

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
Марийский государственный университет

На правах рукописи

Ведерников Александр Андреевич

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ  
Ca<sup>2+</sup>-ЗАВИСИМОЙ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ  
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ  
И ПТИЦ**

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор Самарцев В.Н.

Йошкар-Ола – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Характеристика метаболической активности и потенциальной максимальной продолжительности жизни птиц и млекопитающих .....	11
1.2. Регуляция кальциевого гомеостаза в клетке .....	13
1.2.1. Механизмы депонирования ионов кальция внутри клетки. Роль митохондрий.....	14
1.3. Ионы кальция как индукторы неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий и гибели клеток. ....	15
1.3.1. $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая ЦсА-чувствительная митохондриальная пора.....	17
1.3.2. Влияние окисляющих агентов и разобщителей окислительного фосфорилирования на индукцию $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой митохондриальной поры... ..	21
1.3.3. $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая ЦсА-нечувствительная неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий .....	24
1.4. Особенности индукции $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости в митохондриях, выделенных из различных органов и тканей животных. ....	28
1.5. Видовая специфичность индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий.....	29
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
2.1. Экспериментальные животные.....	34
2.2. Выделение митохондрий.....	34
2.3. Регистрация параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий .....	35
2.4. Оценка набухания митохондрий .....	36
2.5. Оценка проницаемости внутренней мембраны митохондрий для $\text{Ca}^{2+}$ .....	36

2.6. Измерение разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий ( $\Delta\psi$ ) .....	36
2.7. Состав среды инкубации митохондрий .....	37
2.8. Статистическая обработка результатов исследований .....	37
2.9. Реактивы.....	37
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	39
3.1. Характеристика дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени млекопитающих и птиц разных видов.....	39
3.2. Сравнительное исследование индукции $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени млекопитающих и птиц разных видов.....	46
3.3. Изучение кинетики поглощения $\text{Ca}^{2+}$ митохондриями печени млекопитающих и птиц разных видов при индукции ЦсА-чувствительной поры. Кальциевая емкость митохондрий.....	56
3.4. Влияние окисляющего агента ТБГ на индукцию $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях животных разных видов.....	64
3.5. Действие ГДК как индуктора $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц.....	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	80
ВЫВОДЫ .....	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	86

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АДФ – аденозин-5'-дифосфат;

АТФ – аденозин-5'-трифосфат;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ГДК –  $\alpha,\omega$ - гексадекандикарбоновая кислота;

ДНФ – 2,4-динитрофенол;

ЗБП – загорская белогрудая порода цесарок;

КЕ – кальциевая емкость;

МОПС – 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота, буфер;

ПМПЖ – потенциальная максимальная продолжительность жизни;

РК – рутениевый красный;

СКП – серо-крапчатая популяция цесарок;

ТБГ – *трет*-бутилгидропероксид;

Трис – трис-(гидроксиметил)аминометан;

ТФФ<sup>+</sup> – катион тетрафенилфосфония;

ФКФ – *n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразон;

Ф<sub>н</sub> –неорганический фосфат;

ЦсА – циклоспорин А;

ЭГТА – этиленгликоль - бис - (2-аминоэтиловый эфир) - N, N, N', N' - тетрауксусная кислота;

$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  – разность электрохимических потенциалов ионов водорода на внутренней мембране митохондрий;

$\Delta\Psi$  – разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий;

$\Delta pH$  – протонный градиент на внутренней мембране митохондрий.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Хорошо установлено, что митохондрии из различных органов и тканей животных не только обеспечивают клетку АТФ и теплом, но и играют ведущую роль в процессах регуляции ее функций при участии свободного  $\text{Ca}^{2+}$  (Сарис и Карафоли, 2005; Lemasters et al., 2009; Rasola and Bernardi, 2011; Gellerich et al., 2013; Zorov et al., 2014). Также установлено, что изолированные митохондрии в энергизованном состоянии обладают способностью аккумулировать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе (Chalmers and Nicholls, 2003; Lemasters et al., 2009; Rasola and Bernardi, 2011; Zorov et al., 2014).

Максимальный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса этих органелл наблюдается при условии индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны для ионов и растворимых в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да по их градиенту концентрации (открытие митохондриальной поры) (Chalmers and Nicholls, 2003; Lemasters et al., 2009; Скулачев и др., 2010; Rasola and Bernardi, 2011; Siemen and Ziemer, 2013; Zorov et al., 2014). Образование такой поры приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также может вызвать набухание матрикса митохондрий, разрыв внешней мембраны и, как следствие, выход находящихся в межмембранном пространстве цитохрома *c* и других, так называемых, апоптогенных белков (Chalmers and Nicholls, 2003; Lemasters et al., 2009; Скулачев и др., 2010; Rasola and Bernardi, 2011; Siemen and Ziemer, 2013; Zorov et al., 2014). В связи с этим индукция поры внутренней мембраны митохондрий рассматривается как один из факторов гибели клеток при различных патологических состояниях (Lemasters et al., 2009; Скулачев и др., 2010; Malhi et al., 2010; Rasola and Bernardi, 2011; Zorov et al., 2014). Гибель большого количества клеток жизненно важных органов может привести к нарушению их функции, а это, в свою очередь, может быть причиной гибели всего организма (Скулачев и др., 2010; Зоров и др., 2012; Скулачев и др., 2012).

Согласно «классической» гипотезе формирования митохондриальной поры, АДФ/АТФ-антипортер (другое название адениннуклеотидтранслоказа) в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с белком матрикса циклофилином D. Циклоспорин А (ЦсА), специфический блокатор «классической» поры, нарушает его взаимодействие с АДФ/АТФ-антипортером и, тем самым, препятствует открытию поры (Lemasters et al., 2009; Rasola and Bernardi, 2011; Siemen and Ziemer, 2013; Zorov et al., 2014). Было также предположено, что в формировании порового комплекса с циклофилином D принимает участие переносчик фосфата (Leung et al., 2008) и  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза (Bonora et al., 2013; Giorgio et al., 2013). Эффективным природным индуктором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры во внутренней мембране митохондрий печени является неорганический фосфат ( $\text{P}_\text{н}$ ) (Basso et al., 2008; Leung et al., 2008; Varanyuwatana and Halestrap, 2012). Индукция ЦсА-чувствительной поры значительно усиливается при окислительном стрессе (Скулачев и др., 2010; Zorov et al., 2014). Одним из путей моделирования *in vitro* окислительного стресса в изолированных митохондриях является их инкубация с различными окисляющими агентами, в частности, с *трет*-бутилгидропероксидом (ТБГ) (Кожина и Самарцев, 2010; Ronchi et al., 2011; Zorov et al., 2014).

Эффективными природными индукторами  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий являются также свободные монокарбоновые жирные кислоты и их метаболиты, в частности длинноцепочечные  $\alpha,\omega$ -дикарбоновые кислоты (Schönfeld and Bohnensack, 1997; Bodrova et al., 2000; Sultan and Sokolove, 2001a; Sultan and Sokolove, 2001b; Mironova et al., 2004; Белослудцев и др., 2005; Дубинин и др., 2013).

Было установлено, что индукция пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий пальмитиновой и другими насыщенными жирными кислотами, а также  $\alpha,\omega$ -гексадекандикарбоновой кислотой (ГДК) не подавляется ЦсА, и для формирования этой «неклассической» поры  $\text{Ca}^{2+}$  может быть заменен ионами других двухвалентных металлов, например  $\text{Sr}^{2+}$  (Sultan and Sokolove, 2001a; Sultan and Sokolove, 2001b; Mironova et al., 2004; Белослудцев и др., 2005; Дубинин и др., 2013).

Изложенные выше механизмы и пути регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости изучены главным образом на митохондриях печени и сердца лабораторных крыс и мышей (Chalmers and Nicholls, 2003; Basso et al., 2008; Leung et al., 2008; Azzolin et al., 2010; Varanyuwatana and Halestrap, 2012; Bonora et al., 2013; Giorgio et al., 2013), которые характеризуются относительно короткой продолжительностью жизни (Barja, 2002). Имеются лишь фрагментарные данные, свидетельствующие о возможности индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях других видов позвоночных и беспозвоночных животных (Azzolin et al., 2010). Было бы интересно выяснить, каковы особенности индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях животных с большей продолжительностью жизни, чем продолжительность жизни крыс и мышей.

Одним из важнейших, закрепленных генетически биологических признаков, характеризующих разные виды животных, является потенциальная максимальная продолжительность жизни (ПМПЖ), т.е. обобщенная величина продолжительности жизни особей данного вида, достигнутая при идеальных условиях их существования (Barja, 2002; Hulbert et al., 2007). Известно, что ПМПЖ кроликов значительно больше, чем крыс (12 лет и 4 года соответственно) (Barja, 2002). Птицы по сравнению с млекопитающими одинаковой массы тела характеризуются более интенсивным метаболизмом, более высокой температурой тела и большей ПМПЖ (Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007; Furness and Speakman, 2008). Так, например, ПМПЖ голубей составляет 35 лет, что в 8 раз больше ПМПЖ крыс (Montgomery et al., 2011). Однако до сих пор отсутствуют данные о механизме и пути регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях жизненно важных органов птиц. Наряду с голубями наше внимание привлекли птицы отряда курообразных (*Galliformes*) цесарки (*Numida meleagris*) серо-крапчатой популяции (СКП). Эта популяция цесарки является исходной, «дикой», разводится в племенных хозяйствах в качестве резервного генофонда (Забиякин, 2005). Домашние породы цесарки, в частности загорской белогрудой породы (ЗБП), отличаются от исходной популяции генетически и характеризуются более высокими продуктивными качествами (Забиякин, 2005).

**Цель работы:** сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации митохондрий печени разных видов млекопитающих (мыши, крысы и кролики) и птиц (голуби, цесарки СКП и цесарки ЗБП).

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Определить, каковы особенности окислительного синтеза АТФ и свободного окисления в митохондриях печени указанных млекопитающих и птиц.

2. Выяснить, имеется ли в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей ЦсА-чувствительный механизм индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, как в митохондриях печени млекопитающих.

3. Оценить кинетику транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями печени указанных животных при индукции ЦсА-чувствительной поры. Определить связано ли различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ в митохондриях печени животных разных видов.

4. Выяснить, как влияет окисляющий агент ТБГ на индукцию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени указанных животных.

5. Исследовать действие ГДК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц. Определить связано ли различие в резистентности к действию ГДК с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ в митохондриях печени животных разных видов.

**Научная новизна работы.** Впервые установлено, что в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей имеется ЦсА-чувствительный механизм индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, как в митохондриях печени млекопитающих – крыс, мышей и кроликов. При этом митохондрии печени указанных птиц по сравнению с митохондриями печени млекопитающих обладают большей резистентностью к действию  $\text{Ca}^{2+}$  и окисляющего агента ТБГ как к индукторам ЦсА-чувствительной поры. Показано, что митохондрии печени голубей, в отличие от митохондрий печени млекопитающих и цесарок, не

способны эффективно поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе. Установлена специфика в эффективности действия  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии  $\Phi_n$  как индуктора ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени животных разных видов (мыши, крысы, кролики и цесарки), в том числе в условиях действия окисляющего агента ТБГ. Впервые дана оценка индукции ГДК  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий печени мышей, кроликов, голубей, цесарок СКП и цесарок ЗБП. Показано, что в митохондриях печени животных указанных видов различия в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры и к ГДК как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации не связано с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ.

**Научно-практическое значение работы.** Работа имеет, прежде всего, значение для фундаментальной науки в области эволюционной биохимии и биоэнергетики. Результаты исследований используются в учебном процессе в Марийском государственном университете. Новые знания, полученные при выполнении диссертации, позволят лучше понять связанные с функционированием митохондрий механизмы, определяющие различия в видовой продолжительности жизни гомойотермных животных. Знание таких механизмов, в свою очередь, будет способствовать разработке новых подходов к лечению связанных с нарушением функционирования митохондрий возрастных патологий у пожилых людей, а также патологий, возникающих при воздействии на организм экстремальных факторов окружающей среды.

**Основные научные положения, выносимые на защиту.**

1. Митохондрии печени птиц: голубей, цесарок СКП и цесарок ЗБП по сравнению с митохондриями печени млекопитающих: крыс, мышей и кроликов обладают большей резистентностью к действию  $\text{Ca}^{2+}$  и окисляющего агента ТБГ как к индукторам ЦсА-чувствительной поры.

2. Митохондрии печени голубей, в отличие от митохондрий печени указанных млекопитающих и цесарок, не способны эффективно поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе и обладают наибольшей резистентностью к индукторам ЦсА-чувствительной поры и к ГДК как к индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны.

3. В митохондриях печени животных указанных видов различия в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры и к ГДК как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации не связаны с особенностями функционирования системы окислительного синтеза АТФ.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Характеристика метаболической активности и потенциальной максимальной продолжительности жизни птиц и млекопитающих

Одним из важнейших генетически закрепленных биологических признаков является потенциальная максимальная продолжительность жизни (ПМПЖ), или, другими словами, обобщенная величина продолжительности жизни особей данного вида, достигнутая при идеальных условиях их существования (Varja, 2002; Hulbert et al., 2007; Hulbert, 2010). В начале XX века в исследованиях Рубнера и Перла было показано, что более крупные и имеющие относительно низкую температуру тела животные характеризуются большей продолжительностью жизни, которая в свою очередь является функцией двух переменных – генетических предпосылок и скорости метаболизма (см. обзор Speakman, 2005). В настоящее время показано, что скорость метаболизма различных видов млекопитающих увеличивается пропорционально массе тела с показателем степени 0,67-0,76 (Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007).

Масс-специфическая скорость метаболизма, то есть скорость, отнесенная к единице массы тела, снижается при увеличении массы тела млекопитающих, и эта зависимость в двойных логарифмических координатах представлена в виде прямой (Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007). Птицы по сравнению с млекопитающими одинаковой массы тела характеризуются более интенсивным метаболизмом и более высокой температурой тела. Вместе с тем зависимость скорости метаболизма от массы тела разных видов птиц подчиняется такой же закономерности, что и у млекопитающих (Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007). Однако, при этом многие виды птиц характеризуются большей ПМПЖ, чем виды млекопитающих с соответственно одинаковой массой тела. Для различных видов млекопитающих и птиц показано, что снижение масс-специфической скорости метаболизма коррелирует с увеличением ПМПЖ (Hulbert et al., 2007; Hulbert, 2010).

В 50-е годы XX века благодаря фундаментальным работам Гершмана и Харманна получила широкое развитие так называемая «свободнорадикальная теория старения». В основе ее лежит гипотеза о старении клеток организма под действием эндогенных свободнорадикальных процессов, повреждающих молекулы ДНК и мембраны органелл и клеток. Одну из ведущих ролей в этих процессах отводят митохондриям (Furness, Speakman, 2008).

Известно, что уровень генерации активных форм кислорода (АФК) в митохондриях коррелирует со скоростью процессов старения организма, и показано, что для долгоживущих видов по сравнению с короткоживущими характерен низкий уровень образования АФК в митохондриях (Varja, 2002). Наиболее значительным местом образования АФК в митохондриях является электронно-транспортная цепь. Таким образом, можно предположить, что высокий уровень метаболизма требует высокого потребления кислорода митохондриями и образования АТФ, что в свою очередь ведет к увеличенному образованию АФК в митохондриях (Varja, 1999; Furness, Speakman, 2008).

Тем не менее, несмотря на высокую скорость потребления кислорода, для птиц характерен относительно низкий уровень образования АФК в митохондриях. Крупные млекопитающие, и в то же время относительно небольшой массы тела птицы, имеют низкий уровень образования АФК в митохондриях, при том, что последние характеризуются гораздо большей скоростью метаболизма и температурой тела (Varja, 2002). Также показано, что митохондрии различных органов птиц и млекопитающих образуют относительно схожие количества первичных АФК, которые активно компенсируются действием антиоксидантных систем (Montgomery, 2011).

Очевидно, что необходим поиск и анализ других физиологических механизмов, более полно отражающих участие митохондрий в гибели клеток, и как следствие, в определении потенциальной максимальной продолжительности жизни вида.

## 1.2. Регуляция кальциевого гомеостаза в клетке

Ионы кальция являются важными универсальными внутриклеточными регуляторными молекулами, запускающими широкий спектр клеточных ответов (Carafoli et al., 2001; Berridge, 2012).

Несмотря на то, что кальций входит в число наиболее распространенных химических элементов в живом организме, концентрация его в цитоплазме клеток достаточно невелика. Это объясняется тем, что большая часть всего кальция содержится в костной ткани, другая же часть ионов кальция находится внутри клеток в ассоциированном с белками и низкомолекулярными веществами состоянии (Левицкий, 1990; Пермяков, 2012).

