 2 в каждой последовательности), состоящих из 18-22 остатков. Большинство исследований функций и строения АНТ проводится с использованием его высокоспецифичных ингибиторов. Так, было выяснено, что для белка характерно существование в двух конформациях. Бонгкрековая (БК) и изобонгкрековая кислоты ингибируют переносчик, стабилизируя его в открытой в сторону матрикса «m» - конформации, в которой центральный связывающий нуклеотиды сайт доступен митохондриальному матриксу [166].

Предполагается, что такое состояние снижает вероятность взаимодействия АНТ с CypD и, тем самым, открывания РТР [3, 134, 163, 171]. Ингибиторы АНТ атрактилозид и КАТР стабилизируют переносчик в обращенной в сторону цитозоля конформации («с» - конформации), при которой субстрат-связывающий сайт доступен межмембранному пространству. Такая конформация способствует индукции РТР и снижает защитный эффект адениновых нуклеотидов [134, 163, 172, 173]. Однако, в другом исследовании было обнаружено, что комбинация АДФ и КАТР (в присутствии олигомицина) почти полностью подавляет индукцию РТР [174].

Согласно последним данным по атомарной структуре АНТ, белок является мономером, в котором 6 α -спиралей формируют пучок вокруг центральной полости, также в митохондриальном матриксе находятся три дополнительных α -спирали. При этом переносчик имеет единственное общее место связывания для нуклеотидов и функционирует по механизму пинг-понга [175–177].

Многочисленные эксперименты показали, что существуют два АТР/АДФ-связывающих сайта, регулирующих работу РТР. Первый является высокоафинным ($K_d = 1 - 10$ мкМ АДФ) и КАТР-чувствительным, т.е. ассоциирован с АНТ [3, 134, 174]. Второй, низкоафинный ($K_d = 0,025 - 0,9$ мМ АТР/АДФ) КАТР-нечувствительный сайт к настоящему времени не идентифицирован [172, 178–181].

Было показано, что падение мембранного потенциала регулирует РТР [182], при этом сенсором потенциала, возможно, является АНТ. Трифлуоперазин, ингибитор РТР, изменяет чувствительность поры к потенциалу [183], данный реагент эффективен только в энергизованных митохондриях [134]. Предполагается, что эффект трифлуоперазина определяется изменением заряда на поверхности мембраны [183], что согласуется с влиянием поверхностного заряда на связывание адениновых нуклеотидов с АНТ.

Окислительный стресс, индуцируемый ТВН или диамидом, а также тиоловые реагенты, такие как PhAsO, сильно повышают чувствительность РТР к $[Ca^{2+}]$. Действие данных факторов опосредовано регуляцией связывания CypD и АДФ с АНТ (улучшением первого и ухудшением второго). Самый сильный эффект оказывает PhAsO, который увеличивает $K_{0.5}$ ингибиторного действия АДФ до значений, превышающих 500 мкМ [134]. Окислительный стресс и PhAsO также повышают чувствительность РТР к мембранному потенциалу [182, 184]. АНТ содержит три цистеиновых остатка, демонстрирующих различную конформационно-зависимую реактивность с различными тиоловыми и окисляющими реагентами [185]. Предполагается, что данные цистеины несут тиоловые группы, подходящие для регуляции связывания АНТ с CypD, ингибиторного действия АДФ и мембранного потенциала на РТР [134, 186, 187]. Специфическая модификация Cys159 с

помощью малеимида эозина не только ингибирует связывание и транспорт АДФ [188, 189], но и почти полностью снимает ингибирующее действие нуклеотида на индукцию РТР [134, 186]. Было показано, что PhAsO химически связывает Cys159 и Cys256, тогда как диамид вызывает формирование дисульфидного мостика опосредовано, через регуляцию окисления глутатиона [186]. Как PhAsO, так и диамид снижают способность фенантролена меди сшивать два мономера АНТ через их остатки Cys56. Возможно, учитывая близость Cys56 и Pro61, предполагаемого места связывания с CypD, такое конформационное изменение лежит в основе индуцированного PhAsO и окислительным стрессом увеличения связывания CypD с АНТ [129, 186, 190, 191].

Механизм стимулирования открывания РТР ингибиторами АНТ, стабилизирующими переносчик в «с» - конформации, возможно, связан с регулированием проводимости внутренней мембраны митохондрий для ионов H^+ . Известно, что жирные кислоты [192–194], АМР [195] и алкены [196] активируют КАТР-чувствительные протонные утечки. По-видимому, АНТ также вносит основной вклад в базальную, независимую от жирных кислот протонную проводимость, которая не чувствительна к действию КАТР: в митохондриях мышц мышей и дрозофил, независимо от наличия КАТР, генетическое удаление транспортера приводит к снижению проводимости, а увеличение экспрессии – к ее повышению [197]. Было показано, что в присутствии олигомицина АДФ ингибирует протонную и калиевую проводимость митохондрий печени крыс, а карбоксиатрактилозид отменяет данный эффект [198]. Возможно, итоговое увеличение концентрации H^+ приводит к закислению матрикса митохондрий, снижению его кальциевой буферной емкости, увеличению концентрации свободного кальция и, тем самым, индукции РТР [199].

1.4.3. Регуляция Ca^{2+} -буферной емкости матрикса с помощью АН. Роль SCaMC

В нормальных условиях концентрация свободного кальция в митохондриях очень низкая – менее 1 мкМ. Поддерживать такое количество катиона позволяет накопление его в виде солей фосфорной кислоты. Φ_n и его полимерная форма полифосфат (PolyP) сильно регулирует эту Ca^{2+} -буферную систему. Также она зависит от режима входа Ca^{2+} : в изолированных митохондриях сердца быстрый вход небольшого количества Ca^{2+} (0.1 - 2 мкМ) увеличивал $[Ca^{2+}]_{mt}$, вовлеченную в работу в качестве вторичного мессенджера для цикла трикарбоновых кислот; большие добавки Ca^{2+} (2 - 10 мкМ) позволяют Ca^{2+} взаимодействовать с фосфатной буферной системой [13]. Было показано, что большие количества Ca^{2+} (50-500 нмоль/мг белка) могут быть забуферены без значительного изменения концентрации свободного кальция в матриксе [200]. Буферная емкость сильно зависит от рН матрикса: Φ_n входит в митохондрии в качестве $H_2PO_4^-$ и для того, чтобы

связать Ca^{2+} , ему необходимо потерять 2H^+ , что возможно только в щелочной среде. Затем PO_4^{3-} может взаимодействовать с Ca^{2+} с образованием $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [201]. Одним из доказательств такой модели буферизации является то, что при добавлении протонофора/закислении матрикса происходит быстрая диссоциация солей, Ca^{2+} и P_i выходят через их соответствующие переносчики или РТР. Однако, в других работах было показано, что ΔpH на внутренней мембране митохондрий обратно пропорциональна количеству Φ_n в среде, при наличии 10 мМ Φ_n находится в диапазоне 0,11-0,15 и остается относительно постоянной при изменении рН снаружи [116, 202]. В таких условиях добавление разбавителей вызывало выход Ca^{2+} как в кислых, так и щелочных средах. Это говорит о том, что закисление матрикса не является единственным объяснением выхода катиона [116].

По-видимому, PolyP также может взаимодействовать с комплексами и нарушать их образование, увеличивая концентрацию свободного Ca^{2+} . Действительно, в клетках с матриксом, обедненным PolyP, уровень $[\text{Ca}^{2+}]_m$ более низкий и они устойчивы к открыванию РТР [203]. Защитный эффект увеличения преципитатов $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в матриксе был показан на некоторых моделях клеточной гибели, опосредованных перегрузкой Ca^{2+} , например, эксайтотоксичность глутамата в первичной культуре нейронов [39]. Буферизация Ca^{2+} в матриксе с помощью эфира N,N'-[1,2-ethanediylbis(oxo-2,1-phenylene)]bis[N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]]-,bis[(acetyloxy)methyl] (ВАРТА-АМ) эффективно подавляла открывание РТР [204].

Было показано, что комплексы $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в матриксе митохондрий содержат адениновые нуклеотиды [205], при этом на долю АТФ приходится до 7% их сухого веса [206]. Кроме того, в условиях, когда Ca^{2+} поступал в митохондрии в присутствии АТФ, но не в присутствии АДФ [207], преципитаты также содержали Mg^{2+} . По-видимому, адениновые нуклеотиды в матриксе митохондрий влияют на процессы формирования преципитатов, возможно, путем их стабилизации [208].

Белок АНТ обменивает ATP^{4-} на ADP^{3-} , но не изменяет общее содержание АТФ/АДФ/АМР в матриксе. Низкие концентрации адениновых нуклеотидов (около 100 мкМ) ингибируют открывание РТР в изолированных митохондриях печени и мозга [53], вероятно, за счет конформационных изменений АНТ при связывании с его высоко-афинными сайтами (K_d около 1-10 мкМ) [209]. Однако, миллимолярные концентрации адениновых нуклеотидов также оказывают мощное протекторное действие, даже в присутствии ингибиторов АНТ [178, 210, 211]. Учитывая, что концентрации адениновых нуклеотидов в клетке находятся в миллимолярном диапазоне (в митохондриях гепатоцитов [АДФ] ~ 6 мМ, [АТФ] ~ 8 мМ, в цитозоле – [АДФ] ~ 0.7 мМ, [АТФ] ~ 3.3 мМ [212]), должен

существовать еще один АТФ/АДФ – связывающий регулятор РТР. Вполне вероятно, что таким белком является транспортер АТФ-Mg/Ф_n (или SCaMC), осуществляющий обратимый, электронейтральный обмен АТФ-Mg²⁺ или НАДФ²⁺ на НРО₄²⁻ при стимулировании кальцием со стороны цитозоля [213]. В клетках млекопитающих существует четыре изоформы этого белка: SCaMC-1/SLC25A24, SCaMC-2/SLC25A25, SCaMC-3/SLC25A23 и SCaMC-3-подобный/SLC25A41 [214, 215]. Транспортер состоит из трех доменов: N-терминального регуляторного домена, линкерной петли с амфипатической α -спиралью и C-терминального транспортирующего домена. N-терминальный регуляторный домен формирует две пары последовательностей «EF-hand», связанных одной длинной центральной α -спиралью. В кальций-связанном состоянии амфипатическая α -спираль линкерной петли связана с гидрофобной расщелиной EF-hand 3 и 4 аналогично кальмодулину [216]. C-терминальный домен имеет структурную складку, характерную для митохондриальных переносчиков, и участвует в транспорте субстратов через IMM [217]. Он состоит из трех гомологичных повторяющихся последовательностей [218], каждая из которых содержит две трансмембранные спирали, соединенные матриксной α -спиралью [175]. Регуляторный домен расположен в межмембранном пространстве, но его положение относительно переносчика не известно. Одна из гипотез регуляции переносчика кальцием предполагает работу по механизму locking pin (стопорный штифт), действующему амфипатическую α -спираль. Когда уровень кальция в межмембранном пространстве высокий, N-терминальная амфипатическая α -спираль связана с расщелиной в регуляторном домене, приводя к транспорту субстрата C-доменом. Когда уровень кальция падает, расщелина закрывается и амфипатическая α -спираль высвобождается, связывается с C-терминальным доменом и блокирует переносчик [219]. В разных работах сообщалось о разной концентрации Ca²⁺, активирующей работу SCaMC (от 4 до 30 мкМ) [220–222]. В результате исследования транспорта АТФ реконструированными в липосомы SCaMC-1 человека при добавлении 0,05 – 4 мМ Ca²⁺ было показано, что активность переносчика линейно зависит от концентрации катиона [219].

Митохондрии, выделенные из печени мышей с нокаутом SCaMC-3, в отличие от митохондрий дикого типа, не накапливали адениновые нуклеотиды при добавке кальция и не увеличивали кальциевую емкость в присутствии АТФ-Mg. Концентрация кальция, вызывающая полумаксимальную активность переносчика, была равна 3.3±0.9 мкМ. При исследовании потребления кислорода митохондриями, лишенными адениновых нуклеотидов, было обнаружено, что добавка АДФ и кальция стимулировала олигомицин-чувствительное дыхание только в митохондриях дикого типа [221]. В нейронах SCaMC-3-опосредованное поступление адениновых нуклеотидов в матрикс митохондрий

увеличивает стимуляцию дыхания при высоких нагрузках [223, 224]. Мыши с нокаутом SCaMC-3 характеризовались большей уязвимостью к каинат-индуцированным судорогам, а их кортикальные нейроны *in vitro* характеризовались повышенной восприимчивостью к эксайтотоксичности глутамата [225]. У мышинных эмбриональных фибробластов, полученных из Slc25a25(-/-) мышей, потоки Ca^{2+} через эндоплазматический ретикулум, базальное митохондриальное дыхание и содержание АТФ в клетке снижены, по-сравнению с фибробластами дикого типа [226]. Ранее было показано, что многие линии раковых клеток характеризуются повышенной экспрессией белка SCaMC-1. В таких клетках наблюдается усиленное Ca^{2+} -опосредованное поступление адениновых нуклеотидов в матрикс, увеличение его Ca^{2+} -буферной емкости, и, соответственно, повышенная устойчивость клеток к индукции РТР [181].

Различие в Ca^{2+} -буферной емкости АТФ и АДФ может объяснять роль F_0F_1 -АТРаза в регуляции РТР [59, 63, 204, 227]. Действительно, Ca^{2+} и оксиданты могут активировать F_0F_1 -АТРаза-зависимый гидролиз АТФ до АДФ и P_i , который не связан с генерацией протонного градиента [92]. Сопровождающееся снижение общей Ca^{2+} -буферной емкости нуклеотидов матрикса должно индуцировать открывание РТР. Стимулирование РТР добавлением разобщителей также может объясняться F_0F_1 -АТРаза-опосредованным гидролизом АТФ [182]. И наоборот, предотвращение гидролиза АТФ может ингибировать открывание РТР, вызванное гидропероксидом кумола [227].

1.4.4. Ингибирование РТР с помощью ПН

Пиридиновые нуклеотиды матрикса митохондрий, их окислительно-восстановительный статус являются известными регуляторами РТР, однако точные механизмы их действия остаются не известными. Hunter D.R. и Haworth R.A. в 1979 г. показали, что в деэнергизованных митохондриях высокий уровень восстановленного НАД⁺ в матриксе предотвращает Ca^{2+} -индуцированное набухание: ротенон ингибирует открывание РТР, предварительная добавка FCCP отменяет эффект ротенона, а последующая добавка β -гидроксипутирата восстанавливает его. Поскольку добавление внешнего НАДН не влияло на индукцию РТР, авторы заключили, что сайт действия НАДН располагается на матриксной стороне. В митохондриях, содержащих полностью восстановленный НАД⁺, скорость индукции РТР была в пять раз ниже, чем в органеллах с полностью окисленным пулом НАД⁺. Скорость открывания поры в присутствии β -гидроксипутирата была ниже в три раза, чем без субстрата. Субстраты, увеличивающие степень восстановленности НАД⁺, такие, как пируват, α -кетоглутарат, глутамат, ингибировали индукцию РТР [3], напротив, реагенты, снижающие степень

восстановленности нуклеотида, такие, как оксалоацетат, фторлимонная кислота, малонат, пероксид, диамид стимулировали открывание поры [3, 228, 229]. В условиях полного окисления НАД⁺, открывание поры было заингибировано все время, пока поддерживался $\Delta\Psi_m$. Однако коллапс $\Delta\Psi_m$, вызванный добавлением FCCP, не достаточен для индукции РТР, поскольку предварительное восстановление НАД⁺ β -гидроксибутиратом сильно ингибирует открывание поры. Таким образом, НАДН и гиперполяризация $\Delta\Psi_m$ могут независимо ингибировать открывание поры [3].

В митохондриях, уже подвергшихся Ca^{2+} -индуцированному открыванию РТР и лишенных эндогенных нуклеотидов, последующая добавка НАДН, который проникал в матрикс, способствовала в 10 раз более мощному закрытию поры, чем НАД⁺, а его кажущаяся K_i РТР была в 200 раз больше, чем для АДФ [162]. В таких условиях НАДФН и пальмитоил-СоА ослабляли защитное действие НАДН, что указывает на конкуренцию за сайт связывания. АДФ, напротив, синергично усиливал эффект НАДН. Возможно, эффект НАДН на пору является аллостерическим [162, 230].

В 1996 году V.Chernyak and P.Bernardy опубликовали работу, исследующую роль пиридиновых нуклеотидов и глутатиона в регуляции РТР, индуцированной окисляющими агентами в деэнергизованных митохондриях [230]. Авторы показали, полное окисление глутатиона, вызванное добавлением *t*-бутилгидропероксида, а также сшивание митохондриальных дитиолов с помощью арсенитов и PhAsO, увеличивают чувствительность РТР к Ca^{2+} . Такой эффект можно полностью предотвратить добавлением тиолового реагента монобромобимана и затем восстановить с помощью дитиотреитола. Окисление пиридиновых нуклеотидов увеличивало чувствительность поры к Ca^{2+} в условиях, когда глутатион поддерживался в восстановленном состоянии; монобромобиман и дитиотреитол, в отличие от 2-гидроксибутирата, не смогли предотвратить данный процесс. Эффекты сшивания/окисления дитиолов и окисления пиридиновых нуклеотидов, оказываемые на РТР, были аддитивными. При этом полное окисление пиридиновых нуклеотидов не влияло на реакционную способность дитиолов по отношению к монобромобину, что указывает на их восстановленное состояние. После набухания митохондрий в гипотонической среде с добавлением Ca^{2+} они теряли чувствительность к окислению пиридиновых нуклеотидов, но не к сшиванию дитиолов, при последующем индуцировании сжатия с помощью ПЭГ и Ca^{2+} . В совокупности полученные данные указывают на то, что процессы окисления-восстановления влияют на РТР через два отдельных сайта, общим связующим интермедиатом которых является глутатион [230].

По-видимому, окисление НАДФН является более важным фактором, запускающим выход Ca^{2+} из митохондрий, чем окисление НАДН [19, 231, 232]. Окисление НАДФН

приводит к окислению глутатиона и, как следствие, критических тиолов РТР, находящихся в редокс-равновесии с ним [19, 230, 233]. Было показано, что ацетоацетат, окислитель НАДН, стимулировал нечувствительный к рутениевому красному выход Ca^{2+} , который не сопровождался падением мембранного потенциала и набуханием митохондрий (режим низкой проводимости РТР). Напротив, диамид, окислитель тиолов, вызывал быстрый выход Ca^{2+} , падение $\Delta\Psi_m$ и набухание митохондрий (режим высокой проводимости РТР). Добавка FCCP к ацетоацетату индуцировала быстрый переход из состояния низкой проводимости в высокую. При этом и ацетат- и диамид-индуцированную пермеабиллизацию можно было заингибировать добавлением каталазы [19].

Также защитное действие НАДН может быть связано с предотвращением продукции АФК путем восстановления убихинона, являющегося регулятором РТР [3]. Другие данные свидетельствуют о том, что действие убихинонов связано не с редокс-процессами, а непосредственно со связыванием с порой и, возможно, изменениями аффинности РТР к Ca^{2+} [234, 235].

Эффект внешних пиридиновых нуклеотидов, действующих со стороны цитозоля, на индукцию РТР мало изучен. Большую сложность представляет и измерение концентрации свободных нуклеотидов в цитозоле клетки, что не позволило до настоящего времени установить значения данного параметра с приемлемой точностью. Согласно литературным данным, в митохондриях гепатоцита $[\text{НАД}^+ + \text{НАДН}] \sim 1.2 - 4.2 \text{ мМ}$, $[\text{НАДФ}^+ + \text{НАДФН}] \sim 2.2 - 4.2 \text{ мМ}$ [236 – 239], а отношение $[\text{НАД}^+]/[\text{НАДН}] \sim 7$ [240]. При этом предполагается, что цитозольная концентрация $[\text{НАД}^+ + \text{НАДН}]$ меньше митохондриальной и не превышает 1 мМ [241], а $[\text{НАД}^+]/[\text{НАДН}] \sim 700$ [240]. Единственная работа, исследующая прямой эффект добавленного НАДН на РТР, показала, что в деэнергизованных митохондриях, уже подвергшихся Ca^{2+} -индуцированному набуханию, нуклеотид не оказывает ингибирующего действия [3].

Действие пиридиновых нуклеотидов, оказываемое на РТР, может быть опосредовано регуляцией проводимости потенциал-зависимого анионного канала VDAC1, предполагаемого компонента и регулятора поры. VDAC – это единственный канал во внешней мембране митохондрий, регулирующий поток ионов и метаболитов размером до $\sim 5,000 \text{ Да}$ между цитозолем и межмембранным пространством митохондрий. В клетках млекопитающих экспрессируется три изоформы канала: VDAC1, VDAC2 и VDAC3, при этом наиболее многочисленной в большинстве тканей является изоформа VDAC1. Было показано, что VDAC1- и VDAC3-дефицитные мыши жизнеспособны, однако VDAC1-/- мыши рождались в меньшем количестве, что предполагает частичную смертность эмбрионов. Удаление VDAC1 и VDAC2 у мышей приводит к снижению потребления

кислорода [242], отсутствие VADC3 вызывает стерильность самцов, а нехватка VDAC1 и VDAC3 приводит к задержке роста [243] и ассоциирована со сниженной способностью к обучению и ухудшением синаптической пластичности [244].

На данный момент наиболее изучены функции и строение VDAC1. Данный белок состоит из 19 трансмембранных β -нитей, соединенных гибкими петлями и формирующих β -цилиндр, при этом нити $\beta 1$ и $\beta 19$ расположены параллельно N-концевой спирали длиной 25 аминокислотных остатка, находящейся внутри поры. Предполагается, что, перемещаясь с его внутренней стороны на поверхность, данный участок регулирует проводимость канала для ионов и метаболитов, взаимодействие с гексокиназой, анти-апоптотическими и апоптоз-регулирующими белками, а также формирование димеров канала. Диаметр поры составляет 3-3.8 нм, когда N-концевая спираль расположена внутри поры, он уменьшается до 1.5 нм [106].

VDAC1 проницаем для малых ионов (например, Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+), для больших анионов, таких как глутамат, АТФ, АДФ, и для больших катионов, таких как ацетилхолин и дофамин [106, 107]. Каналы, выделенные из митохондрий различных тканей, и реконструированные в планарных липидных бислоях, демонстрировали симметричную колоколообразную потенциал-зависимую проводимость. При низком потенциале (-20 - +20 мВ), VDAC1 находится в состоянии высокой проводимости (~ 4 нСм в 1 М КСl), и предпочтительно транспортирует анионы, тогда как при высоком положительном и отрицательном потенциале (> 40 мВ), VDAC1 переходит в режим низкой проводимости, способствующий транспорту ионов малого размера [106–108].

α - и β -НАДН, НАД и НАДФН могут снижать проводимость VDAC, реконструированных в планарных фосфолипидных мембранах, для Ca^{2+} и других малых ионов, при этом НАДФН оказывает наибольший эффект. Действие пиридиновых нуклеотидов было сходно с АТР, АДФ, АМФ и УТФ. При этом степень влияния нуклеотидов на величину генерируемого низкочастотного шума подчинялась следующей последовательности: β -НАДФН $>$ β -НАДН = α -НАДН $>$ АТР $>$ АДФ $>$ β -НАД \geq АМФ $>$ УТФ [241]. Также было показано, что β -НАДН (но не α -НАДН, НАД, НАДФН и НАДФ) снижает проводимость VDAC для АДФ в шесть раз [245]. Кроме того, было обнаружено, что VDAC обладает сайтом связывания НАДН [246, 247], связывает свободный НАДН ($K_d=86$ мкМ) и НАДФН в комплексе с Mg ($K_d=184$ мкМ) [248].

Таким образом, к настоящему времени действие внешних пиридиновых нуклеотидов на индукцию РТР практически не изучено. Однако, литературные данные позволяют предположить существование как минимум одного белка, подходящего на роль нуклеотид-

связывающего сайта регуляции РТР – канала VDAC. Согласно классической модели строения РТР VDAC входит в состав поры, либо является ее регулятором. При этом показано, что каналы обладают сайтом связывания пиридиновых нуклеотидов и экзогенные нуклеотиды способны модулировать работу VDAC.

2. Механизмы образования активных форм кислорода при пермеабиллизации митохондриальных мембран

Главным активатором РТР является кальций. При этом известно, что окислительный стресс многократно увеличивает вероятность открывания поры в присутствии Ca^{2+} в низких концентрациях [249]. Долгое время не вызывала сомнений концепция, согласно которой генерация митохондриальных АФК увеличивается экспоненциально с ростом мембранного потенциала и достигает максимума при ~ 200 мВ, то есть до индукции РТР. [250]. Однако в начале XXI группой Зорова Д.В. было открыто явление АФК-индуцированного выхода АФК («ROS - induced ROS release» (RIRR)), которое подставило под сомнение устоявшееся представление. В своем исследовании авторы обнаружили, что фотоактивация тетраметилпроламиновых производных в матриксе митохондрий миоцитов сердца приводит к генерации большого количества АФК, что индуцирует РТР. При этом открывание поры сопровождалось многократно усиленной продукцией АФК («вспышками») [251]. Впоследствии подобное явление было продемонстрировано еще в нескольких работах [16–18, 252]. Важно, что эти вспышки индуцируют RIRR в соседних митохондриях, и это, по-видимому, лежит в основе распространения волны дисфункции [26]. Процесс генерации вспышек АФК при пермеабиллизации митохондрий может лежать в основе повреждений и гибели органелл и целых клеток, что придает ему важное физиологическое и патологическое значение. Однако причины генерации АФК в условиях пермеабиллизации мембран к настоящему моменту остаются не изученными. Настоящая глава посвящена рассмотрению существующих в литературе гипотезах о механизмах данного явления.

2.1. Комплекс I дыхательной цепи митохондрий

Предполагается, что основной вклад в генерацию АФК митохондриями вносит комплекс I дыхательной цепи (НАДН-убихинон оксидоредуктаза). Продукция им СА при окислении НАДН не значительна. Однако, добавление ротенона, ингибирующего комплекс I в коэнзим Q-связывающем сайте, приводит к сильному росту генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$ [253]. Такой эффект предполагает либо расположение главного сайта продукции АФК на

комплексе I до ротенон-связывающего сайта, либо его тесную связь с повышением уровня восстановленных НАД.

Не существует единого мнения относительно главного сайта генерации АФК в комплексе I. Согласно многим исследованиям, эту роль играет флавиномононуклеотид НАДН-связывающий сайт (сайт I_f). В других работах показана роль убисемихинона, железосерных кластеров N1a и N2 или радикала НАД [254–256].

С использованием субмитохондриальных частиц было обнаружено, что максимальная генерация СА комплексом I происходит при низких концентрациях НАДН (~50 мкМ), тогда как миллимолярные концентрации сильно ее ингибируют [257, 258]. В другой работе было показано, что активация генерации АФК в интактных митохондриях начинается только тогда, когда ротенон увеличивает степень восстановленности НАД(Ф)⁺ почти до максимального уровня (85%) [256].

Специфической характеристикой комплекса I млекопитающих является его медленные переходы между активным и неактивным состояниями. В основе таких трансформаций должны лежать существенные изменения конформации фермента, особенно того участка, который осуществляет чувствительное к ротенону восстановление убихинона [257]. Конформационные перестройки комплекса, происходящие в патологических условиях, могут лежать в основе увеличения продукции АФК. Было обнаружено, что комплекс I, выделенный из сердца, подвергшегося нормоксичной перфузии, находился в полностью активном состоянии, тогда как 30-минутная аноксичная перфузия приводила к переходу комплекса в неактивное состояние, при этом после реоксигенации наблюдалось возвращение к активному состоянию [259]. Авторы предположили, что данные конформационные перестройки лежат в основе увеличения генерации АФК после реоксигенации сердечных тканей, следующей за коронарной окклюзией. С использованием EPR спектроскопии было показано, что НАДН-убихинон оксидоредуктаза подвергается энергозатратным структурным изменениям в той части комплекса, которая ответственна за продукцию убисемихинона (железо-серный кластер 2) [260]. Также обнаружено, что при переходе НАДН-убихинон оксидоредуктазы в неактивное состояние происходит специфическое демаскирование цистеина 39 субъединицы ND3 [258]. Использование MitoSNO, который является S-нитрозирующим митохондриально-селективным соединением и обратимо модифицирует Cys39, привело к снижению генерации АФК, уменьшению окислительных повреждений и некроза тканей во время реперфузии [261].

Batandier et al. выдвинули гипотезу, согласно которой открывание РТР вызывает конформационные перестройки комплекса I, приводящие к увеличению продукции АФК.

В своем исследовании авторы показали, что в присутствии субстратов дыхательных комплексов I и II индукция РТР ингибирует продукцию пероксида водорода в изолированных митохондриях печени крыс. Добавки НАДН в концентрациях ≥ 50 мкМ стимулировали продукцию H_2O_2 , которая достигала максимума при ≥ 300 мкМ НАДН. При этом величина максимальной продукция H_2O_2 была выше (в 4 раза), чем при пермеабиллизации митохондрий с помощью аламетицина. Открывание РТР подавляло ротенон-чувствительную НАДН-убихинон редуктазную активность, и в то же время не влияло на НАДН-феррицианид редуктазную активность [16]. Таким образом, было сделано предположение, индукция РТР вызывает специфические конформационные повреждения комплекса I, которые увеличивают продукцию H_2O_2 до тех пор, пока электроны поставляются на комплекс.

2.2. Комплекс II дыхательной цепи митохондрий

Еще одним сайтом продукции АФК в митохондриях является комплекс II дыхательной цепи, который представляет собой сукцинат-убихинон оксидоредуктазу (сукцинат дегидрогеназу). Данный белок внутренней мембраны митохондрий состоит из четырех субъединиц и содержит ФАД, три железо-серных кластера, гем β -типа и два хинон-связывающих сайта (проксимальный - Q_p и дистальный - Q_d). Он работает как часть цикла Кребса, катализируя реакцию образования фумарата из сукцината, что приводит к восстановлению флавинового аденин нуклеотида (ФАДН₂) и последующему восстановлению убихинона до убихинола.

Результаты некоторых исследований указывают на то, что автоокисляющимся сайтом комплекса II, ответственным за генерацию АФК, является флавин [262, 263]. Другие предполагают, что им является убисемихинон и железо-серные кластеры, хотя в нормальных условиях эти компоненты только частично восстановлены и время пребывания в восстановленном состоянии мало, что дает низкую вероятность переноса электрона прямо на кислород [264, 265]. При окислении сукцината изолированными митохондриями электронный поток может двигаться в прямом направлении к цитохром оксидазе, и в обратном, к НАД. Продукция АФК во время обратного переноса электронов, приводящего к формированию НАДН, намного выше, нежели при прямом окислении НАДН [266]. Можно предположить, что уровень АФК прямо пропорционален степени восстановленности НАД (или степени восстановленности матрикса митохондрий). Учитывая физиологические концентрации внутримитохондриальной редокс-буферной системы (3–5 мМ НАД(Ф)Н и 2–14 мМ восстановленного глутатиона [267]), а также тот факт, что в митохондриях происходит постоянное фосфорилирование АДФ, не известно,

имеет ли место обратный перенос электронов от комплекса II к комплексу I и, соответственно, генерация АФК *in vivo* [257].

Из-за того, что уровень сукцината в тканях в норме находится на достаточно низком уровне (200–500 мкМ), сукцинатдегидрогеназа обычно не рассматривается в качестве основного сайта генерации АФК в митохондриях [268]. Однако в условиях дефицита кислорода (гипоксия/ишемия) концентрация сукцината может увеличиваться в 5-10 раз [269, 270].

Было показано, что генерация АФК в присутствии сукцината стимулируется добавлением стигмателлина (ингибирует окисление убихинола дыхательным комплексом III) и атпенина А5 (ингибитор сукцинат дегидрогеназы). При этом малонат, напротив, ингибировал продукцию АФК. Скорость генерации H_2O_2 в присутствии ротенона и миксотиазола зависела от концентрации сукцината, при этом кривая зависимости характеризовалась колоколообразной формой. Значение измеряемого параметра увеличивалось с ростом концентрации субстрата до 0.4 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации сукцината приводило к уменьшению скорости генерации пероксида водорода. Авторы предположили, что в основе данной зависимости лежит генерация АФК сукцинат дегидрогеназой только в тех условиях, когда дикарбоновые кислоты не занимают флавиновый сайт фермента [271]. Интермедиаты цикла лимонной кислоты, взаимодействующие с сайтом связывания дикарбоновых кислот, в том числе и сукцинат, могут ингибировать продукцию АФК сукцинат дегидрогеназой путем создания преграды для поступающего O_2 . Тем не менее, повышение концентрации сукцината и фумарата в матриксе митохондрий до миллимолярных значений в условиях ишемии и гипоксии не ингибирует генерацию АФК [269, 270]. В условиях ишемии, наоборот, наблюдается высокая корреляция накопления сукцината, генерации АФК и реперфузионных повреждений [272]. Также маловероятен обратный перенос электронов в качестве источника АФК в таких условиях, поскольку при длительной ишемии может происходить полная деполяризация митохондриальных мембран.

Другой причиной роста продукции АФК может являться увеличение вероятности попадания O_2 на сайт генерации в результате открывания РТР, которое приводит к утечке фумарата и сукцината из митохондрий и падению уровня дикарбоновых кислот рядом с сайтом. Предполагается, что в таких условиях генерация АФК может происходить на дикарбоксилат-связывающем сайте комплекса II, который находится в восстановленном состоянии из-за конформационных перестроек, приводящих к ингибированию восстановления убихинона, либо ингибированию окисления убихинола [18].

При некоторых условиях фармакологически индуцированного апоптоза внутриклеточный рН значительно понижается, что приводит к конформационным перестройкам комплекса II, которые коррелируют с генерацией АФК (Рис.2).