Стоит отметить, что концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме интактных клеток и межклеточной среде существенно различается – по приблизительным оценкам эти величины составляют  $10^{-7}$  М и  $10^{-3}$  М соответственно. Таким образом, очевидно, что благодаря относительно низкой концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток и существованию высокого концентрационного градиента на мембранах, этот ион играет ключевую роль в жизнедеятельности живых организмов (Blinks et al., 1982; Левицкий, 1990; Гусев, 1998; Cheng et al., 2006; Duszyński et al., 2006).

Для поддержания и регуляции уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке, помимо различного рода кальций-связывающих белков, существуют системы входа, выхода, а также депонирования этих ионов. Вход ионов кальция обусловлен наличием большого электрохимического градиента на мембране клеток и реализуются благодаря наличию специальных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (Berridge et al., 2003; Brini et al., 2013). К основным и наиболее изученным относятся потенциал зависимые каналы (voltage-operated channels, VOC) плазматической мембраны шести типов (L, N, P, Q, R и T), отличающихся проводимостью и чувствительностью к фармакологическим препаратам (Reuter, 1985; Terlau and Stühmer, 1998; Brini et al., 2013); рецептор-управляемые каналы (receptor-operated channels, ROC), активируемые по рецептор-опосредованному пути при взаимодействии с лигандами – инозитол-

1,4,5-трифосфатом, L-глутаматом, циклическими нуклеотидами, арахидоновой кислотой и другими (Mignen and Shuttleworth, 2000; Berridge et al., 2003; Brini et al., 2013); кальциевые каналы, регулируемые высвобождением депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry channels, SOCE), которые сопряжены с работой внутриклеточных депо, в первую очередь с эндоплазматическим ретикуломом (Putney, 1986; Noth and Penner, 1992; Krause et al., 1996; Brini et al., 2013).

Выход ионов кальция из цитоплазмы клеток осуществляется благодаря наличию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы плазматической мембраны (PMCA),  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA) и мембраны комплекса Гольджи (SPCA), а также мембранного  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменника (Forstea et al., 2001; Berridge et al., 2003; Gomez-Villafuertes et al., 2007; Brini et al., 2013).

В депонировании ионов кальция в клетке принимают участие такие органеллы, как митохондрии и эндоплазматический ретикулум (Carafoli et al., 2001; Berridge, 2002; Carafoli, 2003; Duszyński et al., 2006).

### **1.2.1. Механизмы депонирования ионов кальция внутри клетки. Роль митохондрий**

Митохондрии и эндоплазматический ретикулум участвуют в гомеостазе  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клетки, и тем самым являются важными звеньями в регуляции внутриклеточных сигнальных путей (Kato and Nishitoh, 2015). Было отмечено, что по приблизительным оценкам от 5 до 20% митохондриальной поверхности непосредственно контактирует с эндоплазматическим ретикуломом. Эти участки тесного контакта между органеллами называются митохондрией-ассоциированные мембраны эндоплазматического ретикулума (mitochondria-associated ER membrane; MAM) (Rizzuto et al., 1998; Csordás et al., 2006).

Взаимодействие между митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом реализуется благодаря белкам наружной мембраны митохондрий – митофузинам 1 и 2 (MFN1 и MFN2) и гомологичным белкам MFN2 на мембране эндоплазматического ретикулума (De Brito and Scorrano, 2008). Подобные

контакты образуются также между рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата эндоплазматического ретикулула и потенциал-зависимыми анионными каналами внешней мембраны митохондрий VDAC1 через молекулярный шаперон глюкозорегулируемый белок 75 (Grp75), что помимо связывания также позволяет осуществлять транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии из эндоплазматического ретикулула (Szabadkai et al., 2006; Tubbs et al., 2014). Показано, что МАМ участвуют в регуляции энергетического метаболизма, липидном обмене и поддержании гомеостаза кальция (Ozcan et al., 2004; Fu et al., 2011; Vial et al., 2011; Tubbs et al., 2014; Kato and Nishitoh, 2015).

Известно, что способность поглощать и удерживать ионы кальция митохондриями существенно выше емкости эндоплазматического ретикулула (Carafoli, 1987; Carafoli et al., 2001; Kato and Nishitoh, 2015). С другой стороны, сродство транспортирующих систем митохондрий к ионам кальция и скорость их переноса значительно ниже, чем у аналогичных систем эндоплазматического ретикулула (Nicholls, 1978; Carafoli et al., 2001; Kato and Nishitoh, 2015). Данные функциональные особенности митохондрий, по всей видимости, свидетельствуют о том, что эти органеллы начинают аккумулировать ионы кальция только при достаточно высокой его концентрации в клетке, и таким образом играют роль «критического» емкостного депо для избытка внутриклеточного свободного кальция (Carafoli, 1987; Carafoli et al., 2001; Kato and Nishitoh, 2015).

### **1.3. Ионы кальция как индукторы неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий и гибели клеток**

Митохондрии являются важными внутриклеточными депо, участвующими в поддержании кальциевого гомеостаза внутри клетки. В исследованиях различных авторов показано, что перегрузка митохондрий ионами кальция может привести к индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий, или, другими словами, открытию неселективной высокопроводящей

митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) (Hunter et al., 1976; Zoratti and Szabo, 1995; Crompton, 1999; Rasola and Bernardi, 2007).

Образование mPTP приводит к высокоамплитудному набуханию матрикса митохондрий за счет значительного поступления в него по градиенту концентрации ионов и растворенных в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да, и, как следствие, разрыву внешней мембраны и выходу находящихся в межмембранном пространстве проапоптогенных белков (Lemasters et al., 2009; Rasola and Bernardi, 2011). Помимо этого наблюдается деполяризация внутренней мембраны митохондрий, ингибирование окислительного фосфорилирования и стимуляция гидролиза АТФ (Halestrap et al., 2002). Индукцию неспецифической поры внутренней мембраны митохондрий рассматривают как один из основных путей запуска гибели клеток по механизмам апоптоза и некроза, а также достаточно хорошо известна ее роль в развитии таких заболеваний и патологических состояний, как ишемия-реперфузия, нейродегенеративные заболевания, болезней печени и ряде других патологий (Bernardi et al., 2006; Kroemer et al., 2007; Fernández-Morales et al., 2012; Guicciardi et al., 2013).

В работах ряда авторов показано, что для индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны уже достаточно избыточной аккумуляции ионов кальция (Zoratti and Szabo, 1995; Rasola and Bernardi, 2011), однако, действие ионов кальция на митохондрии может быть значительно усилено коиндукторами поры, например такими, как окислительный стресс, уменьшение пула адениновых нуклеотидов, повышенная концентрация неорганического фосфата и деполяризация внутренней мембраны митохондрий (Halestrap et al., 2002; Rasola and Bernardi, 2011).

Помимо коиндукторов открытия митохондриальной поры в конце 80-х годов XX века была обнаружена способность циклического ундекапептида циклоспорина А (ЦсА), используемого в качестве иммунодепрессанта, ингибировать открытие поры во внутренней мембране митохондрий (Fournier et al., 1987; Crompton et al., 1988; Broekemeier et al., 1989; Solem and Wallace, 1993). Однако в относительно недавних исследованиях было показано наличие

митохондриальных пор, нечувствительных к ингибирующему действию ЦсА (Sultan and Sokolove, 2001a; Sultan and Sokolove, 2001b; Mironova et al., 2001). Исходя из вышеупомянутых данных, можно выделить как минимум два основных типа неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий – так называемую «классическую» ЦсА-чувствительную и ЦсА-нечувствительную поры (Sultan and Sokolove, 2001a; Sultan and Sokolove, 2001b).

### **1.3.1. $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая ЦсА-чувствительная митохондриальная пора**

Первые представления о возможности образования неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий были сформированы еще во второй половине XX века, когда была показана возможность индукции высокоамплитудного набухания этих органелл при добавлении высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  к суспензии, содержащей неорганический фосфат или анионы жирных кислот, влияние этого процесса на энергетические функции митохондрий, а также возможность ингибирования подобного набухания ионами магния, адениновыми нуклеотидами и снижением pH среды инкубации (Raaflaub, 1953; Brenner-Holzach and Raaflaub, 1954; Hunter and Ford, 1955; Lehninger, 1959; Wojtczak and Lehninger, 1961). Первое время после обнаружения этого процесса преобладало мнение, что подобное набухание митохондрий является лишь следствием специфики методик выделения и инкубации органелл, а также не имеет никакого практического патофизиологического смысла (Hunter and Ford, 1955; Bernardi et al., 2013).

Однако в то же время Pfeiffer и его коллеги обратили внимание на повреждающее действие высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  на митохондрии коры надпочечников, и эти результаты совпали с исследованиями Виноградова и соавторов, которые описали кальций-зависимый выход из матрикса этих органелл пиридиновых нуклеотидов (Vinogradov et al., 1972; Pfeiffer et al., 1976). Эти и другие работы различных авторов в итоге способствовали формированию представлений о неспецифической митохондриальной поре, которая была описана

Hunter и Haworth (Hunter et al., 1976; Hunter and Haworth, 1979a; Haworth and Hunter, 1979b; Haworth and Hunter, 1979). В конечном итоге чуть менее 30 лет назад была выдвинута, а вскоре и подтверждена гипотеза о важной роли  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической поры внутренней мембраны митохондрий в процессах клеточной гибели, однако исследования механизмов и роли митохондриальной поры в патологических процессах не прекращаются и до сих пор (Crompton and Costi, 1988; Bernardi et al., 2006; Bernardi et al., 2013).

Молекулярные механизмы образования и функционирования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической поры внутренней мембраны митохондрий до сих пор являются объектом широкого обсуждения (Bernardi, 2013; Siemen and Ziemer, 2013). В настоящее время наиболее устоявшейся и общепринятой является гипотеза о том, что ЦсА-чувствительная  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая неспецифическая пора представлена комплексом белков внешней и внутренней мембраны митохондрий, формирующих потенциал-зависимый высокопроводящий канал диаметром до 3 нм, регулируемый рядом физиологических модуляторов (Zoratti et al., 2005; Rasola and Bernardi, 2007). Считается, что в образовании митохондриальной поры принимают участие потенциал-зависимый анионный канал внешней мембраны (VDAC), АДФ/АТФ-антипортер (аденилаттранслокатор, ANT) внутренней мембраны митохондрий, чувствительный к ЦсА белок циклофилин D (пептидил пролил-цис, транс-изомераза, Cyp D) (Halestrap et al., 1998; Halestrap et al., 2002), а также ряд регуляторных белков и рецепторов, таких как, например, гексокиназа II (HK II), креатинкиназы, гликоген-синтаза-киназа  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), периферический бензодиазепиновый рецептор и белки семейства Bcl-2 (McEneaney et al., 1992; Marzo et al., 1998; Kroemer et al., 2007; Rasola and Bernardi, 2014). Предполагается, что такая пора пронизывает обе митохондриальные мембраны и образуется в области так называемых контактных сайтов, то есть специализированных структур, где наружная и внутренняя мембраны митохондрий образуют тесные контакты, опосредованные белок-белковыми взаимодействиями (Kottke et al., 1988; Zamzani and Kroemer, 2001; Di Paola and Lorusso, 2006; Bernardi, 2013).

Согласно этой гипотезе АДФ/АТФ-антипортер играет ведущую роль в формировании митохондриальной поры, а также принимает непосредственное участие в ее образовании. Эти данные базируются на исследованиях, демонстрирующих модулирующее действие лигандов АДФ/АТФ-антипортера на индукцию поры в митохондриях – так, например, атрактилат, ингибитор АДФ/АТФ-антипортера, стабилизирует его в конформации «с», и способствует открытию поры, в то время как другой ингибитор – бонгрековая кислота, стабилизирует его в конформации «т» и тем самым вызывает закрытие поры (Schultheiss and Klingenberg, 1984; Halestrap and Brenner, 2003; Bernardi et al., 2006). Однако в настоящее время существуют исследования, ставящие по сомнению необходимость АДФ/АТФ-антипортера для формирования митохондриальной поры. На препарате митохондрий, лишенных всех изоформ АДФ/АТФ-антипортера было показано, что индукция кальций-зависимой неспецифической проницаемости все же возможна (Kokoszka et al., 2004).

Как было упомянуто выше, еще одним элементом неспецифической  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры является потенциал-зависимый анионный канал внешней мембраны митохондрий (VDAC). В экспериментах на митохондриях, лишенных внешней мембраны (митопластах) была показана невозможность индукции неспецифической поры (Lê-Quôc and Lê-Quôc, 1985). В подтверждение участия потенциал-зависимых анионных каналов внешней мембраны митохондрий в индукции неспецифической поры свидетельствуют и результаты исследований различных авторов, показывающих, что встраивание VDAC в плоские фосфолипидные мембраны образует каналы с диаметром 2,5-3 нм, которые имеют электрофизиологические свойства, достаточно схожие с кальций-зависимой неспецифической митохондриальной порой (Szabó and Zoratti, 1993; Szabó et al., 1993). Отмечено, что свойства данных потенциал-зависимых анионных каналов модулируются также, как у митохондриальной поры (Bernardi et al., 2006), в том числе, посредством добавления НАДН (Zizi et al., 1994), ионов кальция (Gincel et al., 2001), глутамата (Gincel and Shoshan-Barmatz, 2004), а также путем связывания гексокиназой (Pastorino et al., 2002; Majewski et al., 2004). В то же время

существуют работы, ставящие под сомнение важность участия потенциал-зависимый анионный канал внешней мембраны митохондрий для индукции поры (Krauskopf et al., 2006; Baines et al., 2007).

Не менее важную роль в формировании ЦсА-чувствительной митохондриальной поры играет и белок циклофилин D. Показано, что данный белок образует единый комплекс с АДФ/АТФ-антипортером и потенциал-зависимым анионным каналом внешней мембраны митохондрий, где, проявляя *цис-транс*-изомеразную активность, может катализировать переход из «*t*» в «*c*» конформацию АДФ/АТФ-антипортера, тем самым вызывая открытие митохондриальной поры (Crompton et al., 1998; Halestrap et al., 2002). Именно циклофилин D является звеном митохондриальной поры, чувствительной к ЦсА, к которому он имеет высокое сродство (McGuinness et al., 1990; Bernardi et al., 2006).

В данном случае эффект ЦсА может быть точнее охарактеризован как десенсибилизация поры к ионам кальция, а не ее ингибирование, поскольку в ряде экспериментов было показано, что дальнейшее повышение концентрации ионов кальция все же приводит к индукции поры (Bernardi et al., 1992; Bernardi et al., 2006). При искусственной инактивации гена *Ppif*, который кодирует циклофилин D в митохондриях мышей, было показано, что отсутствие данного белка примерно вдвое увеличивает количество ионов кальция, необходимого для индукции митохондриальной поры, что сопоставимо с действием ЦсА, который в то же время не оказывал никакого влияния на *Ppif*<sup>-/-</sup> митохондрии. На основании этих и подобных экспериментальных данных некоторые исследователи делают выводы о том, что циклофилин D является скорее не компонентом митохондриальной поры, а ее регулятором (Baines et al., 2005; Basso et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Schinzel et al., 2005; Bernardi et al., 2006).

Предложено несколько альтернативных механизмов индукции митохондриальной поры. В частности, предполагается возможность участия в индукции митохондриальной поры фосфатного переносчика, образующего гетеродимер с АДФ/АТФ-антипортером, который связывается с циклофилином D

и кальцием (Leung and Halestrap, 2008; Leung et al., 2008; Varanyuwatana and Halestrap, 2012). Однако ряд исследователей считают данную гипотезу маловероятной и нуждающейся в дальнейшем изучении (Bernardi, 2013). Была предложена другая модель, согласно которой пора формируется вследствие агрегации интегральных мембранных белков, структура которых нарушена действием окислителей и других стрессорных агентов (Kowaltowski et al., 2001; He and Lemasters, 2002). В ряде недавних исследований были приведены данные, демонстрирующие, что в митохондриях возможно открытие поры по механизму, включающему участие димеров  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы, которые, как оказалось, способны образовывать каналы во внутренней мембране органелл, по своим проводящим свойствам напоминающие классическую ЦсА-чувствительную пору (Bonora et al., 2013; Bernardi, 2013).

Стоит также особенно отметить тот факт, что «классическая» ЦсА-чувствительная митохондриальная пора обладает абсолютной специфичностью к  $Ca^{2+}$ , поскольку другие двухвалентные катионы ( $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) действуют как ингибиторы (Zoratti and Szabo, 1995; Bernardi et al., 2006).