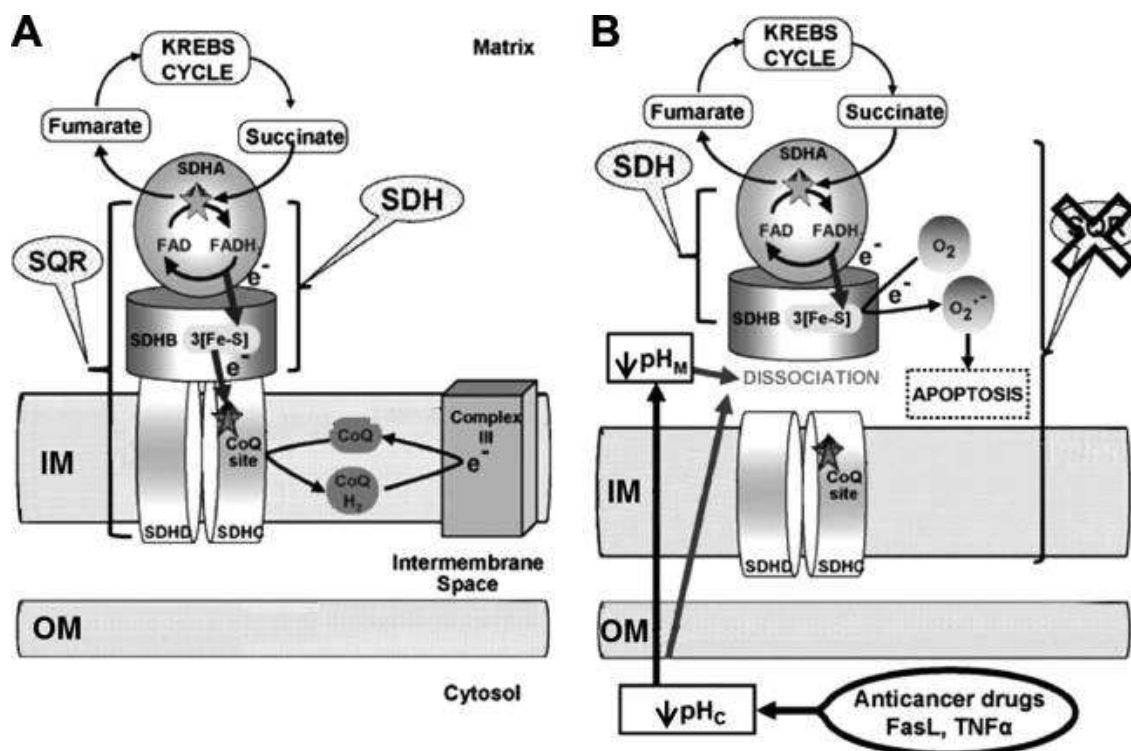


Рис. 2. Диссоциация матричных и мембранных субъединиц комплекса II и активация продукции АФК. А. В здоровых клетках SDHA-опосредованное окисление сукцината до фумарата служит источником электронов для комплекса II. Они транспортируются на железо-серные центры субъединицы SDHB и затем на сайт восстановления коэнзима Q. В. Про-апоптотические соединения, такие как противоопухолевые препараты, FasL или TNF- α вызывают снижение рН внутри клеток и митохондрий, что вызывает диссоциацию субъединиц SDHA/SDHB и комплекса II. В результате происходит частичное ингибирование сукцинат-CoQ-оксидоредуктазной активности без нарушения сукцинатдегидрогеназной реакции, продукция супероксида и апоптоз. Рисунок взят из [273].

В таких условиях наблюдается диссоциация субъединиц сукцинатдегидрогеназы SDHA (флавопротеин)/SDHB (железо-серный протеин) и связанной с мембранной сукцинат CoQ оксидоредуктазы (SQR) [273]. SQR осуществляет восстановление коэнзима Q. SDHA и SDHB катализируют превращение сукцината в фумарат и переносят электроны через железо-серные кластеры. В результате диссоциации работа SQR тормозится, а процесс окисления сукцината не изменяется. Данная конформационная перестройка комплекса может способствовать тому, что его железо-серный кластер будет осуществлять прямое одноэлектронное восстановление кислорода. Предполагается, что низкий рН оказывает

ингибирующее действие на открывание РТР [157]. Однако конформационные перестройки комплекса II могут происходить во время ишемии, когда матрикс митохондрий закислен. Последующая реперфузия может приводить к восстановлению рН, открыванию поры и увеличению продукции АФК на комплексе, ранее подвергнутому перестройке.

2.3. Комплекс III дыхательной цепи митохондрий

Другим АФК-продуцирующим сайтом в митохондриях является дыхательный комплекс III. Данный белок является убихинол-цитохром *c* оксидоредуктазой, он принимает восстанавливающие эквиваленты, образованные на комплексах I и II и переносит их на цитохром *c*, участвуя в работе Q-цикла. В ходе данного процесса убихинол высвобождает протон в межмембранное пространство и отдает один электрон железосерному белку Риске, образуя нестабильный семихинон на внешней стороне ИММ. Семихинон является донором электрона для гемов цитохрома *b_L*, и, затем, цитохрома *b_H*, которые расположены вблизи внутренней стороны мембраны. Цитохром *b_H* восстанавливает убихинон, образуя убисемихинон, который затем восстанавливается вторым электроном и протонируется [274]. Нестабильный семихинон может являться донором электрона для O₂, который, принимая его, переходит в супероксид-анион. Время жизни такого семихинона в нормальных условиях мало из-за его быстрого окисления цитохромом *b*. Антимитин А (АнтА) блокирует окисление цитохромов *b* убихиноном в Q_i-связывающем центре, что увеличивает время жизни семихинона в Q_o-центре и вероятность одноэлектронного восстановления кислорода, вызывая образование АФК. В основе роста продукции АФК могут лежать индуцированные связыванием ингибитора конформационные перестройки комплекса [17, 275]. Было обнаружено, что пермеабиллизация мембран изолированных митохондрий сердца, индуцированная добавкой кальция или аламетицина, вызывает всплеск генерации пероксида водорода на комплексе III. Условиями данной продукции H₂O₂ являлись ингибирование убихинол-цитохром *c* оксидоредуктазы антимитином А, наличие в среде инкубации Mg²⁺ и НАД⁺, а также отсутствие экзогенных субстратов. Возможно, что образование H₂O₂ является результатом работы Mg²⁺-зависимой НАДН-малатдегидрогеназы. Стигмателлин и пирицидин ингибировали генерацию пероксида, что говорит о необходимости НАДН-зависимого восстановления убихинона. Подобные процессы могут происходить во время ишемии и последующей реперфузии, когда увеличивается уровень сукцината, фумарата, малата, а затем происходит открывание РТР [18].

2.4. Роль ПН в генерации АФК

Известно, что процесс индукции РТР сопровождается изменением баланса НАД(Ф)Н/НАД(Ф) в митохондриях: окисление пиридиновых нуклеотидов матрикса предшествует открыванию поры [232], а после открывания поры наблюдается выход ПН из митохондрий [276]. Сдвиг соотношения НАД(Ф)Н/НАД(Ф)⁺ должен влиять на образование АФК, сопровождающее процесс увеличения проницаемости митохондриальных мембран. Влияние НАДН на продукцию АФК было подробно описано в работах группы А.Д. Виноградова. Используя субмитохондриальные частицы, окисляющие НАДН, авторы установили максимальный пик продукции супероксида при 10-50 мкМ НАДН, при миллимолярных концентрациях нуклеотида генерация радикала значительно тормозится [257]. Эксперименты с изолированными пермеабелизованными митохондриями и растворимыми фракциями белка матрикса митохондрий показали аналогичные результаты. Учитывая, что физиологические концентрации пары НАДН + НАД⁺ в матриксе лежат в миллимолярном диапазоне [190], авторы заключили, что в нормальных условиях продукция АФК, опосредованная работой комплекса I, может быть несущественной. Было сделано предположение, что источником АФК в данных условиях могут быть оксидоредуктазы, находящиеся в равновесии с НАД(Ф)/НАД(Ф)Н.

В пермеабелизованных митохондриях при добавлении солей аммония наблюдается образование пероксида водорода, данный процесс регулируется уровнем НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н [277]. Генерация пероксида водорода была нечувствительна к дикумаролу и НАДН-ОН (ингибиторы комплекса I), таким образом, АФК-генерирующим сайтом не является комплекс I. Позже было показано, что исследуемый сайт представляет собой дигидролипоамиддегидрогеназу - фермент, являющийся НАДН:липоамид оксидоредуктазой [257]. Данный белок входит в состав (в качестве E3 компонента) двух митохондриальных редокс-комплексов: α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса и пируватдегидрогеназного комплекса. Данные белки содержат ФАД, который находится в равновесии с НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н окружающей среды. Эксперименты, проведенные на очищенных α -кетоглутаратдегидрогеназе и пируватдегидрогеназе, а также на изолированных митохондриях, показали, что генерацию супероксида аниона и H₂O₂ осуществляет дигидролипоамиддегидрогеназа [278]. В пермеабелизованных митохондриях сердца крыс в присутствии НАДН половина H₂O₂ генерируется на комплексе I и половина - за счет работы дигидролипоамиддегидрогеназы [258].

Помимо осуществления своей основной функции – снабжение дыхательной цепи электронами, ПН также поддерживают антиоксидантный пептид - глутатион в восстановленном состоянии. Глутатион и НАДФН являются субстратами антиоксидантных

белков глутатионредуктазы, которая восстанавливает окисленный глутатион, и глутатионпероксидазы, которая нейтрализует H_2O_2 [249]. Индукция РТР может приводить к утечке глутатиона и НАДФН, в результате происходит увеличение концентрации пероксида [276]. Другой причиной роста H_2O_2 может являться снижение активности никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназы (НАДФН-трансгидрогеназы). В нормальных условиях НАДФН-трансгидрогеназа, используя НАДН в качестве субстрата, осуществляет регенерацию НАДФН в прямой реакции за счет энергии протонного градиента на внутренней мембране. В условиях падения мембранного потенциала уровень восстановленного НАДФ⁺ может снижаться из-за ингибирования фермента [232]. Также предполагается, что в патологических условиях трансгидрирование может протекать в обратном направлении, что приводит к расходу НАДФН и образованию НАДН. В результате поддерживается синтез АТФ [279]. Таким образом, данный процесс может приводить к падению антиоксидантной защиты матрикса, находящейся в редокс-равновесии НАД(Ф)Н, что способствует продукции АФК.

2.5. Роль кальция в генерации АФК

Кальциевая емкость митохондрии очень высока, они способны аккумулировать такое количество кальция, которое, будь Ca^{2+} в матриксе в свободном состоянии, составило бы концентрацию около 1М. Но этого не наблюдается, концентрация свободного Ca^{2+} в матриксе находится в микромолярном диапазоне. В данном диапазоне осуществляется модулирование работы Ca^{2+} -регулируемых ферментов [13]. Такими ферментами являются пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа, они активируются при повышении уровня свободного кальция в матриксе и это приводит к усиленной генерации АФК [278, 280].

Также рост $[Ca^{2+}]$ в матриксе приводит к открыванию РТР [83], это вызывает пермеабиллизацию внешней митохондриальной мембраны. Увеличение проницаемости приводит к выходу из митохондрий около ста белков, среди которых глутатионпероксидаза и цитохром *c* [281].

Цитохром *c* – это компонент дыхательной цепи митохондрий, выполняющий перенос электронов между комплексами III и IV. Его также относят к белкам антиоксидантной защиты, поскольку снижение его уровня ингибирует перенос электронов между комплексами III и IV. Это, в свою очередь, стимулирует образование АФК в Q-цикле. Более того, супероксид-анион обладает способностью прямо восстанавливать цитохром *c* [99]. Цитохром *c* положительно заряжен и связан с кардиолипином, который отрицательно заряжен, на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий. Предполагается, что

цитохром *c* выходит в цитозоль при пермеабиллизации мембран в два этапа: сначала отсоединяется сайтов, связывающих его с внутренней мембраной, и затем проходит сквозь внешнюю мембрану [98]. Поскольку Ca^{2+} конкурирует с цитохрома *c* за связывание с кардиолипином, он может способствовать откреплению белка от внутренней мембраны. Выход цитохрома *c* может также индуцировать окисление кардиолипина, происходящее из-за всплеска АФК при пермеабиллизации, что должно вызывать еще большую продукцию АФК [99]. Таким образом, причинами роста АФК в митохондриях при увеличении концентрации Ca^{2+} в матриксе могут быть активация АФК-генерирующих ферментов и падение антиоксидантной защиты в результате пермеабиллизации мембран.

Таким образом, точные механизмы образования АФК при пермеабиллизации митохондриальных мембран к настоящему времени не обнаружены. Однако, накопленные данные позволяют выдвинуть несколько гипотез. Всплеск продукции АФК может осуществляться на поврежденных, либо подвергшихся конформационным перестройкам дыхательных комплексах I, II и III. Также открывание РТР может приводить к выходу НАДФН, антиоксидантных белков, глутатиона и цитохрома *c*, что должно способствовать накоплению АФК. Согласно третьей гипотезе, рост уровня кальция в матриксе может приводить к активации АФК-продуцирующих ферментов, а именно, пируватдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование роли пиридиновых и адениновых нуклеотидов в регуляции неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры проводилось на различных объектах: пермеабелизованных клетках разных типов и изолированных митохондриях крыс. Все манипуляции с животными до забора печени и сердца проводились в соответствии с Хельсинской конвенцией 1975 года (дополненной 1983 г.) и национальным законодательством о содержании и использовании лабораторных животных.

1. Культуры клеток

В работе использовались клетки вызванной вирусом папилломы эндоцервикальной аденокарциномы человека (линия HEp-2), клетки острой моноцитарной лейкемии (THP-1), клетки мышинных эмбриональных фибробластов (MEF), почечные клетки эмбриона человека (HEK293T). MEF были предоставлены профессором В.Дж. Крайегеном (Отдел молекулярной и человеческой генетики, Колледж медицины Байлора, Хьюстон, США). HEp-2, THP-1, HEK293T были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Кроме того, в работе были использованы первичные кардиомиоциты и гепатоциты крыс.

1.1. Выделение гепатоцитов крысы

Гепатоциты (RLM) выделяли из печени самцов крыс Wistar весом 200-250 грамм способом, описанным ранее [282]. Печень крыс перфузировали через портальную вену раствором коллагеназы IV типа (0.8 мг/мл). Гепатоциты отделяли от непаренхиматозных клеток центрифугированием при (50 g, 2 мин при 4°C). Жизнеспособность изолированных клеток составляла $\geq 80\%$ (определялась окрашиванием трипановым синим). Гепатоциты ресуспендировали в среде, состоящей из 130 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ MgSO_4 , 20 мМ HEPES (pH 7.35), с добавлением 0.2% БСА и хранили на льду.

1.2. Выделение кардиомиоцитов крысы

Миоциты левого желудочка выделяли из сердец самцов крыс Wistar весом 200-250 грамм согласно [283]. Анестезию животных проводили путем внутрибрюшинного введения пентобарбитала (50 мг/кг). Дальнейшие процедуры проводили при 37°C. Изолированные сердца перфузировали средой DMEM с добавлением 10 мМ HEPES (pH 7.25). Продолжительность перфузии составляла 3-5 минут. После достижения стабилизации сокращений сердца, продолжали перфузию, применяя базовый раствор (80 мМ NaCl, 10 мМ

KCl, 1.2 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , 20 мМ глюкоза, 50 мМ таурин, 10 мМ HEPES (pH 7,25), 1 мМ L-аргинин и 2.5 мМ ЭГТА). Далее перфузию продолжали раствором, содержащим протеазу XIV типа (20 мг/100 мл), БСА (фракция V, 1 мг/мл) и 140 мкМ CaCl_2 , до остановки сердечных сокращений. Через 10 минут желудочки отделяли от предсердий и разрезали на части размером 6-10 мм³, процедуру проводили в базовом растворе, дополненном 200 мкМ CaCl_2 . Суспензию инкубировали в течении 20 минут при небольшой скорости перемешивания в базовом растворе с добавлением протеазы XIV типа и коллагеназы IV типа (2.5 мг/10 мл). Затем отбирали первый смыв. Для очистки от крупных кусков ткани смыв, содержащий клетки, пропускали через нейлоновый фильтр. Остальную часть суспензии повторно инкубировали в растворе с ферментами. Ткань подвергалась полному распаду по завершению 2-4 циклов инкубации. Кардиомиоциты осаждали центрифугированием (700 g, 1 мин), дважды отмывали и хранили при комнатной температуре в базовом растворе, содержащем 200 мкМ Ca^{2+} .

1.3. Культивирование клеточных линий

Клетки MEF, HEK293T, HEp-2 росли в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco или NuClone (для клеток MEF)), 80 мг/л гентамицина и 20 мМ бикарбоната натрия в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. Кратность пересева составляла 1:3-1:10, оптимальная плотность 1.0-3.0x10⁴ клеток/см², клетки снимали раствором трипсин 0.25%: ЭДТА. THP-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 2x10⁻⁵М 2-меркаптоэтанола, 10% FBS, 80 мг/л гентамицина; кратность пересева для них равна 1:2, оптимальная плотность 1.0-5.0x10⁵ клеток/мл.

2. Работа с митохондриями

2.1. Выделение интактных митохондрий из печени крыс

Для получения митохондрий из печени крыс (rat liver mitochondria, RLM) применяли стандартный метод дифференциального центрифугирования [284]. В работе использовали самцов крыс линии Wistar весом 200 - 220 грамм. Крыс декапитировали после анестезии (CO_2), извлекали печень, помещали ее в охлажденную среду выделения (0°C). В состав среды выделения входили 220 мМ маннитол, 70 мМ сахароза, 10 мМ буфер HEPES (pH 7.4, для доведения вводили Trizma Base), 0,5% БСА и 1 мМ ЭГТА. Для уменьшения степени деградации материала все процедуры проводили при низких температурах (0 – +4°C). Печень промывали, пропускали через пресс в среду выделения в соотношении 1:10 (вес к объему) и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера. Далее полученный

гомогенат центрифугировали в предварительно охлажденных ($0 - +2^{\circ}\text{C}$) пробирках при 600g 10 минут. Полученный супернатант затем центрифугировали при 7000g 15 минут. В результате получали осадок, содержащий митохондрии. Данный осадок промывали средой выделения, не содержащей БСА и ЭГТА, центрифугируя по 20 минут при 7000g. Процедуру отмывки повторяли еще 2 раза. Последний осадок ресуспендировали в среде промывания в объеме, не превышающем 0,5 мл.

В работе, как правило, использовали митохондрии после трех отмывок в среде без ЭГТА. Это позволяло сохранять достаточно высокое качество полученных митохондрий и минимизировать загрязнение препаратов микросомами [285, 286]. С той же целью мы отказались от процедуры разделения органелл в градиенте перколла (Percoll) при очистке RLM. Дыхательный контроль полученных митохондрий, определяемый по отношению скоростей дыхания в метаболических состояниях 3 и 4 (V_3/V_4), составлял 4-6, 4-5 и 3-4 в присутствии глутамата с малатом, пирувата с малатом и сукцината с ротеноном, соответственно.

Для того, чтобы наружный воздух не согревал выделенные митохондрии во время проведения экспериментов, их хранили в глубоком гомогенизаторе, помещенном в лед. Концентрация выделенных митохондрий составляла примерно 70 мг белка/мл.

2.2. Оценка количества повреждённых митохондрий после выделения

Качество изолированных митохондрий определяли, сравнивая скорости восстановления добавленного цитохрома *c* условно интактными митохондриями и полностью пермебилизированными. При наличии повреждений во внешних мембранах появляется доступ к дыхательной цепи и цитохром *c* восстанавливается за счет ее работы, при целой внешней мембране цитохром *c* не восстанавливается. Пермеабиллизацию мембран вызывали добавлением аламетицина. В среду измерения, содержащую 125 мМ KCl, 20 мМ маннитол, 10 мМ Hepes, pH 7,3) добавляли субстрат второго комплекса (5 мМ сукцинат) и ингибитор I комплекса (1 мкМ ротенон) и спектрофотометрически (550 нм) регистрировали скорость восстановления цитохрома *c*. Для предотвращения окисления цитохрома *c* цитохром *c* оксидазой, в среду измерения добавляли ингибитором фермента - 1мМ NaCN. Принимая показатель, полученный в среде с аламетицином, за скорость восстановления цитохрома *c* 100% пермебилизированными митохондриями, определяли процент поврежденных и интактных органелл. В работе использовали митохондриальную суспензию, содержание поврежденных митохондрий в которой составляло < 5%.

2.3. Определение количества белка

Количество белка в полученных препаратах митохондрий определяли биуретовым методом. Для этого суспензию митохондрий разбавляли средой выделения (в соотношении 1:3) и смешивали с 3% диоксихолатом, который является детергентом, в соотношении 1:4. После интенсивного перемешивания раствор добавляли к биуретовому реагенту (Sigma-Aldrich) в соотношении 1:5, снова перемешивали и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Затем измеряли светопоглощение (546 нм) против раствора, содержащего среду измерения вместо суспензии митохондрий. Для определения концентрации белка использовали калибровочный график, предварительно построенный с использованием БСА в качестве стандарта.

2.4. Индукция пермеабилзации митохондриальных мембран

При решении различных задач в нашей работе мы использовали интактные и пермеабилзированные митохондрии. Для повреждения митохондриальных мембран, использовались три модели. Первая представляет собой индукцию открывания неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) путем добавления высоких концентраций кальция (обычно 20-200 мкМ). Во второй модели для пермеабилзации митохондрий добавляли аламетицин, который является порообразующим белком. В третьей модели митохондрии помещали в среду с низкой осмолярностью (менее 300 мОсм), в которой внешняя мембрана повреждалась за счет осмотических процессов.

2.5. Определение размера пор во внутренней мембране митохондрий

Размер пор, формируемых аламетицином, фузарицидином или Ca^{2+} , определяли с помощью теста на исключаемый размер молекул растворенных веществ. К митохондриям (1 мг/мл) добавляли Ca^{2+} (250 нмоль/мг белка), аламетицин (12.5 мкг/мл) или фузарицидин (10.5 мкг/мл) и оставляли на 10 минут для набухания в КСI-среде. ЭГТА (1 мМ) и 1 мкМ CsA добавляли к образцам, содержащим аламетицин и фузарицидин, для предотвращения индукции РТР. После завершения высоко-амплитудного набухания добавляли растворы ПЭГ с разной молекулярной массой (200-8000 Да), способных создать дополнительно 40% осмотического давления в среде (10% (об./об.) растворы ПЭГ). Сжатие митохондриального матрикса определяли по увеличению абсорбции при 550 нм. Предполагалось, что максимальное восстановление матриксного объема было вызвано ПЭГ, которые были не способны проникнуть через внутреннюю мембрану.

3. Методы оценки функционального состояния изолированных митохондрий

3.1. Установка для одновременной регистрации скорости потребления кислорода митохондриями и изменения концентрации различных ионов в среде инкубации

Скорость потребления кислорода митохондриями измеряли на установке, разработанной в ИТЭБ РАН. Данный прибор представляет собой термостатируемую ячейку ($V = 1$ мл), которая установлена на магнитной мешалке и сопряжена с системой усиления, компьютерной регистрации и обработки экспериментальных данных. Прибор также позволяет одновременно регистрировать изменения митохондриального мембранного потенциала и кальциевой емкости. В основе метода измерения концентрации ионов в митохондриальной суспензии лежат принципы потенциометрии. В ячейку вмонтировано несколько ион селективных микроэлектродов, связанных с одним электродом сравнения. Также в ячейку вмонтирован кислородный электрод, который имеет собственный электрод сравнения. Для регистрации сигналов от электродов, проходящих через усилитель, используется специально разработанная компьютерная программы Record 4. Количественный анализ величин потоков ионов требует учета логарифмической зависимости показаний электродов от концентрации соответствующего иона. Для этого перед каждым измерением необходимо калибровать шкалы измерения каждого электрода, используя стандартные солевые растворы.

3.1.1. Измерение трансмембранного потенциала изолированных митохондрий

Мембраны сопряженных митохондрий обладают высоким электрическим потенциалом, который зависит от функционального состояния органелл. Обычно измерение потенциала осуществляют косвенными методами, поскольку прямая регистрация $\Delta\psi_m$ с применением микроэлектродов затруднительна. В основе наиболее применяемых косвенных методов лежит использование специфических красителей и ионоселективных электродов, которые чувствительны к потенциалу. В данной работе для измерения потенциала изолированных митохондрий использовали ионселективный тетрафенилфосфониевый (TPP^+) электрод. В основе метода лежит высокая растворимость липофильных катионов TPP^+ в липидах. Для того, чтобы катион TPP^+ перешел из водной среды в неполярное липидное окружение, требуется невысокая энергии активации. Это позволяет катионам при наличии потенциала проходить через мембраны митохондрий и накапливаться в их матриксе. В термостатируемую ячейку с вмонтированным TPP^+ -селективным электродом добавляли раствор TPP^+ в концентрации 0.7-1.5 мкМ. После

добавки митохондриальной суспензии в среду измерения происходит снижение концентрации TRP^+ в ячейке и, соответственно, уменьшение величины регистрируемого сигнала. Уравнение Нернста позволяет рассчитать абсолютное значение мембранного потенциала. В наших экспериментах значение потенциала выражали в относительных единицах, как отношение ионов TRP^+ , поглощенных митохондриями, к TRP^+ , оставшимся в среде.

3.1.2. Измерение максимальной кальциевой емкости митохондрий

Способность аккумулировать ионы кальция является важной характеристикой функционального состояния митохондрий. Данную функцию обычно оценивают с помощью определения скорости входа кальция и кальциевой емкости. В нашей работе мы проводили измерение Ca^{2+} -емкости, определяемой как количество кальция, поглощенного митохондриями до момента открывания РТР и выброса кальция наружу. Для этого в исследуемые образцы вносили небольшие добавки кальция (20-50 мкМ) через равные промежутки времени.

3.1.3. Измерение потребления кислорода митохондриями

Для измерения потребления кислорода митохондриями использовали полярографический метод, в основе которого лежит электрохимическая реакция восстановления растворенного O_2 до воды. Для этого использовали закрытый кислородный электрод Кларка. Катод такого электрода закрыт полимерной мембраной, которая проницаема для газов и малопроницаема для других веществ. В качестве электрода сравнения используется хлорсеребряный электрод. Зависимость показаний кислородного датчика от концентрации O_2 в среде инкубации линейна. Митохондрии инкубировались в стандартной KCl-среде, дополненной 5 мМ сукцинатом и в присутствии ротенона (2 мкг/мл). Для измерения скоростей дыхания в процессе окислительного фосфорилирования (состояние 3 (V_3 -после добавления АДФ) и при состоянии 4 (V_4 -после того, как весь АДФ перешел в АТФ)) в среду измерения добавляли 200–500 мкМ АДФ. Скорость АДФ-стимулируемого дыхания определяли как разницу между V_3 и скоростью дыхания в присутствии олигомицина ($V_{\text{олиго}}$), ($V_3 - V_{\text{олиго}}$). Скорость разобщенного дыхания (V_{FCCP}) измеряли в присутствии 500 нМ FCCP.

3.2. Регистрация высокоамплитудного набухания митохондрий

Изменение объема митохондриального матрикса, отражающее вход низкомолекулярных соединений при открывании РТР, мы оценивали по набуханию

митохондрий с помощью планшетного ридера (Infinite 200 Tecan). Набухание митохондрий регистрировали по изменению светопоглощения митохондриальной суспензии при $\lambda = 550$ нм.

На рис. 3 показана динамика мембранного потенциала митохондрий (измеряемого по флуоресценции родамина 123) при длительной инкубации в открытом многолуночном планшете при ежеминутном перемешивании. Как следует из рисунка, мембранный потенциал не менялся в течение 5 часов с любыми использованными субстратами. Это говорит о достаточной оксигенации митохондриальной суспензии в данных экспериментальных условиях.

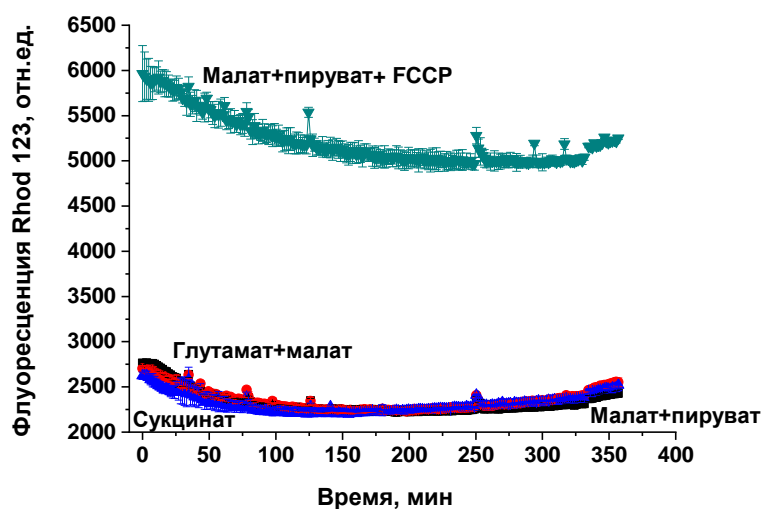


Рис. 3. Динамика трансмембранного потенциала в суспензии митохондрий при длительной инкубации в многолуночном планшете. RLM (0.75 мг/мл) помещали в стандартную KCl-среду, содержащую 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭГТА, 325 нМ родамин 123 (Rhod 123) и, где указано, 5 мМ сукцинат (+ротенон (2 мкг/мл)), 5 мМ глутамат, 5 мМ малат, 5 мМ пируват, 500 нМ FCCP.

3.3. Измерение содержания АТФ в митохондриальной суспензии

Содержание АТФ в митохондриальной суспензии измеряли с помощью ATP Biomass Kit HS в соответствии с инструкцией производителя. Метод основан на измерении интенсивности световой эмиссии при протекании люциферазной реакции в среде, содержащей D-люциферин и люциферазу. Люминесценцию регистрировали с использованием планшетного ридера (Infinite 200 Tecan).

3.4. Определение степени восстановленности ПН в митохондриальной суспензии

3.4.1. Контроль соотношения окисленных и восстановленных форм ПН в стоковых растворах

Расчет концентрации окисленных (НА(Ф)Д⁺) и восстановленных (НАД(Ф)Н) форм пиридиновых нуклеотидов проводили, принимая значения ϵ_{259} и ϵ_{339} 17.8 и 6.22 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, соответственно. Для того, чтобы определить величину ϵ_{259} для восстановленных форм в наших условиях инкубации, мы провели регистрацию 30 сканирований абсорбции при 200–500 нм (1 сканирование/мин) при восстановлении НАД или НАДФ в глутаматдегидрогеназной реакции, протекающей в КСI-среде в присутствии 10 мМ глутамата. Это позволило установить, что восстановление НАДФ и НАД приводит к снижению абсорбции при 259 нм на 0.00286 ± 0.00012 и 0.00311 ± 0.00008 на 1 мкМ НАДФН и НАДН, соответственно. Таким образом, ϵ_{259} для НАДФН и НАДН были 14.94 и 14.49, соответственно. Используя построенные кривые соотношения A_{259}/A_{339} , мы определили процент восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов в наших стоковых растворах, они равнялись 98.6 (НАДН) и 96.2(НАДФН) %.

3.4.2. Определение редокс-потенциала ПН в митохондриальной суспензии

Кинетику окисления добавленных НАДН и НАДФН регистрировали по снижению флуоресценции (E_x 360/ E_m 465 нм) с использованием планшетного ридера (Infinite 200 Tecan). Зависимость флуоресценции от концентрации НАД(Ф)Н не была линейна в концентрациях, близких к миллимолярным (Рис. 2.4 и 2.5). Поэтому концентрацию НАД(Ф)Н в растворе в каждый момент времени определяли, используя уравнение сигмоидных кривых, построенное для каждой серии методом Больцмана (Sigmoidal Fit, Origin 7.0) (вставка на рис. 2.5, Б). Динамику редокс-потенциала НАДН и НАДФН в митохондриальной суспензии, $E_{\text{НАД(Н)}}$ и $E_{\text{НАДФ(Н)}}$, рассчитывали по уравнению Нернста, полагая, что (1) E_0 для НАДН и НАДФН равен -0.32V; (2) концентрация эндогенных НАД(Н) и НАДФ(Н) в митохондриальном матриксе составляет 2 и 3 мМ, соответственно; (3) в пермеабелизованных митохондриях НАД(Ф)Н полностью окислен в отсутствие дыхательных субстратов; и (4) объем митохондриального матрикса равен 1 мкл/мг белка.

4. Измерение продукции активных форм кислорода

4.1. Измерение уровня пероксида водорода

Уровень пероксида водорода в митохондриальной суспензии измеряли в стандартной KCl-среде с добавлением 500 мкМ ЭГТА, 20 мкМ Amplex Red и пероксидазы хрена (3 ед./мл). Накопление флуоресцентного продукта резорфина регистрировали, используя планшетный флуориметр (Infinite 200 Tecan) (Ex 530 / Em 595 нм). Для количественного определения пероксида водорода флуоресцентный сигнал калибровали добавкой пероксида водорода в конце эксперимента. Чтобы избежать формирования резорфина, вызванное светом, флуоресценцию регистрировали один или два раза в минуту.

4.2. Измерение уровня СА

Для определения уровня СА использовали высокоселективный и высокочувствительный хемилюминисцентный зонд 2-метил-6-(p-метоксифенил)-3,7-дигидроксиимидазол[1,2- α]пирозин-3-он (MCLA) в концентрации 10-20 мкМ. Регистрацию хемилюминисценции проводили с помощью планшетного спектрофлуориметра (Infinite 200 Tecan). Данные на кривых являются средними \pm стандартная ошибка среднего для трех измерений интегральной люминесценции за 900 мс, выраженных в относительных единицах.

4.3. Определение активности аконитазы

Активность аконитазы измеряли путем регистрации флуоресценции при восстановлении НАДФ (Ex360/Em465) в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 5 мМ цитрат натрия, 0.6 мМ MnCl₂, 200 мкМ НАДФ, изоцитрат дегидрогеназу сердец свиней (1 ед./мл) [287] и Alam (20 мкг/мл) для пермеабилзации IMM. Реакцию начинали добавлением образцов, содержащих 10 мкг белка, к 100 мкл среды измерения, предварительно инкубированную при 25°C. Активность аконитазы выражали в нмоль·мин⁻¹·мг белка⁻¹.

4.4. Генерация СА с помощью пероксида калия

Измерения проводили при 25°C в KCl-среде, дополненной 50 мМ HEPES (pH доведен Trizma Base до 7.3), 20 мкМ MCLA и, где указанл, СОД (100 ед./мл). Реакцию начинали добавкой 500 мкМ КО₂ в реакционную смесь. Так как образование СА с помощью

пероксида калия является кратковременным, кинетика MDCL записывали в 3-6 ячейках и время интеграции хемоллюминесценции снижали до 500 мс.

5. Вестерн-блоттинг

Клетки лизировали 30 мин в буфере RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз, фенилметилсульфонил фторид и ортованадат натрия, согласно протоколу производителя (Santa Cruz Biotechnology, CA, США). Митохондриальные белки разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, затем электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифическое связывание блокировали раствором Roti-block (1 час) (Carl Roth, Германия). Блоты затем инкубировали ночь с антителами для VDAC1 (1:1000), VDAC2 (1:500) и VDAC3 (1:500). После инкубации с соответствующими вторичными антителами блоты были подготовлены для визуализации с помощью субстрата Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories).

6. Статистическая обработка

Результаты исследований представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего для трех экспериментов, как минимум. Статистическую значимость (p) рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни.

7. Материалы

Аламетицин, Ampliflu™ Red (Amplex Red), бычий сывороточный альбумин (БСА), цитохром *c* сердца лошадей, этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТА), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), глутамат, α -кетоглутарат, малат, маннитол, 3,7-дигидро -2-метил-6-(4-метоксифенил)имидазол[1,2-а]пирозин-3-он (MCLA), миксотиазол, НАДН, НАДФН, НАД, НАДФ, β -оксибутират, изоцитрат дегидрогеназа сердец свиней, пероксид калия, пируват, ротенон, сахароза, сукцинат, супероксиддисмутаза (СОД), Trizma Base были куплены в Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, США). ATP Biomass Kit HS был куплен в BioThema AB (Haninge, Швеция). Антитела к VDAC1 (Cat# NBP2-42187), VDAC2 (Cat# NBP2-20849) и VDAC3 (Cat# NB100-74561) были куплены в NovusBio (CO, США). Вторичные козы антитела против мышинных, крольчих, куриных были куплены в Cell Signaling Technology, Inc. (MA, США), Thermo Fisher Scientific (MA, США) и Abcam (Великобритания), соответственно. DMEM, RPMI получены из Gibco (США). Эмбриональная бычья сыворотка (FBS) из Gibco или HyClone (США). Другие химические реагенты аналитического класса были куплены у местных поставщиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние добавленных ПН на индукцию неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры

ПН и АН матрикса являются сильными природными ингибиторами РТР, однако точные механизмы их действия на пору на данный момент не установлены. Считается, что мишенями АН являются АНТ и F_0F_1 -АТРаза (предполагаемые компоненты РТР), также они могут регулировать рН матрикса митохондрий и тем самым увеличивать их Ca^{2+} -буферную емкость. НАДН, возможно, оказывает аллостерический эффект, либо его действие опосредовано поддержанием в восстановленном состоянии убихинона, предполагаемого регулятора РТР. Защитное действие НАДФН связывают с ферментативным восстановлением глутатиона, который находится в редокс равновесии с критическим тиолами поры. Эффект внешних нуклеотидов, то есть действующих со стороны цитозоля, остается не исследованным. Поэтому первая часть данной работы посвящена изучению механизмов влияния внешних пиридиновых нуклеотидов на индукцию РТР в изолированных митохондриях и пермеабилizованных клетках. Было проведено сравнение эффектов ПН и АН на пору, определены условия их действия, а также исследована роль транспортеров АН (АНТ, SCaMC) и VDAC в НАД(Н)-зависимом подавлении РТР.

1. 1. Влияние ПН на индукцию неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры в изолированных митохондриях печени крыс

1.1.1. Способы определения индукции РТР в изолированных митохондриях

Для измерения открывания РТР в настоящей работе были применены два разных метода. Одним из них является измерение кальциевой емкости, определяемой как количество поглощенного органеллами кальция, который добавляется в определенной концентрации через равные промежутки времени до момента, когда кальций начнет выходить. Он удобен в работе с любыми объектами исследования и его можно использовать для регистрации открывания поры в пермеабилizованных клетках.

В изолированных митохондриях индукцию РТР также можно изучать с помощью регистрации ЭГТА- и CsA-чувствительного высокоамплитудного набухания. Поскольку набухание представляет собой динамичный процесс, для его количественной оценки удобно применять два параметра: время полумаксимального набухания (ВПМН) и амплитуду набухания в конкретное время после добавки Ca^{2+} . Способ определения данных параметров продемонстрирован на рис. 4 на примере влияния различных концентраций НАДН на набухание RLM. Мы полагаем, что ВПМН отражает время после добавки Ca^{2+} , при котором

РТР индуцирована в 50% митохондрий в образце, тогда как амплитуда набухания отражает долю набухших митохондрий в суспензии. Набухание митохондрий регистрировали по снижению абсорбции при 550 нм (A_{550}) с использованием планшетного ридера (Infinite 200 Tecan, Austria).

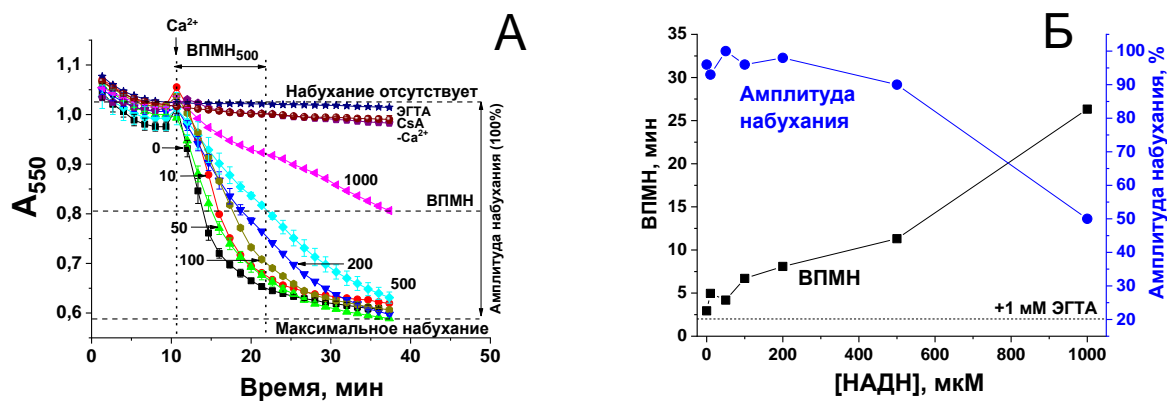


Рис. 4. Количественная оценка индукции РТР путем определения ВПМН и амплитуды набухания митохондрий. А. Стандартные кривые Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий в присутствии и отсутствии НАДН. RLM (0.5 мг/мл) были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ глутамат, 5 мМ малат, 10 мкМ ЭГТА и, где указано, 1 мМ ЭГТА, 1 мкМ CsA и НАДН в указанных концентрациях. Стрелкой показана добавка 30 мкМ Ca^{2+} . Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$). Горизонтальные пунктирные линии показывают значения абсорбции, соответствующие нулевому, полумаксимальному и максимальному набуханию. Вертикальные пунктирные линии показывают ВПМН в присутствии 500 мкМ НАДН ($VPMN_{500}$). Б. Зависимость среднего ВПМН и средней амплитуды набухания от концентрации НАДН для эксперимента на панели А. Нижняя пунктирная линия показывает амплитуду РТР-независимого набухания митохондрий (в присутствии 1 мМ ЭГТА). Верхняя пунктирная линия показывает время окончания регистрации.

1.1.2. Сравнение эффекта добавленных ПН и АН на индукцию РТР в митохондриях печени крыс

На рис. 5 представлены данные об эффекте добавленных ПН и АН на набухание и Ca^{2+} -емкость митохондрий печени крыс. Как и ожидалось, АН ингибировали открывание РТР и их действие было дозозависимым. Максимальный защитный эффект наблюдался при миллимолярных концентрациях, характерных для цитозоля клетки и превышающих необходимые для связывания с АНТ. В концентрации 1 мМ АТФ и АДФ увеличивали ВПМН в 5,6 и 7,1 раз, соответственно (А), а также снижали амплитуду ЭГТА-чувствительного набухания примерно на 75% (Б) по сравнению с митохондриями, инкубируемыми без нуклеотидов. Кроме того, АТФ и АДФ увеличивали Ca^{2+} -емкость митохондрий в 3,3 и 4,2 раза, соответственно (В и Г). В присутствии олигомицина защитный эффект АДФ был менее выраженным (А и Б).

НАД(Н) и НАДФ(Н) по-разному действовали на индукцию РТР. НАДН и НАД так же, как и АН, дозозависимо ингибировали открывание РТР. В 1 мМ концентрации они увеличивали ВПМН в 2,9 (НАДН) и 2,2 (НАД) раза (А), и снижали количество набухших митохондрий на 48 и 39%, соответственно (Б). Кроме того, данные нуклеотиды увеличивали Ca^{2+} -емкость митохондрий в 2.3 (НАДН) и 1.6 (НАД) раз (В и Г). НАДФН и НАДФ в низких концентрациях (50-200 мкМ) слабо ингибировали индукцию РТР (А, Б). В высоких концентрациях (500 мкМ-1 мМ), наоборот, оказывали слабый стимулирующий эффект (А-Г).

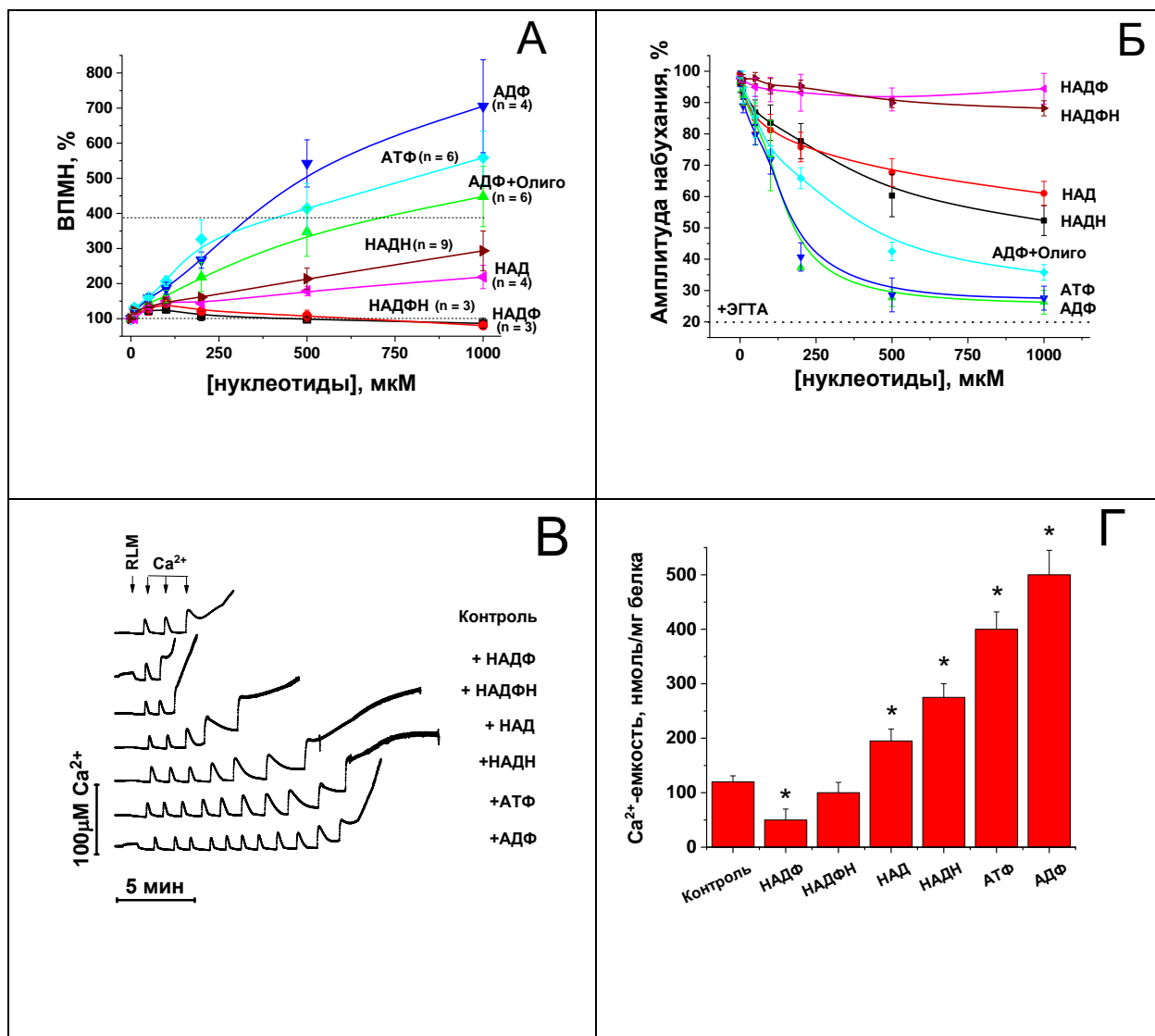


Рис. 5. Эффект добавленных АН и ПН на набухание (А и Б) и Ca^{2+} -емкость (В и Г) митохондрий печени крыс. Митохондрии (0.75 (А и Б) и 1 (В и Г) мг/мл) были помещены в стандартную КСI-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мг/мл). А и Б. Суспензию митохондрий помещали в ячейки планшета, в которые были добавлены, где указано, олигомицин (2.5 мкг/мл, Олиго) и нуклеотиды в обозначенных концентрациях и инкубировали в течении 5 мин перед добавкой 20 мкМ Ca^{2+} . Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n \geq 3$). А. Среднее

ВПМН митохондрий в отсутствие нуклеотидов (45.04 +/- 3.49 мин, n = 20) соответствует 100% на оси ординат. Значения выше пунктирной линии были получены путем экстраполяции кривых абсорбции. **Б.** Амплитуда набухания RLM на 150 минуту после добавки Ca^{2+} . Пунктирная линия (+ЭГТА) показывает уровень независимого от РТР снижения A_{550} . **В.** Стрелки показывают добавку RLM и Ca^{2+} (порциями по 50 мкМ). Где указано, среда измерения содержала 1 мМ нуклеотиды. Показаны типичные кривые одного из трех аналогичных экспериментов. **Г.** Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3-6) для трех независимых экспериментов. * - $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Таким образом, было показано, что пиридиновые нуклеотиды НАДН и НАД, действуя со стороны цитозоля, оказывают ингибирующее действие на индукцию Ca^{2+} -зависимой неспецифической поры в изолированных митохондриях и этот эффект сравним с действием адениновых нуклеотидов. При этом действие НАДН было более выраженным по сравнению с НАД. НАД(Ф)Н, в отличие от НАД(Н), не оказывал существенного влияния на набухание митохондрий и их кальциевую емкость. Так как НАД(Н) не способны проникать в матрикс, полученные данные указывают на то, что во внешних отделах митохондрий существует раннее неизвестный НАД(Н) – зависимый регулятор РТР.

1.2. Исследование механизма ингибирования индукции РТР внешним НАД(Н)

Следующим шагом в данной работе стало определение механизма регуляции неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры НАД(Н). При проведении экспериментов на изолированных митохондриях мы использовали RLM.

1.2.1. Окисление/восстановление внешнего НАД(Н) не является необходимым условием подавления открывания РТР

Теоретически внешний НАД(Н) может ингибировать индукцию РТР прямо, связываясь с аллостерическим сайтом регуляции, либо опосредованно, влияя на работу НАД(Н) – зависимых дегидрогеназ внешних отделов митохондрий. Значения K_m различных оксидоредуктаз для НАД(Н) лежат в диапазоне 1-100 мкМ. В наших же условиях (рис. 5) самое сильное подавление открывания РТР наблюдалось при миллимолярных концентрациях НАД(Н), что указывает на аллостерический сайт действия. Мы проверили, является ли необходимым окисление/восстановление НАД(Н) для ингибирования поры. Для этого мы сравнили эффекты используемой в работе ферментативно окисляемой формы НАДН (β -НАДН) и ее неокисляемого аналога α -НАДН. Как следует из рис. 6, α -НАДН значительно увеличивал митохондриальную Ca^{2+} -емкость, но эффект был слабее, чем при

добавлении β -НАДН, более, чем в два раза (А). Регистрация флуоресценции пиридиновых нуклеотидов показала, что митохондрии не окисляют и не восстанавливают внешний β -НАД(Н) в наших экспериментальных условиях (Б).

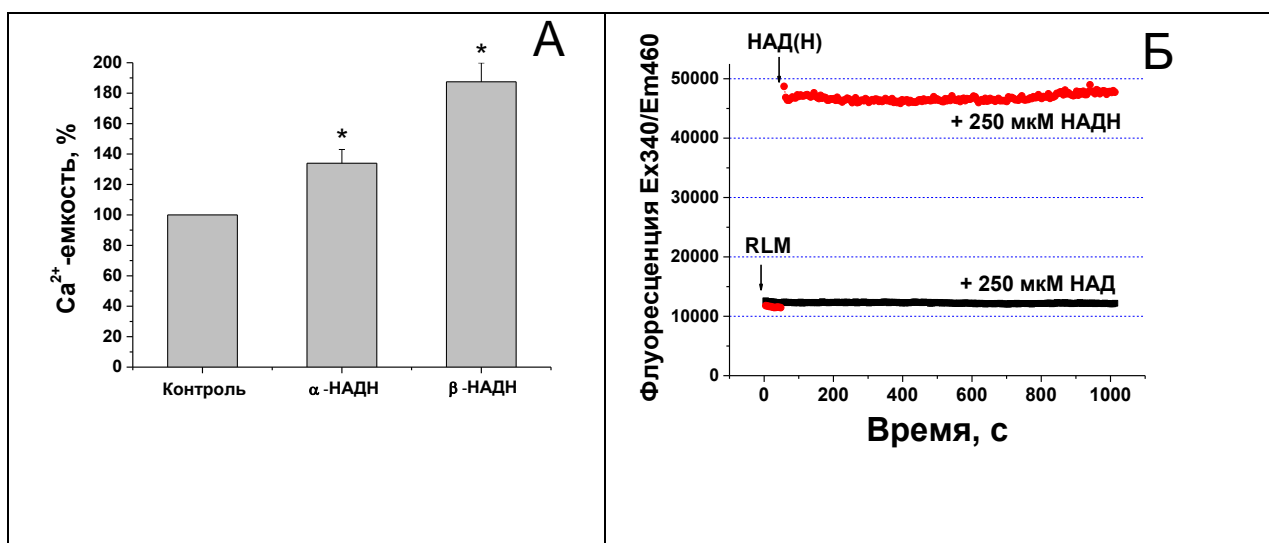


Рис. 6. Ингибирование индукции РТР не требует окисления и восстановления внешнего НАД(Н). А. Митохондриальная Ca^{2+} -емкость в присутствии ферментативно окисляемого и не окисляемого изомеров НАДН. RLM 1.5 мг/мл были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl_2 , 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Концентрация нуклеотидов 1 мМ. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3-6$); 100% Ca^{2+} -емкость соответствует 135.1 ± 15.9 нмоль Ca^{2+} /мг белка. * - $p < 0.01$ по сравнению с контролем. Б. Динамика флуоресценции ПН в суспензии митохондрий в присутствии 250 мкМ НАД и НАДН. RLM (0.5 мг/мл) были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Показаны типичные кривые одного из трех аналогичных экспериментов.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что эффект НАД и НАДН не связан с работой какой-либо НАД(Н)-зависимой оксидоредуктазы и данные нуклеотиды ингибируют открывание РТР путем связывания с внешним аллостерическим регуляторным сайтом.

1.2.2. Влияние Mg^{2+} на подавление открывания РТР с помощью НАД(Н)

Известно, что открывание РТР ингибируется добавлением ионов Mg^{2+} . Также показано, что он увеличивает ингибиторный эффект АН, оказываемый на индукцию поры. При этом механизм действия Mg^{2+} на РТР точно не определен. Предполагается, что он может конкурировать с Ca^{2+} за сайты связывания на компонентах поры.

В наших условиях ингибиторное действие НАД(Н) было обнаружено в среде, содержащей 2 мМ Mg^{2+} (см. рис. 5). На рис. 7 (вставка в А) показано, что 2 мМ Mg^{2+} сам по себе увеличивает ВПМН в 1.9 раз. Также Mg^{2+} увеличивал ВПМН при наличии в среде измерения НАД и НАДН в 2-2,4 и 2-3 раза, соответственно, в зависимости от концентрации нуклеотидов (А). Кроме того, Mg^{2+} снижал амплитуду набухания в присутствии НАД(Н) (Б).

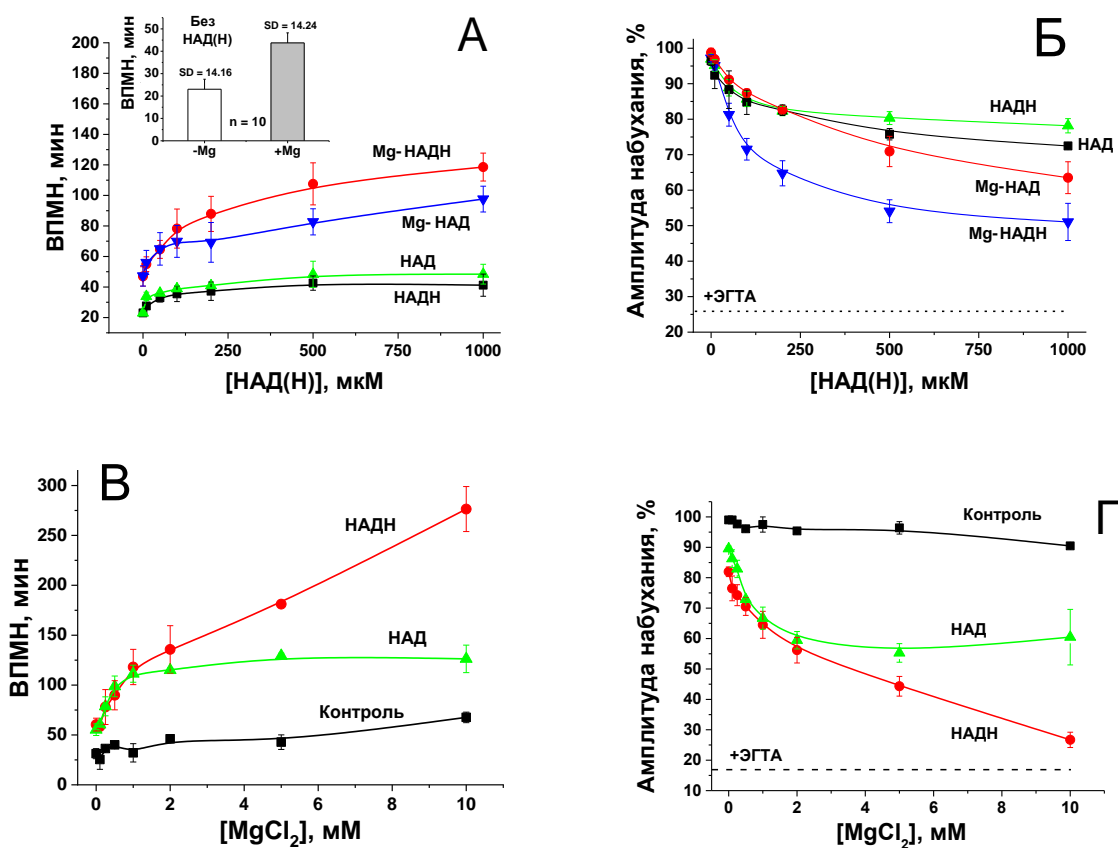


Рис. 7. Эффект Mg^{2+} на НАД(Н)-зависимое ингибирование открывания РТР. RLM (0.75 мг/мл) были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ $MgCl_2$ (А и Б, где указано), 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). **А и Б. ВПМН и амплитуда набухания в присутствии 2 мМ Mg^{2+} .** Открывание РТР индуцировали путем добавления Ca^{2+} (60 нмоль/мг белка). Пунктирная линия с пометкой (+ЭГТА) показывает РТР-независимое набухание митохондрий. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=9). **В и Г. ВПМН и амплитуда набухания в присутствии различных концентраций Mg^{2+} .** Где указано, среда инкубации содержала 1 мМ НАД(Н) и $MgCl_2$ в различных концентрациях. Открывание РТР индуцировали путем добавления Ca^{2+} (37.5 нмоль/мг белка). **В.** Значения выше пунктирной линии были получены путем экстраполяции кривых абсорбции. **Г.** Пунктирная линия показывает РТР-независимое снижение абсорбции. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=9).

На панелях В и Г показано, что Mg^{2+} в концентрациях от 100 мкМ до 10 мМ постепенно увеличивал ВПМН (В) и снижал амплитуду набухания (Г). Mg^{2+} линейно усиливал

подавление открывания РТР, вызванное 1 мМ НАДН (наиболее сильное ингибирование происходило при 10 мМ Mg^{2+}). Mg^{2+} в концентрациях до 2 мМ линейно увеличивал защитное действие НАД без полного подавления открывания РТР. Таким образом, ингибирование РТР, вызванное совместным действием Mg^{2+} и НАД(Н), является более сильным, чем эффект, вызванный ингибиторами по отдельности.

Способность НАД(Н) и Mg^{2+} синергично подавлять РТР может указывать либо на взаимодействие комплекса Mg -НАД(Н) с внешним регулятором РТР или на их синергичный эффект, оказываемый на различные сайты [206]. Можно предположить, что Mg^{2+} в матриксе конкурирует с Ca^{2+} за связывающий сайт, тогда как НАДН действует на внешний регуляторный сайт. Недавно было показано, что N-терминальный матриксный домен MCU содержит отрицательно заряженный участок (MRAP), который содержит сайты связывания Ca^{2+} ($K_d \sim 2.3$ мМ) и Mg^{2+} ($K_d \sim 1.7$ мМ). Связывание с катионами приводит к дестабилизации белка, снижению его олигомеризации и, соответственно, активности. По-видимому, данный механизм лежит в основе снижения скорости поступления Ca^{2+} в митохондрии при добавлении в среду инкубации Mg^{2+} . С другой стороны, в наших условиях наблюдается линейное увеличение защитного эффекта НАДН при росте концентрации Mg^{2+} до 10 мМ. Такой эффект, возможно, указывает на действие на внешний регуляторный сайт РТР образующихся комплексов Mg -НАДН. Ранее было показано, что величина K_d НАДН для Mg^{2+} может равняться 80 мМ. Эффект НАД плюс Mg^{2+} был менее выраженным, так как K_d НАД для Mg^{2+} может быть даже выше, чем для НАДН [248].

1.2.3. Сочетанный эффект добавленных НАД(Н), АН и CsA на индукцию РТР

Адениновые нуклеотиды и CsA являются мощными ингибиторами РТР. Мы проверили, каким образом они влияют на проявление защитного эффекта НАД(Н) (рис. 8). АТФ в низких концентрациях (≤ 250 мкМ) сильно увеличивал ВПМН (в 1.5 – 4.1 раз) и снижал амплитуду набухания (в 1.8 – 6.7 раз) RLM в присутствии 1 мМ НАДН. В случае НАД ВПМН увеличивалось в 1.5 – 4.7 раз, амплитуда набухания снижалась в 2.2 – 5.8 раз (рис. 8, А и Б). Напротив, АДФ (+ олигомицин) в низких концентрациях снижал ВПМН в присутствии НАДН и НАД (до 1.7 и 1.6 раз, соответственно) (рис. 8, Б), и не влиял на амплитуду набухания RLM (рис. 8, Г). АН в высоких концентрациях (0.5–1 мМ) мощно подавляли набухание митохондрий в присутствии НАД(Н), при этом АТР в концентрациях ≥ 0.5 мМ полностью предотвращал набухание.

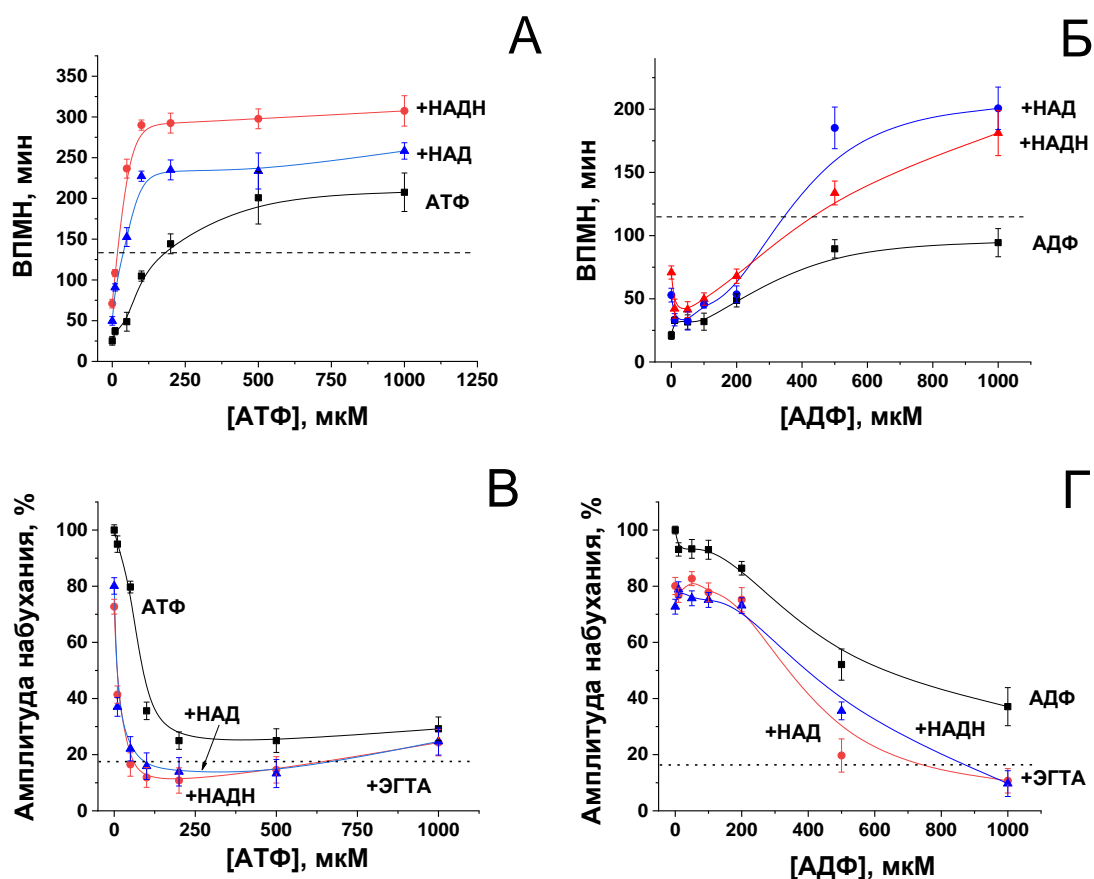


Рис. 8. Комбинированный эффект НАД(Н) и АН на ВПМН (А и Б) и амплитуду набухания (В и Г) митохондрий. А и Б. RLM (0.75 мг/мл) были помещены в стандартную КСI-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl₂, 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Открывание РТР индуцировали путем добавления 40 мкМ (53,3 нмоль/мг белка.) Са²⁺. Где указано, среда измерения содержала 1 мМ НАДН, 1 мМ НАД, а также АТР и АДФ в указанных концентрациях. В АДФ-содержащие образцы был добавлен олигомицин (2.5 мкг/мл). Значения выше пунктирной линии были получены путем экстраполяции кривых абсорбции (А и Б). Пунктирная линия на панелях В и Г (+ ЭГТА) показывает уровень независимого от РТР снижения А₅₅₀. Представленные данные есть среднее ± стандартная ошибка среднего (n=9).

Далее был исследован защитный эффект 1 мМ НАДН в присутствии 1 мМ АН и 1 мкМ CsA путем измерения Са²⁺-емкости митохондрий (рис. 9). Было обнаружено, что инкубация RLM при одновременном добавлении НАДН и АТР (А, В) или НАДН и АДФ (А, Б) приводила к аддитивному увеличению значений данного параметра: НАДН = 275, АТР = 400, АДФ = 500, НАДН+АТР = 650, НАДН+АДФ = 650, контроль = 120 (указаны средние значения, нмоль/мг белка.). Совместное действие НАДН и CsA вызывало синергичное увеличение значений исследуемого параметра (А, Г), которые были следующими: НАДН = 275, CsA = 1250, НАДН+CsA = 2050, контроль = 120. Интересно, что в присутствии НАДН и АН, Са²⁺- зависимое падение мембранного потенциала сопровождалось окончанием закачки, но не выходом аккумулированного Са²⁺ (рис. 10, Г и Е), что может указывать на накопление кальция в матриксе в виде кальций-фосфатных гранул.