### **1.3.2. Влияние окисляющих агентов и разобщителей окислительного фосфорилирования на индукцию $Ca^{2+}$ -зависимой митохондриальной поры**

Ранее Ленинджер с соавторами продемонстрировали, что на индукцию нечувствительного к рутениевому красному выхода ионов кальция из матрикса митохондрий оказывает существенное влияние окисление пиридиновых нуклеотидов. В свою очередь, восстановление НАД и НАДФ ингибировало данный процесс (Lehninger et al., 1978). Было высказано предположение, что механизмы входа и выхода ионов кальция в митохондриях могут регулироваться путем изменения окислительно-восстановительного состояния пиридиновых нуклеотидов (Lehninger et al., 1978).

Позднее была показана возможность управления индукцией неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий за счет

изменения окислительно-восстановительного состояния пиридиновых нуклеотидов, причем отмечается, что окисление НАДФН связано в большей мере с индукцией митохондриальной поры по сравнению с НАДН (Vercesi, 1984; Bernardes et al., 1994; Zago et al., 2000; Kowaltowski et al., 2001). Эти и другие подобные экспериментальные данные позволили положить начало формированию представлений о влиянии окислительного стресса на индукцию неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий (Takeyama et al., 1993; Kowaltowski et al., 2001).

Состояние пиридиновых нуклеотидов тесно связано с окислительно-восстановительным статусом глутатиона, тиоредоксина и тиоловых (SH-) групп белков митохондриальных мембран (Le Quoc et al., 1976; Kowaltowski et al., 2001). Таким образом, существуют логичные предположения, что неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий может быть связана с окислительно-восстановительным состоянием мембранных белков и их тиоловых групп (Kowaltowski et al., 2001).

Действительно, индукторы окислительного стресса, такие, например, как ТБГ, диамид, менадион способны индуцировать неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий (Rizzuto et al., 1987; Castilho et al., 1995; Kakkar et al., 1996; Vercesi et al., 1997; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001; Zavodnik et al., 2012). Добавление гидропероксидов вызывает выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса и падение  $\Delta\psi$ , которое происходит в две фазы – первая протекает быстро и не чувствительна к АТФ (происходит, по-видимому, вследствие активации трансгидрогеназ); вторая происходит медленно и существенно ингибируется АТФ, и связана с активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых реакций. Одновременно со второй, медленной, фазой падения  $\Delta\psi$  наблюдается выход ионов калия из матрикса митохондрий и их набухание. Диамид и менадион также вызывают падение мембранного потенциала, выход ионов калия и кальция из матрикса и набухание митохондрий; их эффекты также ингибировались АТФ, ЦсА и анестетиком нуперкаинном – ингибитором митохондриальной фосфолипазы А (Rizzuto et al., 1987; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001).

Также происходит окисление глутатиона и перекисное окисление липидов мембран (Zavodnik et al., 2012). Действие гидроперекисей и диамида сопровождается обратимым окислением пиридиновых нуклеотидов, однако, при их высоких концентрациях, а также при добавлении менадиона, окисление приобретает необратимый характер (Rizzuto et al., 1987; Castilho et al., 1995; Kakkar et al., 1996; Vercesi et al., 1997; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001; Zavodnik et al., 2012).

Добавление высоких концентраций ионов кальция усиливает действие прооксидантов, также аналогичное действие могут оказывать и ионы стронция. Внесение к митохондриям рутениевого красного перед добавлением гидроперекисей способно уменьшить степень активности «медленной» фазы падения  $\Delta\psi$ , но не влияет на первую, «быструю» фазу и выход ионов кальция из матрикса митохондрий (Rizzuto et al., 1987; Vercesi et al., 1997; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001). С другой стороны, известно и об ингибирующем действии рутениевого красного на набухание, индуцированное ТБГ (Kakkar et al., 1996). Действие гидроперекисей и диамида сопровождается обратимым окислением пиридиновых нуклеотидов, однако, при их высоких концентрациях, а также при добавлении менадиона, окисление приобретает необратимый характер (Rizzuto et al., 1987; Vercesi et al., 1997; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001).

В качестве ингибиторов индуцированной прооксидантами неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий также могут выступить ионы лантана, токоферол, дитиотреитол, АДФ, АТФ, ЭГТА, ЭДТА (Rizzuto et al., 1987; Vercesi et al., 1997; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001).

Таким образом, можно заключить, что действие прооксидантов как индукторов неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий не вызывает сомнений. В основе предполагаемого механизма действия индукторов окислительного стресса лежит их способность окислять SH-остатки цистеина АТФ/АДФ антипортера, тем самым стабилизируя его в «с» конформации, подобно атрактилату, и тем самым способствовать открытию

митохондриальной поры (Halestrap et al., 1997; McStay et al., 2002; Pestana et al., 2009).

Помимо индукторов окислительного стресса на открытие митохондриальной поры оказывают большое влияние протонный градиент  $\Delta pH$  и разность мембранных потенциалов  $\Delta\psi$  – к примеру, деполяризация митохондриальной мембраны приводит к ее индукции, в то время как закисление матрикса, напротив, способствует ее закрытию (Bernardi, 1992; Bernardi et al., 1992). В рамках механистического подхода к действию различных индукторов и ингибиторов поры, предполагается, что их действие может быть опосредовано как раз изменением этих двух параметров (Bernardi et al., 1994; Bernardi, 1996).

Показано, что разобщители окислительного фосфорилирования, например, *n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразон (ФКФ), способны индуцировать неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий (Petronilli et al., 1993; Scorrano et al., 1997). С одной стороны, предполагается, что их действие заключается в снижении мембранного потенциала; по другой версии, разобщители окислительного фосфорилирования вызывают значительное усиление дыхания, что приводит к увеличению продукции АФК митохондриями (Petronilli et al., 1993; Scorrano et al., 1997). Следовательно, механизмы действия окислительного стресса и разобщителей окислительного фосфорилирования как индукторов митохондриальной поры имеют общие точки пересечения и могут выступать как взаимосвязанные процессы.

### **1.3.3. $Ca^{2+}$ -зависимая ЦсА-нечувствительная неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий**

Известны различные индукторы  $Ca^{2+}$ -зависимой проницаемости внутренней мембраны митохондрий, действие которых не подавляется ЦсА. Среди них бутилированный гидрокситолуол, сигнальные пептиды, гормон тироксин (Sokolove and Haley, 1996; Sokolove and Kinnally, 1996; Sultan and Sokolove,

2001a). Было высказано предположение, что, в частности, бутилированный гидрокситолуол активирует ЦсА-нечувствительную  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую пору внутренней мембраны митохондрий путем увеличения активности фосфолипазы  $\text{A}_2$ , что вызывает накопление свободных жирных кислот и лизофосфолипидов (Gudz et al., 1997; Sultan and Sokolove, 2001a). В тоже время стоит отметить, что свободные жирные кислоты также способны индуцировать и «классическую» ЦсА-чувствительную митохондриальную пору за счет взаимодействия с АДФ/АТФ антипортером в присутствии ионов кальция (Bodrova et al., 2000).

Действие свободных жирных кислот, как индукторов неспецифической проницаемости митохондрий было известно еще с середины XX века (Lehninger and Remmert, 1959; Wojtczak and Lehninger, 1961; Ленинджер, 1966; Hunter et al., 1976), однако лишь относительно недавно было сформировано представление об их роли в образовании отличного от «классического» по механизму и путям регуляции принципиально нового типа  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий (Mironova et al., 2001; Sultan and Sokolove, 2001a; Sultan and Sokolove, 2001b; Agafonov et al., 2003; Mironova et al., 2004; Белослудцев и др. 2005).

Свободные монокарбоновые насыщенные жирные кислоты (пальмитиновая и другие насыщенные жирные кислоты) известны как эффективные природные индукторы неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий (Schönfeld and Bohnensack, 1997; Bodrova et al., 2000; Sultan and Sokolove, 2001a; Sultan and Sokolove, 2001b; Mironova et al., 2004; Белослудцев и др., 2005). Для ее индукции, также как и в случае формирования ЦсА-чувствительной поры, необходимо присутствие в матриксе митохондрий достаточного количество ионов кальция, что подтверждается в экспериментах с ингибированием кальциевого унипортера рутениевым красным, добавлением в среду инкубации реагентов, способных связывать ионы кальция, например ЭГТА, АТФ, сывороточного альбумина, при деэнергизации внутренней мембраны митохондрий, когда во всех этих случаях из-за невозможности транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс не наблюдалось набухания этих органелл (Sultan and Sokolove, 2001a; Белослудцев и др., 2005).

В отличие от «классической» ЦсА-чувствительной поры, индуцированная свободными жирными кислотами ЦсА-нечувствительная неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий не обладает строгой селективностью к двухвалентным ионам металлов, которые способны переноситься кальциевым унипортером, как к активаторам поры (Sultan and Sokolove, 2001a). Показано, что ионы  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  в присутствии пальмитиновой кислоты также способны индуцировать митохондриальную пору, однако с меньшей эффективностью. И в то же время ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , являющиеся ингибиторами кальциевого унипортера и не способные к транспортировке им, такой способностью не обладают (Gunter and Pfeiffer, 1990; Sultan and Sokolove, 2001a; Белослудцев и др., 2005).

В ряде экспериментов была продемонстрирована способность ЦсА-нечувствительной поры к самопроизвольному закрытию (Sultan and Sokolove, 2001a; Agafonov et al., 2003), и было предположено, что таким образом митохондрии могут осуществлять контроль кальциевого обмена в клетке (Mironova et al., 2007).

Показано, что насыщенные жирные кислоты, имеющие относительно среднюю длину углеродной цепи (12-18 атомов углерода) вызывали более эффективное набухание митохондрий, по сравнению с более короткоцепочечными и длинноцепочечными кислотами (Sultan and Sokolove, 2001b). Некоторые ненасыщенные жирные кислоты, например олеиновая, также способны индуцировать ЦсА-нечувствительную неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий, однако действие их реализуется при значительно больших концентрациях, по сравнению с насыщенными, и требует значительно большей концентрации ионов кальция в матриксе митохондрий (Belosludtsev et al., 2014).

В экспериментах на модельных липосомах достаточно убедительно продемонстрировано, что ЦсА-нечувствительная пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная митохондриальная пора имеет липидную природу, в основе которой лежит образование комплексов жирных кислот с ионами кальция. Предполагается, что

такая пора реализуется по механизму хемотропного фазового перехода в липидном бислое (Agafonov et al., 2003; Agafonov et al., 2007).

Показано также, что и метаболиты свободных жирных кислот, образующихся, в частности, в процессе  $\omega$ -окисления, способны индуцировать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую неспецифическую ЦсА-нечувствительную проницаемость внутренней мембраны митохондрий и липосом (Дубинин и др., 2013; Dubinin et al., 2014). В норме  $\omega$ -окисление занимает не более 10% от общего метаболизма свободных жирных кислот, однако при ряде патологических состояний, например, при диабете, ожирении, голодании, алкоголизме, некоторых заболеваниях печени, доля этого процесса может существенно возрасти, что приводит к накоплению  $\alpha, \omega$ -дикарбоновых жирных кислот в клетках (Tonsgard, 1986; Mortensen, 1992; Reddy, 2001; Reddy and Rao, 2006; Madec et al., 2011; Wanders et al., 2011).

В относительно недавних исследованиях было выявлено, что наибольшей эффективностью по сравнению с более короткоцепочечными дикарбоновыми жирными кислотами обладает ГДК (Дубинин и др., 2013). Индуцированная данной кислотой митохондриальная пора способна к самопроизвольному закрытию, и ингибируется добавлением в инкубационную среду адениновых нуклеотидов, ионов магния, спермина, бычьего сывороточного альбумина (Дубинин и др., 2013). В экспериментах на митохондриях и липосомах было показано, что действие дикарбоновых жирных кислот, по всей видимости, реализуется по отличному от монокарбоновых жирных кислот пути. Предполагается, что индукция неспецифической ЦсА-чувствительной кальций-зависимой митохондриальной поры ГДК реализуется по механизму полиморфного фазового перехода (Dubinin et al., 2014).

Подводя итог рассмотренной выше роли митохондрий во внутриклеточном кальциевом гомеостазе и участии в реализации гибели клеток, стоит отметить, что, несмотря на значительное количество исследований в данной области, природа и механизмы митохондриальной поры до сих пор до конца не известны. В настоящее время ведется активный поиск веществ, способных повышать

кальциевую емкость органелл и влиять на параметры индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий. Модуляция митохондриального гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  и механизмов регуляции митохондриальной поры является важным потенциальным объектом исследования в области биохимии, биофизики, фармакологии и медицины.

#### **1.4. Особенности индукции $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости в митохондриях, выделенных из различных органов и тканей животных**

Кроме исследований, проведенных на митохондриях печени, существует ряд работ, демонстрирующих возможность индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны органелл в других различных органах и тканях. На митохондриях сердца крыс показано, что они характеризуются большей устойчивостью к действию ионов кальция как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной митохондриальной поры, по сравнению с митохондриями печени (Endlicher et al., 2009; Drahotka et al., 2012). В сравнительных исследованиях также отмечается, что при относительно низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  (25 мкМ) амплитуда набухания митохондрий сердца в семь раз меньше, по сравнению с митохондриями печени; при увеличении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  до 100 мкМ это различие уменьшается до трех раз. Исходя из этого можно предположить, что при более низких концентрациях ионов кальция митохондрии сердца крыс обладают большей устойчивостью к индукции кальций-зависимой неспецифической проницаемости (Endlicher et al., 2009).

В экспериментах на митохондриях сердца крыс разного возраста было продемонстрировано, что органеллы новорожденных крысят обладают большей резистентностью к индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной митохондриальной поры по сравнению с митохондриями крыс зрелого возраста. Митохондрии сердца новорожденных крысят обладают, по приблизительным оценкам, в два раза меньшей амплитудой и скоростью  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного

набухания, характеризуются большей кальциевой емкостью (Ostádal et al., 2009; Milerova et al., 2010). В то же время митохондрии печени крыс такой возрастной зависимостью не обладают (Drahota et al., 2012).

Для митохондрий сердца крыс были показаны и половые различия в индукции митохондриальной поры. Митохондрии, выделенные из сердца самок крыс, при добавлении 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  обладали большей устойчивостью к индукции поры, по сравнению с митохондриями сердца самцов, однако, при уменьшении концентрации ионов кальция до 50 мкМ эти различия нивелировались. Отмечено, что митохондрии сердца самцов и самок содержат практически одинаковое количество Cyp D, АДФ/АТФ-антипортера и VDAC, и, следовательно, предполагается, что повышенная резистентность митохондрий печени сердца не может быть объяснена изменениями в содержании предполагаемых компонентов митохондриальной поры (Milerová et al., 2016).

Не менее интересные данные были получены и при исследовании митохондрий мозга млекопитающих. Для индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий мозга крыс и мышей необходима концентрация ионов кальция в три раза превосходящая таковую для митохондрий печени этих животных (Friberg et al., 1999; Panov et al., 2007). Было выдвинуто предположение, что относительно невысокая по сравнению с митохондриями сердца и мозга резистентность к индукции поры в митохондриях печени может быть связана с ее значительно большей регенеративной способностью (Panov et al., 2007; Endlicher et al., 2009).

### **1.5. Видовая специфичность $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий**

Индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий млекопитающих достаточно хорошо изучена, ее особенности и возможные механизмы были представлены в предыдущих разделах литературного обзора. В то же время стоит отметить, что в большинстве

исследований в качестве лабораторных животных использовались в основном крысы и мыши. Большой интерес у исследователей вызывает изучение функционирования митохондриальной поры у различных видов животных (Azzolin et al., 2010).