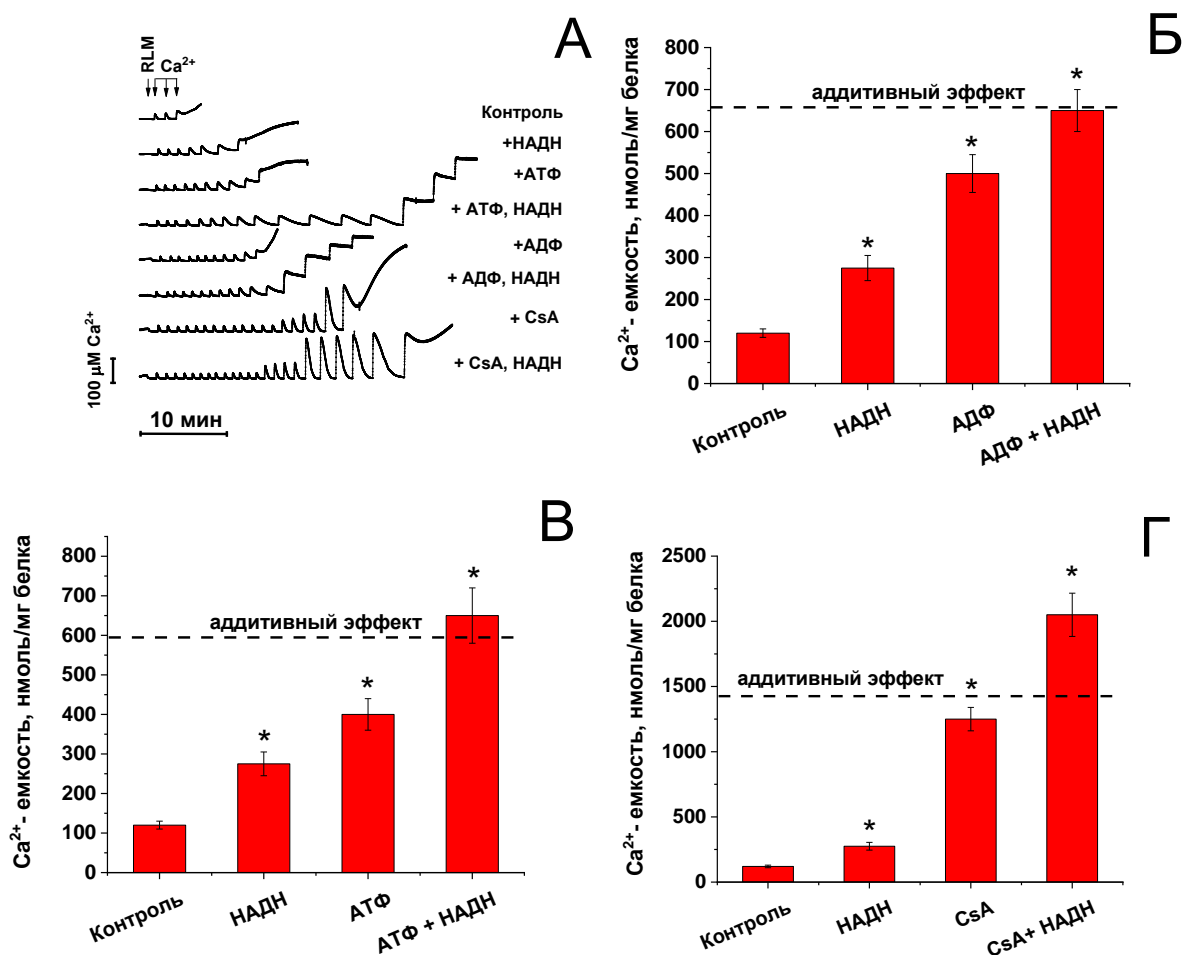


Рис. 9. Влияние НАДН в комбинации с АН либо CsA на Ca^{2+} -емкость RLM. Митохондрии (1 мг/мл) были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl_2 , 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). **А.** Стрелки показывают добавку RLM и Ca^{2+} (порциями по 50 мкМ). Где указано, среда измерения содержала 1 мМ АТФ, 1 мМ АДФ, 1 мМ НАДН, 1 мкМ CsA. Показаны типичные кривые одного из трех аналогичных экспериментов. **Б-Г.** Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=9). * - $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

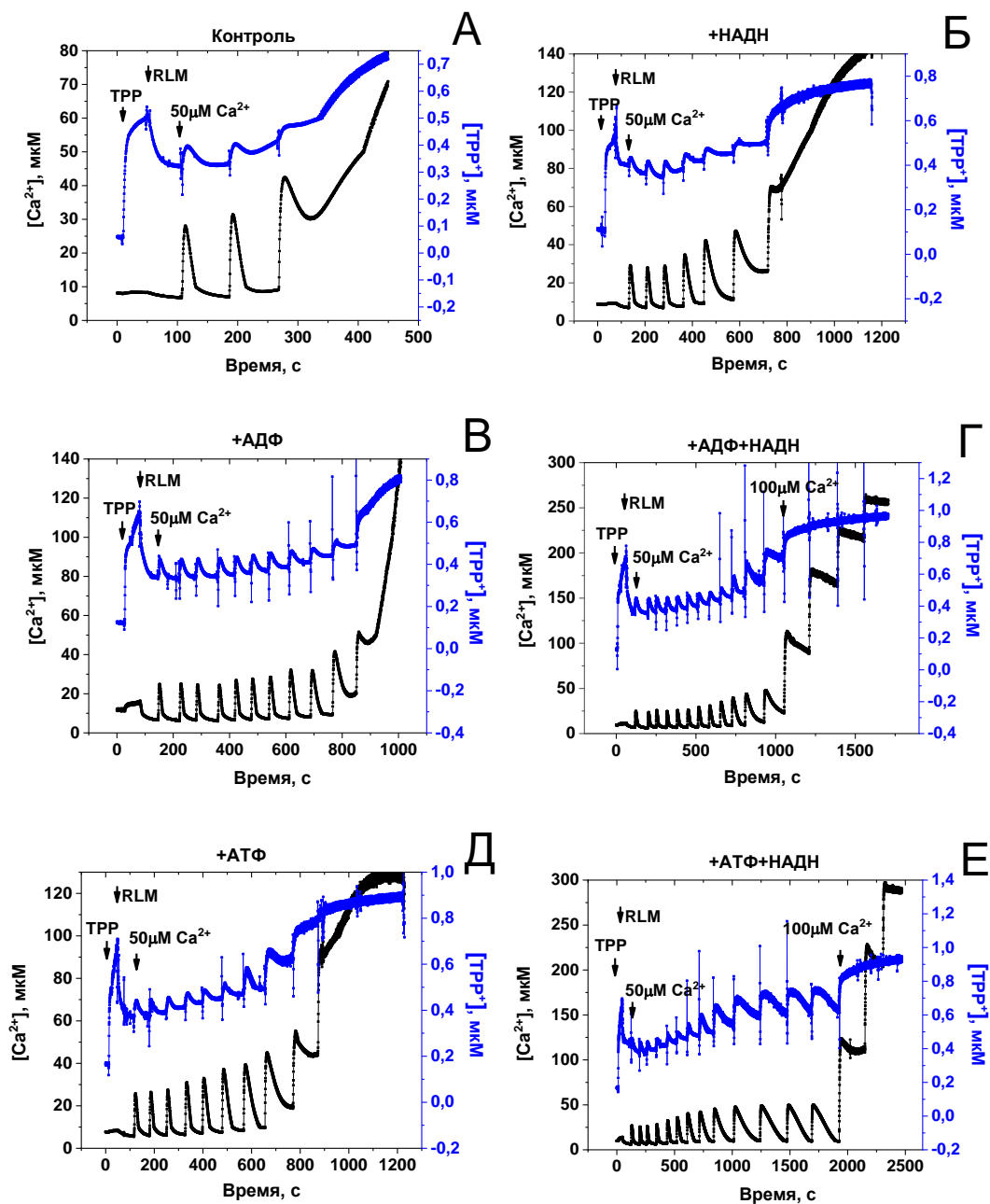


Рис. 10. НАДН в комбинации с АН предотвращает Ca^{2+} -зависимый выход загруженного Ca^{2+} после падения мембранного потенциала. Стрелками показаны добавки 1 мкМ TPP^+ , 1 мг/мл RLM и 50 мкМ Ca^{2+} . Где указано, среда измерения содержала 1 мМ НАДН (Б), 1 мМ АДФ (+олигомицин) (В) 1 мМ АТФ (Д) или оба нуклеотида (Г, Е). Показаны типичные кривые одного из трех аналогичных экспериментов.

Таким образом, комбинированное защитное действие НАДН и CsA на пору больше суммы отдельных эффектов компонентов, что указывает на различные сайты действия (или разные механизмы). Совместное действие НАД(Н) и АН (АТФ и АДФ в концентрациях ≥ 250 мкМ) также осуществляется через разные сайты, поскольку оно является аддитивным и равно сумме индивидуальных эффектов нуклеотидов. НАД(Н) и АДФ (в концентрациях ≤ 250 мкМ) действуют антагонистично, что указывает на конкуренцию за один сайт, возможно, АНТ.

1.2.4. Эффект НАДН на Ca²⁺-емкость митохондрий пермеабилizованных клеток

Для поиска кандидата на роль НАД(Н)-связывающего регулятора РТР были использованы базы данных Uniprot и Medline для анализа белкового состава митохондрий грызунов. Поиск в Uniprot по ключевым словам «Mus musculus», «mitochondrion» и «НАД» обнаруживает 457 записей о 176 белках. Их митохондриальная локализация и способность взаимодействовать с НАД(Ф)Н были проверены с использованием Uniprot и Medline (Таблица 1). Митохондриальная локализация, обозначенная как «сомнительна», была подтверждена только одним исследованием. Способность взаимодействовать с цитозольным НАД(Ф)Н определялась как «сомнительна» в тех случаях, если внутримитохондриальная локализация не известна. Среди найденных белков только 14 являются доступными для действия цитозольных НАД(Н), так как расположены в ОММ, и на внешней поверхности IMM. Это белки AGK, AIFM1, AIFM2, AIFM3, CYB5R1, CYB5R3, GAPDH, KMO, RDH13, SIRT1, SORD, VDAC1, VDAC2 и VDAC3.

Таблица 1. Митохондриальные НАД(Ф)(Н)-связывающие белки крыс.

1	<p>Митохондриальная локализация сомнительна (38 белков)</p> <p>AASDH, ADH1, ADH5, AKR1B7, ALDH1L1, ALDH3A2, ALDH9A1, CERK, CRYM, CYB5R2, CYBB, CYP2E1, DHRS4, DUS2, EHHADH, FASN, GPD1, H6PD, HSD17B4, IDH1, MAT2B, MDH1, ME1, MMACHC, NME3, PARP9, POR, PTGR2, QDPR, RDH14, SIRT2, SLC25A1, SLC25A17, SPR, TXNRD1, TXNRD3, UXS1, ZADH2</p>
2	<p>Способны взаимодействовать с НАД(Ф)(Н) матрикса (87 белков)</p> <p>AASS, ALDH1B1, ALDH1L2, ALDH2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, BCKDHA, BCKDHB, BDH1, CBR2, CBR4, COQ6, COQ7, DBT, DECR1, DHRS2, DLAT, DLD, DLST, ETFA, ETFDH, FDXR, FOXRED1, GLUD1, GSR, H2-KE6/HSD17B8, HADH, HIBADH, HSD17B10, HSD3B1, HSD3B2, HSD3B3, HSD3B4, HSD3B5, HSD3B6, IDH2, IDH3A, IDH3B, IDH3G, LDHAL6B, LDHB, MDH2, ME2, ME3, MECR, MTHFD1, MTHFD1L, MTHFD2, MTHFD2L, MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6, NADK2, NAXD, NAXE, NDUFA5, NDUFA9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NMNAT3, NNT, OGDH, OGDHL, PARP1, PDHA1, PDHB, PDHX, PDPR, PYCR1, PYCR2, SDHA, SIRT3, SIRT4, SIRT5, TDH, TXNRD2</p>
3	<p>Способность взаимодействовать с цитозольным НАД(Ф)(Н) сомнительна/ внутримитохондриальная локализация не известна (18 белков)</p>

	ADHFE1, APOA1BP, CARKD, CRYZL2, DHRS1, HIBADH, HSDL1, HSDL2, LDHA, NOS1, NOX4, OXNAD1, PECR, PPOX, RFK, RTN4IP1, SCCPDH, VAT1
4	Способны взаимодействовать с цитозольным НАД(Ф)(Н) (10 белков)
	AIFM1, AIFM2, AIFM3, KMO, NOS3, RDH13, VDAC1, VDAC2, VDAC3, WWOX
5	Способны взаимодействовать с цитозольным НАД(Н) (14 белков)
	AGK, AIFM1, AIFM2, AIFM3, RDH13, SIRT1, SORD, CYB5R1, CYB5R3, GAPDH, KMO, VDAC1, VDAC2, VDAC3

Среди этих белков VDAC1 представляется наиболее подходящим кандидатом на роль НАД(Н)-зависимого регулятора РТР. Во-первых, он является регулятором РТР и, предположительно, входит в состав поры [288]. Во-вторых, он взаимодействует с другими регуляторами РТР: белками (АНТ, НК, GAPDH) [289–291], Ca^{2+} [241, 292, 293] и нуклеотидами (АТР/АДФ) [294]. В-третьих, ранее было показано, что НАДН и НАД способны снижать проницаемость VDAC для Ca^{2+} и других малых ионов [241].

Для определения роли канала VDAC в НАДН-зависимом ингибировании РТР была проанализирована зависимость эффекта нуклеотида от уровня экспрессии изоформ VDAC в эмбриональных (MEF, HEK293T), раковых (HEp-2, THP-1) и дифференцированных клетках (изолированные гепатоциты и кардиомиоциты крыс).

На рисунке 11 показано, что НАДН не влиял на Ca^{2+} -емкость пермеабелизованных с помощью дигитонина эмбриональных и раковых клеток, но увеличивал данный параметр в гепатоцитах (в 2.2 раза) и в кардиоцитах (в 1.9 раз) (А). В то же время, как эмбриональные, так и дифференцированные клетки несли полный набор изоформ VDAC (Б). Мы предположили, что отсутствие защитного эффекта НАДН может быть связано с действием низких концентраций цитозольного АДФ как его антагониста (см. рис. 8). Мы измерили эффект НАДН на Ca^{2+} -емкость клеток, в которых были отмыты нуклеотиды после пермеабелизации дигитонином. Отмывка, действительно, увеличила эффект НАДН, оказываемый на гепатоциты, но не оказала влияния на клетки MEF, HEK293T, HEp-2 (В). Еще одной причиной отсутствия эффекта НАДН может являться конкуренция нуклеотида и белков-партнеров VDAC за общий сайт связывания. Ранее было показано, что НК1 и II, тубулин и глицеральдегидфосфат дегидрогеназа сверхэкспрессируются в раковых клетках и повышают их жизнеспособность [83, 295]. Если НАДН и данные белки конкурируют за общий сайт связывания на молекуле VDAC, их диссоциация будет увеличивать

чувствительность РТР к НАДН. Однако реагенты, вызывающие диссоциацию НК и VDAC, а именно, глюкозо-6-фосфат (G6P) и метил ясмонат, не увеличили защитный эффект НАДН на клетки MEF и HEK293T. Также эффекта не оказал эрастин, индуцирующий диссоциацию тубулина (рис. 11, Г).

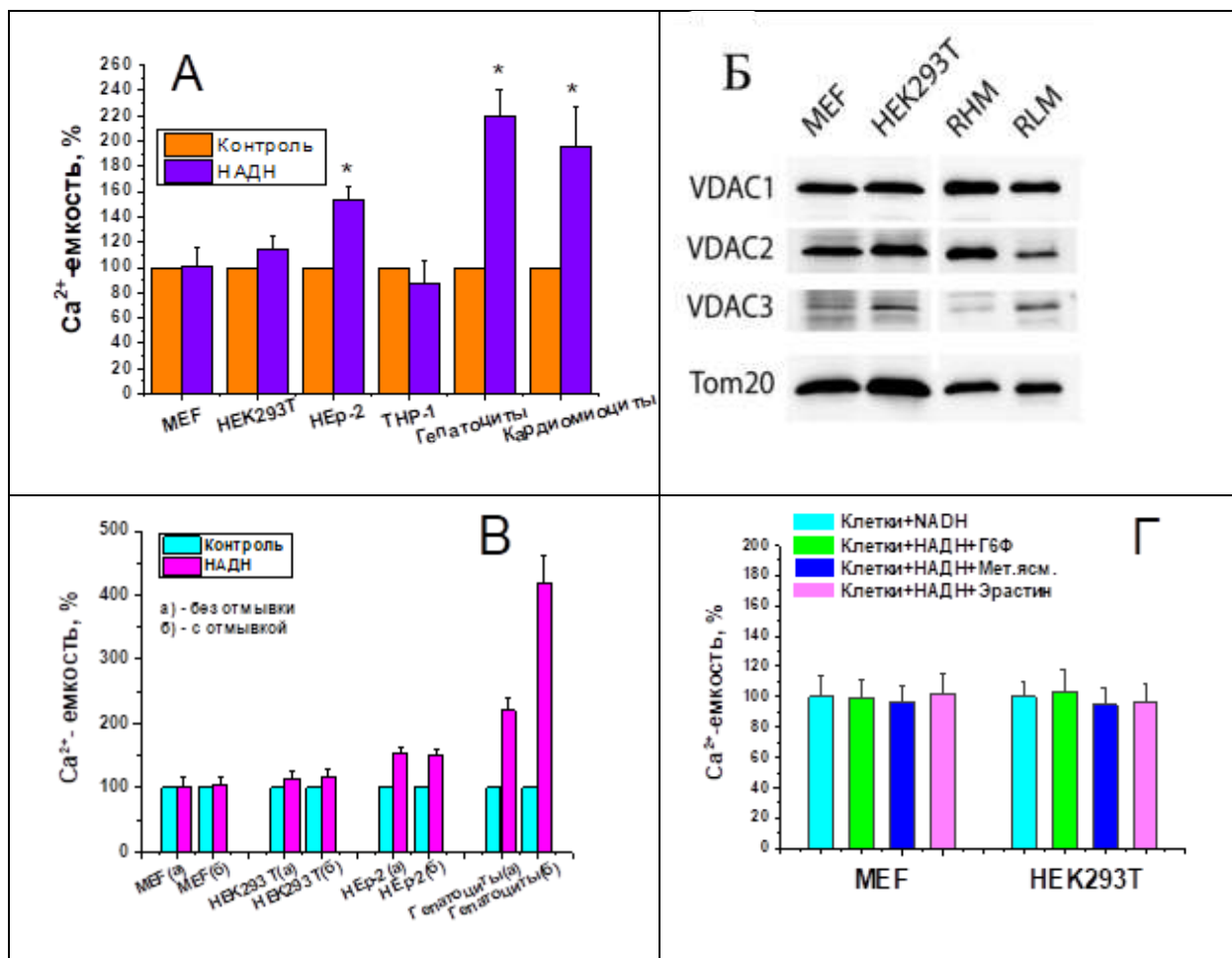


Рис. 11. Влияние НАДН на Ca^{2+} -емкость митохондрий в эмбриональных, раковых и дифференцированных клеточных линиях. Перед измерением клетки были отмыты в стандартной среде инкубации и пермеабелизованы дигитонином (10 мкМ/млн клеток). Концентрация добавленного НАДН равна 2 мМ. **А.** 100% Ca^{2+} -емкость соответствует 47.8 ± 5.8 (MEF), 56.5 ± 7.3 (HEK293T), 41.7 ± 15.8 (Hep-2), 73.3 ± 6.7 (THP-1), 128.6 ± 34.1 (гепатоциты) и 168.3 ± 40.5 нмоль/млн клеток (кардиоциты). **Б.** В гель добавляли 40 мкг белка лизатов MEF и HEK293T и 10 мкг белка RLM и RHM. **В и Г.** После пермеабелизации дигитонином клетки центрифугировали 5 мин при 3000 rpm и удаляли супернатант (в **В** обозначено «б»). **Г.** Перед добавкой Ca^{2+} клетки, где указано, инкубировали в присутствии 1 мМ глюкозо-6-фосфата (G6P, 20 минут), 1.5 мМ метил ясмоната (Met.jasm, 20 минут) и 0,05 мМ эрастина (Erastin, 10 минут). 100% Ca^{2+} -емкость соответствует 47.8 ± 5.8 (MEF), 56.5 ± 7.3 (HEK293T) нмоль/млн клеток.

Полученные данные указывают на то, что способность НАДН подавлять открывание РТР может зависеть от степени дифференцировки клеток. Кроме того, результаты не

подтверждают роль VDAC в НАД(Н)-зависимом ингибировании открывания РТР, либо указывают на действие его неизвестного партнера – антагониста НАД(Н).

1.2.5. Эффект ингибиторов АНТ на подавление открывания РТР внешними ПН

Теоретически, внешние АН могут подавлять РТР, действуя через внешний или внутренний регуляторный сайт. В последнем случае АДФ и АТФ должны транспортироваться в матрикс с помощью АНТ или SСaМС [134, 181, 211]. В матриксе АН, возможно, стабилизируют АНТ в матриксной «т»-конформации ($IC_{50} = 5-10$ мкМ для АДФ; 50-200 мкМ для АТФ [3, 134, 161, 162] и, таким образом, аллостерически ингибируют РТР [134]. Кроме того, увеличение концентрации АН в матриксе связывают с увеличением его Ca^{2+} -буферной емкости [205–208]. Так как в состав НАД(Н) входит АДФ как структурный компонент, мы предположили, что его защитный эффект может быть опосредован связыванием с АН-транспортирующими белками и предотвращением выхода АТФ из матрикса.

Известными регуляторами индукции РТР являются КАТР и БК, конформационно-специфические ингибиторы АНТ. КАТР способствует открыванию РТР, стабилизируя АНТ в цитозольной «с»-конформации, БК оказывает ингибирующее действие, стабилизируя транспортер в «т»-конформации [163, 172]. Для оценки участия АНТ в НАД(Н)-опосредованном ингибировании РТР был исследован эффект КАТР и БК на защитное действие нуклеотидов. Сначала были определены концентрации КАТР и БК, которые вызывают максимальное и полумаксимальное (IC_{50}) ингибирование АНТ, путем измерения их влияния на АДФ-стимулированное дыхания ($V_3 - V_{\text{олиго}}$) (рис. 12). КАТР подавлял АНТ с IC_{50} , близкой к 120 нМ/мг белка (А, вставка). БК добавляли за 5 мин до добавления 2 мМ АДФ. IC_{50} для БК равна 540 нМ (Б, вставка). Вставки на панелях А и Б показывают, что максимальное ингибирование АНТ происходит при действии 2 мкМ БК и ~300 нМ КАТР.

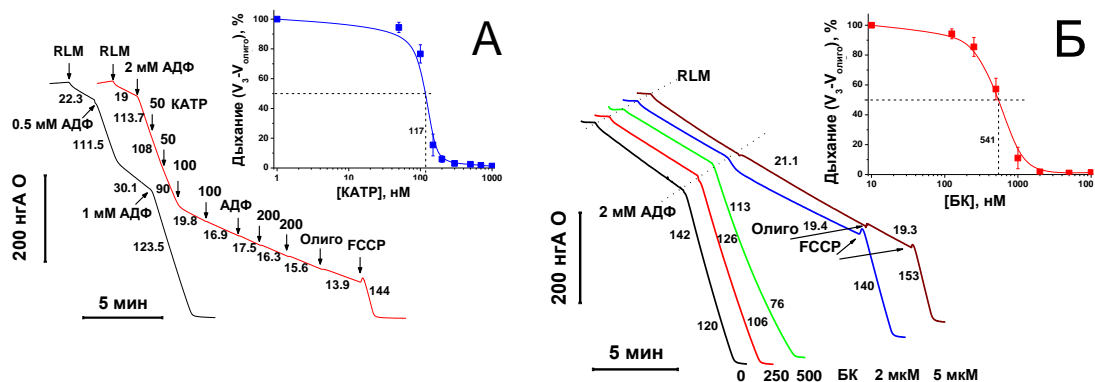


Рис. 12. Эффект ингибиторов АНТ на АДФ-стимулируемое дыхание митохондрий. RLM (1 мг/мл) были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl₂, 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Где указано, были добавлены АДФ (0.5–2 мМ), КАТР (50–200 нМ) (А), БК (250 нМ–5 мкМ) (Б), 500 нМ FCCP и олигомицин (2.5 мкг/мл). Показаны типичные кривые одного из четырех аналогичных экспериментов. Вставки показывают дозозависимое влияние КАТР и БК на скорости АДФ-стимулируемого дыхания. Представленные данные есть среднее ± стандартная ошибка среднего (n=4).

Как БК, так и КАТР в концентрациях $\leq IC_{50}$ увеличивали ВПМН (до 1.5 и 1.6 раз, соответственно) (рис. 13, А и В). БК также дозозависимо снижала амплитуду набухания (максимально – в 1.2 раза в концентрации 10 мкМ) (Б). БК в концентрациях $> IC_{50}$ слабо снижала ВПМН, и увеличивала данный параметр вновь до максимальных значений в концентрациях 5–10 мкМ (в 1.5 раз). КАТР в концентрациях $> IC_{50}$ (250–1000 нМ) снижал ВПМН (В) до контрольных величин и увеличивал амплитуду набухания на 5-10% (Г).

Величина IC_{50} отражает 50%-е ингибирование АНТ при действии данных концентраций кислот. Поэтому, исходя из полученных данных, можно заключить, что стабилизация 50% АНТ в «с»-, либо «т»-конформации, неблагоприятна для открывания поры. В то же время, в данных условиях добавление НАД не вызывает увеличения ВПМН, и слабо снижает амплитуду набухания только в случае БК (А-Г). Защитный эффект НАДН остается сильным. В условиях полного ингибирования АНТ НАД не оказывает влияния на ВПМН и, как и в случае 50% ингибирования АНТ, слабо снижает амплитуду набухания в присутствии БК. При этом полная стабилизация транслокатора в «т»-конформации не оказывает влияния на защитное действие НАДН. КАТР снижает ВПМН для НАДН в 2 раза и увеличивает амплитуду набухания на 20%, но не подавляет полностью эффект нуклеотида.

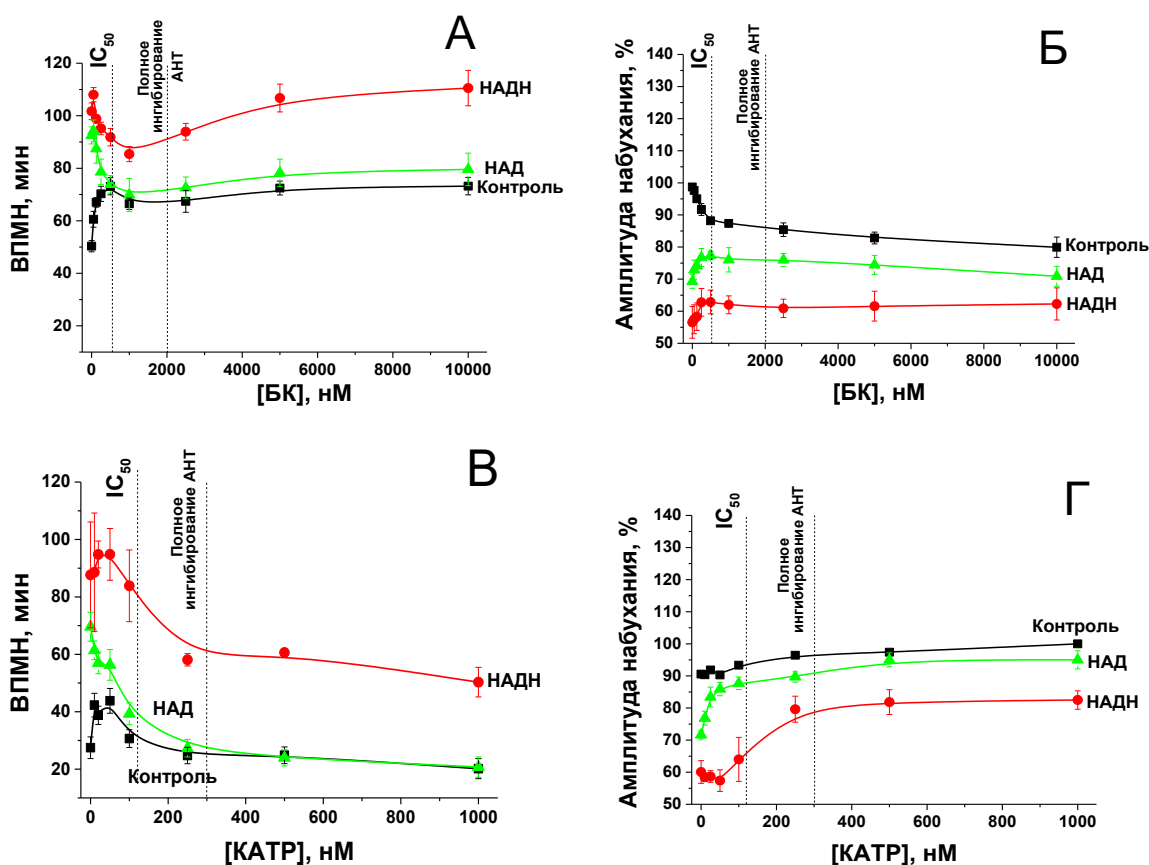


Рис. 13. Эффект КАТР и БК на НАД(Н)-зависимое подавление открывание РТР. RLM (0.75 мг/мл) были помещены в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl₂, 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Концентрация нуклеотидов равна 1 мМ. КАТР был добавлен одновременно с нуклеотидами, БК за 5 мин. После 5 мин инкубации с нуклеотидами был добавлен Ca²⁺ (35 нмоль/мг белка). Амплитуда набухания (Б и Г) была определена на 150 мин инкубации, РТР-независимое снижение A₅₅₀ (+1 мМ ЭГТА) составило 18 (Б) и 16.5% (Г). Показаны типичные данные одного из двух аналогичных экспериментов, каждый из которых состоял из трех титрований. Представленные данные есть среднее ± стандартная ошибка среднего (n=3).

Таким образом, конформация АНТ модулирует защитный эффект НАД(Н) в отношении РТР. При этом 100% - ингибирование переносчика в любой конформации почти полностью подавляет эффект НАД, а ингибирование в «с»-конформации снижает эффект НАДН. Эти данные можно интерпретировать двояко. Во-первых, как действие НАД(Н) через два сайта: НАД – через АНТ и НАДН через АНТ и дополнительный сайт. Во-вторых, это может говорить о разной способности НАД и НАДН вызывать конформационные изменения регулятора РТР. АНТ может быть мишенью прямого воздействия НАД(Н), либо нуклеотиды могут действовать на белок, находящийся в комплексе с АНТ и регулирующий его конформационное состояние.

1.2.6. Активация выхода АТФ из митохондрий при действии НАД(Н)

Одним из возможных механизмов ингибирования РТР с помощью ПН, теоретически, может являться повышение Ca^{2+} -буферной емкости матрикса за счет подавления выхода АТФ. В отличие от АНТ, транспортирующего свободные молекулы АТФ и АДФ, SСaМС переносит MgATP^{2-} , протонированную форму АДФ (НАДФ^{2-}), АМФ^{2-} , и неорганический фосфат ($\text{Ф}_\text{н}^{2-}$). Ранее было показано, что Ca^{2+} -активируемая работа SСaМС, приводящая к накоплению MgATP^{2-} в матриксе (в обмен на $\text{Ф}_\text{н}$), может увеличивать Ca^{2+} -буферную емкость внутреннего пула АН [181, 211] и/или снижать рН матрикса [296] и, таким образом, ингибировать открывание РТР. Также Ca^{2+} может активировать выход АТФ из матрикса (в обмен на внешний НАДФ^{2-} или $\text{Ф}_\text{н}$), что должно снижать Ca^{2+} -буферную емкость матрикса и индуцировать открывание РТР [211].

Для проверки гипотезы об увеличении Ca^{2+} -буферной емкости матрикса с помощью ПН мы исследовали влияние НАД(Н) на выход АТФ из RLM. Регистрацию АТФ проводили с применением 20% раствора люциферин - люциферазы, который быстро окисляет внемитохондриальный АТФ и генерирует хемилюминесценцию. В наших условиях в среде измерения, не содержащей митохондрии, АТФ-опосредованная генерация люминесценции была в 20 раз выше, чем АДФ-опосредованная (рис. 14, А). Ни НАДН, ни НАД не поддерживали люциферазную реакцию (рис. 14, Б).

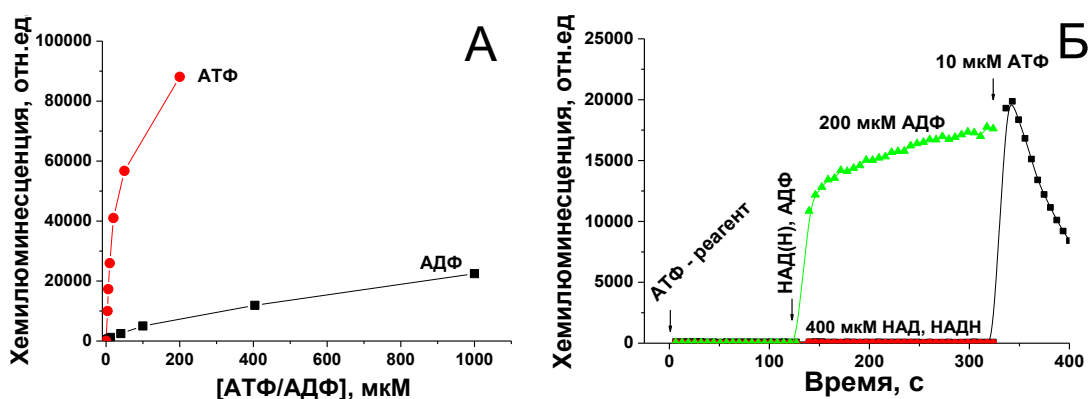


Рис. 14. Эффект АДФ, АТР и НАД(Н) на хемилюминесценцию в 20% растворе люциферин-люциферазного реагента. Регистрация хемилюминесценции проводилась в стандартной KCl-среде, содержащей 2 мМ MgCl_2 , 20% АТФ-реагент, АТР, АДФ (А и Б) и НАД(Н) (Б) в указанных концентрациях. Показаны типичные кривые одного из четырех аналогичных экспериментов.

В суспензии митохондрий наблюдалась относительно низкая, но постоянная люминесценция, которая, по-видимому, отражает постоянный обмен малого количества АТФ на АДФ/АМР между средой и митохондриями (рис. 15). Так как КАТР и ВА

полностью подавляли данный обмен, он опосредован работой АНТ. Ca^{2+} в присутствии Ru-360, ингибитора кальциевого унипортера, активировал выход АТФ, возможно, путем активации обмена $\Phi_{\text{H}}/\text{MgATP}$, осуществляемого SCaMC. БК (но не КАТР) снижала этот обмен наполовину.

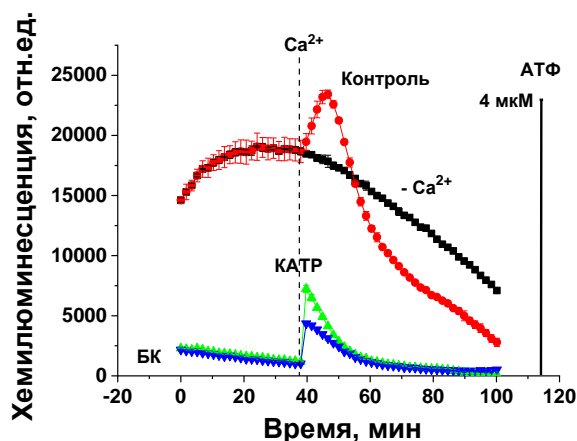


Рис. 15. Ca^{2+} -зависимый выход АТФ из митохондрий. Стандартная среда инкубации содержала 20% АТФ-реагент, 5 мМ сукцинат, 2 мкг/мл ротенон, 10 мкМ ЭГТА и 250 нМ Ru-360. Концентрация митохондрий в суспензии составляла 0.7 мг белка/мл. Где указано, среда также содержала 1 мкМ КАТР и 10 мкМ БК. Пунктирной линией показана добавка 100 мкМ Ca^{2+} . Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3).

Добавка НАДН и НАД стимулировала выход и обмен АТФ в RLM (рис. 16, А, Б и В). При этом выход АТФ был почти одинаковым в присутствии разных концентраций НАДН (0.25-2 мМ) (Б). КАТР и БК отменяли люминесценцию в присутствии НАД(Н) (А, В), что говорит о том, что выход был опосредован работой АНТ. Mg^{2+} в присутствии и отсутствии НАД(Н) оказывал минимальный эффект на выход АТФ (А, В). Таким образом, Ca^{2+} и НАД(Н) активируют выход митохондриального АТФ через SCaMC и АНТ, соответственно.