Относительно недавно на примере дрожжей было продемонстрировано, что митохондрии одноклеточных организмов могут обладать неспецифической проницаемостью внутренней мембраны, имеющей некоторое сходство с подобным процессом у многоклеточных животных (Manon et al., 1998; Deryabina and Zvyagil'skaya, 2000; Deryabina et al., 2000; Deryabina et al., 2001). Так, митохондрии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обладают неспецифической порой, имеющей схожие размеры и предполагаемые функции с  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной митохондриальной порой млекопитающих (Manon and Guerin, 1998; Gutiérrez-Aguilar et al., 2007). Митохондрии дрожжей характеризуются отсутствием кальциевого унипортера, что затрудняет исследование кинетики данного иона, но, тем не менее, было показано, что содержание ионов кальция в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae* сопоставимо с таковым в митохондриях печени крыс (Kowaltowski et al., 2000; Carraro et al., 2014). С другой стороны отмечается, митохондрии дрожжей этого вида способны накапливать значительные количества ионов кальция в присутствии кальциевого ионофора ETН129 без последующего открытия поры (Jung et al., 1997). Недавно были опубликованы данные, показывающие, что димеры АТФ-синтазы митохондрий дрожжей *S. cerevisiae* способны образовывать высокопроводящие каналы, аналогичные митохондриальной поре млекопитающих (Carraro et al., 2014). В то же время показано, что митохондрии аэробных дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Dipodascus magnusii* не имеют «классической»  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры внутренней мембраны митохондрий, или неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий осуществляется по иному механизму, не связанному с поглощением ионов кальция (Kovaleva et al., 2009; Trendeleva et al., 2011).

Неспецифическая проницаемость митохондрий дрожжей регулируется рядом модуляторов. На предварительно загруженных ионами кальция митохондриях *Endomyces magnusii* показано, что в качестве ингибиторов могут выступать  $\Phi_n$ , тетрафенилфосфоний (ТФФ),  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , нигерицин. Стимулируют открытие поры валиномицин, спермин, гипотоническая среда. Атрактилозид, ЦсА, ТБГ, дезэнергизация и истощение пула адениновых нуклеотидов не оказывали никакого эффекта. При индукции неспецифической проницаемости в митохондриях данного вида дрожжей выход ионов кальция из матрикса митохондрий происходил без высокоамплитудного набухания органелл, и, по-видимому, осуществлялся по отличному от митохондрий млекопитающих пути (Jung et al. 1997; Deryabina et al., 2001; Deryabina et al., 2004).

Показано, что митохондрии дрозофил вида *Drosophila melanogaster* способны к индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости по схожему с млекопитающими механизму (von Stockum et al., 2011). Отмечено, что неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий *Drosophila melanogaster* индуцируется в результате перегрузки матрикса ионами кальция, деполяризации внутренней мембраны, окисления тиоловых групп, действия высоких концентраций N-этилмалеимида и ингибируется тетракаином (von Stockum et al., 2011; Bernardi and von Stockum, 2012). Недавно также были представлены данные, свидетельствующие о возможности формирования в митохондриях дрозофил каналов при участии АТФ-синтазы (von Stockum et al., 2015).

Однако существует и ряд особенностей индукции неспецифической проницаемости в митохондриях данных животных. В отличие от млекопитающих, пора в митохондриях дрозофил нечувствительна к действию ЦсА, убихинона и АДФ, а также ингибируется  $\Phi_n$ , как в митохондриях дрожжей, и не характеризуется высокоамплитудным набуханием и выходом цитохрома *c* даже в гипотонической среде (von Stockum et al., 2011; Bernardi and von Stockum, 2012). Все это позволяет предположить, что митохондрии *Drosophila melanogaster* обладают неспецифической проницаемостью внутренней мембраны, по своим

параметрам занимающей промежуточное положение между порами у млекопитающих и дрожжей (Azzolin et al., 2010; von Stockum et al., 2011).

Помимо рассмотренных выше животных, существование неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий также описано у рыб и амфибий (Azzolin et al., 2010). Показано, что митохондрии *Zosterisessor ophiocephalus*, рыбы семейства бычковых, характеризуются  $\text{Ca}^{2+}/\Phi_{\text{H}}$ -индуцируемой митохондриальной порой, как и митохондрии млекопитающих. Индукция неспецифической проницаемости внутренней мембраны также, как и в митохондриях млекопитающих, ингибируется ионами  $\text{Mg}^{2+}$ , ЦсА, ЭГТА, спермином. Существенным является тот факт, что концентрация ионов кальция, необходимая для индукции поры у митохондрий данного вида рыб превышает более чем в два раза аналогичный показатель для митохондрий печени крыс (Toninello et al., 2000). Для митохондрий рыб *Oncorhynchus mykiss* и *Danio rerio* также описана неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий, схожая по своим параметрам и регуляции с митохондриальной порой млекопитающих, и для индукции которой уже достаточно примерно той же концентрации ионов кальция, что и для митохондрий печени крыс, а для *Oncorhynchus mykiss* эта концентрация может составлять и несколько меньшие значения (Azzolin et al., 2010; Adiele et al., 2012).

Для некоторых видов рыб и амфибий описаны процессы сезонной изменчивости метаболической активности, которая характеризуется наличием метаболической депрессии, наблюдаемой в зимний период (Emel'ianova et al., 2007). В это время наблюдается длительная обратимая митохондриальная дисфункция, сопровождаемая низкой активностью дыхательной цепи, в особенности комплекса I дыхательной цепи, низким уровнем окислительного фосфорилирования, существенным снижением содержания адениновых нуклеотидов, высоким уровнем восстановленных пиридиннуклеотидов. Отмечено, что в зимний преднерестовый период у речной миноги *Lampetra fluviatilis* наблюдается индукция митохондриальной поры в низкопроводящем состоянии, не ингибируемом ЦсА, в то время как при их энергизации или в

весенний период характерно наличие типичной митохондриальной поры, чувствительной к действию ЦсА,  $Mg^{2+}$ , ЭГТА (Emel'ianova et al., 2007; Belyaeva et al., 2014). Интересен и тот факт, что индукция неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий может играть важную роль в процессах метаморфоза амфибий (Hanada et al., 2003).

Большой интерес представляют некоторые виды беспозвоночных животных, характеризующихся высокой резистентностью к гипоксическим условиям (Azzolin et al., 2010; Galli and Richards, 2014). Так для митохондрий планктонных ракообразных *Artemia franciscana*, креветок *Lepidophthalmus louisianensi* и устриц *Crassostrea virginica* было показано, что при добавлении концентрации ионов кальция в 10 раз превышающей пороговое значение для митохондрий печени крыс не происходило высокоамплитудного набухания митохондрий, выхода  $Ca^{2+}$  и цитохрома *c* во внешнюю среду (Sokolova et al. 2004; Menze et al., 2005; Holman and Hand, 2009).

В настоящее время данный феномен активно обсуждается, и дальнейшие исследования пытаются ответить на вопрос, является ли данное явление адаптацией к экстремальным условиям обитания или характерной общей чертой всех беспозвоночных (Galli and Richards, 2014). Исследования показывают, что неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий характерна для большинства пойкилотермных животных, она сохраняется и претерпевает изменения в процессе эволюции. Для многих из пойкилотермных животных отмечается десенсибилизация митохондриальной поры к ионам кальция, и, следовательно, для ее индукции требуются значительные концентрации этих ионов (Galli and Richards, 2014).

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Экспериментальные животные

В работе были использованы млекопитающие зрелого возраста (самцы): белые лабораторные мыши (масса тела 25–28 г), белые лабораторные крысы (масса тела 210–240 г) и домашние кролики породы серый великан (масса тела 3500–3700 г). Птицы зрелого возраста (самцы): сизые голуби (*Columba livia*) зрелого возраста (масса тела 420–460 г), цесарки (*Numida meleagris*) «дикой» серо-крапчатой популяции (СКП) и загорской белогрудой породы (ЗБП) (масса тела 1570–2100 г.), отличающейся более высокими продуктивными качествами (Забиякин, 2005). Содержание, кормление и забой животных соответствует необходимым требованиям, изложенным в соответствующих руководствах (Западнюк и др., 1983; Лукьянов, 2008), а также международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals» и правилам, утвержденным в системе Министерства высшего и среднего образования СССР (Приказ № 742 от 13 ноября 1984 г). Перед проведением экспериментов все животные содержались в помещениях вивария при одинаковом световом и температурном режиме не менее месяца. В эксперимент одновременно брали четырех мышей и по одному – всех остальных животных.

### 2.2. Выделение митохондрий

Митохондрии выделяли из печени животных общепринятым методом дифференциального центрифугирования (Маркова и др., 1999). Охлажденную в снегообразной среде выделения печень отмывали от крови, измельчали с помощью ножниц до размера кусочков около 1 мм, а затем вручную гомогенизировали тefлоновым пестиком в гомогенизаторе из пирекса (отношение массы ткани и среды 1:10). Полученный гомогенат центрифугировали 5 минут при 1200 г для осаждения ядер, остатков цитоплазмы и неразрушенных клеток. Полученную надосадочную жидкость, содержащую митохондрии, фильтровали через четыре слоя марли. Митохондрии осаждали 10 минут при 9800 г и суспендировали в 2 мл среды выделения, дополнительно содержащей

БСА (2 мг/мл) для связывания и удаления эндогенных жирных кислот, затем добавляли 15 мл среды выделения без БСА и вновь центрифугировали 10 мин при 9800 g. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА и 5 мМ МОПС-Трис, рН 7,4. Суспензию митохондрий (60 - 70 мг белка в 1 мл) хранили на льду. Белок определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА.

### **2.3. Регистрация параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий**

Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при температуре 25°C (и 39°C при исследовании параметров свободного окисления в митохондриях печени цесарок) с помощью кислородного электрода типа Кларка и оригинальной многоканальной электрометрической системы Record 4usb при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Концентрация кислорода в среде инкубации при 25°C – 240 мкМ (Chance and Williams, 1955). Концентрация белка митохондрий в кислородной ячейке составляла ~1,1 – 1,2 мг/мл. Ротенон в концентрации 2 мкМ добавляли в кислородную ячейку сразу после митохондрий. Через 2 мин после ротенона к митохондриям добавляли 200 мкМ АДФ и еще через 2 мин после выхода митохондрий в состоянии 4 – 50 мкМ 2,4-динитрофенола для определения максимальной скорости транспорта электронов по дыхательной цепи. Применяли следующие показатели дыхания и окислительного фосфорилирования:  $J_2$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  до добавления АДФ (состояние 2 по Чансу);  $J_3$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  и АДФ (состояние 3 по Чансу);  $J_4$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  после того, как весь добавленный АДФ был израсходован в процессе синтеза АТФ (состояние 4 по Чансу);  $J_u$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола в концентрации, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания;  $J_p$  – скорость синтеза АТФ;  $R_C$  – отношение величин  $J_3$  и  $J_4$  (дыхательный контроль по Чансу);  $P_C$  – отношение величин  $J_p$  и  $J_4$ ;  $АДФ/О$  – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного

фосфорилирования. Значение коэффициента  $AДФ/O$  определяли пульсовым методом (Hinkle and Yu, 1979). Значение величины  $J_p$  – как удвоенное произведение величин  $J_3$  и  $AДФ/O$ . Размерность величин  $J_2$ ,  $J_3$ ,  $J_4$  и  $J_u$  – нмоль  $O_2$ /мин на 1 мг белка; размерность величины  $J_p$  – нмоль АДФ / мин на 1 мг белка; размерность величин  $R_C$ ,  $P_C$  и  $AДФ/O$  – относительные единицы.

#### **2.4. Оценка набухания митохондрий**

Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (А) при длине волны 540 нм на спектрометре «КФК- 3-01» («ЗОМЗ», Россия) в кювете объемом 4 мл и при температуре 25°C. Для регистрации и первичной обработки данных применяли специально разработанную нами программу (свидетельство о регистрации № 2015619788). Концентрация митохондриального белка в кювете 0,8 – 1,0 мг/мл. Скорость набухания митохондрий ( $\Delta A_{540}$ /мин на 1 мг белка) определяли как изменение оптической плотности суспензии митохондрий в течение первой минуты набухания.

#### **2.5. Оценка проницаемости внутренней мембраны митохондрий для $Ca^{2+}$**

Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для  $Ca^{2+}$  оценивали по изменению концентрации этих ионов в среде инкубации с помощью  $Ca^{2+}$ -селективного электрода и универсального иономера И-500 («Аквилон», Россия) в ячейке объемом 10 мл и при температуре 25°C. Концентрация митохондриального белка в кювете была ~ 1,5 мг/мл.

#### **2.6. Измерение разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий ( $\Delta\psi$ )**

Разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий ( $\Delta\psi$ ) оценивали по распределению предварительно добавленного в среду инкубации катиона тетрафенилфосфония ( $TФФ^+$ ) через внутреннюю мембрану,

концентрацию которого регистрировали ТФФ<sup>+</sup>-чувствительным электродом (Kamo et al., 1979) при 25°C и постоянном перемешивании в открытой ячейке объемом 2 мл с помощью оригинальной многоканальной электрометрической системы Record 4usb. В этих экспериментах среда инкубации дополнительно содержала 1,6 мкМ ТФФ<sup>+</sup>. Концентрация митохондриального белка в кювете была ~ 1,5 мг/мл.

### **2.7. Состав среды инкубации митохондрий**

В большинстве экспериментов среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ КСl, 5 мМ янтарную кислоту, 1 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 20 мкМ ЭГТА, 10 мМ МОПС-Трис, рН 7,4. При изучении дыхания и окислительного фосфорилирования среда инкубации дополнительно содержала 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и БСА (0,2-0,4 мг/мл), а концентрации ЭГТА и КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> были увеличены до 0,5 и 5 мМ соответственно.

### **2.8. Статистическая обработка результатов исследований**

Предварительно был проведен анализ гомогенности дисперсий, который был выполнен с применением критериев Бартлетта, Кохрена, Хартли, а также был проведен анализ гистограмм остатков внутри ячеек. Для комплексного анализа исследуемых биохимических параметров, где это необходимо, применяли метод однофакторного дисперсионного анализа или t-критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений ± средняя квадратичная ошибка среднего значения. Для оценки достоверности различий использовали уровень вероятности  $P < 0,05$ . Статистическая обработка данных проводилась с использованием лицензионных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2010.

### **2.9. Реактивы**

В работе использовалась 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота (МОПС), α,ω-гексадекандикарбоновая кислота (ГДК), рутениевый красный (РК), олигомицин, янтарная кислота, циклоспорин А (ЦсА), очищенный от жирных

кислот бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-ОН), хлорид тетрафенилфосфония, ("Sigma", США), ротенон, ЭГТА ("Serva", Германия), сахароза, АДФ, 2,4-динитрофенол, KCl ("Fluka" Швейцария), CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ("Merck", Германия). Использовались растворы олигомицина (2 мг/мл), ротенона (2 мМ), ГДК (20 мМ), циклоспорина А (1 мМ) в дважды перегнанном этаноле; АДФ (100 мМ) и 2,4-динитрофенола (5 мМ) – в бидистиллированной воде. При проведении экспериментов в контрольных пробах к митохондриям добавлялись растворители в том же объеме, как и в опытах с исследуемыми веществами. Во всех случаях растворители не изменяли исследуемые параметры митохондрий.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Характеристика дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени млекопитающих и птиц разных видов

В соответствии с первой поставленной задачей необходимо было дать характеристику митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц по скоростям дыхания в различных метаболических состояниях, по скорости окислительного синтеза АТФ и по степени сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ. При проведении исследований митохондрии печени инкубировались в течение двух минут в состоянии 2 в присутствии сукцината как субстрата окисления,  $\Phi_n$ , а также БСА, необходимого для устранения действия эндогенных разобщителей окислительного фосфорилирования свободных жирных кислот. При этих условиях, т.е. в отсутствие синтеза АТФ и без разобщителей окислительного фосфорилирования, митохондрии потребляют кислород с небольшой скоростью. После двух минут инкубации в состоянии 2 ( $J_2$ ) к митохондриям был добавлен 200 мкМ АДФ, что приводит к существенной стимуляции дыхания, т.е. при этих условиях митохондрии переходят в состояние 3 ( $J_3$ ). Затем, вследствие исчерпания АДФ, наблюдается переход митохондрий в состояние 4 ( $J_4$ ). Необходимо отметить, что в этом случае митохондрии печени обладали высокой сукцинатоксидазной активностью, так как добавление протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола в оптимальной концентрации 50 мкМ приводит к значительной стимуляции дыхания ( $J_u$ ).

В качестве меры сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ, или, говоря по-другому, эффективности окислительного фосфорилирования, в митохондриях применяются коэффициенты  $АДФ/О$  и дыхательного контроля ( $R_C$ ). Коэффициент  $АДФ/О$  представляет собой количество синтезированного АТФ, отнесенное на количество потребленного кислорода, или что эквивалентно отношению скоростей синтеза АТФ ( $J_P$ ) и  $J_3$  (Hinkle and Yu, 1979; Самарцев и др., 2005; Скулачев и др., 2010). Коэффициент  $R_C$  – отношение скоростей дыхания в состоянии 3 и в состоянии 4 ( $J_3/J_4$ ).  $P_C$  – отношение  $J_P$  и  $J_4$ . Для обозначения

максимального значения  $AДФ/O$ , которое может быть достигнуто при условии отсутствия утечки протонов и других возможных реакций вызывающих свободное, т.е. не сопряженное с синтезом АТФ, дыхание в состоянии 3 был применен коэффициент  $n_2$  (Самарцев и др., 2005).

Были получены данные, характеризующие митохондрии печени исследуемых животных как по показателям дыхания в различных состояниях (табл. 1), так и по показателям сопряжения дыхания с окислительным синтезом АТФ (табл. 2).

**Таблица 1.** Скорости дыхания в различных состояниях митохондрий печени исследуемых животных.

Животные	$J_2$	$J_3$	$J_4$	$J_u$
	нмоль $O_2$ / мин на 1 мг белка			
Крысы ( $n=8$ )	$10,9 \pm 0,4$	$43,7 \pm 1,8$	$10,6 \pm 0,4$	$65,8 \pm 1,7$
Мыши ( $n=5$ )	$14,3 \pm 1,1^*$	$44,2 \pm 3,3$	$14,7 \pm 1,4^*$	$56,3 \pm 4,4$
Кролики ( $n=7$ )	$5,8 \pm 0,4^*$	$27,3 \pm 0,8^*$	$5,7 \pm 0,2^*$	$33,2 \pm 3,0^*$
Голуби ( $n=7$ )	$9,8 \pm 0,7$	$38,3 \pm 2,8$	$10,1 \pm 0,7$	$46,1 \pm 3,0^*$
Цесарки СКП ( $n=8$ )	$10,2 \pm 0,5$	$44,2 \pm 2,6$	$11,2 \pm 0,6$	$51,8 \pm 3,1$
Цесарки ЗБП ( $n=6$ )	$7,0 \pm 0,6^*$	$31,4 \pm 3,1^*$	$18,3 \pm 2,5^*$	$40,7 \pm 4,2^*$

*Примечание.* Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы,  $p < 0,05$ .

Как видно из таблиц, митохондрии печени крыс, голубей и цесарок СКП не отличаются по показателям дыхания и окислительного синтеза АТФ, за исключением скорости разобщенного 2,4-динитрофенолом дыхания. Митохондрии печени мышей отличаются от митохондрий этих животных более высокой скоростью дыхания в отсутствие синтеза АТФ (свободное окисление) и вследствие этого меньшей степенью сопряжения дыхания и окислительного

фосфорилирования. В отличие от этого митохондрии печени кроликов характеризуются меньшей скоростью дыхания в различных состояниях, меньшей скоростью окислительного синтеза АТФ, и наряду с этим большей степенью сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования. Митохондрии печени цесарок ЗБП характеризуются более низкой скоростью дыхания в состоянии 2 и более высокой в состоянии 4, меньшей скоростью окислительного синтеза АТФ, а также наиболее слабым сопряжением дыхания и окислительного синтеза АТФ.

**Таблица 2.** Сравнение скорости синтеза АТФ и степень сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ митохондрий печени исследуемых животных

Животные	$R_c$	АДФ/О	$P_c$	$J_p$
	относительные единицы			нмоль АДФ/ мин на 1 мг белка
Крысы ( $n=8$ )	$4,11 \pm 0,07$	$1,73 \pm 0,03$	$7,01 \pm 0,18$	$150,9 \pm 7,8$
Мыши ( $n=5$ )	$3,01 \pm 0,08^*$	$1,46 \pm 0,03^*$	$4,43 \pm 0,20^*$	$129,7 \pm 8,0$
Кролики ( $n=7$ )	$4,82 \pm 0,20^*$	$1,81 \pm 0,03$	$8,51 \pm 0,21^*$	$96,0 \pm 4,7^*$
Голуби ( $n=7$ )	$3,80 \pm 0,14$	$1,65 \pm 0,07$	$6,25 \pm 0,37$	$125,1 \pm 7,4$
Цесарки СКП ( $n=8$ )	$3,97 \pm 0,08$	$1,75 \pm 0,03$	$6,80 \pm 0,20$	$152,6 \pm 9,4$
Цесарки ЗБП ( $n=6$ )	$1,79 \pm 0,12^*$	$1,06 \pm 0,06^*$	$1,76 \pm 0,11^*$	$67,4 \pm 6,0^*$

*Примечание.* Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы,  $p < 0,05$ .

Как известно, скорость пассивной утечки протонов, определяющая свободное окисление, в митохондриях печени млекопитающих различных видов снижается при увеличении массы тела этих животных (Rolfe and Brand, 1997; Brand et al., 2003; Самарцев и др., 2004). Следовательно, полученные данные,

свидетельствующие о снижении скорости свободного окисления в митохондриях печени по мере увеличения массы тела млекопитающих в ряду: мышь, крыса, кролик согласуются с этой закономерностью.

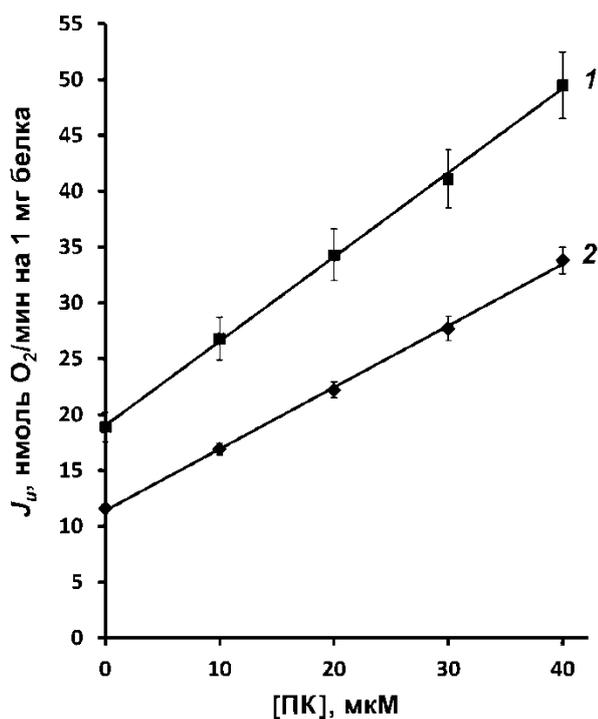
Цесарки СКП являются исходной, «дикой», популяцией, которая разводится в племенных хозяйствах в качестве резервного генофонда (Забиякин, 2005). Цесарки ЗБП отличается от исходной популяции генетически и характеризуется более высокими продуктивными качествами (Забиякин, 2005). Как уже отмечалось выше, митохондрии печени цесарки ЗБП характеризуются более низкой скоростью дыхания в состоянии 2 (свободное окисление), а также слабым сопряжением окисления и фосфорилирования (табл. 1 и 2).

Эффективным активатором свободного окисления в митохондриях может служить пальмитиновая кислота, разобщающий эффект которой обусловлен трансмембранным переносом протонов из межмембранного пространства в матрикс митохондрий (Skulachev, 1998). Как видно из рисунка 1, при концентрации пальмитиновой кислоты вплоть до 40 мкМ скорость дыхания митохондрий ЗБП цесарок меньше, чем СКП цесарок.

Для оценки способности пальмитиновой кислоты активировать в митохондриях свободное окисление применяли величину ее удельной разобщающей активности ( $V_U$ ). В наших опытах  $V_U$  составляет  $1,001 \pm 0,053$  ( $n=12$ ) и  $0,738 \pm 0,048$  ( $n=8$ ) мкМ  $O_2$  / мин на 1 мкМ пальмитиновой кислоты для митохондрий СКП и ЗБП цесарок соответственно. Следовательно, активация этой жирной кислоты свободного окисления менее выражена в митохондриях печени ЗБП цесарок, чем СКП цесарок.

Как уже отмечалось выше, в качестве меры сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ, или, говоря по-другому, эффективности окислительного фосфорилирования, в митохондриях применяются коэффициенты  $АДФ/О$  и дыхательного контроля ( $R_C$ ). Эти коэффициенты часто применяются для характеристики функционального состояния изолированных митохондрий (Hinkle and Yu, 1979; Самарцев и др., 2005; Кожина и др., 2007; Скулачев и др., 2010). Вместе с тем, для проведения дальнейших исследований необходимо выбрать тот

из коэффициентов, который бы наилучшим образом характеризовал способность митохондрий эффективно синтезировать АТФ. В качестве такого коэффициента можно было бы рассматривать отношение скоростей синтеза АТФ и потребления кислорода не связанного с этим процессом, т.е. свободного окисления в состоянии 3. Необходимо проведение дополнительных исследований для определения этой величины в митохондриях печени указанных животных.



**Рисунок 1.** Зависимость скорости дыхания ( $J_u$ ) митохондрий печени цесарок СКП (1) и цесарок ЗБП (2) от концентрации пальмитиновой кислоты (ПК). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы».

Скорость дыхания в состоянии 3 может быть определена как сумма скоростей синтеза АТФ ( $J_P/n_2$ ) и свободного окисления вызванного утечкой протонов ( $J_L$ ), выраженных в одних и тех же единицах потребления кислорода (Самарцев и др., 2005). Принимая, что скорость утечки протонов пропорциональна скорости дыхания в состоянии 4 ( $J_L = kJ_4$ ) скорость дыхания в состоянии 3 можно определить как:

$$J_3 = \frac{J_P}{n_2} + kJ_4, \quad (1)$$

После деления правой и левой частей ур. 1 на  $J_4$  получаем ур. 2:

$$R_C = \frac{P_C}{n_2} + k, \quad (2)$$

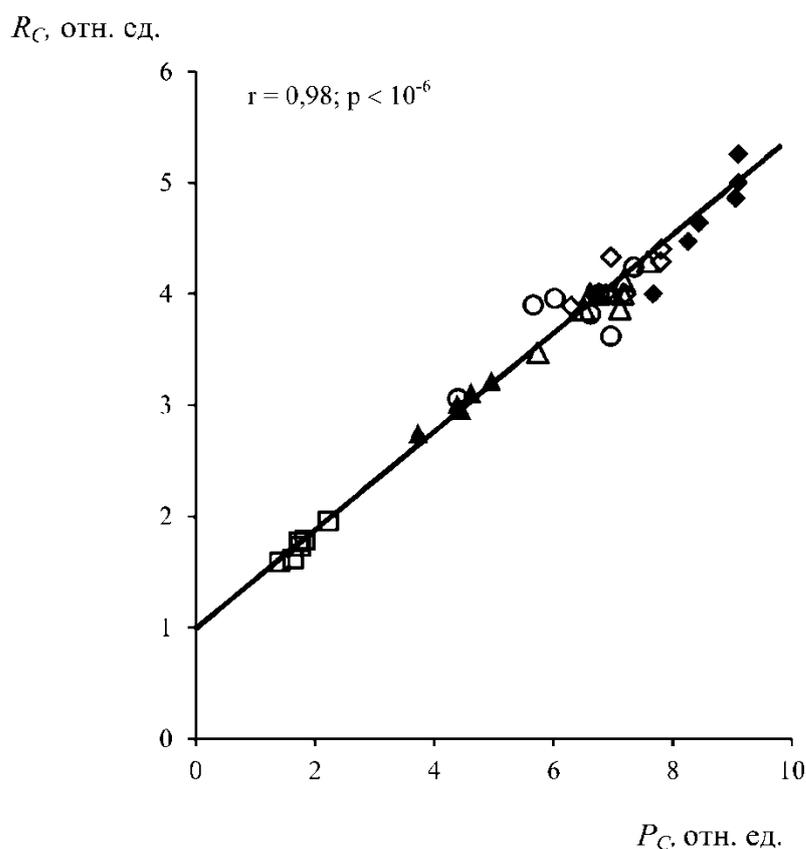
где,  $P_C$  – отношение величин  $J_P$  и  $J_4$ .

В соответствии с «классической» хемиосмотической теории Митчелла при наличии между процессами синтеза АТФ и пассивной утечки протонов конкуренции за  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  значение величины  $J_L$  будет существенно меньше, чем  $J_4$  (Hinkle and Yu, 1979). Говоря по-другому, при этих условиях окислительный синтез АТФ оказывает ингибирующее действие на свободное окисление. Согласно альтернативной точке зрения значения величин  $J_L$  и  $J_4$  равны (или близки), в этом случае окислительный синтез АТФ не оказывает ингибирующего влияния на свободное окисление (Самарцев и др., 2005).

С помощью ур. 2 можно определить значения коэффициентов  $k$  и, следовательно, оценить скорость свободного окисления в состоянии 3. Для этого необходимо исследовать зависимость  $R_C$  от  $P_C$  при различных значениях  $J_P$  и  $J_4$ . Известно, что вариабельность этих величин может быть достигнута как с помощью ингибиторов (уменьшение  $J_P$ ), так и разобщителей-протонофоров (увеличение  $J_4$ ) (Самарцев и др., 2005). В настоящей работе предложен другой экспериментальный подход. В основе его исследование зависимости величины  $R_C$  от величины  $P_C$  при использовании митохондрий животных разных видов, в которых вариабельности величин  $J_P$  и  $J_4$  обусловлены эндогенными процессами. Как показано на рис. 2, при исследовании митохондрий различных животных коэффициент  $R_C$  увеличивается пропорционально увеличению коэффициента  $P_C$ , и эта зависимость может быть описана с помощью линейного регрессионного ур. 2. При  $P_C = 0$  экспериментальная прямая пересекает ось ординат в точке  $R_C = 1$  (рис. 2).

Проведенные расчеты показали, что  $k = 1,010 \pm 0,085$  и  $n_2 = 2,273 \pm 0,052$ . Следовательно, в наших экспериментальных условиях скорость свободного

окисления в состоянии 3 в митохондриях печени указанных животных равна скорости дыхания в состоянии 4. Это подтверждает данные, ранее полученные на митохондриях печени крыс (Самарцев и др., 2005). Коэффициент  $n_2$  больше теоретически рассчитанных максимальных значений  $AD\Phi/O$  при окислении сукцинита (Скулачев и др., 2010). Следует, однако, отметить, что пульсовой метод определения коэффициента  $AD\Phi/O$  дает завышение истинного значения приблизительно на 10% (Hinkle and Yu, 1979). При этих условиях максимальное значение коэффициента  $AD\Phi/O$  в отсутствие утечки протонов составляет 2.



**Рисунок 2.** Зависимость величины дыхательного контроля ( $R_C$ ) от отношения величин скоростей синтеза АТФ и дыхания в состоянии 4 ( $P_C$ ). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в тексте. Каждая точка на графике соответствует значениям величин  $R_C$  и  $P_C$ , полученных в одном независимом эксперименте. На графике символами обозначены митохондрии печени: крыс ( $\diamond$ ), мышей ( $\blacktriangle$ ), кроликов ( $\blacklozenge$ ), голубей ( $\circ$ ), цесарок СК ( $\triangle$ ), цесарок ЗБ ( $\square$ ).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют говорить о том, что в митохондриях печени окислительный синтез АТФ не оказывает ингибирующего действия на свободное окисление. Следовательно, скорость свободного окисления наряду со скоростью окислительного синтеза АТФ должна быть составной частью интегрального коэффициента характеризующего способность митохондрий эффективно синтезировать АТФ. Таким коэффициентом может быть отношение скорости окислительного синтеза АТФ и скорости дыхания в состоянии 4 – коэффициент  $P_C$ . В дальнейших наших исследованиях этот коэффициент предполагается использовать для выяснения связи между способностью митохондрий синтезировать АТФ и их резистентностью митохондрий к индукторам  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры.

Следует отметить тот факт, что окислительный синтез АТФ не оказывает ингибирующего действия на свободное окисление, не согласуется с «классической» хемиосмотической теорией. Эта теория, как сказано выше, предполагает, что скорость свободного окисления как составная часть скорости дыхания в состоянии 3 должна быть существенно меньше скорости дыхания в состоянии 4. В рамках уточнения хемиосмотической теории рассматривается, что в течение окислительного синтеза АТФ выбрасываемые комплексами дыхательной цепи протоны могут непосредственно передаваться на расположенную рядом  $F_0F_1$ -АТФ синтазу без их диффузии в объемную водную фазу межмембранного пространства (Papa et al., 2006). Можно полагать, что в этом случае скорость свободного окисления, вызванная пассивной утечкой протонов, не будет зависеть от скорости синтеза АТФ.