На панели Г показано, что инкубация митохондрий в отсутствие Ru-360 с добавлением 1 мМ ЭГТА (линия 1), ЭГТА и 1 мМ НАДН (линия 2), 100 мкМ Ca^{2+} (линия 3), и Ca^{2+} плюс НАДН (линия 4) приводит к накоплению АТФ в растворе только в присутствии ЭГТА и НАДН. Ca^{2+} (линия 3) и Ca^{2+} плюс НАДН (линия 4), по-видимому, вызывали набухание митохондрий и накопление АДФ, который может регенерироваться до АТФ путем добавления свежих митохондрий и ЭГТА. НАДН усиливал выход АДФ даже из пермеабелизованных митохондрий (+ Ca^{2+}) (линия 4).

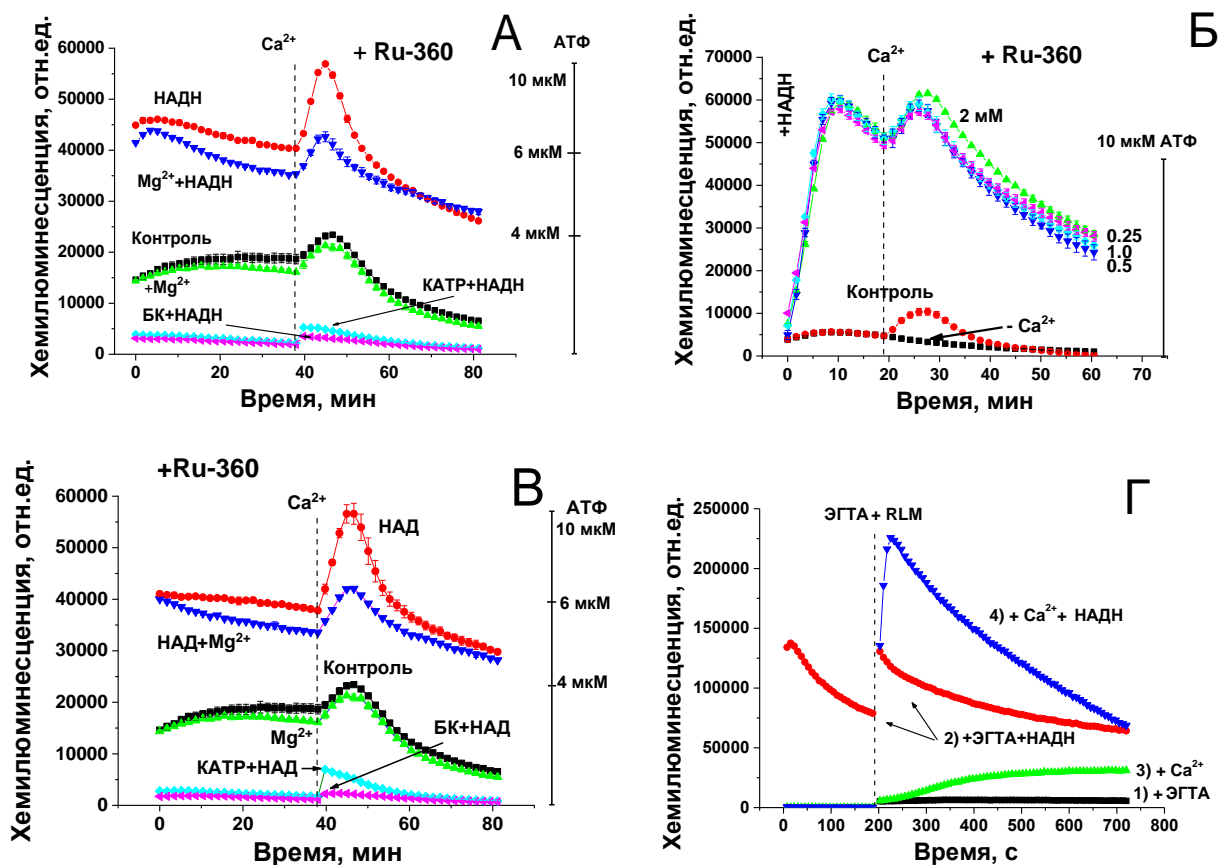


Рис. 16. НАД(Н) активирует выход АТФ из митохондрий. А – В. Стандартная среда инкубации содержала 20% АТР-реагент, 5 мМ сукцинат, 2 мкг/мл ротенон, 10 мкМ ЭГТА и 250 нМ Ru-360. Концентрация митохондрий в суспензии равна 0.7 мг/мл. Где указано, среда также содержала 1 мкМ КАТР, 10 мкМ БК, 2 мМ НАДН, 2 мМ НАД и 2 мМ Mg^{2+} . Вертикальная пунктирная линия обозначает добавку 100 мкМ Ca^{2+} . Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$). Г. Митохондрии (1 мг/мл) были помещены в стандартную среду с добавлением 5 мМ сукцината и 2 мкг/мл ротенона, а также 1 мМ ЭГТА (1), ЭГТА и 1 мМ НАДН (2), 100 мкМ Ca^{2+} (3), Ca^{2+} плюс НАДН (4). После 10 мин инкубации митохондрии осаждали путем центрифугирования (5 мин, 14600 гpm). В полученном супернатанте определяли уровень АТФ. После 3 мин записи были добавлены митохондрии (1 мг/мл) и 1 мМ ЭГТА (только к содержащим Ca^{2+} -образцам). Показаны типичные данные одного эксперимента из трех аналогичных.

Таким образом, НАД(Н), прямо, либо путем связывания с партнерами АНТ, усиливает выход АН через АНТ и не подавляет Ca^{2+} -индуцированный выход АТФ. Следовательно, механизм подавления РТР внешним НАД(Н) не связан с накоплением АН в матриксе и $SCaMC$ не является НАД(Н)-связывающим регуляторным сайтом.

Таким образом, в данной работе впервые были описаны эффекты, оказываемые немитохондриальными ПН на регуляцию открывания РТР. На изолированных митохондриях, выделенных из печени крыс, а также на гепатоцитах и кардиомиоцитах было показано, что НАДН и, в меньшей степени, НАД в микромолярных и миллимолярных концентрациях оказывают дозозависимое ингибирующее действие на пору. НАДФ(Н) не

оказывал заметного влияния на РТР. Так как НАД⁺ и НАДН не способны проникать в матрикс, должен существовать сайт их действия во внешних отделах митохондрий. По-видимому, данный регуляторный сайт является аллостерическим, поскольку при проявлении своего защитного действия НАД(Н) не окисляется и не восстанавливается. Mg²⁺ синергично усиливает эффект НАД(Н). Полученные данные не подтверждают участие VDAC в НАДН-зависимой регуляции РТР. В эмбриональных (MEF, HEK293T) и раковых клетках (HEp2, THP-1), в отличие от терминально дифференцированных гепатоцитов и кардиомиоцитов, защитный эффект НАДН был минимальным либо отсутствовал, хотя все исследуемые клетки обладали полным набором изоформ VDAC. Ни удаление возможного антагониста НАДН - цитозольного АДФ, ни диссоциация НК и тубулина, предполагаемых конкурентов за сайт связывания на VDAC, не смогли восстановить защитный эффект НАДН. Таким образом, либо VDAC не вовлечен в НАД(Н)-зависимое подавление РТР, либо его действие может быть отменено неизвестным, связанным с дифференциацией клеток, партнером. Ингибиторный анализ показал, что стабилизация АНТ в «с»- и «т»-конформациях отменяет защитное действие НАД, оказываемое на митохондрии. Стабилизация АНТ в «с» конформации частично подавляет действие НАДН. Также не подтвердилась гипотеза о том, что НАД(Н) увеличивает Ca²⁺-буферную емкость внутреннего пула АН, регулируя работу SCaMC. Наоборот, НАД(Н) усиливает выход митохондриальных АН через АНТ и не подавляет Ca²⁺-зависимый выход АТР через SCaMC. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что НАД(Н) может оказывать эффекты на РТР через АНТ. Однако в литературе отсутствуют данные о том, что АНТ обладает сайтом связывания цитозольных ПН. Возможно, их эффект опосредован влиянием на отличный от транслокатора НАД(Н)-связывающий регулятор поры, который способен взаимодействовать с АНТ, менять его конформацию и ингибировать открывание РТР.

2. Регуляция вспышек Са, индуцированных пермеабиллизацией митохондриальных мембран, внешним НАД(Ф)Н

Известно, что Ca²⁺-зависимое открывание РТР стимулирует генерацию АФК в изолированных митохондриях [16–18, 252]. В 2000 году было открыто явление ROS induced ROS released (RIRR): накопление АФК в митохондриях при фотоактивации тетраметилпроламиновых производных приводит к открыванию РТР, которое сопровождалось усиленной генерацией АФК [251]. Также было показано, что транзитное открывание РТР, ассоциированное с эксайтотоксичностью глутамата в моторных нейроноподобных клетках, подавление пролиферации клеток-предшественников нейронов,

вызванное бета-амилоидами, а также Ca^{2+} и окислительный стресс приводят к краткосрочному усилению генерации СА (так называемым «вспышкам») [23–25]. Для объяснения данных процессов было предложено несколько механизмов: увеличение скорости работы Ca^{2+} -активируемых АФК-продуцирующих дегидрогеназ матрикса митохондрий, нарушение конформации комплексов I, II, III дыхательной цепи митохондрий, выход антиоксидантных белков в цитозоль через РТР [18, 259, 271, 278, 280, 281]. Однако на данный момент точные механизмы продукции АФК при открывании РТР остаются не выясненными.

Мы предположили, что большой вклад в генерацию АФК могут вносить ПН, поступающие в матрикс при пермеабиллизации IMM. Являясь субстратом оксидоредуктаз внешних отделов митохондрий и матрикса и регулируя редокс-состояние среды, они могут влиять на появление вспышек СА и других форм АФК. При исследовании данного вопроса был использован хемлюминесцентный зонд MCLA, который представляется наиболее удобным инструментом для детекции СА. Он высокочувствителен и селективен к СА (в 300 раз более чувствителен, чем люцигенин), хотя также регистрирует синглетный кислород. И MCLA, и его супероксидный аддукт не несут заряда, поэтому мембранный потенциал не влияет на хемлюминесценцию [297]. Его относительно высокая спонтанная люминесценция в суспензии (СОД-чувствительный MDCL) [298] может быть вычтена из общего сигнала. Использование низкой концентрации белка в экспериментах позволяет избежать тушения хемлюминесценции серосодержащими соединениями [299]. Эксперименты были выполнены на изолированных митохондриях печени крыс.

2.1. Активация продукции АФК при пермеабиллизации митохондриальных мембран

Для пермеабиллизации митохондриальных мембран мы использовали пороформирующий белок аламетицин, а также высокие концентрации Ca^{2+} , вызывающие индукцию открывания РТР. Использование аламетицина является удобной моделью исследования пермеабиллизации, не связанной с РТР, например, пермеабиллизации, вызванной действием микробных токсинов, особенно липофильных и положительно заряженных. Ранее было показано, что постоянное воздействие токсинов окружающей среды, включая аламецитин-подобные пептайболы и фузарицидины, наносит ущерб здоровью. Неочищенные экстракты и очищенные токсины частиц пыли, собранной в жилищных и промышленных зданиях, могут вызывать сильные нарушения клеточных и митохондриальных функций [300–302].

На рис. 17 показано, что оба метода индукции пермеабилзации приводили к набуханию митохондрий (Б), которое сопровождалось продукцией СА (А) и пероксида водорода (Г). Кроме того, активность аконитазы, АФК-чувствительного фермента матрикса митохондрий, была снижена в 1.6 (Ca^{2+}) и в 8 раз (аламетицин) (В).

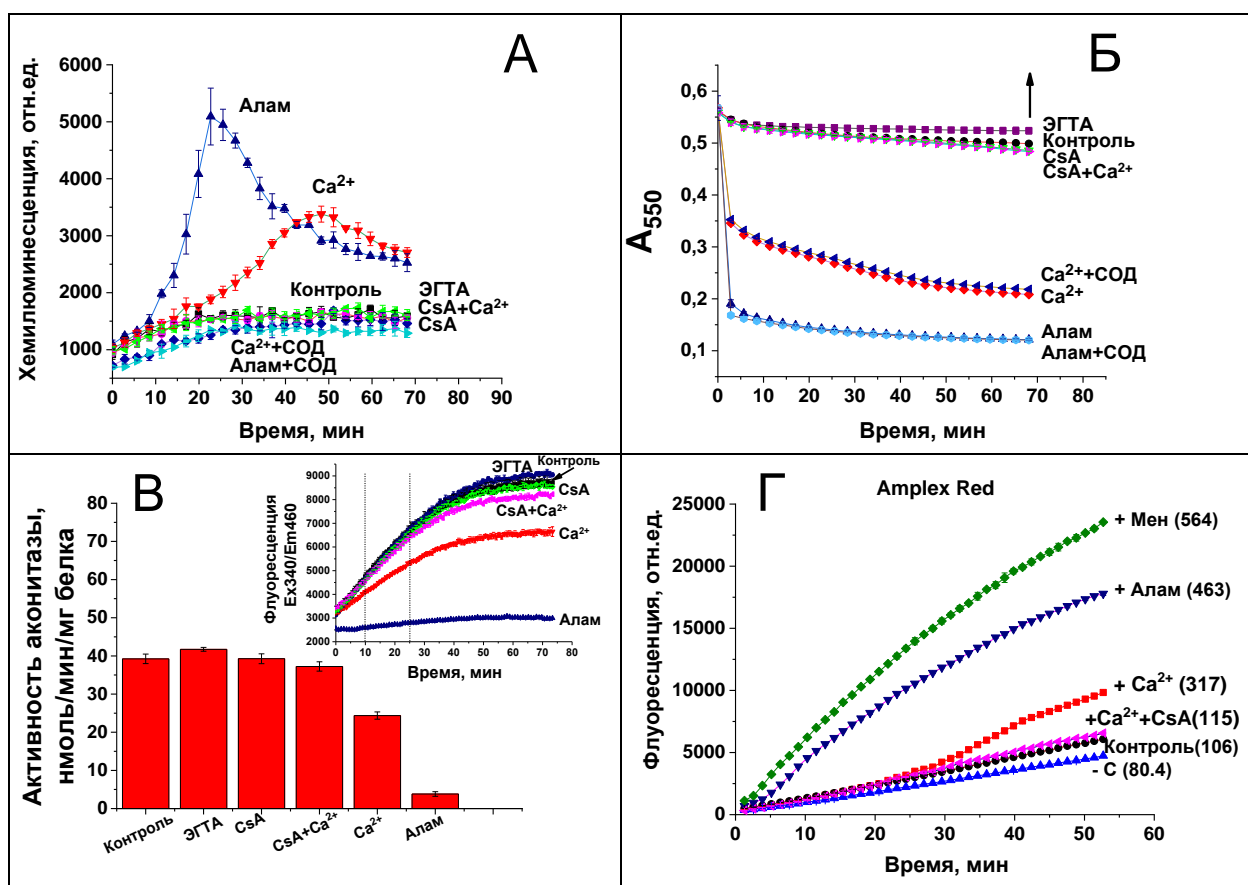


Рис. 17. Пермеабилзация митохондриальных мембран вызывает продукцию АФК и ингибирование аконитазы. А и Б. Одновременная регистрация MDCL и Ca^{2+} - и аламетицин-индуцированного набухания изолированных митохондрий. Митохондрии (0.5 мг/мл) были помещены в среду инкубации, содержащую 5 мМ малат, 5 мМ пируват, 10 мкМ ЭГТА и 20 мкМ MCLA (А). Суспензию помещали в ячейки, содержащие, где указано, 40 мкг/мл аламетицин (Алам), 1 мкМ CsA, 1 мМ ЭГТА, 150 мкМ CaCl_2 , СОД (100 ед./мл), CsA плюс Ca^{2+} и СОД плюс Ca^{2+} . Стрелкой показан отбор образцов (10 мкг белка) без MCLA для измерения активности аконитазы. **В.** Активность аконитазы в интактных и пермеабилзованных митохондриях. На вставке показаны кривые восстановления НАД(Ф). **Г.** Продукция H_2O_2 в пермеабилзованных RLM. Митохондрии (0.5 мг/мл) помещали в KCl-среду, содержащую 10 мкМ ЭГТА, 20 мкМ Amplex Red и 3 ед./мл пероксидазу хрена, затем суспензию распределяли по ячейкам, содержащим 5 мМ пируват, 5 мМ малат и, где указано, 50 мкМ Ca^{2+} , 40 мкг/мл аламетицин и 5 мкМ менадион (Мен). Линия «-C» показывает продукцию АФК в отсутствие субстратов. В скобках указаны максимальные скорости генерации H_2O_2 (пмол·мин⁻¹·мг белка⁻¹). Показаны типичные данные одного из четырех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3).

Предотвращение открывание РТР с помощью CsA или ЭГТА отменяет генерацию АФК и ингибирование аконитазы. Продукция АФК и набухание в митохондриях,

пермеабилizованных с помощью аламетицина, были намного сильнее, чем в обработанных Ca^{2+} органеллах. Причиной этого может являться пермеабилзация IMM во всей популяции митохондрий при добавлении аламетицина. Известно, что митохондриальная популяция является гетерогенной: митохондрии постоянно производятся *de novo*, становятся старыми и утилизируются. Старые и поврежденные митохондрии являются более восприимчивыми к действию Ca^{2+} [204]. Более того, начальная скорость аккумуляции Ca^{2+} митохондриями очень высока [303]. Поэтому те органеллы, которые расположены ближе к месту добавки Ca^{2+} , будут загружать большее количество катиона. Кроме того, известно, что аламетицин вызывает на 20-30% более сильный выход цитохрома *c*, скавенджера АФК, чем Ca^{2+} [304]. Также в процессе открывания РТР происходит окисление ПН матрикса [305] и они не могут поддерживать генерацию АФК.

Большой эффект аламетицина по сравнению с Ca^{2+} позволяет предположить, что в основе усиления генерации АФК лежит процесс пермеабилзации митохондриальных мембран, а не работа Ca^{2+} -активируемых дегидрогеназ матрикса (пируват дегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы). Очевидно также, что продукция СА не вызвана РТР-зависимыми изменениями в структуре дыхательных комплексов. Ранее было показано, что скорость продукции АФК коррелирует с накоплением сукцината во время ишемии [272]. Возникла гипотеза, согласно которой источником АФК является обратный перенос электронов. Другой механизм предполагает выход дикарбоксилатов через поры, что увеличивает доступ кислорода к комплексу II, поврежденному при ишемии/реперфузии или инактивации с помощью селективных ингибиторов [77]. Однако, обратный транспорт электронов требует высокого мембранного потенциала, который отсутствует в пермеабилizованных митохондриях, что ставит под сомнение сукцинат-зависимую продукцию АФК. Основываясь на описанных выше результатах, можно заключить, что пермеабилзация IMM вызывает сильное увеличение генерации АФК независимо от того, чем она индуцирована (аламетицин или кальций).

2.2. Влияние осмотического набухания интактных митохондрий на хемолюминесценцию MCLA

Пермеабилзация мембран RLM, вызванная добавлением аламетицина и Ca^{2+} , приводит к высокоамплитудному набуханию митохондрий, которое снижает абсорбцию в исследуемых образцах. Поэтому необходимо было подтвердить, что увеличение регистрируемого уровня СА не связано с повышением прозрачности суспензии. Для этого были проверены сигналы люминесценции зонда в средах различной тоничности, которые вызывают разную степень набухания RLM. На рис. 18 показано, что снижение тоничности

среды инкубации (600–50 мОсм) вызывало сильное снижение абсорбции при 540 нм, сравнимое с вызванным аламетицином (Б). При этом уровень СОД-чувствительного MDCL изменялся не так сильно (В). Снижение тоничности среды от 400 до 100 мОсм (в пределах данных значений лежит тоничность стандартной среды инкубации – 300 мОсм), приводило к снижению абсорбции от ~ 0.8 до ~ 0.5 без какого-либо заметного влияния на уровень СА (Б-Г). Только при крайних значениях тоничности (50 и 600 мОсм) после продолжительной инкубации наблюдалось усиление генерации СА, очевидно, связанное с повреждением мембран при инкубации в экстремальных условиях.

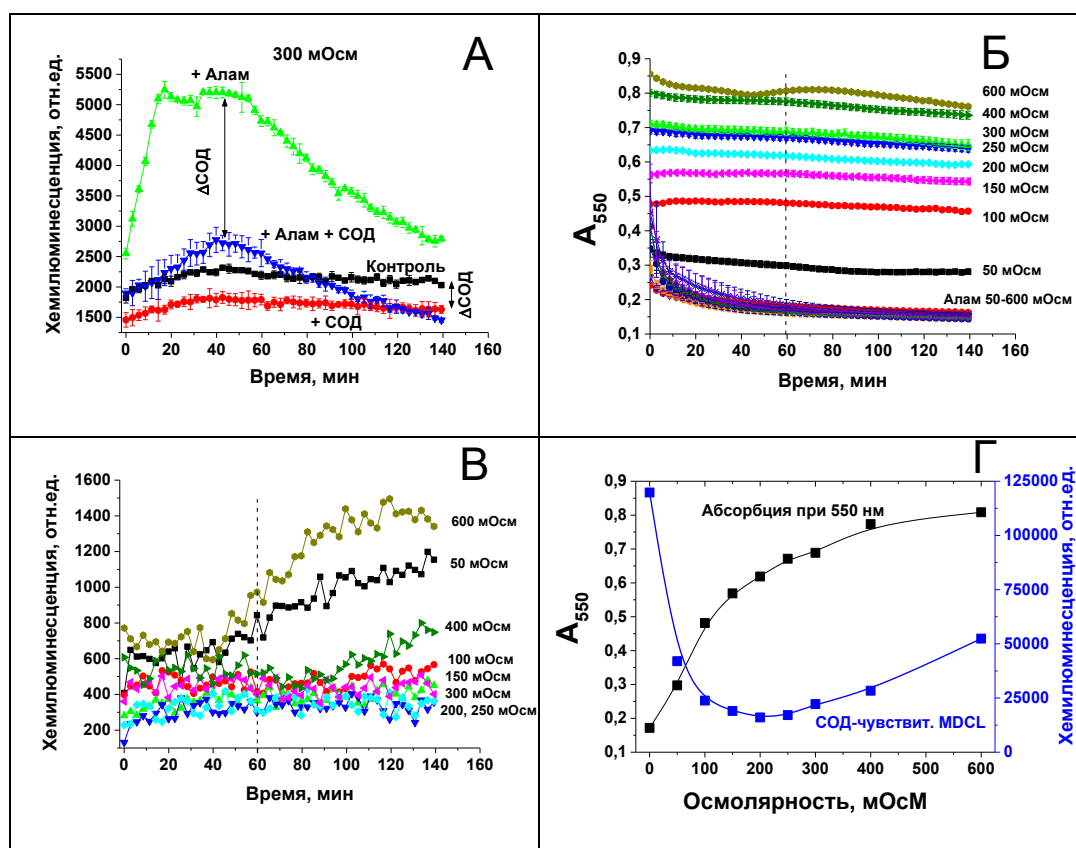


Рис. 18. Влияние осмотического набухания интактных митохондрий на хемолюминесценцию MCLA. Митохондрии (0.5 мг/мл) были помещены в KCl-среды различной тоничности (50–600 мОсм), содержащие 5 мМ малат, 5 мМ пируват, 10 мкМ ЭГТА и 20 мкМ MCLA. Суспензию помещали в ячейки, содержащие, где указано, 40 мкг/мл аламетицин (Алам) и 100 ед./мл СОД и проводили одновременную регистрацию абсорбции и люминесценции. А. Кривые MDCL в стандартной (300 мОсм) среде. Б. Абсорбция при 550 нм в митохондриальных суспензиях с различной тоничностью. В. Хемолюминесценция MCLA в средах различной тоничности. Г. Сопоставление осмотического набухания после 60 мин инкубации (Б) и СОД-чувствительного MDCL (интеграл за 60 мин) (В). Значение MDCL и A_{550} в присутствии Alam приняты за значение при нулевой тоничности. Показаны типичные данные одного из четырех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$) (А и Б) либо средние значения (В и Г).

Полученные данные говорят о том, что в наших условиях степень прозрачности митохондриальной суспензии незначительно влияет на величину MDCL и она отражает реальные изменения уровня СА. Набухание митохондрий не стимулирует продукцию СА при условии сохранения интактности внутренней мембраны.

2.3. Эффект дыхательных субстратов и ингибиторов дыхательной цепи на продукцию СА в пермеабелизованных митохондриях

НАДН и НАДФН являются донорами электронов для митохондриальных АФК-генерирующих ферментов. Пермеабелизация мембран может вызывать выход СА, H_2O_2 [306], эндогенных субстратов дыхания, ПН, GSH, но не антиоксидантных ферментов матрикса (MnСОД, GSH-пероксидаза, GSSG редуктаза), способных утилизировать АФК [19, 276]. Кроме того, разобщение окислительного фосфорилирования должно приводить к ускорению окисления субстратов. В то же время, в интактных митохондриях НАД(Ф)Н может взаимодействовать только с дегидрогеназами матрикса (дыхательный комплекс I, аденодоксин редуктаза (AR), дигидролипоилдегидрогеназа), а в результате пермеабелизации IMM появляется доступ к дегидрогеназам во внешних компартментах (AIF1, цитохром-b5-редуктаза 3, NOX4). Все эти условия могут способствовать кратковременной вспышке СА. Поэтому мы предположили, что добавление дыхательных субстратов, а также НАДН, НАДФН и ингибиторов их окисления будет поддерживать продукцию СА в пермеабелизованных митохондриях. На рисунке 19 показано, что Ca^{2+} (А) и аламетицин (Б) вызывали быструю активацию генерации СА в отсутствие добавленных субстратов (-С). Субстраты НАД- и НАДФ- зависимых дегидрогеназ (β -гидроксипутират, малат, глутамат, пируват) и их комбинации в высоких концентрациях (5 мМ) тормозили окисление эндогенного НАД(Ф)Н (вставка на панели А), а также задерживали и/или снижали максимальную продукцию СА (А и Б). Ингибиторы дыхательной цепи (ротенон, миксотиазол, цианид) также сильно замедляли появление пика продукции СА (В).

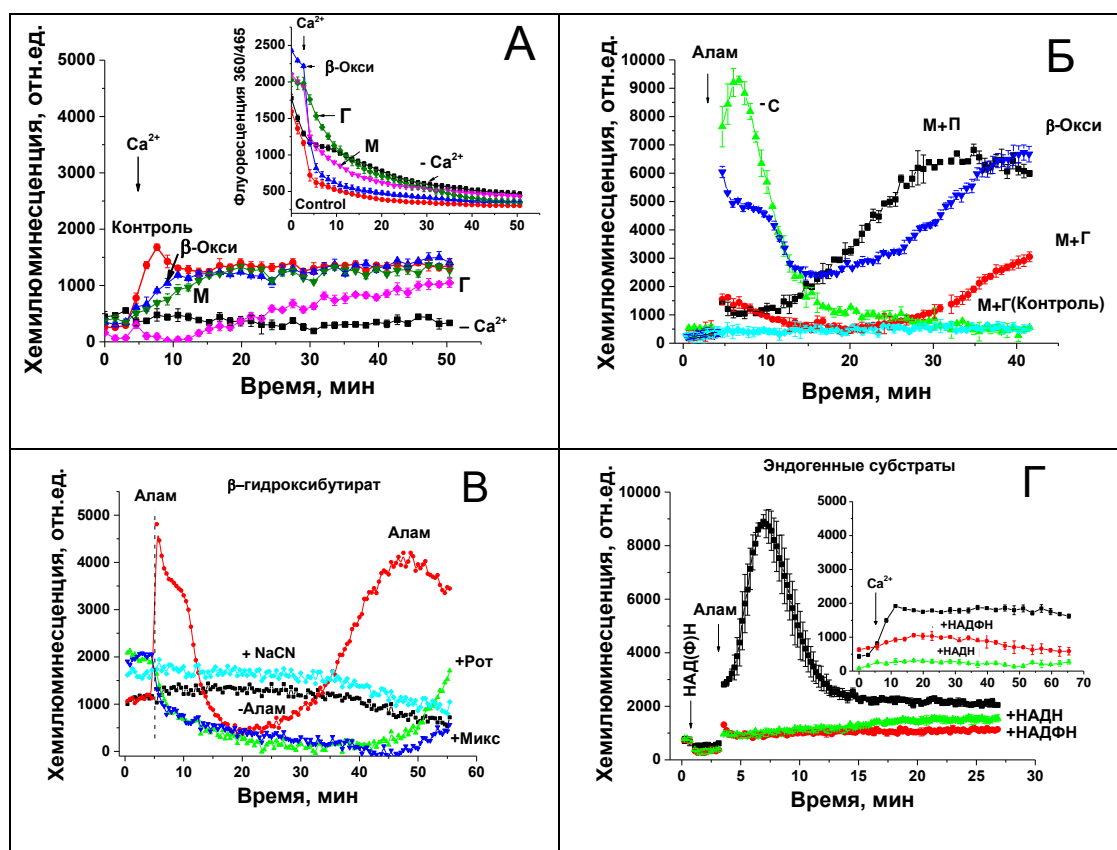


Рис. 19. Эффект дыхательных субстратов, ингибиторов дыхательной цепи, НАДН, НАДФН на генерацию СА в пермеабилзованных митохондриях. Митохондрии (0.6 мг/мл) были помещены в стандартную среду инкубации, содержащую 10 мкМ ЭГТА, 20 мкМ МСЛА и, где указано, дыхательные субстраты (А и В), 5 мМ малат (М), 5 мМ пируват (П), 5 мМ глутамат (Г), 5 мМ гидроксibuтрат (β -Окси); ингибиторы дыхательной цепи (В), 2 мкг/мл ротенон (Рот), 2 мМ миксотиазол (Микс) и 1 мМ NaCN. Линия, обозначенная «-С» показывает продукцию СА в отсутствии дыхательных субстратов. Контрольные ячейки содержали СОД (200 ед./мл). Стрелки показывают добавку 200 мкМ Ca^{2+} (А), 30 мкг/мл аламетицина (Алам) (Б–Г), 2 мМ НАДН и 2 мМ НАДФН (Г). Представлена СОД-чувствительная часть сигнала MDCL. Вставка на панели А показывает эффект малата, глутамата и гидроксibuтратата на редокс состояние эндогенных НАД(Ф)Н в пермеабилзованных Ca^{2+} митохондриях, измеренное в параллельных экспериментах. Вставка на панели Г показывает эффект 1 мМ НАДН и НАДФН на генерацию СА в митохондриях, пермеабилзованных с помощью Ca^{2+} . Показаны типичные данные одного из четырех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$).

И НАДН, и НАДФН в высоких концентрациях относительно слабо стимулировали продукцию СА, но полностью подавляли появление его вспышки (Г). По-видимому, условия, способствующие поддержанию митохондриальных НАД(Ф)Н-связывающих редокс-центров в восстановленном состоянии, предотвращают вспышки СА. Поэтому далее было исследовано влияние редокс-состояния НАД(Ф)Н на генерацию СА.

2.4. Генерация вспышек СА в пермеабелизованных митохондриях в присутствии НАДФН

Для более подробного исследования эффекта НАДФН было оценено влияние различных концентраций данного нуклеотида на генерацию СА. Для того, чтобы пермеабелизовать всю популяцию RLM, к суспензии митохондрий добавляли аламетицин. Рис. 20 показывает, что добавление 18 мкМ НАДФН к предварительно пермеабелизованным митохондриям вызывало незамедлительную сильную активацию продукции СА (вспышку) (А).

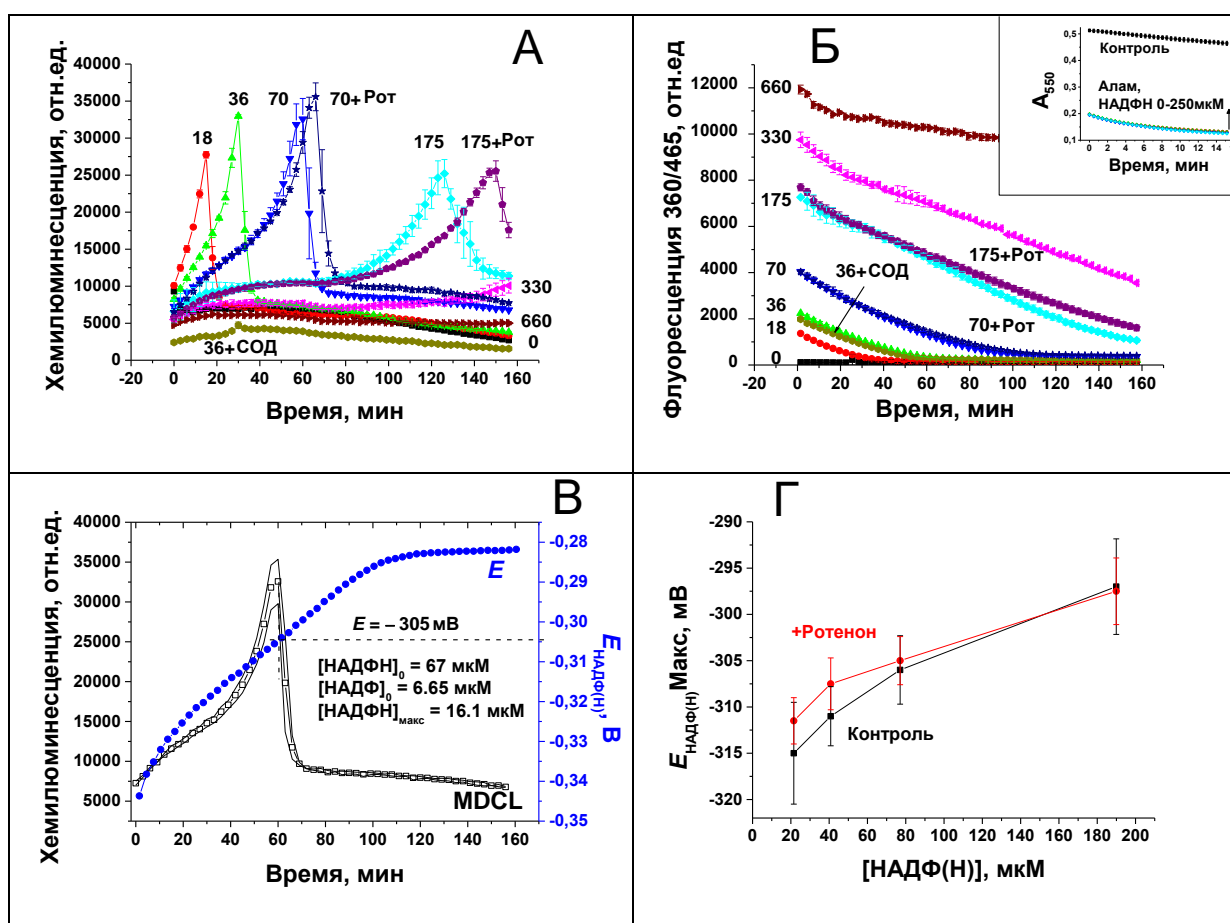


Рис. 20. Снижение степени восстановленности НАДФН вызывает активацию продукции СА в пермеабелизованных митохондриях. Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировались в стандартной среде без дыхательных субстратов в присутствии аламетицина (40 мкг/мг белка, Алам) в течение 15 мин (вставка на панели Б). Где указано, среда также содержала ротенон (2 мкг/мл) и СОД (200 ед./мл). Затем суспензию переносили в ячейки, содержащие НАДФН в различных концентрациях и 20 мкМ МСЛА (А) или только НАДФН (Б) и проводили одновременную регистрацию люминесценции и флуоресценции. **В.** Динамика продукции СА и редокс-потенциала НАДФН. **Г.** Эффект концентрации НАДФН+НАДФ на $E_{(НАДФН/НАДФН^+) \text{Max}}$. На панели А–В показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3). Данные на панели Г представлены как среднее \pm стандартная ошибка для трех независимых экспериментов (n=9).