### **3.2. Сравнительное исследование индукции $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени млекопитающих и птиц разных видов**

Механизмы индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны достаточно хорошо рассмотрены у млекопитающих, а также у

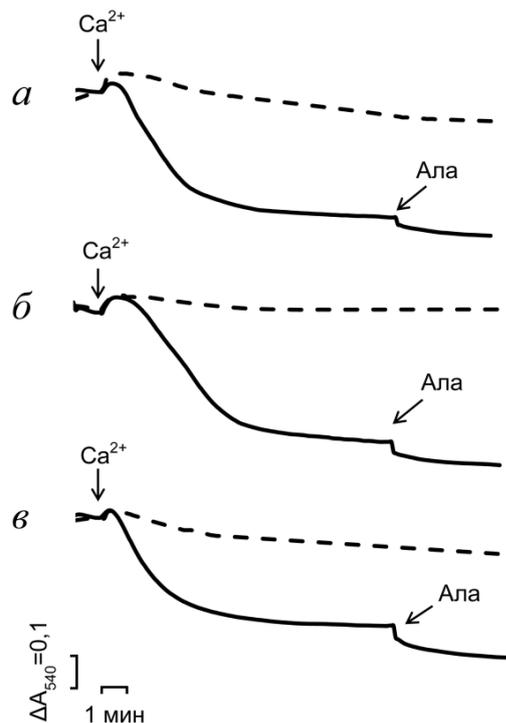
некоторых представителей других классов, однако данные об этих процессах у птиц отсутствуют (Azzolin et al., 2010). Исходя из этого представляется необходимым провести сравнительные исследования особенностей индукции кальций-зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени у млекопитающих и птиц разных видов.

Хорошо известно, что в условиях *in vitro* митохондрии, выделенные из различных органов и тканей и энергизованные путем окисления сукцината, в присутствии ионов кальция способны к формированию неспецифической проницаемости внутренней мембраны (открытие поры), что приводит к высокоамплитудному набуханию этих органелл (Petronilli et al., 1993; Leung et al., 2008; Varanyuwatana and Halestrap, 2012). Кинетику данного процесса достаточно хорошо можно измерить спектрофотометрически путем регистрации изменения оптической плотности суспензии органелл, снижение которой свидетельствует о набухании митохондрий (Petronilli et al., 1993; Leung et al., 2008; Varanyuwatana and Halestrap, 2012).

Как установлено в наших экспериментах, добавление хлорида кальция к митохондриям печени крыс, инкубируемых в сахарозной среде в присутствии  $\Phi_n$  и энергизованных путем окисления сукцината, приводит к существенному снижению оптической плотности суспензии, в то время как в присутствии ЦсА такого эффекта не наблюдается (рис. 3, а). Аналогичные результаты получены при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в том же количестве и к митохондриям печени мышей (рис. 3, б) и кроликов (рис. 3, в). Полученные данные согласуются с литературными источниками, свидетельствующими о формировании в присутствии  $\Phi_n$  неспецифической  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры во внутренней мембране митохондрий печени крыс (Petronilli et al., 1993; Leung et al., 2008; Varanyuwatana and Halestrap, 2012). При этом следует отметить, что митохондрии печени кроликов отличаются от митохондрий печени крыс и мышей по амплитуде набухания (рис. 3, табл. 3).

Известно, что в сахарозной среде инкубации индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры во внутренней мембране каждой отдельной митохондрии

сопровождается ее набуханием до постоянного уровня. В этом случае оптическая плотность суспензии митохондрий печени зависит от того, какое количество органелл набухло; при набухании всех митохондрий в суспензии оптическая плотность достигает своего минимального уровня (Petronilli et al., 1993). Можно предположить, что меньшее изменение оптической плотности суспензии митохондрий кроликов по сравнению с митохондриями крыс и мышей связано с меньшим количеством набухших органелл. Однако добавление к митохондриям печени этих животных известного каналообразующего агента аламетицина (Brustovetsky et al., 2002; Gostimskaya et al., 2003), вызывает дальнейшее изменение оптической плотности не более чем на 20% (рис. 3). Это свидетельствует о том, что лишь малая часть популяции митохондрий является резистентной по отношению к действию применяемых нами индукторов поры.



**Рисунок 3.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (*a*), мышей (*б*), кроликов (*в*), инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , при добавлении 250 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в отсутствие (сплошная линия) и присутствии (пунктирная линия) 1 мкМ ЦсА. Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Другие добавки: 5 мкг/мл аламетицин (Ала). Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.

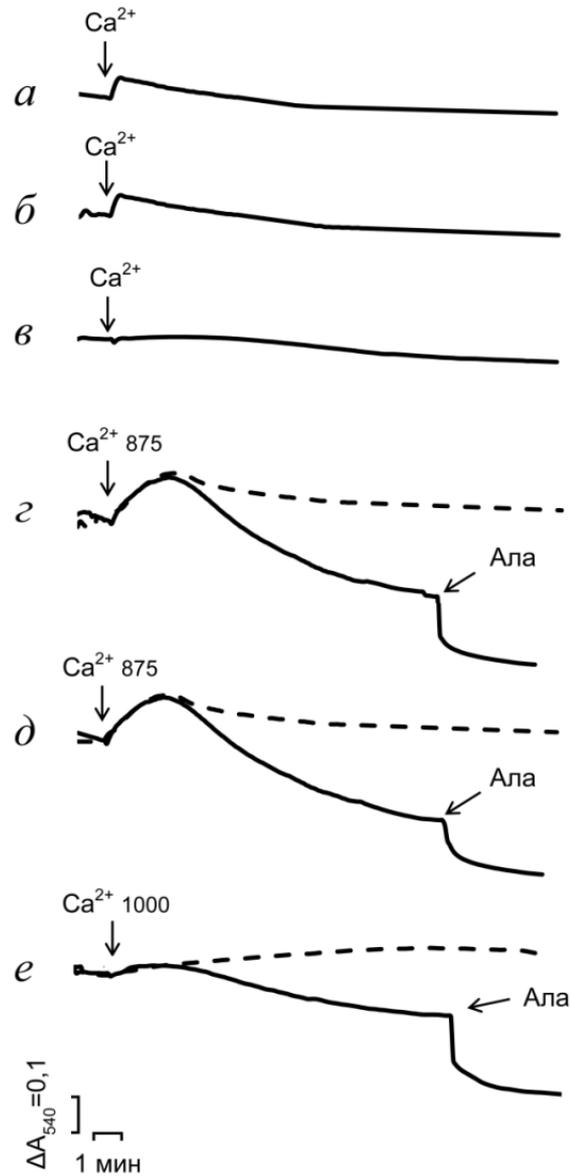
**Таблица 3.** Сравнение скорости ( $\Delta A/\text{мин}$  на 1 мг белка) и амплитуды ( $\Delta A$  на 1 мг белка) набухания митохондрий печени крыс, мышей и кроликов в условиях индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры

Животные	Скорость Набухания	Амплитуда набухания (за 10 мин)	Амплитуда набухания после добавления аламетицина
Крысы	$0,134 \pm 0,009$	$0,542 \pm 0,006$	$0,619 \pm 0,002$
Мыши	$0,126 \pm 0,002$	$0,527 \pm 0,008$	$0,663 \pm 0,010^*$
Кролики	$0,177 \pm 0,004^*$	$0,480 \pm 0,005^{**}$	$0,605 \pm 0,003^*$

*Примечание.* Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл. Добавки, как в подписи к рис. 3. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 4$ ). Различия между показателями митохондрий контрольной группы животных (крысы) и показателями митохондрий указанных групп животных статистически значимы,  $*p < 0,01$ ;  $**p < 0,001$ .

Установлено, что митохондрии печени цесарок СКП (рис. 4, а) и цесарок ЗБП популяций (рис. 4, б), также как митохондрии печени голубей (рис. 4, в) не набухают при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в количестве 250 нмоль на 1 мг белка. В этом случае количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  должно быть повышено как минимум до 875 нмоль на 1 мг белка для митохондрий цесарок СКП (рис. 4, г) и цесарок ЗБП (рис. 4, д), и до 1000 нмоль на 1 мг белка для митохондрий печени голубей (рис. 4, е).

В отличие от митохондрий печени крыс, добавление аламетицина к митохондриям печени цесарок СКП и ЗБП, также как и к митохондриям печени голубей приводит к дальнейшему существенному усилению их набухания (рис. 4). Следовательно, даже при таких больших количествах добавляемого  $\text{CaCl}_2$  имеется существенная доля митохондрий резистентная к действию  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\Phi_H$  как к индукторам поры.



**Рисунок 4.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени цесарок СКП (*a, c*), цесарок ЗБП (*б, д*) и голубей (*в, е*) инкубируемых в присутствии 1 мМ Фн, при добавлении 250 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ), 875 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$  875) и 1000 нмоль на 1 мг белка  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$  1000) в отсутствии (сплошная линия) и присутствии (пунктирная линия) 1 мкМ ЦсА. Другие добавки: 5 мкг/мл аламетицин (Ала). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.

Скорости и амплитуды набухания митохондрий этих животных приведены в таблице 4. Обращает на себя внимание, что митохондрии печени голубей обладают наименьшей скоростью и амплитудой набухания этих органелл.

**Таблица 4.** Сравнение скорости ( $\Delta A$ /мин на 1 мг белка) и амплитуды ( $\Delta A$  на 1 мг белка) набухания митохондрий печени цесарок и голубей в условиях индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры

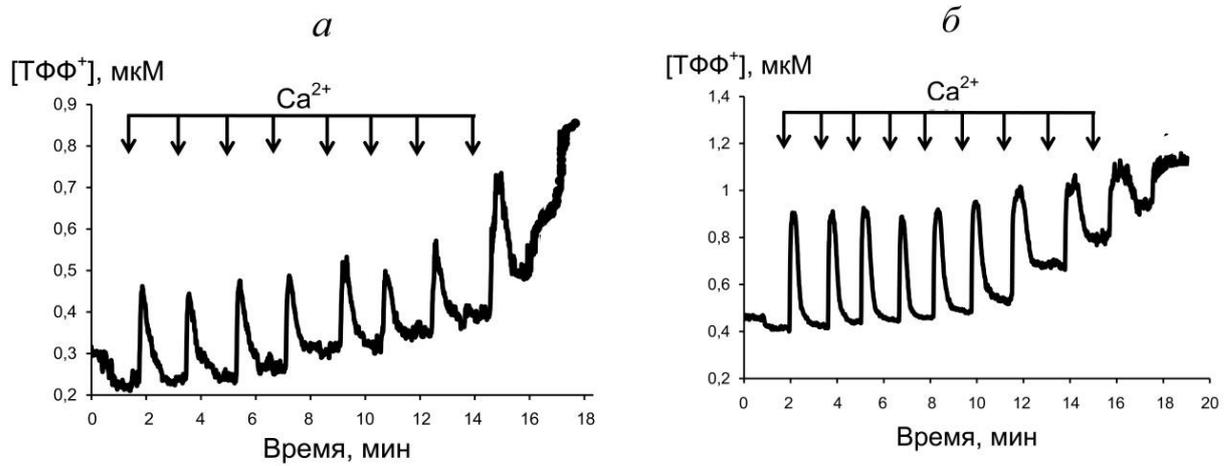
Животные	Скорость Набухания	Амплитуда набухания (за 10 мин)	Амплитуда набухания после добавления аламетицина
Цесарки СКП	$0,042 \pm 0,008$	$0,358 \pm 0,016$	$0,684 \pm 0,016$
Цесарки ЗБП	$0,056 \pm 0,007$	$0,419 \pm 0,016^*$	$0,692 \pm 0,024$
Голуби	$0,012 \pm 0,001^{**}$	$0,179 \pm 0,005^{***}$	$0,409 \pm 0,016^{***}$

*Примечание.* Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл. Добавки, как в подписи к рис.4. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 4$ ). Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий указанных животных и аналогичными показателями митохондрий цесарок СКП,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

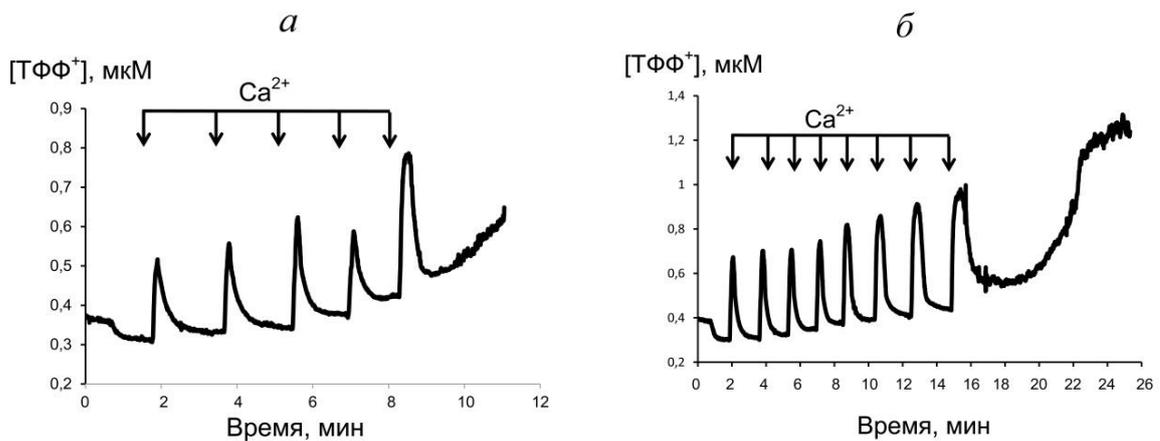
Транспорт ионов кальция в матрикс митохондрий в условиях присутствия в среде инкубации  $\Phi_n$  и субстрата окисления вызывает кратковременное падение мембранного потенциала  $\Delta\psi$  с последующим его восстановлением практически до исходного уровня. В случае же индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий происходит полное и необратимое падение  $\Delta\psi$  (Varanyuwatana and Halestrap, 2012; Vodrova et al., 2000; Toninello et al., 2000).

Для митохондрий печени крыс показано, что импульсное добавление к суспензии порядка 160 нМ  $CaCl_2$  в отсутствии ЦсА (рис. 5) вызывает необратимое снижение  $\Delta\psi$ . Для митохондрий печени мышей и кроликов аналогичные концентрации  $CaCl_2$  составляют в среднем 100 нМ и 40 нМ соответственно (рис. 6 и 7). В присутствии ЦсА концентрация  $CaCl_2$ , необходимая для индукции

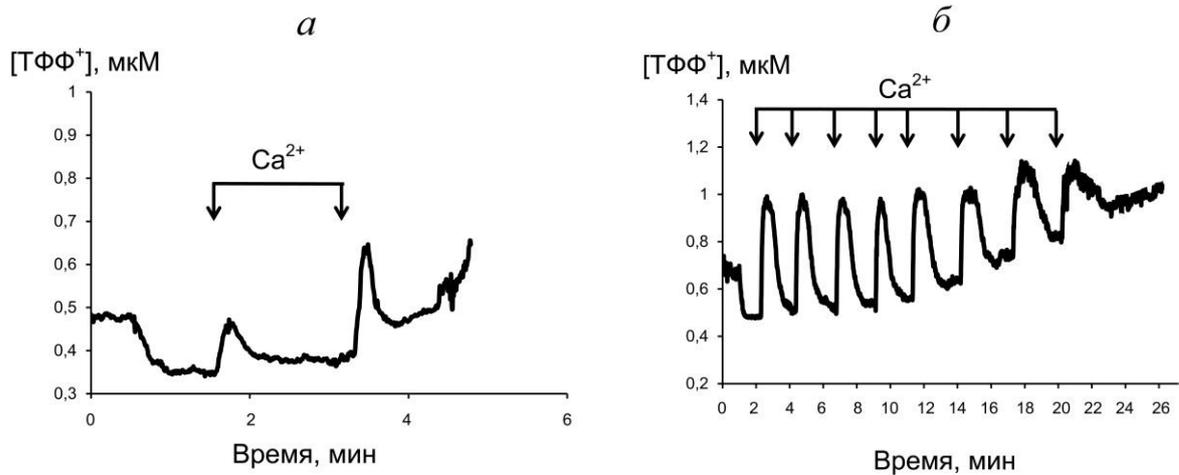
необратимого падения мембранного потенциала существенно возрастает (рис. 5, 6 и 7).



**Рисунок 5.** Кинетика выхода ТФФ<sup>+</sup> из митохондрий печени крыс, инкубируемых в присутствии 1 мМ Ф<sub>н</sub>, при добавлении СаСl<sub>2</sub> (Са<sup>2+</sup>) в отсутствие (а) и присутствии (б) ЦсА. Добавки: а – СаСl<sub>2</sub> по 20 нмоль на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>); б – СаСl<sub>2</sub> по 100 нмоль СаСl<sub>2</sub> на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы».

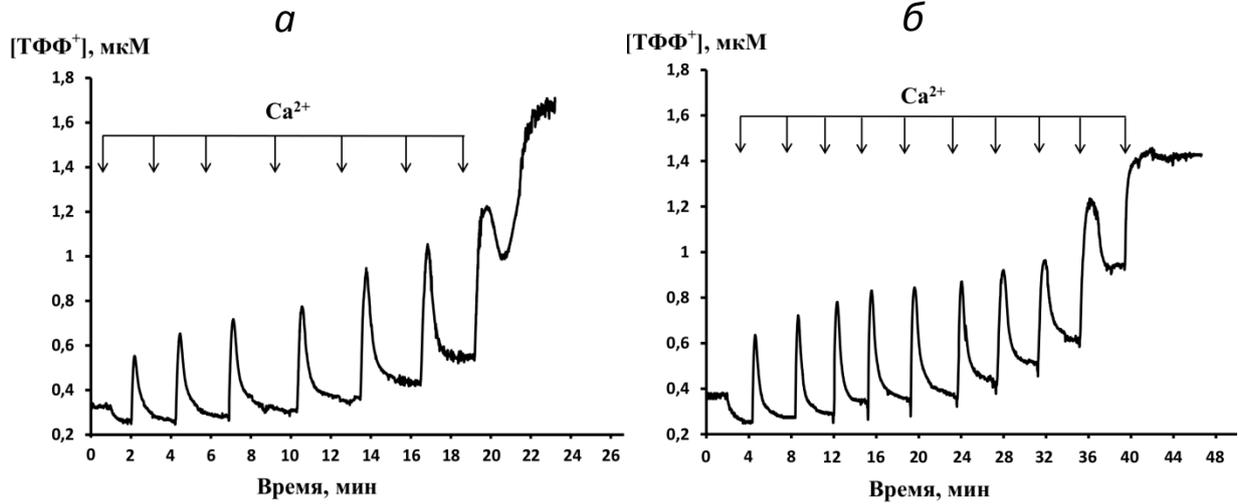


**Рисунок 6.** Кинетика выхода ТФФ<sup>+</sup> из митохондрий печени мышей, инкубируемых в присутствии 1 мМ Ф<sub>н</sub>, при добавлении СаСl<sub>2</sub> (Са<sup>2+</sup>) в отсутствие (а) и присутствии (б) ЦсА. Добавки: а – СаСl<sub>2</sub> по 20 нмоль на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>); б – СаСl<sub>2</sub> по 100 нмоль СаСl<sub>2</sub> на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы».

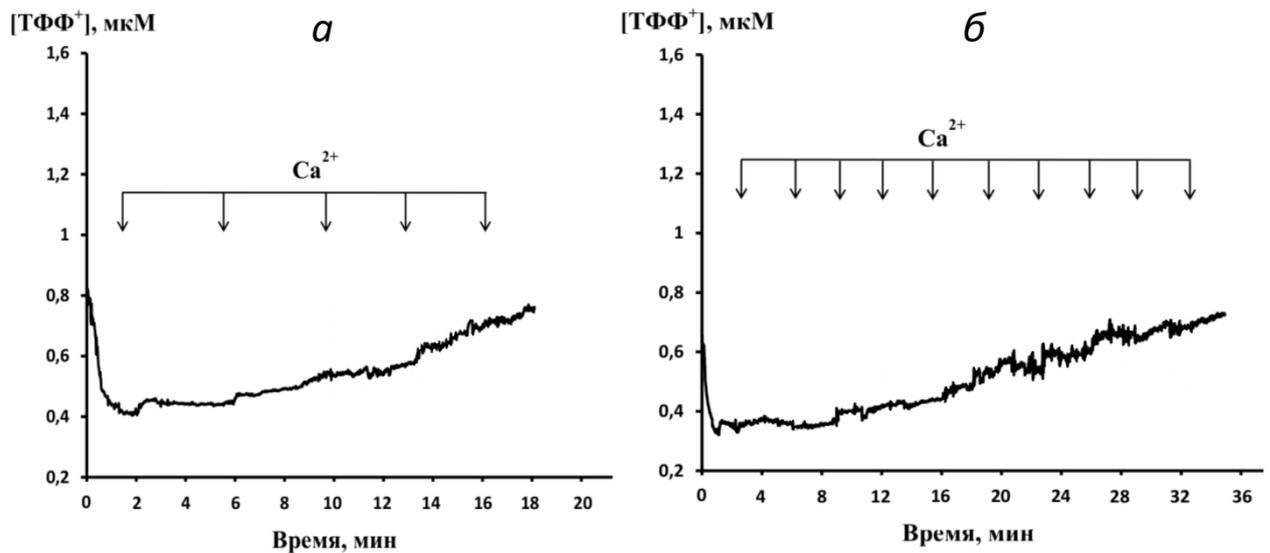


**Рисунок 7.** Кинетика выхода ТФФ<sup>+</sup> из митохондрий печени кроликов, инкубируемых в присутствии 1 мМ Ф<sub>н</sub>, при добавлении СаСl<sub>2</sub> (Са<sup>2+</sup>) в отсутствии (а) и присутствии (б) ЦсА. Добавки: а – СаСl<sub>2</sub> по 20 нмоль на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>); б – СаСl<sub>2</sub> по 100 нмоль СаСl<sub>2</sub> на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы».

В случае с митохондриями печени птиц показано, что концентрация ионов кальция, необходимая для индукции необратимого падения  $\Delta\psi$  в присутствии Ф<sub>н</sub> существенно превышает данный показатель для митохондрий печени исследуемых нами млекопитающих (рис. 8 и 9). Следует отметить, что митохондрии печени голубей практически нечувствительны к добавкам ионов кальция – даже при добавлении значительного количества СаСl<sub>2</sub> не происходит видимого изменения  $\Delta\psi$  (рис. 9). ЦсА также как и в случае с митохондриями печени млекопитающих значительно повышает концентрацию СаСl<sub>2</sub>, необходимую для необратимого снижения  $\Delta\psi$  (рис. 8 и 9).



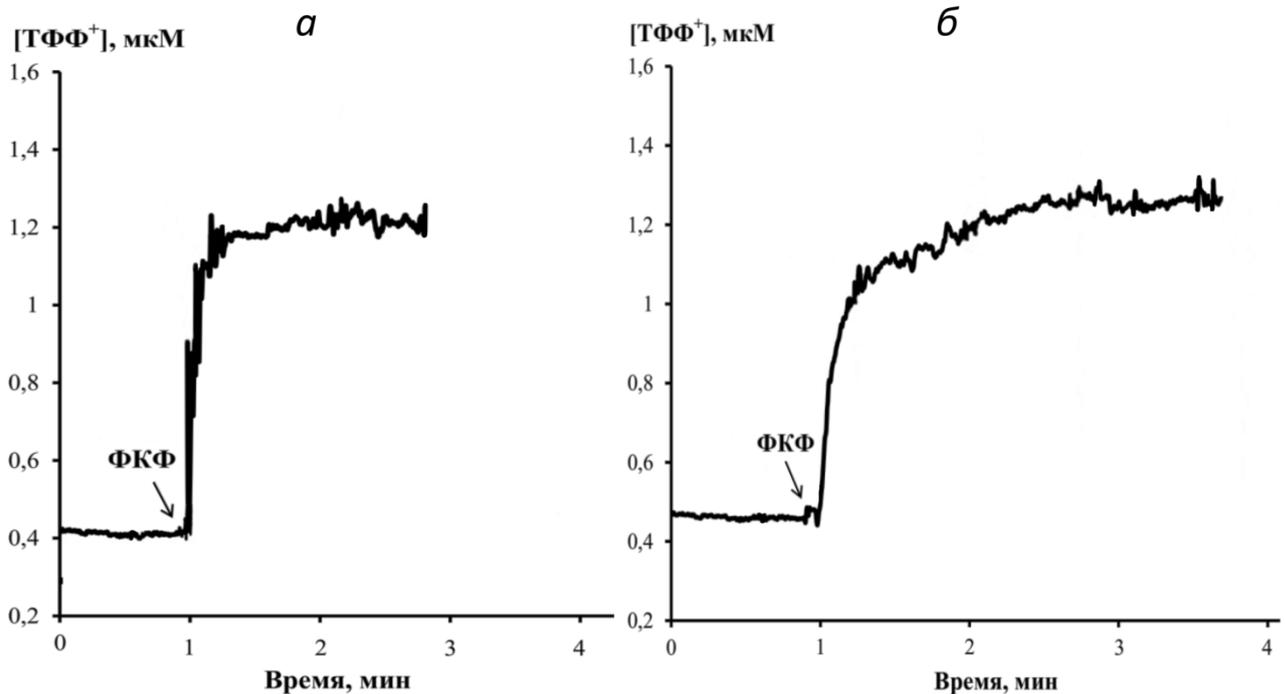
**Рисунок 8.** Кинетика выхода ТФФ<sup>+</sup> из митохондрий печени цесарок СКП, инкубируемых в присутствии 1 мМ Ф<sub>н</sub>, при добавлении СаСl<sub>2</sub> (Са<sup>2+</sup>) в отсутствии (а) и присутствии (б) ЦсА. Добавки: СаСl<sub>2</sub> по 133 нмоль на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы».



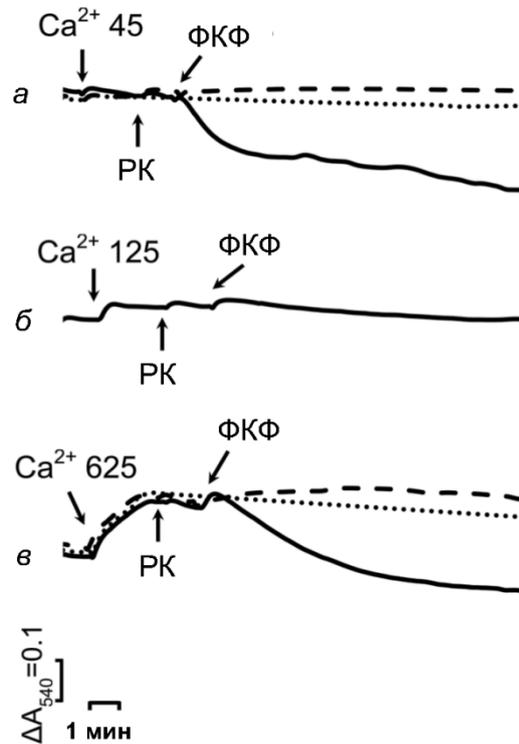
**Рисунок 9.** Кинетика выхода ТФФ<sup>+</sup> из митохондрий печени голубей, инкубируемых в присутствии 1 мМ Ф<sub>н</sub>, при добавлении СаСl<sub>2</sub> (Са<sup>2+</sup>) в отсутствии (а) и присутствии (б) ЦсА. Добавки: СаСl<sub>2</sub> по 133 нмоль на 1 мг белка (Са<sup>2+</sup>). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы».

Известно, что индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени животных также может происходить при условии деэнергизации органелл с помощью протонофорных разобщителей, например ФКФ (Petronilli et al., 1993; Scorrano et al., 1997).

Добавление ФКФ в концентрации 200 нМ к суспензии митохондрий печени крыс и цесарок вызывает существенное падение  $\Delta\psi$  (рис. 10). Как показано на рисунке 11, в условиях ФКФ-индуцируемой деэнергизации митохондрий для индукции набухания митохондрий печени крыс достаточно предварительного добавления  $\text{CaCl}_2$  в концентрации 45 нМ на 1 мг белка митохондрий. При аналогичных условиях набухание митохондрий печени цесарок наблюдается только в случае добавления 625 нМ  $\text{CaCl}_2$  на мг белка. В обоих случаях добавление к суспензии митохондрий ЦсА эффективно ингибировало набухание митохондрий.



**Рисунок 10.** Кинетика выхода  $\text{TFF}^+$  из митохондрий печени крыс (а) и цесарок (б), индуцированная добавлением 200 нМ ФКФ. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».

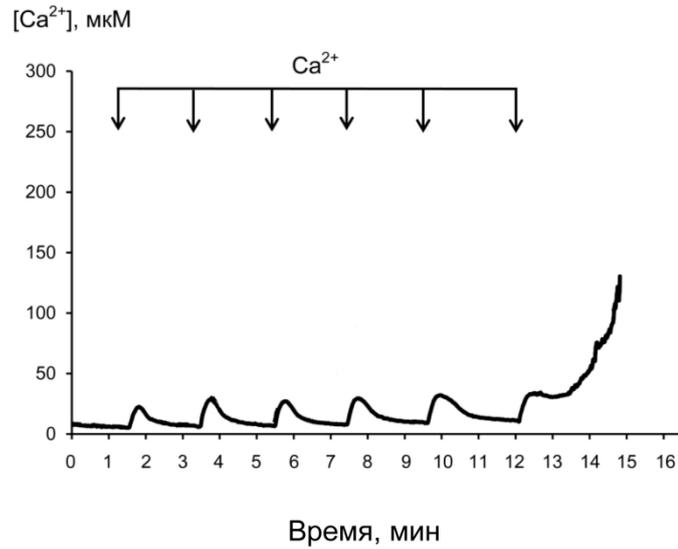


**Рисунок 11.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (*а*) и цесарок СКП (*б*, *в*) при добавлении 45 нМ  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$  45); 125 нМ  $\text{CaCl}_2$  в 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$  125) и 625 нМ  $\text{CaCl}_2$  на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$  625) в присутствии 0,5 мкМ рутения красного (РК) и 200 нМ ФКФ (сплошная линия), в присутствии РК, ФКФ и ЦсА (пунктирная линия) и в их отсутствии (точечная линия). Среда инкубации предварительно содержала 1 мМ  $\text{F}_n$ . Концентрация белка митохондрий 0,8 мг/мл.

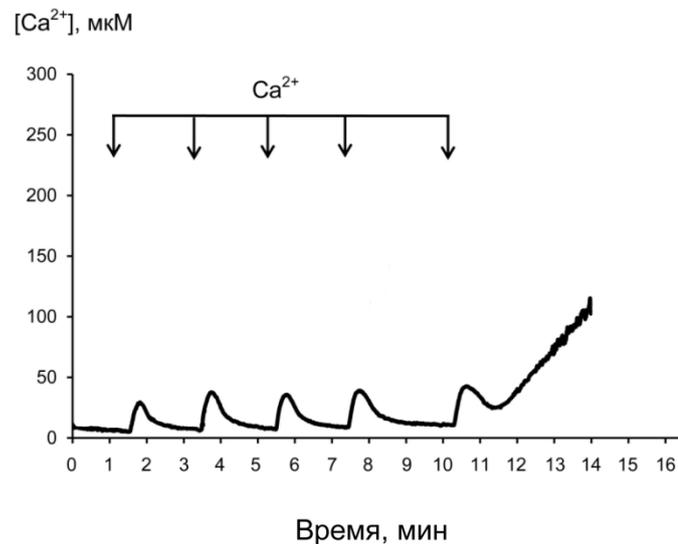
### 3.3. Изучение кинетики поглощения $\text{Ca}^{2+}$ митохондриями печени млекопитающих и птиц разных видов при индукции ЦсА-чувствительной поры. Кальциевая емкость митохондрий

На рис. 12-14 представлены результаты сравнительных исследований кинетики поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями печени крыс, мышей и кроликов, инкубируемых в сахарозной среде в присутствии  $\text{F}_n$ . В отсутствие ЦсА митохондрии печени крыс способны полностью поглощать  $\text{Ca}^{2+}$  при условии пятикратного добавления  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка (рис. 12) и удерживать его в матриксе как минимум 10 мин. В этом случае только после шестой добавки  $\text{CaCl}_2$  наблюдается выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий (рис. 12). Выход

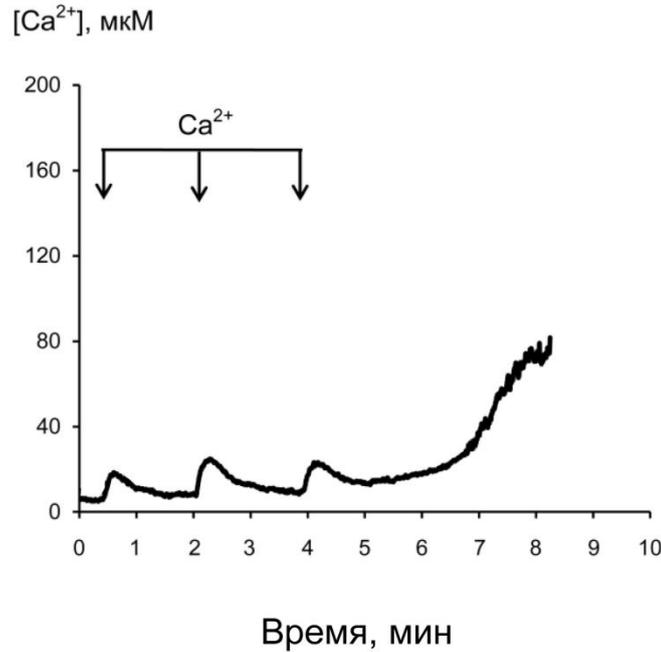
$\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий печени мышей и кроликов наблюдается соответственно после пятой и третьей добавок  $\text{CaCl}_2$  в том же количестве (рис. 13, 14).