Увеличение концентрации НАДФН постепенно отодвигало начало генерации СА и при 660 мкМ НАДФН полностью предотвращало появление вспышки на всем протяжении эксперимента. Регистрация флуоресценции ПН показала, что пик генерации СА появлялся только тогда, когда основной пул НАДФН был окислен (Б). Ротенон оказывал слабый эффект на скорость окисления НАДФН и, как следствие, на время активации продукции СА. При решении уравнения Нернста были получены динамики редокс-потенциалов НАДФ/НАДФН ($E_{\text{НАДФ(Н)}}$) для каждой исследованной концентрации нуклеотидов (В, кривая E отображает изменение редокс-потенциала после добавления в раствор 67 мкМ НАДФН). Сопоставление динамик MDCL и $E_{\text{НАДФ(Н)}}$ (В) позволяет определить величину $E_{\text{НАДФ(Н)}}$, при которой происходила максимальная продукция СА ($E_{\text{НАДФ(Н)Max}}$). Увеличение общей концентрации НАДФ(Н) в суспензии сдвигает $E_{\text{НАДФ(Н)Max}}$ к более положительным значениям (от -315 до -295 мВ) (Г). Эти данные показывают, что снижение отношения НАДФН/НАДФ ниже определенного уровня увеличивает возможность электронной утечки из редокс центров на кислород. Возможно, НАДФН-зависимые вспышки СА опосредованы системой адрендоксин редуктаза (AR)-адрендоксин (ADx) [307, 308], стабильного комплекса в матриксе ($K_d \leq 1$ нМ) [309]. Стандартные редокс-потенциалы для флавинов AR и железо-серных кластеров ADx равны -295 и -331 мВ, соответственно [309, 310]. Восстановление AR с помощью НАДФН ($K_m = 1.82$ мкМ) приводит к формированию комплекса переноса заряда ($\text{ARH}_2\text{-НАДФ}^+$) ($K_d \sim 10$ нМ), который может быть окислен кислородом с формированием СА и семихинона флавина. Редокс-потенциал ADx более низкий, чем AR и комплекса AR-НАДФ^+ (-198 мВ), что снижает вероятность восстановления ADx при эквимольном восстановлении комплекса AR-ADx НАДФН. Важно то, что НАДФН может связываться с восстановленным AR (K_d не определена) и снижать время жизни заряженного комплекса, таким образом увеличивая восстановление ADx [310, 311]. Восстановленный ADx слабо окисляется кислородом [311]. НАДФ^+ может связываться с окисленной и восстановленной одним электроном формой AR ($K_d = 14$ и 24 мкМ, соответственно) и конкурентно ингибировать активность комплекса AR-ADx ($K_i \sim 25$ мкМ) [310, 311]. Следовательно, появление вспышки СА при снижении отношения НАДФН/НАДФ⁺ можно объяснить конкуренцией НАДФН и НАДФ⁺ за сайт связывания на заряженном комплексе AR-НАДФ^+ (рис. 20). Более того, различия между величинами K_d для НАДФН и НАДФ⁺ объясняют снижение $E_{\text{НАДФ(Н)Max}}$, вызванное ростом концентрации НАДФ(Н).

2.5. Продукция СА в пермеабелизованных митохондриях в присутствии НАДН

Далее мы исследовали влияние различных концентраций НАДН и изменения его редокс-потенциала на генерацию вспышек СА. На рис. 21 показано, что активация продукции СА в пермеабелизованных митохондриях в присутствии НАДН происходит только после окисления его основного пула, так же, как и в случае НАДФН (рис. 21, А и Б).

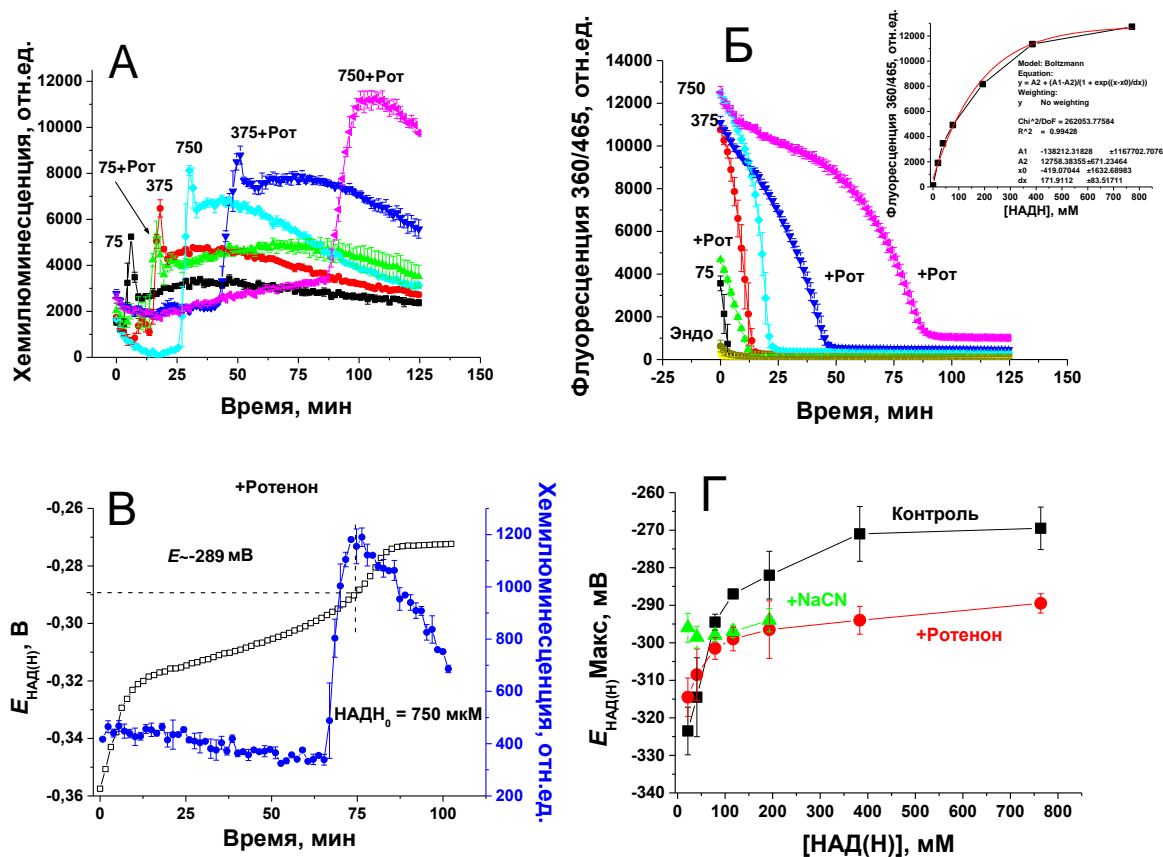


Рис. 21. Влияние степени восстановленности НАДН на продукцию СА в пермеабелизованных митохондриях. Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировались в стандартной среде без дыхательных субстратов в присутствии аламетицина (40 мкг/мг белка, Алам) в течении 15 мин. Где указано, среда также содержала 2 мкг/мл ротенон (Рот). Затем суспензию переносили в ячейки, содержащие НАДН в различных концентрациях и 20 мкМ МСЛА (А) или только НАДН (Б) и проводили одновременную запись люминесценции и флуоресценции. Вставка на панели Б показывает вывод уравнения для определения концентрации НАДН из данных флуоресценции по методу Больцмана (Origin 7.0 software). **В. Динамика продукции СА и редокс-потенциала НАДН.** **Г. Эффект концентрации НАДН+НАД на $E_{(НАД/НАДН)}\text{Макс}$.** На панелях А–В показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3). Данные на панели Г представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего для двух (+1.5 мМ NaCN) и трех (Контроль, +Ротенон) независимых экспериментов (n=6 и 9, соответственно).

Ротенон (Б) сильно ингибировал окисление НАДН и отодвигал начало активации генерации СА (А и В). Величина редокс-потенциала НАДН, при которой наблюдался пик продукции СА, была намного выше, чем в случае НАДФН (рис. 20) и также увеличивалась с увеличением концентрации НАД(Н) (от -325 до 270 мВ) (Г). При концентрации НАД(Н) выше 50 мкМ ротенон и NaCN сдвигали $E_{\text{НАДФ(Н)Мах}}$ к более отрицательным значениям.

Для проверки возможности влияния ПН на хемилюминесценцию MCLA было оценено их влияние на СОД-чувствительный MDCL в присутствии химического донора СА пероксида калия. На рис. 22 показано, что НАДН и НАДФН не влияют на реакцию СА с MCLA и не тушат сигнал MDCL. Следовательно, возможной причиной предотвращения вспышки СА НАДН и НАДФН в высоких концентрациях (низкий редокс-потенциал) является их взаимодействия с редокс центрами ферментов, но не с молекулой MCLA. Также было продемонстрировано, что десятикратное усиление продукции пероксида водорода происходило только после частичного окисления НАДН в суспензии пермеабелизованных митохондрий (рис. 23).

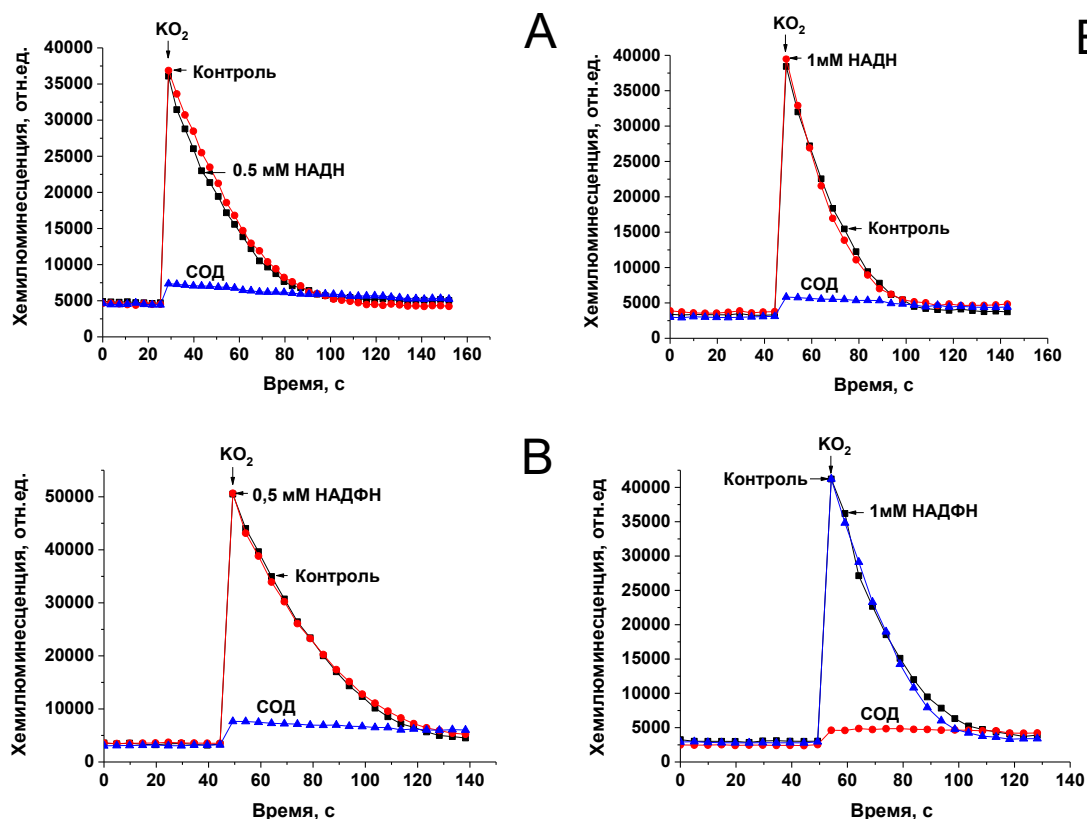


Рис. 22. Эффект пиридиновых нуклеотидов на уровень KO_2 -индуцированной продукции СА в инкубационной среде. Условия эксперимента описаны в Материалах и методах. Где указано, среда содержала СОД (100 ед./мл), НАДН и НАДФН. Стрелками показана добавка 500 мкМ KO_2 . Показаны типичные данные одного из 10-20 аналогичных экспериментов.

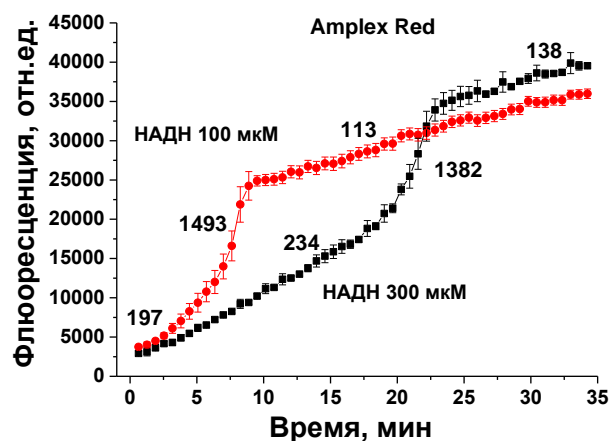


Рис. 23. Кинетика НАДН-зависимой продукции пероксида водорода в перемабилезованных митохондриях. Числа над кривыми обозначают скорости продукции пероксида водорода, выраженные в $\text{пмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$. Митохондрии (0.5 мг белка/мл) инкубировались в стандартной среде без дыхательных субстратов в присутствии аламетицина (40 мкг/мг белка) в течении 15 мин. Затем в суспензию добавили 20 мкМ Ampliflu™ Red и пероксидазу хрена (3 ед./мл) и перенесли ее в ячейки, содержащие НАДН в указанных концентрациях. Показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$).

Природа систем, ответственных за НАДН-зависимые вспышки СА ясна еще меньше, чем природа НАДФН-зависимых систем генерации СА. Главными генераторами СА и H_2O_2 в митохондриях считаются комплекс I дыхательной цепи и DLD [258, 312–314]. Можно предположить, что НАДН-опосредованные вспышки являются результатом работы этих ферментов. В нашем исследовании ротенон значительно влиял на $E_{\text{НАД(Н)Max}}$, но оказывал минимальный эффект на $E_{\text{НАДФ(Н)Max}}$ при различных концентрациях НАД(Ф)Н (рис. 20 и 21). Однако, ранее было показано, что максимальные скорости продукции АФК наблюдаются при значительно более отрицательных потенциалах (от -400 до -380 мВ) [258, 315, 316], чем вспышки СА, генерируемые в наших условиях (от -325 до -270 мВ в зависимости от концентрации НАД(Н)) (рис. 20). В случае DLD максимальная скорость продукции H_2O_2 характерна для условий с минимальным отношением $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ [317]. Данные различия могут быть объяснены сдвигом $E_{\text{НАД(Н)Max}}$ к более положительным величинам из-за различной аффинности окисленных и восстановленных ферментов к окисленным и восстановленным формам нуклеотидов [318]. Также продукция СА может быть опосредована редокс центрами с намного более положительными потенциалами, чем ФМН [313]. Существование двух центров продукции СА на комплексе I постулировалось ранее [319]. Однако, вопрос осложняется тем фактом, что НАДН может восстанавливать AR ($K_m = 5.56 \text{ мМ}$) [310], который, в свою очередь, может формировать комплекс переноса заряда с эндогенным НАДФ^+ [309]. Кроме того, связывание НАД^+ с AR чрезвычайно слабое

[309]. Все вместе, это может объяснить низкие величины $E_{\text{НАД(Н)Мах}}$, полученные в наших экспериментах. Тем не менее вопрос касательно систем, ответственных за НАД(Ф)Н-зависимые вспышки СА в пермеабелизованных митохондриях, остается открытым.

2.6. Сравнение НАДН- и НАДФН-зависимой стимуляции продукции СА в интактных и пермеабелизованных митохондриях.

Так как внешняя поверхность IMM и OMM содержит НАД(Ф)Н-связывающие ферменты (AIF1, цитохром-b5-редуктаза 3, NOX4), способные к генерации АФК, мы сравнили эффекты НАДН и НАДФН на продукцию СА в пермеабелизованных и интактных митохондриях. На рис. 24 показано, что в интактных RLM НАДФН в различных концентрациях (50-500 мкМ) вызывал продукцию СА, примерно в 15 раз меньшую (Б), чем в органеллах, пермеабелизованных добавлением Ca^{2+} (Г).

Более того, в интактных митохондриях НАДФН-зависимая генерация СА происходила без задержки, зависящей от концентрации. НАДН в интактных митохондриях не вызывал продукции СА во всех тестируемых концентрациях (А). В пермеабелизованных митохондриях НАДН-зависимая генерация СА была в несколько раз слабее, чем в НАДФН-зависимая (Г и В). Похожие результаты были получены для митохондрий, пермеабелизованных с помощью аламетицина (Д, Е).

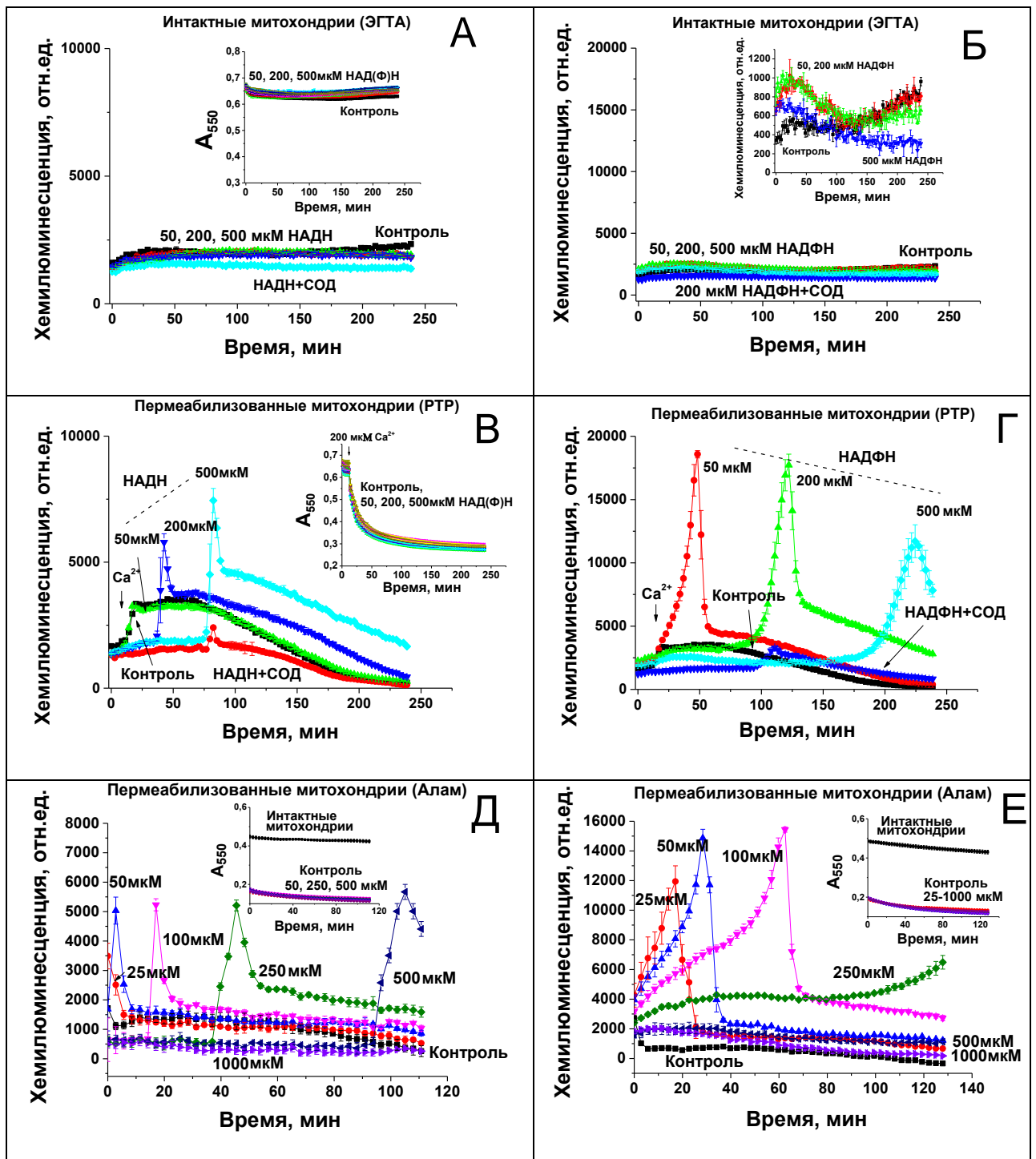


Рис. 24. Сравнение эффектов НАДН и НАДФН на продукцию СА в интактных и пермеабелизованных митохондриях. Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировались в стандартной КСI-среде без дыхательных субстратов в присутствии 10 мкМ ЭГТА (В, Г), 500 мкМ ЭГТА (А, Б, Д, Е), Алам (25 мкг/мл) (Д, Е), 20 мкМ МСLА, НАДН (А, В, Д), НАДФН (Б, Г, Е) в указанных концентрациях. Стрелками показана добавка 200 мкМ Ca²⁺ (В и Г). Вставки на панелях А, В, Д, Е показывают данные параллельной записи митохондриального набухания. Вставка на панели Б показывает те же данные, только в более крупном масштабе. Показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3).

Таким образом, главными генераторами как НАДН-, так и НАДФН-зависимых вспышек СА являются внутренние редокс системы митохондрий. В свою очередь, НАДФН-зависимые системы являются главным источником СА в пермеабелизованных митохондриях.

2.7. Эффект дыхательных субстратов на способность НАД(Ф)Н поддерживать вспышки СА в пермеабелизованных митохондриях

Увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} во время ишемии или при интенсивных нагрузках может сопровождаться снижением концентрации дыхательных субстратов ниже нормального физиологического уровня 100–300 мкМ. Поэтому мы проверили, могут ли дыхательные субстраты в физиологических и субфизиологических концентрациях предотвращать окисление экзогенного НАД(Ф)Н митохондриальными дегидрогеназами и вспышки СА в пермеабелизованных митохондриях. На рис. 25 показано, что в митохондриях, пермеабелизованных Ca^{2+} , малат плюс пируват в низких (75 плюс 25 мкМ, кривая Н), физиологических (300 плюс 100 мкМ, кривая Ф) и высоких концентрациях (1 мМ плюс 500 мкМ, кривая В) значительно отодвигали окисление эндогенного НАД(Ф)Н, но только слегка подавляли начальную продукцию СА (А).

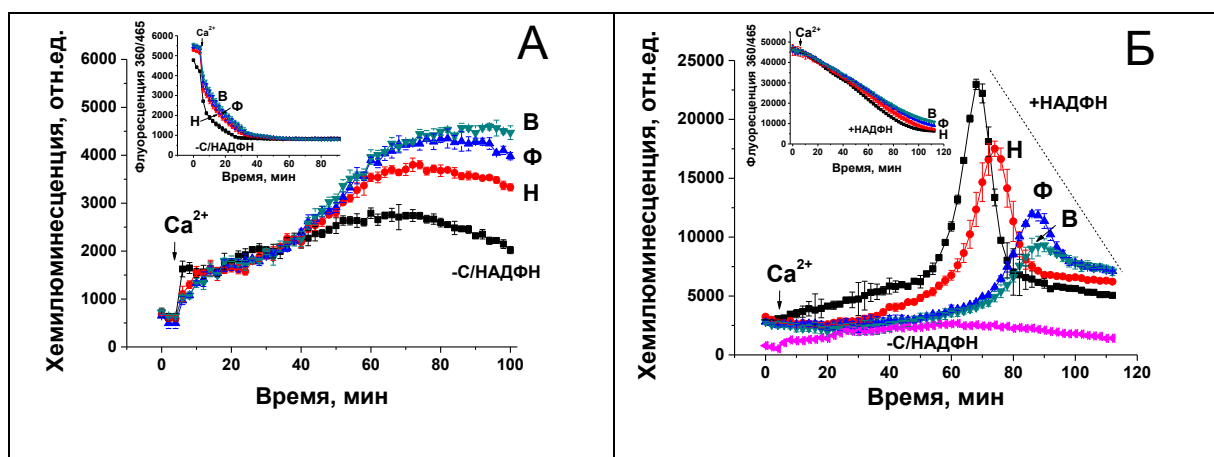


Рис. 25. Эффект дыхательных субстратов в концентрациях, близких к физиологическим, на вспышки СА и окисление эндогенных и добавленных НАД(Ф)Н в митохондриях, пермеабелизованных Ca^{2+} . Митохондрии помещали в стандартную среду инкубации, содержащую 10 мкМ ЭГТА (-С/НАДФН), 20 мкМ МСЛА и, где указано, 75 мкМ НАДФН (Б) и малат плюс пируват в низких (Н, 75+25 мкМ), “физиологических” (Ф, 300+100 мкМ) и высоких (В, 1+0.5 мМ) концентрациях. Инкубационная среда для измерения НАД(Ф)Н (вставки) не содержала МСЛА. Стрелками показана добавка 200 мкМ Ca^{2+} . Показаны типичные данные одного из четырех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего (n=3).

Дозозависимые эффекты субстратов на уровень СА были более выраженными после длительной инкубации. В тоже время, субстраты ингибировали окисление экзогенного НАДФН, отодвигали начало появления вспышек СА и снижали их интенсивность в концентрационно-зависимой манере: увеличение концентрации снижало уровень СА (Б).

Таким образом, доступность цитозольного НАДФН и низкая концентрация НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов способствуют появлению вспышек СА в пермеабелизированных митохондриях.

2.8. Продукция СА при пермеабелизации митохондрий фузарицидином

Применение пороформирующего белка аламетицина и кальция, вызывающего открывание РТР, при исследовании генерации вспышек СА показало, что они происходят независимо от способа индукции пермеабелизации митохондриальных мембран. Для того, чтобы понять, присущ ли данный эффект и другим пороформирующим соединениям, была оценена способность антибиотика фузарицина вызывать пермеабелизацию внутренней мембраны митохондрий и образование СА.

Антибиотик фузарицидин, продуцируемый бактериями *Paenibacillus polymyxa*, представляет собой липодепептид с кольцом из шести аминокислотных остатков, несущий 15-гуанидино-3-гидроксипентадекановый кислотный «хвост». Было показано, что внутрибрюшинное введение фузарицидинов приводит к высокой смертности среди мышей [320], загрязнение антибиотиком подстилок для скота вызывает гибель поросят, а неочищенный экстракт из подстилочной пыли чрезвычайно токсичен для свиных сперматозоидов. Также существуют доказательства вредного воздействия фузарицидинов на здоровье человека. Было обнаружено, что в основе токсичности фузарицидинов лежат повреждения митохондриальных и плазматических мембран, а также активация апоптоза [300]. В бислойных липидных мембранах антибиотик формирует каналы, проницаемые для калия [321].

В настоящей работе мы исследовали способность фузарицидина, содержащегося в спиртовом экстракте бактериального штамма RS10, вызывать пермеабелизацию внутренней мембраны митохондрий для ионов и низкомолекулярных соединений путем создания неселективных пор. Также мы проверили возможность индукции антибиотиком генерации вспышек СА, и сравнили его эффекты с действием аламетицина и Ca^{2+} (рис. 26).

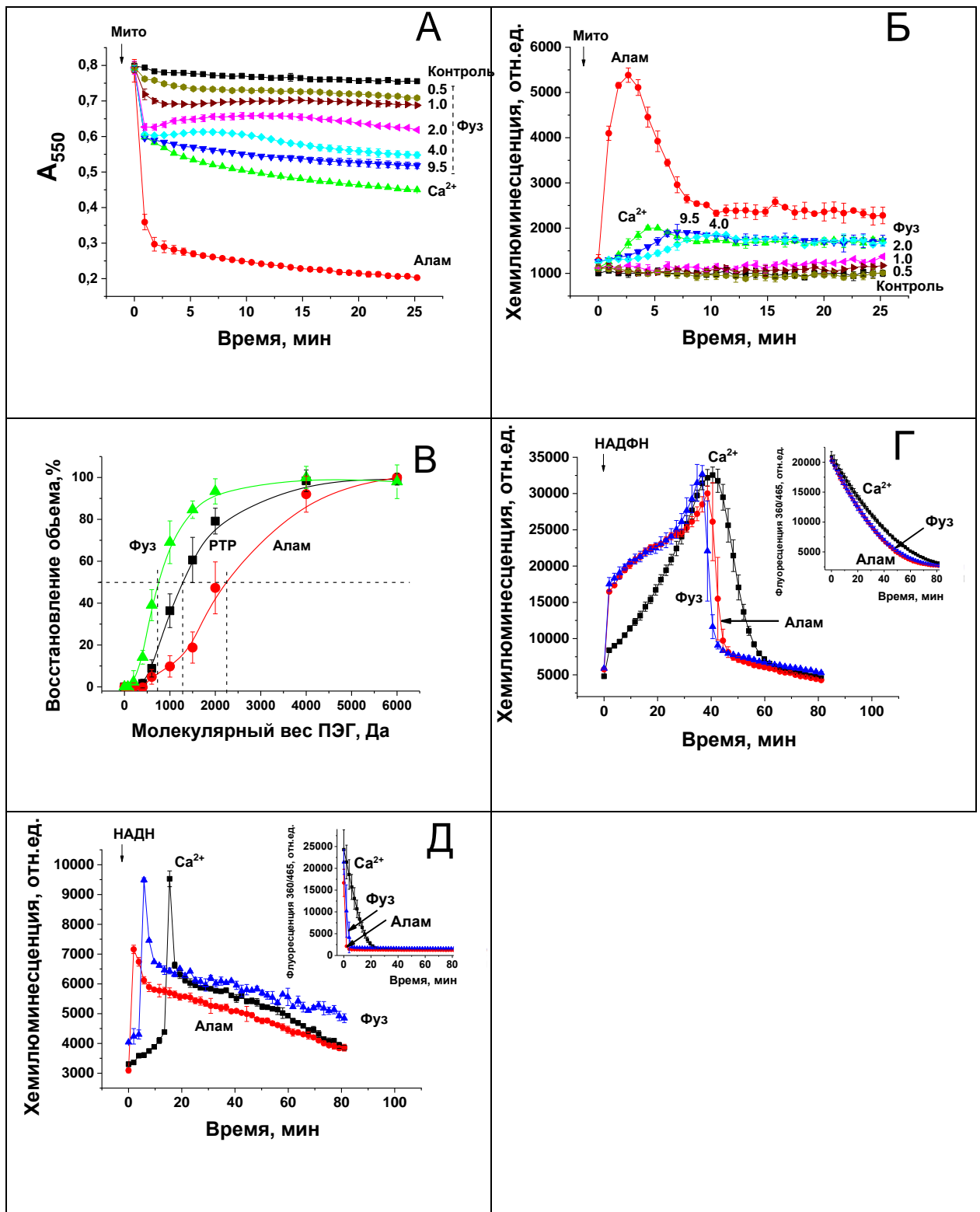


Рис. 26. Влияние пороформирующих пептидов (аламетицина и фузарицидина) и Ca^{2+} на набухание митохондрий (А), продукцию СА в отсутствие (Б) и присутствии добавленных ПН (Г и Д), а также их окисление (вставки в Г и Д). Определение размера пор, формируемых фузарицидином, во внутренней мембране митохондрий (В). А и Б. Митохондрии (0.5 мг/мл) были добавлены в стандартную среду инкубации, содержащую 20 мкМ МСLА (Б). Стрелками показаны добавки суспензии митохондрий в ячейки, содержащие, где указано, аламетицин (Алам, 20 мкг/мл), 100 мкМ Ca^{2+} и фузарицидин (Фуз) в указанных концентрациях (мкг/мл). Данные на панелях А и Б регистрировались

одновременно. **В.** Восстановление митохондриального объема после добавок полиэтиленгликоля (ПЭГ) разного молекулярного веса к митохондриям, набухшим в результате добавления аламетицина (12.5 мкг/мл), фузарицидина (10.5 мкг/мл), либо Ca^{2+} (250 нмоль /мг белка). Представленные данные есть среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$) для трех независимых измерений. **Г и Д.** К суспензии митохондрий, содержащей, где указано, фузарицидин (9.5 мкг/мл) и Ca^{2+} (250 нмоль/мг белка), добавляли 100 мкМ НАДФН (Г) и 200 мкМ НАДН (Д) и одновременно регистрировали люминесценцию и флуоресценцию (вставки). Показаны типичные кривые одного эксперимента из трех идентичных.

Было обнаружено, что фузарицидин вызывает набухание митохондрий, амплитуда которого увеличивается при росте концентрации пептида (А). Кроме того, фузарицидин стимулировал генерацию СА митохондриями, уровень которой при максимальных используемых концентрациях (9.5 мкг/мл) был таким же, как и при индукции РТР (Б). Аламетицин вызывал более сильное набухание митохондрий (А) и более высокий уровень СА (Б) по-сравнению с Ca^{2+} и фузарицидином.

С использованием ПЭГ разного молекулярного веса, было обнаружено, что антибиотик формирует в IMM поры со средним размером ~ 750 Да. Эти поры меньше, чем поры, индуцированные Ca^{2+} (РТР, ~ 1350 Да) и аламетицином (~ 2250 Да).

Аналогично пермеабиллизации, вызванной добавлением аламетицина и Ca^{2+} , фузарицидин-индуцированная пермеабиллизация приводила к генерации вспышки СА после окисления основного пула добавленных НАДФН (Г) и НАДН (Д).

Полученные данные указывают на то, что фузарицидины могут быть полезным инструментом для исследования регуляции и свойств РТР в различных модельных системах. В таких исследованиях широко применяется аламетицин в качестве отрицательного контроля РТР. Однако, аламетицин-индуцированные изменения функций и морфологии митохондрий не идентичны вызванным открыванием РТР. Добавка аламетицина приводит к формированию пор намного большего размера, чем РТР, более высокой продукции СА и большей амплитуде набухания (рис. 26). В тоже время, фузарицидин формирует поры, не на много меньшие по размеру, чем РТР, и вызывает аналогичное по амплитуде набухание митохондрий и уровень генерируемого СА.

Таким образом, при физиологических концентрациях цитозольных НАД(Ф) и НАД(Ф)Н вспышка СА в пермеабиллизованных митохондриях может происходить, только если редокс-потенциал НАД(Ф)Н значительно сдвигается к положительным значениям (происходит окисление НАД(Ф)Н). Редокс-система, ответственная за генерацию СА, локализуется во внутренних отделах митохондрий и, возможно, ею является AR-ADx.

Полученные результаты могут объяснить механизм формирования вспышек СА, которые сопровождают пермеабиллизацию IMM митохондриях при патологических состояниях. Ишемия, индуцированная гипометаболизмом активация нейрональных клеток, окислительный стресс, воздействие токсинов окружающей среды могут приводить к увеличению концентрации цитозольного Ca^{2+} , снижению концентрации дыхательных субстратов и НАДФН ниже физиологических величин. Эти изменения могут увеличивать вероятность пермеабиллизации IMM путем открывания РТР или формирования поры токсинами и создания оптимальных условий для вспышек СА (рис. 27).

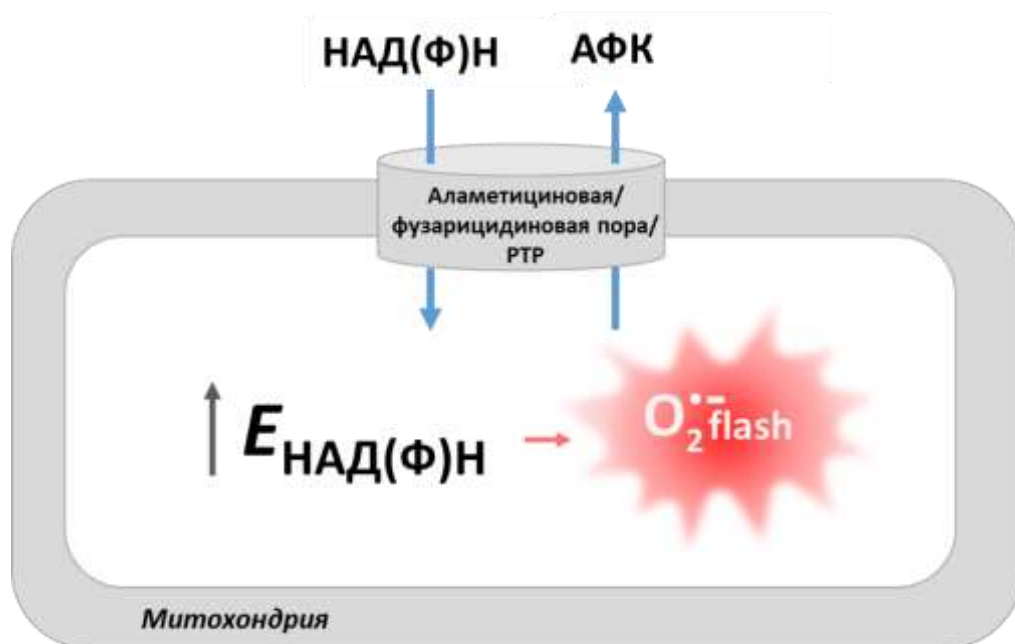


Рис. 27. Предполагаемый механизм генерации вспышек СА при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было проанализирован эффект, который оказывают действующие со стороны цитозоля ПН на индукцию неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры митохондрий, а также влияние НАД(Ф)Н на генерацию всплеск СА при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

Впервые было показано, что НАДН и, в меньшей степени, НАД (но не НАДФ(Н)) подавляет открывание РТР, проявляя максимальную защиту в миллимолярных концентрациях. По силе эффект ПН вполне сравним с эффектом АН. Невозможность проникновения ПН в матрикс митохондрий предполагает существование ПН-зависимого сайта регуляции РТР во внешних отделах митохондрий. Данный регулятор взаимодействует с НАД(Н) аллостерически, поскольку подавление РТР не требует окисления и восстановления нуклеотидов. Mg^{2+} дозозависимо увеличивал эффект НАД(Н).

Была проанализирована роль VDAC в НАД(Н)-зависимом ингибировании поры. В эмбриональных (MEF, HEK293T) и раковых клетках (HEp-2, THP1), в отличие от терминально дифференцированных гепатоцитов и кардиомиоцитов, подавление открывания поры с помощью НАДН было минимальным, либо отсутствовало, хотя все типы клеток экспрессировали полный набор изоформ VDAC. Диссоциация НК и тубулина - предполагаемых конкурентов НАДН за сайт связывания на VDAC, не способствовала появлению защитного эффекта нуклеотида. Таким образом, VDAC не является НАДН-зависимым регулятором РТР.

Было показано, что механизм ингибирования РТР НАД(Н) не связан с предотвращением выхода АТФ из митохондрий с помощью транспортеров АН, и, следовательно, с увеличением Ca^{2+} -буферной емкости матрикса. НАД(Н) не снижают Ca^{2+} -зависимый выход АТФ через SCaMC. Более того, они усиливают выход нуклеотида через АНТ. Полное ингибирование АНТ с помощью БК и КАТР почти полностью предотвращает защитное действие НАД и модулирует эффект НАДН без его отмены. Таким образом, АНТ является модулятором ингибирующего действия НАД(Н).

Было показано, что пермеабиллизация митохондриальных мембран вызывает генерацию всплеск СА, независимо от способа пермеабиллизации (открывание РТР, формирование аламетициновой или фузарицидиновой поры). Данный процесс регулируется внешними ПН и связан с работой внутренних (матриксных) НАД(Ф)Н-

оксидорезуктаз. Окисление НАДФН и НАДН до определенных, довольно низких значений редокс-потенциала (от -315 до -297 мВ и от -325 до -270 мВ, соответственно) сопровождается генерацией СА. Внешний НАДФН стимулирует большие по величине вспышки СА, чем НАДН. Таким образом, впервые были описаны условия, способствующие генерации вспышек СА в митохондриях с участием экзогенных НАД(Ф)Н: 1) наличие независимой от механизма возникновения пермеабилзации IMM, 2) доступность цитозольных НАД(Ф)Н, 3) снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов. Также мы показали, что поры, формируемые фузарицидином, по размеру и функциям более схожи с РТР, чем аламетициновые и, таким образом, являются более подходящей моделью для исследования РТР (в качестве отрицательного контроля).

Таким образом, данная работа демонстрирует новые механизмы участия пиридиновых нуклеотидов цитозоля в регуляции жизнеспособности клеток в физиологических и патологических состояниях. С одной стороны, НАД(Н), ингибируя неспецифическую Ca^{2+} -зависимую пору, могут участвовать в цитопротекции наряду с АН. Поэтому одной из причин потери клеточной жизнеспособности при активации поли(АДФ-рибоза)-полимеразы может быть открывание РТР, вызванное снижением уровня НАД(Н) в цитозоле. С другой стороны, НАД(Ф)Н могут поддерживать генерацию СА при многих патологических состояниях (ишемия, окислительный стресс, воздействие токсинов), когда возникают благоприятные для этого условия: увеличение цитозольного Ca^{2+} , индуцирующего РТР, падение уровня дыхательных субстратов и НАД(Ф)Н матрикса ниже физиологических величин. Дальнейшее исследование механизмов и сайтов действия ПН при индукции РТР представляется необходимым, поскольку их точное определение позволит разработать способы регуляции для предупреждения развития многих патологических состояний организма.

Таким образом, результаты исследования, описанные в данной работе, позволяют сделать следующие выводы:

1. НАДН и, в меньшей степени, НАД в микромолярных и миллимолярных концентрациях подавляют открывание РТР в терминально дифференцированных клетках, аллостерически действуя на регуляторный сайт, расположенный во внешних отделах митохондрий. По силе своего действия эффект сравним с влиянием адениновых нуклеотидов. Магний дозозависимо увеличивает эффект НАД(Н).

2. VDAC не является НАДН-зависимым регулятором РТР.

3. НАД(Н) подавляет РТР путем взаимодействия с мишенью, отличной от S_{Ca}M_C. АНТ модулирует защитное действие НАД(Н). Цитозольные НАД и НАДН усиливают АНТ-опосредованный выход АТР из митохондрий.

4. Вспышки супероксидного аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран происходят после существенного окисления (повышения редокс-потенциала) НАД(Ф)Н матрикса и/или цитозоля. Главный вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые системы матрикса.

5. Пермеабиллизация мембран (по любому механизму), доступность цитозольного НАД(Ф)Н и снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов способствуют высокой продукции супероксид-аниона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hunter D.R., Haworth R.A., Southard J.H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria // *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 5069–5077.
2. Haworth R.A., Hunter D.R. The Ca²⁺-induced membrane transition of rat liver mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, v. 195, p. 460–467.
3. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, v. 195, p. 453–459.
4. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, v. 195, p. 468–477.
5. Kinnally K.W., Campo M.L., Tedeschi H. Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1989, v. 21, p. 497–506.
6. Petronilli V., Szabó I., Zoratti M. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria // *FEBS. Lett.*, 1989, v. 259, p. 137–143.
7. Massari S., Azzone G.F. The equivalent pore radius of intact and damaged mitochondria and the mechanism of active shrinkage // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1972, v. 283, p. 23–29.
8. Halestrap A.P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection // *Biochem. Soc. Trans.*, 2010, v. 38, p. 841–860.
9. Kinnally K.W., Peixoto P.M., Ryu S.Y., Dejean L.M. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011, v. 1813, p. 616–622.
10. Petronilli V., Miotto G., Canton M., Brini M., Colonna R., Bernardi P., Di Lisa F. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence // *Biophys. J.*, 1999, v. 76, p. 725–734.
11. Zorov D.B., Kinnally K.W., Perini S., Tedeschi H. Multiple conductance levels in rat heart inner mitochondrial membranes studied by patch clamping // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, v. 1105, p. 263–270.
12. Kwong J.Q., Molkentin J.D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart // *Cell. Metabolism*, 2015, v. 21, p. 206–214.

13. Wei A.C., Liu T., Winslow R.L., O'Rourke B. Dynamics of matrix-free Ca²⁺ in cardiac mitochondria: two components of Ca²⁺ uptake and role of phosphate buffering // *J. Gen. Physiol.*, 2012, v. 139, p. 465–478.
14. Hurst S., Gomez L., Jhun B., O-Uchi J., Sheu S.-S. Truncation of GSK-3 β in Cardiac Mitochondria is the Master Switch of the mPTP // *FASEB J.*, 2015, v. 29(1)
15. Korge P., Yang L., Yang J.H., Wang Y., Qu Z., Weiss J.N. Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria // *J. Biol. Chem.*, 2011, v. 286(40), p. 34851-34857.
16. Batandier C., Leverve X., Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I // *J. Biol. Chem.*, 2004, v. 279(17), p. 17197-17294.
17. Korge P., Calmettes G., John S.A., Weiss J.N. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III // *J. Biol. Chem.*, 2017, v. 292(24), p. 9882-9895.
18. Korge P., John S.A., Calmettes G., Weiss J.N. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: the role of complex II // *J. Biol. Chem.*, 2017, v. 292(24), p. 9896-9905.
19. Zago E.B., Castilho R.F., Vercesi A.E. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore // *FEBS Lett.*, 2000, v. 478(1-2), p. 29-33.
20. Webster K.A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species // *Future Cardiol.*, 2012, v. 8(6), p. 863–884.
21. Bernardi P., Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection // *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2015, v. 78, p. 100–106.
22. Javadov S., Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore openings as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection // *Cell. Physiol. Biochem.*, 2007, v. 20(1-4), p. 1–22.
23. Liu X., Xu S., Wang P., Wang W. Transient mitochondrial permeability transition mediates excitotoxicity in glutamate-sensitive NSC34D motor neuron-like cells // *Exp. Neurol.*, 2015, v. 271, p. 122–130.
24. Hou Y., Ghosh P., Wan R., Ouyang X., Cheng H., Mattson M.P., Cheng A. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes mediate an early inhibitory effect of amyloid beta₁₋₄₂ on neural progenitor cell proliferation // *Neurobiol. Aging*, 2014, v. 35(5), p. 975–989.

25. Hou T., Zhang X., Xu J., Jian C., Huang Z., Ye T., Hu K., Zheng M., Gao F., Wang X., Cheng H. Synergistic triggering of superoxide flashes by mitochondrial Ca²⁺ uniport and basal reactive oxygen species elevation // *J. Biol. Chem.*, 2013, v. 288(7), p. 4602–4612.
26. Kuznetsov A.V., Javadov S., Saks V., Margreiter R., Grimma M. Synchronism in mitochondrial ROS flashes, membrane depolarization and calcium sparks in human carcinoma cells // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2017, v. 1858(6), p. 418–431.
27. Yellon D.M., Hausenloy D.J. Myocardial reperfusion injury // *N. Engl. J. Med.*, 2007, v. 357(11), p. 1121–1135.
28. Piot C., Croisille P., Staat P., Thibault H., Rioufol G., Mewton N., Elbelghiti R., Cung T.T., Bonnefoy E., Angoulvant D., Macia C., Raczka F., Sportouch C., Gahide G., Finet G., André-Fouët X., Revel D., Kirkorian G., Monassier J.P., Derumeaux G., Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.*, 2008, v. 359(5), p. 473–481.
29. Shiga Y., Onodera H., Matsuo Y., Kogure K. Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain // *Brain Res.*, 1992, v. 595(1), p. 145–148.
30. Konukoglu D., Taşci I., Cetinkale O. Effects of cyclosporin A and ibuprofen on liver ischemia-reperfusion injury in the rat // *Clin. Chim. Acta.*, 1998, v. 275(1), p. 1–8.
31. Soda Y., el-Assal O.N., Yu L., Nagasue N. Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine // *Surgery*, 1999, v. 125(1), p. 23–32.
32. Park J.S., Pasupulati R., Feldkamp T., Roeser N.F., Weinberg J.M. Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2011, v. 301(1), p. 134–150.
33. Jung S., Yang H., Kim B.S., Chu K., Lee S.K., Jeon D. The immunosuppressant cyclosporin A inhibits recurrent seizures in an experimental model of temporal lobe epilepsy // *Neurosci Lett.*, 2012, v. 529(2), p. 133–138.
34. Quintanilla R.A., Jin Y.N., von Bernhardi R., Johnson G.V. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease // *Mol. Neurodegener.*, 2013, v. 8, p. 45.
35. Du H., Guo L., Zhang W., Rydzewska M., Yan S. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model // *Neurobiol. Aging.*, 2011, v. 32(3), p. 398–406.
36. Martin L.J., Semenkow S., Hanaford A., Wong M. Mitochondrial permeability transition pore regulates Parkinson's disease development in mutant α -synuclein transgenic mice // *Neurobiol. Aging.*, 2014, v. 35(5), p. 1132–1152.

37. Martin L.J, Fancelli D., Wong M., Niedzwiecki M., Ballarini M., Plyte S., Chang Q. GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *Front. Cell. Neurosci.*, 2014, v. 8:433.
38. Savino C., Pelicci P., Giorgio M. The P66Shc/mitochondrial permeability transition pore pathway determines neurodegeneration // *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013, 2013:719407
39. Pivovarova N.B., Andrews S.B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons // *FEBS J.*, 2010, v. 277(18), p. 3622–3636.
40. Klöhn P.C., Soriano M.E., Irwin W., Penzo D., Scorrano L, Bitsch A., Neumann H.G., Bernardi P. Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2003, v. 100(17), p. 10014–10019.
41. Marchi S., Lupini L., Patergnani S., Rimessi A., Missiroli S., Bonora M., Bononi A., Corrà F., Giorgi C., De Marchi E., Poletti F., Gafà R., Lanza G., Negrini M., Rizzuto R., Pinton P. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25 // *Curr. Biol.*, 2013, v. 23(1), p. 58–63.
42. Dvorakova K., Payne C.M., Tome M.E, Briehl M.M., Vasquez M.A., Waltmire C.N., Coon A., Dorr R.T. Molecular and cellular characterization of imexon-resistant RPMI8226/I myeloma cells // *Mol. Cancer. Ther.*, 2002, v. 1(3), p. 185–195.
43. Biaglow J.E., Miller R.A. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy // *Cancer. Biol. Ther.*, 2005, v. 4(1), p. 6–13.
44. Pani G., Colavitti R., Bedogni B., Fusco S., Ferraro D., Borrello S., Galeotti T. Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies // *Curr. Med. Chem.*, 2004, v. 11(10), p. 1299–1308.
45. Bonora M., Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death // *Front. Oncol.*, 2014, v. 4, p. 302.
46. Sinha D., D’Silva P. Chaperoning mitochondrial permeability transition: regulation of transition pore complex by a J-protein, DnaJC15 // *Cell. Death. Dis.*, 2014, v. 5, p. 1101.
47. Kinnally K.W., Zorov D.B., Antonenko Y.N., Snyder S.H., McEnery M.W., Tedeschi H. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, v. 90(4), p. 1374–1378.
48. Halestrap A.P., Davidson A.M. Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase // *Biochem. J.*, 1990, v. 268(1), p. 153–160.

49. McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R., Snyder S.H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, v. 89(8), p. 3170–3174.
50. Beutner G., Ruck A., Riede B., Welte W., Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore // *FEBS. Letters.*, 1996, v. 396(2), p. 189–195.
51. Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S.A., Beutner G., Brdiczka D., Rémy R., Xie Z.H., Reed J.C., Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins // *J. Exp. Med.*, 1998, v. 187(8), p. 1261–1271.
52. Zamzami N., Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001, v. 2(1), p. 67–71.
53. Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R., Wallace D.C. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore // *Nature*, 2004, v. 427(6973), p. 461–465.
54. Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J., Molkentin J.D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death // *Nat. Cell. Biol.*, 2007, v. 9(5), p. 550–555.
55. Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W., Robbins J., Molkentin J.D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death // *Nature*, 2005, v. 434(7033), p. 658–662.
56. Hurst S., Hoek J., Sheu S.S. Mitochondrial Ca²⁺ and Regulation of the Permeability Transition Pore // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2017, v. 49(1), p.27–47.
57. Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death // *Nature*, 2005, v. 434(7033), p. 652–658.
58. Schinzel A.C., Takeuchi O., Huang Z., Fisher J.K., Zhou Z., Rubens J., Hetz C., Danial N.N., Moskowitz M.A., Korsmeyer S.J., Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, v. 102(34), p. 12005–12010.
59. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The Mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology // *Physiol. Rev.*, 2015, v. 95(4), p. 1111–1155.

60. Out T.A., Kemp A., Souverijn J.H. The effect of bongkreikic acid on the Ca^{2+} -stimulated oxidation in rat-liver mitochondria and its relation to the efflux of intramitochondrial adenine nucleotides // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1971, v. 245(2), p. 299–304.
61. Gunter T.E., Pfeiffer D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium // *Am. J. Physiol.*, 1990, v. 258(5 Pt 1), p. 755–786.
62. Basso E., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation // *J. Biol. Chem.*, 2008, v. 283(39), p. 26307–26311.
63. Giorgio V., von Stockum S., Antoniel M., Fabbro A., Fogolari F., Forte M., Glick G.D., Petronilli V., Zoratti M., Szabó I., Lippe G., Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, 2013, v. 110(15), p. 5887–5892.
64. Giorgio V., Bisetto E., Soriano M.E., Dabbeni-Sala F., Basso E., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P., Lippe G. Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex // *J. Biol. Chem.*, 2009, v. 284(49), p. 33982–33988.
65. Xie G.C., Wilson J.E. Rat brain hexokinase: the hydrophobic N-terminus of the mitochondrially bound enzyme is inserted in the lipid bilayer // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1988, v. 267(2), p. 803–810.
66. Gelb B.D., Adams V., Jones S.N., Griffin L.D., MacGregor G.R., McCabe E.R. Targeting of hexokinase 1 to liver and hepatoma mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, v. 89(1), p. 202–206.
67. Chiara F., Castellaro D., Marin O., Petronilli V., Brusilow W.S., Juhaszova M., Sollott S.J., Forte M., Bernardi P., Rasola A. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels // *PLoS ONE.*, 2008, v. 3(3), p. 1852.
68. Pastorino J.G., Hoek J.B. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis // *Curr. Med. Chem.*, 2003, v. 10(16), p. 1535–1551.
69. Pastorino J.G., Hoek J.B., Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3 disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity // *Cancer. Res.*, 2005, v. 65(22), p. 10545–10554.
70. Miyamoto S., Murphy A.N., Brown J.H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II // *Cell. Death. Differ.*, 2008, v. 15(3), p. 521–529.

71. Roberts D.J., Tan-Sah V.P., Smith J.M., Miyamoto S. Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.*, 2013, v. 288(33), p. 23798–23806.
72. Pasdois P., Parker J.E., Halestrap A.P. Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion // *J. Am. Heart. Assoc.*, 2013, v. 2(1), e005645–e005645.
73. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC // *Nature*, 1999, v. 399(6735), p. 483–487.
74. Leung A.W., Varanyuwatana P., Halestrap A.P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition // *J. Biol. Chem.*, 2008, v. 283(39), p. 26312–26323.
75. Varanyuwatana P., Halestrap A.P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore // *MITOCH.*, 2012, v. 12(1), p. 120–125.
76. Gutiérrez-Aguilar M., Douglas D.L., Gibson A.K., Domeier T.L., Molkentin J.D., Baines C.P. Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2014, v. 72, p. 316–325.
77. Carraro M., Giorgio V., Šileikyte J., Sartori G., Forte M., Lippe G., Zoratti M., Szabò I., Bernardi P. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition // *J. Biol. Chem.*, 2014, v. 289(23), p. 15980-15985.
78. Alavian K.N., Beutner G., Lazrove E., Sacchetti S., Park H.A., Licznerski P., Li H., Nabili P., Hockensmith K., Graham M., Porter G.A. Jr., Jonas E.A. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2014, v. 111(29), p. 10580–10585.
79. Bonora M., Bononi A., De Marchi E., Giorgi C., Lebiezinska M., Marchi S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J.M., Wojtala A., Wieckowski M.R., Kroemer G., Galluzzi L., Pinton P. Role of the c subunit of the F₀ ATP synthase in mitochondrial permeability transition // *Cell. Cycle.*, 2013, v. 12(4), p. 674–683.
80. Shanmughapriya S., Rajan S., Hoffman N.E., Higgins A.M., Tomar D., Nemani N., Hines K.J., Smith D.J., Eguchi A., Vallem S., Shaikh F., Cheung M., Leonard N.J., Stolakis R.S., Wolfers M.P., Ibeti J., Chuprun J.K., Jog N.R., Houser S.R., Koch W.J., Elrod J.W., Madesh M. SPG7 Is an Essential and Conserved Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore // *Mol. Cell.*, 2015, v. 60(1), p. 47-62.

81. He L., Lemasters J.J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function // *FEBS Lett.*, 2002, v. 512(1-3), p. 1–7.
82. Chen Q., Lesnefsky E.J. Heart mitochondria and calpain 1: Location, Function, and Targets // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015, v. 1852(11), p. 2372-2378.
83. Halestrap A.P., Richardson A.P. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2015, v. 78, p.129–141.
84. Morciano G., Giorgi C., Bonora M., Punzetti S., Pavesini R., Wieckowski M.R., Campo G., Pinton P. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2015, v. 78, p. 142–153.
85. Solesio M.E., Elustondo P.A., Zakharian E., Pavlov E.V. Inorganic polyphosphate (polyP) as an activator and structural component of the mitochondrial permeability transition pore // *Biochem. Soc. Trans.*, 2016, v. 44(1), p.7–12.
86. Bagur R., Hajnóczky G. Intracellular Ca²⁺ sensing: its role in calcium homeostasis and signaling // *Mol. Cell.*, 2017, v. 66(6), p. 780-788.
87. Eisner V., Csordás G., Hajnóczky G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle - pivotal roles in Ca²⁺ and reactive oxygen species signaling // *J. Cell. Sci.*, 2013, v. 126(Pt 14), p. 2965-2978.
88. Marchi S., Bittremieux M., Missiroli S., Morganti C., Patergnani S., Sbrana L., Rimessi A., Kerkhofs M., Parys J.B., Bultynck G., Giorgi C., Pinton P. Endoplasmic reticulum-mitochondria communication through Ca²⁺ signaling: the importance of mitochondria-associated membranes (MAMs) // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, v. 997, p. 49-67.
89. Hackenbrock C.R., Caplan A.I. Ion-induced ultrastructural transformations in isolated mitochondria. The energized uptake of calcium // *J. Cell. Biol.*, 1969, v. 42(1), p. 221–234.
90. McCormack J.G., Denton R.M. The role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism and energy production in rat heart // *Mol. Cell. Biochem.*, 1989, v. 89(2), p. 121–125.
91. McCormack J.G., Halestrap A.P., Denton R.M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism // *Physiol. Rev.*, 1990, v. 70(2), p. 391–425.
92. Jekabsone A., Ivanoviene L., Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003, v. 35(7), p. 803–809.
93. Arakaki N., Ueyama Y., Hirose M., Himeda T., Shibata H., Futaki S., Kitagawa K., Higuti T. Stoichiometry of subunit e in rat liver mitochondrial H⁽⁺⁾-ATP synthase and membrane

topology of its putative Ca(2+)-dependent regulatory region // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2001, v. 1504(2-3), p. 220–228.

94. Van Walraven H.S., Scholts M.J., Zakharov S.D., Kraayenhof R., Dilley R.A. pH-dependent Ca²⁺ binding to the F₀ c-subunit affects proton translocation of the ATP synthase from *Synechocystis* 6803 // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2002, v. 34(6), p. 455–464.

95. Sohal R.S., Allen R.G. Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: a unified theory // *Basic. Life. Sci.*, 1985, v. 35, p. 75–104.

96. Perez-Campo R., López-Torres M., Cadenas S., Rojas C., Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach // *J. Comp. Physiol. B.*, 1998, v. 168(3), p. 149–158.

97. Grijalba M.T., Vercesi A.E., Schreier S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain // *Biochemistry.*, 1999, v. 38(40), p. 13279–13287.

98. Ott M., Robertson J.D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, v. 99(3), p. 1259–1263.

99. Pereverzev M.O., Vygodina T.V., Konstantinov A.A., Skulachev V.P. Cytochrome c, an ideal antioxidant // *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, v. 31(Pt. 6), p. 1312–1315.

100. Arrington D.D., Van Vleet T.R., Schnellmann R.G. Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2006, v. 291(6), p. 1159–1171.

101. Chen Q., Paillard M., Gomez L., Ross T., Hu Y., Xu A., Lesnefsky E.J. Activation of mitochondrial μ -calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia–reperfusion // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, v. 415(4), p. 533–538.

102. Shintani-Ishida K., Yoshida K. Mitochondrial m-calpain opens the mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion // *Int. J. Cardiol.*, 2015, v. 197, p. 26–32.

103. Sorimachi H., Ono Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders // *Cardiovasc. Res.*, 2012, v. 96(1), p. 11–22.

104. Hernando V., Insete J., Sartório C.L., Parra V.M., Poncelas-Nozal M., Garcia-Dorado D. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010, v. 49(2), p. 271–279.

105. Ni R., Zheng D., Xiong S., Hill D.J., Sun T., Gardiner R.B., Fan G.C., Lu Y., Abel E.D., Greer P.A., Peng T. Mitochondrial calpain-1 disrupts ATP synthase and induces superoxide

generation in type-1 diabetic hearts: a novel mechanism contributing to diabetic cardiomyopathy // *Diabetes*, 2015, v. 65(1), p. 255-268.

106. Shoshan-Barmatz V., Maldonado E.N, Krelin Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress // *Cell. Stress.*, 2017, v. 1(1), p. 11-36.

107. Gincel D., Silberberg S.D., Shoshan-Barmatz V. Modulation of the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) by glutamate // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2000, v. 32(6), p. 571-583.

108. Colombini M. VDAC structure, selectivity, and dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012, v. 1818(6), p. 1457-1465.

109. Baughman J.M., Perocchi F., Girgis H.S., Plovanich M., Belcher-Timme C.A., Sancak Y., Bao X.R., Strittmatter L., Goldberger O., Bogorad R.L., Kotliansky V., Mootha V.K. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter // *Nature*, 2011, v. 476(7360), p. 341–345.

110. De Stefani D., Raffaello A., Teardo E., Szabó I., Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter // *Nature*, 2012, v. 476(7360), p. 336–340.

111. Joiner M.L., Koval O.M., Li J., He B.J., Allamargot C., Gao Z., Luczak E.D., Hall D.D., Fink B.D, Chen B., Yang J., Moore S.A., Scholz T.D., Strack S., Mohler P.J., Sivitz W.I., Song L.S., Anderson M.E. CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart // *Nature*, 2012, v. 491(7423), p. 269–273.

112. Mallilankaraman K., Cárdenas C., Doonan P.J., Chandramoorthy H.C, Irrinki K.M., Golenár T., Csordás G., Madireddi P., Yang J., Müller M., Miller R., Kolesar J.E., Molgó J., Kaufman B., Hajnóczky G., Foskett J.K., Madesh M. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism // *Nat. Cell. Biol.*, 2012, v. 14(12), p. 1336–1343.

113. Csordás G., Golenár T., Seifert E.L., Kamer K.J., Sancak Y., Perocchi F., Moffat C., Weaver D., de la Fuente Perez S., Bogorad R., Kotliansky V., Adijanto J., Mootha V.K., Hajnóczky G. MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter // *Cell Metab.*, 2013, v. 17(6), p. 976–987.

114. Sancak Y., Markhard A.L., Kitami T., Kovács-Bogdán E., Kamer K.J., Udeshi N.D., Carr S.A., Chaudhuri D., Clapham D.E., Li A.A., Calvo S.E., Goldberger O., Mootha V.K. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex // *Science*, 2013, v. 342(6164), p. 1379–1382.

115. O-Uchi J., Jhun B.S., Xu S., Hurst S., Raffaello A., Liu X., Yi B., Zhang H., Gross P., Mishra J., Ainsbinder A., Kettlewell S., Smith G.L., Dirksen R.T., Wang W., Rizzuto R., Sheu S.S.

Adrenergic signaling regulates mitochondrial Ca^{2+} uptake through Pyk2-dependent tyrosine phosphorylation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter // *Antioxid. Redox. Signal.*, 2014, v. 21(6), p. 863–879.

116. Vajda S., Mandi M., Konrad C., Kiss G., Ambrus A., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. A re-evaluation of the role of matrix acidification in uncoupler-induced Ca^{2+} release from mitochondria // *FEBS J.*, 2009, v. 276, p. 2713–2724.

117. Luongo T.S., Lambert J.P., Yuan A., Zhang X., Gross P., Song J., Shanmughapriya S., Gao E., Jain M., Houser S.R., Koch W.J., Cheung J.Y., Madesh M., Elrod J.W. The mitochondrial calcium uniporter matches energetic supply with cardiac workload during stress and modulates permeability transition // *Cell. Rep.*, 2015, v. 12(1), p. 23–34.

118. Beutner G., Sharma V.K., Giovannucci D.R., Yule D.I., Sheu S.S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria // *J. Biol. Chem.*, 2001, v. 276(24), p. 21482–21488.

119. Jiang D., Zhao L., Clapham D.E. Genome-wide RNAi screen identifies *Letm1* as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter // *Science*, 2009, v. 326(5949), p. 144–147.

120. Michels G., Khan I.F., Endres-Becker J., Rottlaender D., Herzig S., Ruhparwar A., Wahlers T., Hoppe U.C. Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca^{2+} uptake by 2 different voltage-gated Ca^{2+} channels // *Circulation*, 2009, v. 119(18), p. 2435–2443.

121. Sparagna G.C., Gunter K.K., Sheu S.S., Gunter T.E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode // *J. Biol. Chem.*, 1995, v. 270(46), p. 27510–27515.

122. De Stefani D., Rizzuto R., Pozzan T. Enjoy the trip: calcium in mitochondria back and forth // *Annu. Rev. Biochem.*, 2016, v. 85, p. 161–192.

123. Crompton M., Künzi M., Carafoli E. The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier // *Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 79(2), p. 549–558.

124. Pozzan T., Bragadin M., Azzone G.F. Disequilibrium between steady-state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria. Pathway and role of Ca^{2+} efflux // *Biochemistry*, 1977, v. 16(25), p. 5618–5625.

125. Palty R., Silverman W.F., Hershfinkel M., Caporale T., Sensi S.L., Parnis J., Nolte C., Fishman D., Shoshan-Barmatz V., Herrmann S., Khananshvili D., Sekler I. NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2010, v. 107(1), p. 436–441.

126. Chinopoulos C., Adam-Vizi V. Mitochondrial Ca^{2+} sequestration and precipitation revisited // *FEBS J.*, 2010, v. 277(18), p. 3637–3651.

127. Rottenberg H., Marbach M. Regulation of Ca²⁺ transport in brain mitochondria. II. The mechanism of the adenine nucleotides enhancement of Ca²⁺ uptake and retention // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, 1016(1), p. 87–98.
128. Ong S-B., Subrayan S., Lim S.Y., Yellon D.M., Davidson S.M, Hausenloyet D.J. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury // *Circulation.*, 2010, v. 121(18), p. 2012–2022.
129. Yu T., Sheu S-S., Robotham J.L., Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species // *Cardiovasc. Res.*, 2008, v. 79(2), p.341–351.
130. Cribbs J.T., Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death // *EMBO Rep.*, 2007, v. 8(10), p. 939–944.
131. Hom J., Yu T., Yoon Y., Porter G., Sheu S-S. Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca²⁺ in rat ventricular myocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, v. 1797(6-7), p. 913–921.
132. Breckenridge D.G., Stojanovic M., Marcellus R.C., Shore G.C. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol // *J. Cell. Biol.*, 2003, v. 160(7), p. 1115–1127.
133. Hom J.R., Gewandter J.S., Michael L., Sheu S-S., Yoon Y. Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis// *J. Cell. Physiol.*, 2007, v. 212(2), p. 498–508.
134. Halestrap A.P., Woodfield K.Y., Connern C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase // *J. Biol. Chem.*, 1997, v. 272, p. 3346–3354.
135. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., A.L. Nieminen. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, v. 1787(11), p. 1395–1401.
136. Byrne A.M., Lemasters J.J., Nieminen A.L. Contribution of increased mitochondrial free Ca²⁺ to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes // *Hepatology*, 1999, v. 29, p. 1523–1531.
136. Kim J.S., Jin Y., Lemasters J.J. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion // *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, 2006, 290(5), H2024–H2034.
137. Butterfield D.A., Dalle-Donne I. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease // *Mass Spectrom. Rev.*, 2014, v. 33(1), p.1–6.

138. Steinberg S.F. Oxidative stress and sarcomeric proteins // *Circ. Res.*, 2013, v.112(2), p.393–405.
139. Petronilli V., Costantini P., Scorrano L., Colonna R., Passamonti S., Bernardi P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents // *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269(24), p.16638–16642.
140. Costantini P., Chernyak B.V., Petronilli V., Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites // *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271 (12), p.6746– 6751.
141. Costantini P., Chernyak B.V., Petronilli V., Bernardi P. Selective inhibition of the mitochondrial permeability transition pore at the oxidation-reduction sensitive dithiol by monobromobimane // *FEBS Lett.*, 1995, v. 362(2), p. 239–242.
142. Costantini P., Colonna R., Bernardi P. Induction of the mitochondrial permeability transition by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-ortho-phenanthroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase // *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, v.1365(3), p.385–392.
143. Dupuis A., Lunardi J., Issartel J.P., Vignais P.V. Interactions between the oligomycin sensitivity conferring protein (OSCP) and beef heart mitochondrial F1-ATPase. 2. Identification of the interacting F1 subunits by crosslinking // *Biochemistry*, 1985, v. 24(3), p.734–739.
144. Linard D., Kandlbinder A., Degand H., Morsomme P., Dietz K.J., Knoops B. Redox characterization of human cyclophilin D: identification of a new mammalian mitochondrial redox sensor? // *Arch. Biochem. Biophys.*, 2009, v. 491(1-2), p.39–45.
145. Radi R., Rodriguez M., Castro L., Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, v. 308, p. 89–95.
146. Kaludercic N., Giorgio V. The dual function of reactive oxygen/nitrogen species in bioenergetics and cell death: the role of ATP synthase // *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2016, v. 2016:3869610.
147. Petit-Paitel A., Brau F., Cazareth J., Chabry J. Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3 β in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP $^{+}$ -treated neurons // *PLoS ONE*, 2009, v. 4(5), e5491.
148. Crompton M., Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca $^{2+}$, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca $^{2+}$ overload // *Eur. J. Biochem.*, 1988, v. 178, p. 489–501.
149. Abramov A.Y., Fraley C., Diao C.T., Winkfein R., Colicos M.A., Duchon M.R., French R.J., Pavlov E. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and

inhibits calcium-dependent cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, v. 104, p. 18091–18096.

150. Pavlov E., Zakharian E., Bladen C., Diao C.T.M., Grimbley C., Reusch R.N., French R.J. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction // *Biophys. J.*, 2005, v. 88, p. 2614–2625.

151. Giorgia V., Soriano M., Bassoa E., Bisetto E., Lipped G., Fortee M., Bernardi P. Cyclophilin D in Mitochondrial Pathophysiology // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, v. 1797(6-7), p. 1113–1118.

152. Crompton M., Ellinger H., Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress // *Biochem. J.*, 1988, v. 255, p. 357–360.

153. Basso E., Fante L., Fowlkes J., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D // *J. Biol. Chem.*, 2005, v. 280, p. 18558–18561.

154. Šileikytė J, Blachly-Dyson E, Sewell R, et al. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)) *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:13769–13781. doi: 10.1074/jbc.M114.549634.

155. Vainio H., Mela L., Chance B. Energy dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria // *Eur. J. Biochem.*, 1970, v. 12, p. 387–391.

156. Szabo I., Bernardi P., Zoratti M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons // *J. Biol. Chem.*, 1992, v. 267, p. 2940–2946.

157. Bernardi P., Vassanelli S., Veronese P., Colonna R., Szabó I., Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations // *J. Biol. Chem.*, 1992, v. 267, p. 2934–2939.

158. Bernardi P., Veronese P., Petronilli V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me²⁺ binding sites with opposing effects on the pore open probability // *J. Biol. Chem.*, 1993, v. 268, p. 1005–1010.

159. Halestrap A.P. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage // *Biochem. J.*, 1991, v. 278(Pt 3), p. 715–719.

160. Nicolli A., Petronilli V., Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation // *Biochemistry.*, 1993, v. 32, p. 4461–4465.

161. Saito A., Castilho R.F. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition // *Neurochem. Res.*, 2010, v. 35, p. 1667-1674.
162. Haworth R.A., Hunter D.R. Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides // *J. Membr. Biol.*, 1980, v. 54, p. 231-236.
163. Haworth R.A., Hunter D.R. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2000, v.32, p. 91–96.
164. Fiore C., Trezeguet V., LeSaux A., Roux P., Schwimmer C., Dianoux A.C., Noel F., Lauquin G.J.M., Brandolin G., Vignais P.V. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects // *Biochimie*, 1998, v. 80(2), p.137-150.
165. Klingenberg M.J. The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport // *Membr. Biol.*, 1980, v. 56(2), p. 97-105.
166. Halestrap A.P., Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death // *Curr. Med. Chem.*, 2003, v. 10, p.1507-1525.
167. Stepien, G., Torroni A., Chung A.B., Hodge J.A., Wallace D.C. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation // *J.Biol.Chem.*, 1992, v. 267(21), p. 14592-14597.
168. Lunardi J., Hurko O., Engel W.K., Attardi G.J. The multiple ADP/ATP translocase genes are differentially expressed during human muscle development // *J. Biol. Chem.*, 1992, 267(22), p. 15267-15270.
169. Barath P., Luciakova K., Hodny Z., Li R., Nelson B.D. The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation // *Exp. Cell Res.*, 1999, v. 248(2), p. 583-588.
170. Quatresous E., Legrand C., Pouvreau S. Mitochondria-targeted cpYFP: pH or superoxide sensor? // *J. Gen. Physiol.*, 2012, v. 140(5), 567–570.
171. Brustovetsky N., Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺// *Biochemistry*, 1996, v. 35, p. 8483-8488.
172. Novgorodov S.A., Gudz T.I., Brierley G.P., Pfeiffer D.R. Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, v. 311, p. 219–228.
173. De Macedo D.V., Nepomuceno M.E., Pereira-da-Silva L. Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane// *Eur. J. Biochem.*, 1993, v. 215, p. 595-600.

174. Novgorodov S.A., Gudz T.I., Milgrom Y.M., Brierley G.P. The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A // *J. Biol. Chem.*, 1992, v. 267, p. 16274-16282.
175. Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trézéguet V., Lauquin G.J., Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside // *Nature*, 2003, v. 426, p. 39–44.
176. Kunji E.R., Crichton P.G. Mitochondrial carriers function as monomers // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, v. 1797(6-7), p. 817-831.
177. Ruprecht J.J., King M.S., Zögg T., Aleksandrova A.A., Pardon E., Crichton P.G., Steyaert J., Kunji E.R.S. The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier // *Cell*, 2019, v. 176(3), p. 435-447.
178. Gizatullina Z.Z., Chen Y., Zierz S., Gellerich F.N. Effects of extramitochondrial ADP on permeability transition of mouse liver mitochondria// *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, v. 1706(1-2), p. 98-104.
179. Novgorodov S.A., Gudz T.I., Kushnareva Y.E., Zorov D.B., Kudrjashov Y.B. Effect of ADP/ATP antiporter conformational state on the suppression of the nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane by cyclosporine A// *FEBS Lett.*, 1990, v. 277, p. 123–126.
180. Novgorodov S.A., Gudz T.I., Jung D.W., Brierley G.P. The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites// *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, v. 180, p. 33–38.
181. Traba J., Del Arco A., Duchon M.R., Szabadkai G., Satrústegui J. ScaMC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca(2+) buffering// *Cell Death Differ.*, 2012, v.19, p. 650–660.
182. Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R., Bernardi P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria// *J. Biol. Chem.*, 1993, v. 268, p. 21939-21945.
183. Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases // *Biochemistry.*, 1995, v. 34(50), p. 16440-16449.
184. Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues // *Eur. J. Biochem.*, 1999, v. 264(3), p. 687-701.

185. Majima E., Ikawa K., Takeda M., Hashimoto M., Shinohara Y., Terada H. Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline// *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(49), p. 29548-29554.
186. McStay G.P., Clarke S.J., Halestrap A.P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore // *Biochem. J.*, 2002, v. 367(Pt 2), p. 541-548.
187. Costantini P., Belzacq A.S., Vieira H.L., Larochette N., de Pablo M.A., Zamzami N., Susin S.A., Brenner C., Kroemer G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis // *Oncogene*, 2000, v. 19(2), p. 307-314.
188. Majima E., Koike H., Hong Y.M., Shinohara Y., Terada H. Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide // *J. Biol. Chem.*, 1993, v. 268(29), p. 22181-22187.
189. Majima E., Yamaguchi N., Chuman H., Shinohara Y., Ishida M., Goto S., Terada H. Binding of the fluorescein derivative eosin Y to the mitochondrial ADP/ATP carrier: characterization of the adenine nucleotide binding site // *Biochemistry*, 1998, 37(1), p. 424-432.
190. Williamson J.R., Corkey B.E. Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds--update with tissue metabolite levels and intracellular distribution// *Methods Enzymol.*, 1979, v. 55, p. 200-222.
191. Woodfield, K., Rück A., Brdiczka D., Halestrap A.P. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition// *Biochem. J.*, 1998, v. 336(Pt 2), p. 287-290.
192. Andreyev A., Bondareva T.O., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Volkov N.I. Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids// *FEBS Lett.*, 1988, v. 226, p. 265-269
193. Andreyev A., Bondareva T.O., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Tsofina L.M., Volkov N.I., Vygodina T.V. The ATP/ADP-antiporteris involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria// *Eur. J. Biochem.*, 1989, v. 182, p. 585-592.
194. Skulachev V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics// *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, v. 1363, p. 100-124.
195. Cadenas S., Buckingham J.A., St-Pierre J., Dickinson K., Jones R.B., Brand M.D. AMP decreases the efficiency of skeletal-muscle mitochondria // *Biochem. J.*, 2000, v. 351, p. 307-311.

196. Echtay K.S., Esteves T.C., Pakay J.L., Jekabsons M.B., Lambert A.J., Portero-Otin M., Pamplona R., Vidal-Puig A., Wang S., Roebuck S.J., Brand M.D. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling // *EMBO J.*, 2003, v. 22, p. 4103–4110.
197. Brand M.D., Pakay J.L., Ocloo A., Kokoszka J., Wallace D.C., Brookes P.S., Cornwall E.J. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content // *Biochem. J.*, 2005, v. 392, p. 353–362
198. Panov A., Filippova S., Lyakhovich V. Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to H⁺ and K⁺ ions // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, v. 199(2), p.420-426.
199. Panov A.V., Andreeva L., Greenamyre J.T. Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, v. 424(1), p, 44-52.
200. Chalmers S., Nicholls D.G. The Relationship between Free and Total Calcium Concentrations in the Matrix of Liver and Brain Mitochondria // *J. Biol. Chem.*, 2003, v. 278, p. 19062–19070.
201. Nicholls D.G., Chalmers S. The integration of mitochondrial calcium transport and storage// *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2004, v. 36, p. 277–281.
202. Chinopoulos C., Vajda S., Csanády L., Mándi M., Mathe K., Adam-Vizi V. A novel kinetic assay of mitochondrial ATP-ADP exchange rate mediated by the ANT// *Biophys. J.*, 2009, v. 96(6), p. 2490-2504.
203. Solesio M.E., Demirkhanyan L., Zakharian E., Pavlov E.V. Contribution of inorganic polyphosphate towards regulation of mitochondrial free calcium // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2016, v. 1860(6), p. 1317-1325.
204. Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P., Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition // *Cell Calcium*, 2018, v. 70, p. 56-63.
205. Weinbach E.C., von Brand T. The isolation and composition of dense granules from Ca⁺⁺-loaded mitochondria// *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, v.19, p. 133–137.
206. Becker G.L., Chen C.H., Greenawalt J.W., Lehninger A.L. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus* // *J. Cell Biol.*, 1974, v. 61, p. 316–326
207. Kristia 'n T., Pivovarova N.B., Fiskum G., Andrews S.B. Calcium-induced precipitate formation in brain mitochondria: composition, calcium capacity, and retention// *J. Neurochem.*, 2007, v. 102, p. 1346–1356.

208. Carafoli E., Rossi C.S., Lehninger A.L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of Ca⁺⁺ and phosphate// *J. Biol. Chem.*, 1965, v. 240, p. 2254–2261.
209. Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target// *FEBS J.*, 2006, v. 273, p. 2077–2099.
210. Zoratti M., Szabo I. The mitochondrial permeability transition// *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, v. 1241, p. 139–176.
211. Hagen T., Lagace C.J., Modica-Napolitano J.S., Aprille J.R. Permeability transition in rat liver mitochondria is modulated by the ATP-Mg/Pi carrier // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2003, v. 285, p.274–281.
212. Traut T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines // *Mol. Cell Biochem*, 1994, v. 140(1), p. 1-22.
213. Aprille J.R. Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier// *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1993, 25, p. 473–481.
214. Satru´stegui J., Pardo B., del Arco A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling // *Physiol. Rev.*, 2007, v. 87, p. 29–67
215. Traba J., Satru´stegui J., del Arco A. Characterization of SCaMC-3-like/slc25a41, a novel calcium-independent mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier // *Biochem. J.*, 2009, v. 418, p. 125–133.
216. Harborne S.P.D., Ruprecht J.J., Kunji E.R.S. Calcium-induced conformational changes in the regulatory domain of the human mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier // *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, v. 1847, p. 1245–1253.
217. Kunji E.R.S., Aleksandrova A., King M.S., Majd H., Ashton V.L., Cerson E., Springett R., Kibalchenko M., Tavoulari S., Crichton P.G., Ruprecht J.J. The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier // *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, v. 1863, p. 2379–2393.
218. Saraste M., Walker J.E. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase // *FEBS Lett.*, 1982, v. 144, p. 250–254.
219. Harborne S.P.D., M.S. King, P.G. Crichton, E.R.S. Kunji. Calcium regulation of the human mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SLC25A24 uses a locking pin mechanism // *Sci. Rep.*, 2017, v. 7:45383.
220. Kwong J.Q., Davis J., Baines C.P., Sargent M.A., Karch J., Wang X., Huang T., Molkenin J.D. Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy // *Cell Death Differ.*, 2014, v. 21, p. 1209–1217.

221. Amigo I., Traba J., González-Barroso M.M., Rueda C.B., Fernández M., Rial E., Sánchez A., Satrústegui J., Del Arco A. Glucagon regulation of oxidative phosphorylation requires an increase in matrix adenine nucleotide content through Ca^{2+} activation of the mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier S_{Ca}MC-3 // *J. Biol. Chem.*, 2013, v. 288, p. 7791–7802.
222. Traba J., Froschauer E. M., Wiesenberger G., Satrústegui J., del Arco, A. Yeast mitochondria import ATP through the calciumdependent ATP-Mg/Pi carrier S_{all}p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose // *Mol. Microbiol.*, 2008, v. 69, 570–585.
223. Llorente-Folch I., Rueda C.B., Amigo I., del Arco A., Saheki T., Pardo B., Satrústegui J. Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1malate aspartate shuttle in intact cortical neurons // *J. Neurosci.*, 2013, v.33, p. 13957–13971.
224. Rueda C.B., Llorente-Folch I., Amigo I., Contreras L., González-Sánchez P., Martínez-Valero P., Juaristi I., Pardo B., del Arco A., Satrústegui J. Ca^{2+} regulation of mitochondrial function in neurons // *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, v.1837, p. 1617–1624.
225. Rueda C.B., Traba J., Amigo I., Llorente-Folch I., González-Sánchez P., Pardo B., Esteban J.A., del Arco A., Satrústegui J. Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier S_{Ca}MC-3/Slc25a23 counteracts PARP-1-dependent fall in mitochondrial ATP caused by excitotoxic insults in neurons // *J. Neurosci.*, 2015, v. 35, p. 3566–3581.
226. Anunciado-Koza R.P., J. Zhang, J. Ukropec, S. Bajpeyi, R.A. Koza, R.C. Rogers, W.T. Cefalu, R.L. Mynatt, L.P. Kozak. Inactivation of the mitochondrial carrier SLC25A25 (ATP-Mg²⁺/Pi transporter) reduces physical endurance and metabolic efficiency in mice // *J. Biol. Chem.*, 2011, v. 286(13), p. 11659–11671.
227. Novgorodov S.A., Gudz T.I., Mohr Yu.E., Goncharenko E.N., Yaguzhinsky L.S. ATP-synthase complex: the mechanism of control of ion fluxes induced by cumene hydroperoxide in mitochondria // *FEBS Lett.*, 1989, v. 247, p. 255-258.
228. Jurkowitz M., Scott K.M., Altschuld R.A., Merola A.J., Brierley G.P. Ion transport by heart mitochondria. Retention and loss of energy coupling in aged heart mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, v. 165(1), p. 98-113.
229. Siliprandi D, Toninello A, Zoccarato F, Rugolo M, Siliprandi N. Synergic action of calcium ions and diamide on mitochondrial swelling // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 66(3), p. 956-961.
230. Chernyak B.V., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites // *Eur. J. Biochem.*, 1996, 238(3), p. 623-630

231. Bernardes C.F., Silva L.P., Vercesi A.E. t-Butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP // *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, v. 850(1), p. 41 – 48.
232. Vercesi A.E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, v. 252(1). p. 171-178.
233. Nieminen A.L., Byrne A.M., Herman B., Lemasters J.J. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species // *Am. J. Physiol.*, 1997, v. 272, p. 1286–1294
234. Walter L., Nogueira V., Leverage X., Heitz M.P., Bernardi P., Fontaine E. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site// *J. Biol. Chem.*, 2000, v. 275, p. 29521-29527.
235. Fontaine E., Eriksson O., Ichas F., Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I // *J. Biol. Chem.*, 1998, v. 273, p. 12662-12668.
236. Hoch F.L. Thyroid hormone action on mitochondria. IV. Redox states of intrinsic pyridine nucleotides in hypothyroidism, and influence of L-thyroxine // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1976, v. 8, p. 223-238.
237. Noack H., Kunz W.S., Augustin W. Evaluation of a procedure for the simultaneous determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides and adenylates in organic phenol extracts from mitochondria // *Anal. Biochem.*, 1992, v. 202, p. 162-165.
238. Lê-Quốc D., Lê-Quốc K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1989, v. 273, p. 466-478.
239. Jacobson K.B., Kaplan N.O. Pyridine coenzymes of subcellular tissue fractions // *J. Biol. Chem.*, 1957, v. 226, p. 603-613.
240. Stubbs M., Veech R.L., Krebs H.A. Control of the redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm // *Biochem. J.*, 1972, v. 126, p. 59-65.
241. Rostovtseva T.K., Komarov A., Bezrukov S.M., Colombini M. Dynamics of nucleotides in VDAC channels: structure-specific noise generation // *Biophys. J.*, 2002, v. 82, p. 193-205.
242. Wu S., Sampson M.J., Decker W.K., Craigen W.J. Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration // *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, v. 1452(1), p. 68-78.

243. Sampson M.J., Decker W.K., Beaudet A.L., Ruitenbeek W., Armstrong D., Hicks M.J., Craigen W.J. Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3 // *J. Biol. Chem.*, 2001, v. 276(42), p. 39206-39212.
244. Weeber E.J., Levy M, Sampson M.J., Anflous K., Armstrong D.L., Brown S.E., Sweatt J.D., Craigen W.J. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity // *J. Biol. Chem.*, 2002, v. 277(21), p. 18891-18897.
245. Zizi M., Forte M., Blachly-Dyson E., Colombini M. NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel // *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269(3), p. 1614-1616.
246. Villinger S., Giller K., Bayrhuber M., Lange A., Griesinger C., Becker S., Zweckstetter M. Nucleotide interactions of the human voltage-dependent anion channel// *J. Biol. Chem.*, 2014, v. 289, p. 13397-13406
247. Hiller S., Garces R.G., Malia T.J., Orekhov V.Y., Colombini M., Wagner G. Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles// *Science.*, 2008, v. 321(5893), p. 1206-1210.
248. Lee A.-C., Xu X., Colombini M. The role of pyridine dinucleotides in regulating the permeability of the mitochondrial outer membrane // *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271, p. 26724-26731.
249. Brookes P.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle// *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, v. 287(4), p.817–833.
250. Ruiz-Ramírez A., López-Acosta O., Barrios-Maya M.A., El-Hafidi M. Cell death and heart failure in obesity: role of uncoupling proteins // *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, v. 2016:9340654, p. 1-11.
251. Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O., Zweier J.L., Sollott S.J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes// *J. Exp. Med.*, 2000, v. 192, p. 1001-1014.
252. Andrienko T., Pasdois P., Rossbach A., Halestrap A.P. Real-time fluorescence measurements of ROS and [Ca²⁺] in ischemic/reperfused rat hearts: detectable increases occur only after mitochondrial pore opening and are attenuated by ischemic preconditioning // *PLoS ONE*, 2016, v. 11(12):e0167300.
253. Ramsay RR, Singer TP. Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP⁺. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Nov 30; 189(1):47-52.

254. Krishnamoorthy G., Hinkle P.C. Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase//*J. Biol. Chem.*, 1988, v. 263(33), p. 17566-17575.
255. Kotlyar A.B., Sled V.D., Burbaev D.S., Moroz I.A., Vinogradov A.D. Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles// *FEBS Lett.*, 1990, v. 264(1), p. 17-20.
256. Kushnareva Y., Murphy A.N., Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state// *Biochem. J.*, 2002, v. 368(Pt 2), p. 545-553.
257. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // *Успехи биологической химии*, 2013, т. 53. с. 245-296.
258. Grivennikova V.G., Kareyeva A.V., Vinogradov A.D. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, v. 1797(6-7). p. 939-944.
259. Maklashina E., Sher Y., Zhou H.Z. Gray M.O., Karliner J.S., Cecchini G. Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2002, v. 1556(1). p. 6-12.
260. de Jong A.M., Kotlyar A.B., Albracht S.P. Energy-induced structural changes in NADH:Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain// *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, v. 1186(3), p. 163-171.
261. Chouchani E.T., Methner C., Nadtochiy S.M. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I // *Nat. Med.*, 2013, v. 19(6). p. 753-759.
262. Imlay J.A. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.*, 1995, v. 270. p. 19767-19777.
263. Messner K.R., Imlay J.A. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase // *J. Biol. Chem.*, 2002, v. 277(45), p. 42563-42571.
264. Liang L.P., Patel M. Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease // *J. Neurochem.*, 2004, v. 90(5), p. 1076-1084.
265. Guo J., Lemire B. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide // *J. Biol. Chem.*, 2003, v. 278(48), p. 47629-47635.
266. Votyakova T.V., Reynolds I.J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria// *J. Neurochem.*, 2001, v. 79(2), p. 266-277.

267. Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, v. 1147, p. 37-52.
268. Hansford R.G., Hogue B.A., Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1997, v. 29(1), p. 89-95.
269. Benzi G., Pastoris O., Dossena M. Relationships between gamma-aminobutyrate and succinate cycles during and after cerebral ischemia // *J. Neurosci. Res.*, 1982, v. 7(2), p. 193-201
270. Sato K., Kashiwaya Y., Keon C.A., Tsuchiya N., King M.T., Radda G.K., Chance B., Clarke K., Veech R.L. Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction // *FASEB J.*, v. 9(8), p. 651-658
271. Siebels I., Drose S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2013, v. 1827(10). p. 1156-1164.
272. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS// *Nature*, 2014, v. 515(7527), p. 431-435.
273. Lemarie A., Huc L., Pazarentzos E., Mahul-Mellier A-L., Grimm S., Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction // *Cell Death Differ.*, 2011, v. 18(2), p. 338-349.
274. Trumpower B.L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex // *J. Biol. Chem.*, 1990, v. 265(20), p. 11409-11412.
275. Huang L.S., Cobessi D., Tung E.Y., Berry E.A. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc₁ complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern // *J. Mol. Biol.*, 2005, v. 351(3), p. 573-597.
276. Peng T.I., Jou M.J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010, v. 1201, p. 183-188.
277. Grivennikova V.G., Cecchini G., Vinogradov A.D. Ammonium-dependent hydrogen peroxide production by mitochondria// *FEBS Lett.*, 2008, v. 582(18), p. 2719-2724.
278. Starkov A.A. An update on the role of mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress // *Mol. Cell. Neurosci.*, 2013, v. 55. p. 13-16.
279. Nickel A.G., von Hardenberg A., Hohl M. et al. Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure // *Cell Metabol.*, 2015., v. 22(3). p. 472-484.
280. Denton R.M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, v. 1787(11). p. 1309-1316.

281. Patterson S.D., Spahr C.S., Daugas E., Susin S.A., Irinopoulou T., Koehler C., Kroemer G. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition // *Cell Death Differ.*, 2000, v. 7(2). p. 137–144.
282. Herman B., Nieminen A.L., Gores G.J., Lemasters J.J. Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability // *FASEB J.*, 1988, v. 2(2), p. 146–151.
283. Maltsev A.V., Kokoz Y.M., Evdokimovskii E.V., Pimenov O.Y., Reyes S., Alekseev A.E. Alpha-2 adrenoceptors and imidazoline receptors in cardiomyocytes mediate counterbalancing effect of agmatine on NO synthesis and intracellular calcium handling // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2014, v. 68, p. 66-74.
284. Johnson D., Lardy H.A. Isolation of liver or kidney mitochondria // *Methods Enzymol.*, 1967, v. 10, p. 94–96.
285. Kruglov A.G., Teplova V.V., Saris N.E. The effect of the lipophilic cation lucigenin on mitochondria depends on the site of its reduction // *Biochem. Pharmacol.*, 2007, v. 74(4), p. 545-556.
286. Kruglov A.G., Solov'eva M.E., Teplova V.V. Flow cytometry-based assay for the activity of NAD(P)H oxidoreductases of the outer mitochondrial membrane // *Anal. Biochem.*, 2009, v. 395(2), p. 134-143.
287. Gardner P.R. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide // *Methods Enzymol.*, 2002, v. 349, p. 9-23
288. Chinopoulos C. Mitochondrial permeability transition pore: Back to the drawing board// *Neurochem. Int.*, 2018, v. 117, p. 49-54.
289. Tarze A., Deniaud A., Le Bras M., Maillier E., Molle D., Larochette N., Zamzami N., Jan G., Kroemer G., Brenner C. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization// *Oncogene*, 2007, v. 26(18), p. 2606-2620.
290. Allouche M., Pertuiset C., Robert J.L., Martel C., Veneziano R., Henry C., Dein O.S., Saint N., Brenner C., Chopineau J. ANT-VDAC1 interaction is direct and depends on ANT isoform conformation in vitro// *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, v. 429(1-2), p. 12-17.
291. Abu-Hamad S., Zaid H., Israelson A., Nahon E., Shoshan-Barmatz V. Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding // *J. Biol. Chem.*, 2008, v. 283(19), p. 13482-13490.
292. Israelson A., Abu-Hamad S., Zaid H., Nahon E., Shoshan-Barmatz V. Localization of the voltage-dependent anion channel-1 Ca²⁺-binding sites // *Cell Calcium*, 2007, v. 41(3), p. 235-244.

293. Báthori G., Csordás G., Garcia-Perez C., Davies E., Hajnóczky G. Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) // *J. Biol. Chem.*, 2006, v. 281(25), 17347-17358.
294. Yehezkel G., Hadad N., Zaid H., Sivan S., Shoshan-Barmatz V. Nucleotide-binding sites in the voltage-dependent anion channel: characterization and localization // *J. Biol. Chem.*, 2006, v. 281(9), p. 5938-5946.
295. Tanaka T., Saotome M., Katoh H., Satoh T., Hasan P., Ohtani H., Satoh H., Hayashi H., Maekawa Y. Glycogen synthase kinase-3 β opens mitochondrial permeability transition pore through mitochondrial hexokinase II dissociation // *J. Physiol. Sci.*, 2018, v. 68(6), p. 865–871
296. Bao H., Ge Y., Zhuang S., Dworkin L.D., Liu Z., Gong R. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β prevents NSAID-induced acute kidney injury // *Kidney Int.*, 2012, v. 81, p. 662–673.
297. Kambayashi Y., Ogino K. Reestimation of Cypridina luciferin analogs (MCLA) as a chemiluminescence probe to detect active oxygen species--cautionary note for use of MCLA // *J. Toxicol. Sci.*, 2003, v. 28(3), p. 139-148.
298. Shimomura O., Wu C., Murai A., Nakamura H. Evaluation of five imidazopyrazinone-type chemiluminescent superoxide probes and their application to the measurement of superoxide anion generated by *Listeria monocytogenes* // *Anal. Biochem.*, 1998, v. 258(2), p. 230-235.
299. Kruglov A.G., Nikiforova A.B., Shatalin Y.V., Shubina V.V., Fisyuk A.S., Akatov V.S. Sulfur-containing compounds quench 3,7-dihydro-2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)imidazol[1,2-a]pyrazine-3-one chemiluminescence: discrimination between true antioxidants and quenchers using xanthine oxidase // *Anal. Biochem.*, 2010, v. 406(2), p. 230-232.
300. Mikkola R., Andersson M.A., Grigoriev P., Heinonen M., Salkinoja-Salonen M.S. The toxic mode of action of cyclic lipodepsipeptide fusaricidins, produced by *Paenibacillus polymyxa*, toward mammalian cells // *J. Appl. Microbiol.*, 2017, v. 123(2), p. 436-449.
301. Mikkola R., Andersson M.A., Kredics L., Grigoriev P.A., Sundell N., Salkinoja-Salonen M.S. 20-Residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺ -permeable channels and adverse action towards mammalian cells // *FEBS J.*, 2012, v. 279(22), p. 4172-4190.
302. Apetroaie-Constantin C., Mikkola R., Andersson M.A., Teplova V.V., Suominen I., Johansson T., Salkinoja-Salonen M. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin // *J. Appl. Microbiol.*, 2009, v. 106(6), p. 1976-1985.
303. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev.*, 1999, v. 79(4), p. 1127-1155.

304. Kruglov A.G., Solov'eva M.E., Teplova V.V. Flow cytometry-based assay for the activity of NAD(P)H oxidoreductases of the outer mitochondrial membrane // *Anal. Biochem.*, 2009, v. 395(2), p. 134-143.
305. Brunner M., Moeslinger T., Spieckermann P.G. Regulation of cyclosporin A sensitive mitochondrial permeability transition by the redox state of pyridine nucleotides // *Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 2001, v. 128(1), p. 31-41.
306. Gostimskaya I.S., Grivennikova V.G., Zharova T.V., Bakeeva L.E., Vinogradov A.D. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria // *Anal. Biochem.*, 2003, v. 313(1), p. 46-52.
307. Derouet-Hümbert E., Roemer K., Bureik M. Adrenodoxin (Adx) and CYP11A1 (P450_{scc}) induce apoptosis by the generation of reactive oxygen species in mitochondria // *Biol. Chem.*, 2005, v. 386(5), p. 453-461.
308. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells // *Drug. Metab. Rev.*, 2006, v. 38(1-2), p. 171-196.
309. Lambeth J.D., McCaslin D.R., Kamin H. Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex // *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251(23), p. 7545-7550.
310. Lambeth J.D., Kamin H. Adrenodoxin reductase. Properties of the complexes of reduced enzyme with NADP⁺ and NADPH // *J. Biol. Chem.*, 1976, 251(14), p. 4299-4306.
311. Lambeth J.D., Kamin H. Adrenodoxin reductase and adrenodoxin. Mechanisms of reduction of ferricyanide and cytochrome c // *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252(9), p. 2908-171977.
312. Kareyeva A.V., Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Mitochondrial hydrogen peroxide production as determined by the pyridine nucleotide pool and its redox state // *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, v. 1817, p. 1879-1885.
313. Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex I // *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, v. 1827, p. 446-454
314. Starkov A.A., Chinopoulos C., Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury // *Cell Calcium*, 2004, v. 36(3-4), p. 257-264.
315. Kudin A.P., Bimpong-Buta N.Y., Vielhaber S., Elger C.E., Kunz W.S. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria // *J. Biol. Chem.*, 2004, v. 279(6), p. 4127-4135.
316. Kussmaul L., Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2006, v. 103(20), p. 7607-7612.

317. Tretter L., Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase // *J. Neurosci.*, 2004, v. 24(36), p. 7771-7778.
318. Grivennikova V.G., Kotlyar A.B., Karliner J.S., Cecchini G., Vinogradov A.D. Redox-dependent change of nucleotide affinity to the active site of the mammalian complex I // *Biochemistry*, 2007, v. 46(38), p. 10971–10978.
319. Ohnishi S.T., Shinzawa-Itoh K., Ohta K., Yoshikawa S., Ohnishi T. New insights into the superoxide generation sites in bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I): the significance of protein-associated ubiquinone and the dynamic shifting of generation sites between semiflavin and semiquinone radicals // *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, v. 1797(12), p. 1901-1909.
320. Kurusu K., Ohba K., Arai T., Fukushima K. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07, and F08, produced by *Bacillus polymyxa*. I. Isolation and characterization // *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1987, v. 40(11), p. 1506-1514.
321. Ekman J.V., Kruglov A.G., Andersson M.A., Mikkola R., Raulio M., Salkinoja-Salonen M. Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases the fitness of the producer organism in low-potassium environments // *Microbiology*, 2012, v. 158(4), p. 1106-1116.