**Рисунок 12.** Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени крысы, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{Ф}_\text{н}$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



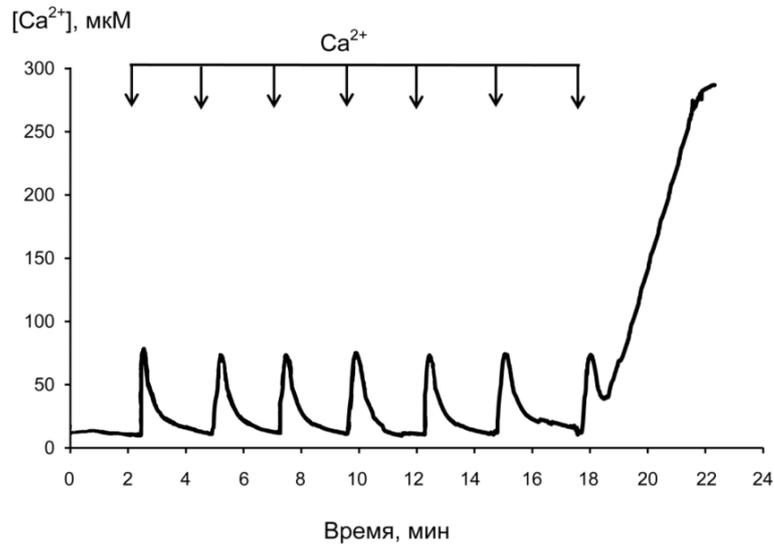
**Рисунок 13.** Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени мышей, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{Ф}_\text{н}$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



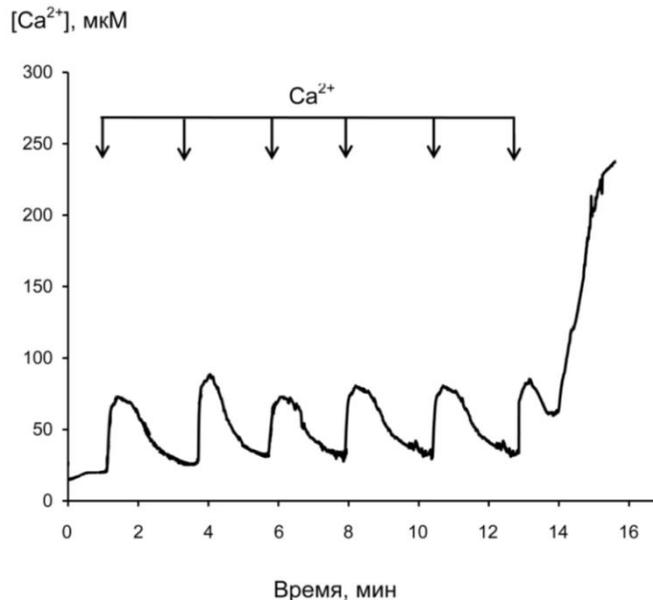
**Рисунок 14.** Транспорт  $Ca^{2+}$  в митохондриях печени кроликов, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\Phi_n$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $CaCl_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $Ca^{2+}$ ).

В отличие от митохондрий печени млекопитающих, митохондрии печени цесарок СКП, также инкубируемые в сахарозной среде с  $\Phi_n$ , способны даже в отсутствие ЦсА поглощать и удерживать  $Ca^{2+}$  при условии шестикратного добавления  $CaCl_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка (рис. 15). Аналогичные свойства были обнаружены и у митохондрий печени цесарок ЗБП (рис. 16).

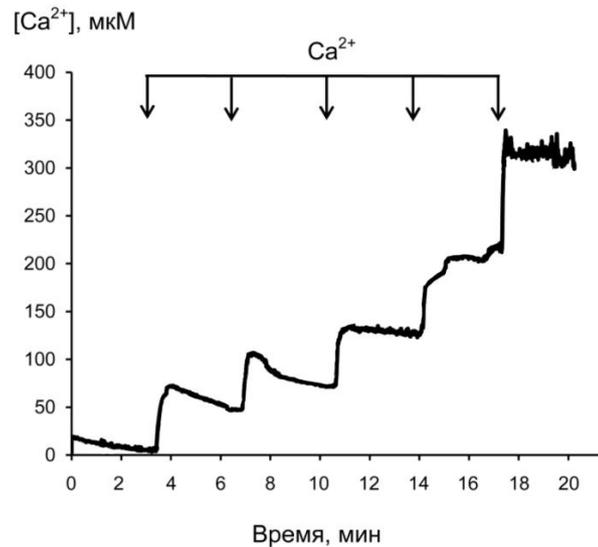
Интересно отметить, что митохондрии печени голубей существенно отличаются от митохондрий печени других животных, так как не обладают способностью полностью захватывать и удерживать в матриксе  $Ca^{2+}$  (рис. 17). Это, однако, не препятствует индукции  $Ca^{2+}$ -зависимой поры, по крайней мере, у части митохондрий этих птиц.



**Рисунок 15.** Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени цесарок СКП, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_n$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Рисунок 16.** Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени цесарок ЗБП, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_n$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Рисунок 17.** Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени голубей, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_n$ . Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 66 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Способность  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировать открытие поры в митохондриях можно выразить количественно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, другими словами, то максимальное количество  $\text{Ca}^{2+}$ , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры (Basso et al., 2008; Varanyuwatana, Halestrap, 2012; Giorgio et al., 2013).

Очевидно, что, исходя из кинетики поглощения  $\text{Ca}^{2+}$ , можно определить КЕ митохондрий указанных животных за исключением голубей. Как показано на рисунке 18 и в таблице 5, КЕ митохондрий печени крыс и мышей приблизительно одинаковы, в то время как КЕ митохондрий печени кроликов существенно меньше. КЕ митохондрий печени цесарок СКП и цесарок ЗБП одинаковы и существенно превосходит таковую для митохондрий печени крыс, мышей и кроликов (табл. 5). Предварительная инкубация органелл с 1 мкМ ЦсА приводит к существенному повышению КЕ митохондрий печени животных (табл. 5).

**Таблица 5.** Сравнение кальциевой емкости (нмоль  $\text{CaCl}_2$ /на 1 мг белка) митохондрий печени различных животных в отсутствии добавок и в присутствии 1 мМ ЦсА.

Животные	Без добавок	ЦсА 1 мкМ
Крысы ( $n = 9$ )	$70 \pm 5$	$933 \pm 51$
Мыши ( $n = 9$ )	$57 \pm 7$	$734 \pm 33$
Кролики ( $n = 6$ )	$38 \pm 5^*$	$789 \pm 52$
Цесарки СКП ( $n = 6$ )	$844 \pm 46^*$	$1400 \pm 67^*$
Цесарки ЗБП ( $n = 6$ )	$793 \pm 35^*$	$1289 \pm 77^*$

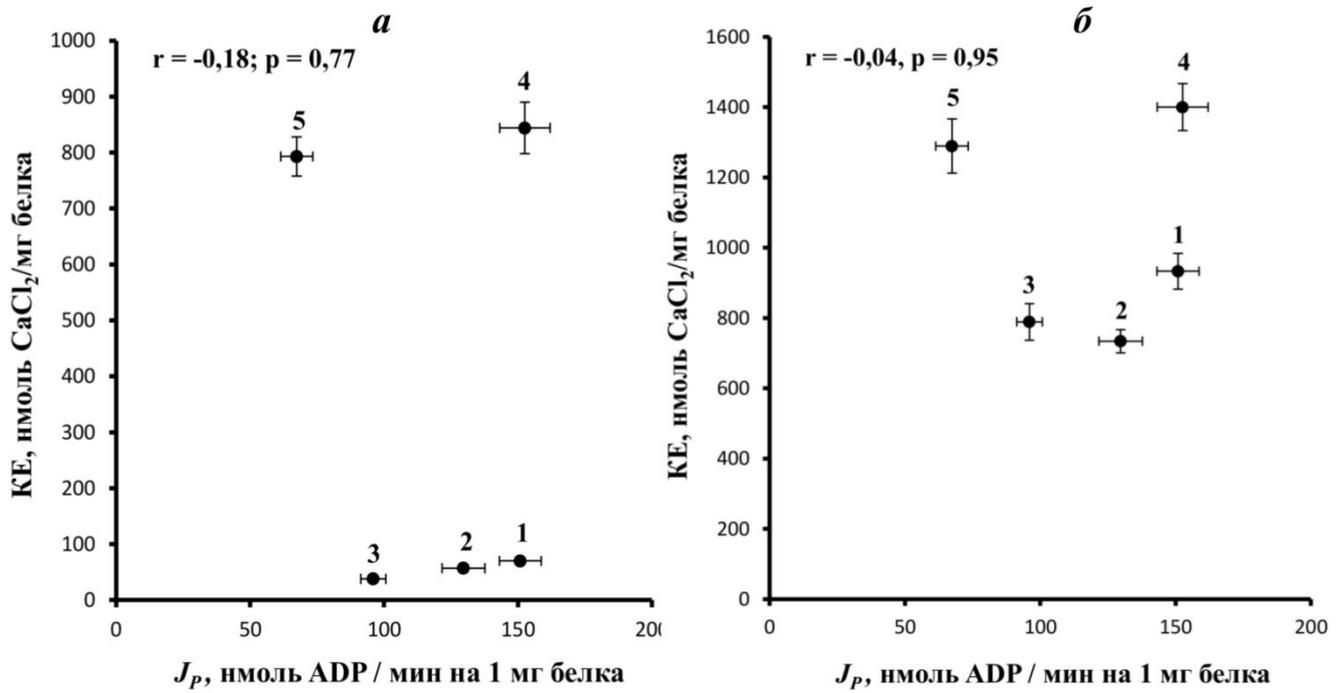
*Примечание.* Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия между опытом (присутствие ЦсА) и контролем (их отсутствие) статистически значимы,  $p < 0,01$ .

\*Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий указанных животных и аналогичными показателями митохондрий крыс,  $p < 0,05$ .

Выше уже отмечалось (раздел 1.3), что, как предполагается, в формировании ЦсА-чувствительной поры может принимать участие  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза, АДФ/АТФ-антипортер и переносчик фосфата (Leung et al., 2008; Bonora et al., 2013; Giorgio et al., 2013). Вместе с тем известно, что основная функция  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы заключается в синтезе АТФ, в то время как АДФ/АТФ-антипортер и переносчик фосфата осуществляют сопряженный с этим процессом обмен АДФ на АТФ и транспорт  $\text{F}_h$  соответственно (Chen et al., 2004; Klingenberg, 2008; Скулачев и др., 2010; Chevrollier et al., 2011; Nishi et al., 2011; Jonckheere et al., 2012). Совместное функционирование этих систем во многом определяет скорость и эффективность окислительного синтеза АТФ (Ko et al., 2003; Chen et al., 2004; Скулачев и др., 2010). Представляет интерес выяснить, связано ли различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени животных указанных видов с особенностями основной функции этих органелл – окислительного синтеза АТФ.

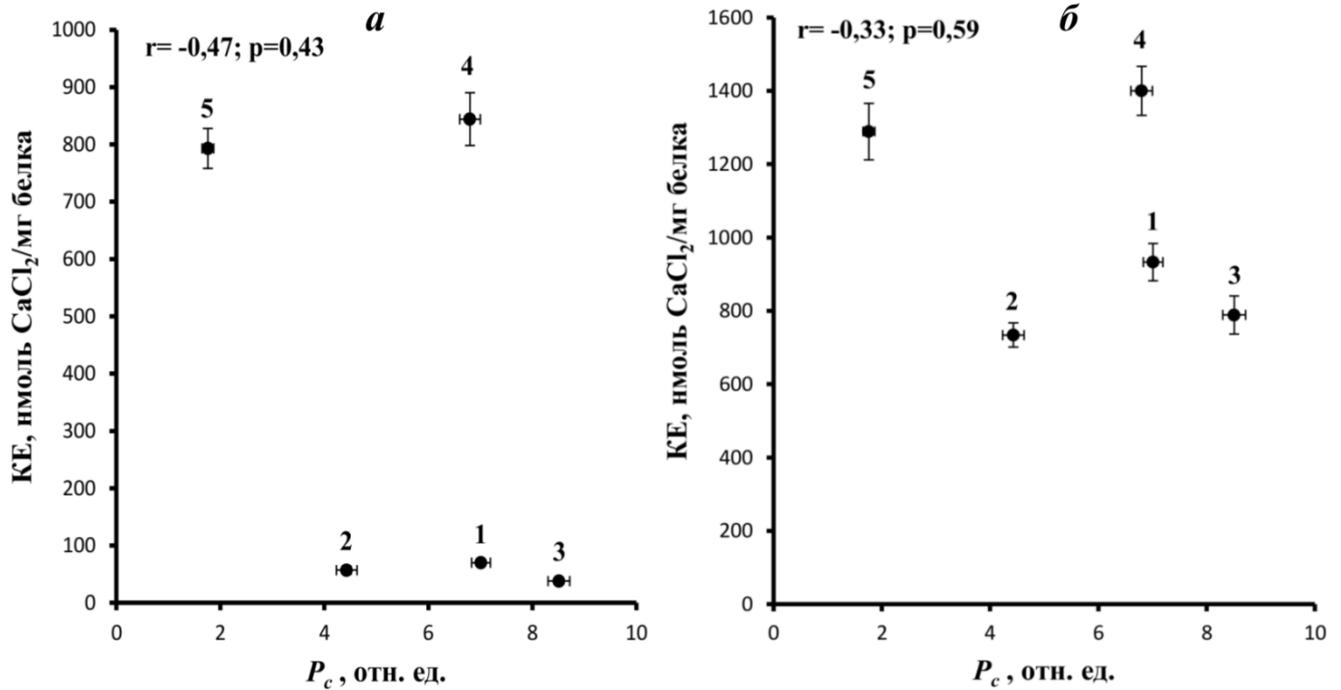
Был применен количественный показатель способности  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировать открытие поры в митохондриях – КЕ этих органелл. Проведенные исследования

не выявили связи между КЕ и скоростью синтеза АТФ ( $J_p$ ) для митохондрий печени крыс, мышей, кроликов, цесарок СКП и цесарок ЗБП в отсутствии и в присутствии ЦсА (рис. 18).



**Рисунок 18.** Отсутствие зависимости величины кальциевой емкости (КЕ) в отсутствии (а) и присутствии (б) ЦсА от скорости синтеза АТФ ( $J_p$ ) митохондрий печени животных разных видов. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в тексте. Каждая точка на графике – средние значения величин КЕ и  $J_p$  митохондрий печени одного вида животных  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На графике цифрами обозначены митохондрии печени: крыс (1), мышей (2), кроликов (3), цесарок СКП (4), цесарок ЗБП (5).

Также не выявлена связь между КЕ и эффективностью окислительного синтеза АТФ (коэффициент  $P_c$ ) для митохондрий печени этих животных в отсутствии и в присутствии ЦсА (рис. 19). Следовательно, различие в резистентности митохондрий печени животных этих видов к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как к идуктору ЦсА-чувствительной поры не связано с изменением скорости и эффективности сопряженного с потреблением кислорода синтеза АТФ.



**Рисунок 19.** Отсутствие зависимости величины кальциевой емкости (КЕ) в отсутствии (а) и присутствии (б) ЦсА от отношения величин скоростей синтеза АТФ и дыхания в состоянии 4 ( $P_C$ ) митохондрий печени животных разных видов. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в тексте. Каждая точка на графике – средние значения величин КЕ и  $P_C$  митохондрий печени одного вида животных  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На графике цифрами обозначены митохондрии печени: крыс (1), мышей (2), кроликов (3), цесарок СКП (4), цесарок ЗБП (5).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что митохондрии печени цесарок и голубей обладают существенно большей резистентностью к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры, чем митохондрии печени крыс, мышей и кроликов. В митохондриях печени животных этих разных видов различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры не связано с особенностями основной функции органелл – окислительного синтеза АТФ. Хорошо известно, что для эффективной индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры необходим транспорт этих ионов в матрикс (Chalmers and Nicholls, 2003; Lemasters et al., 2009; Скулачев и др., 2010; Rasola and Bernardi, 2011; Siemen and Ziemer, 2013; Zorov et al., 2014). В

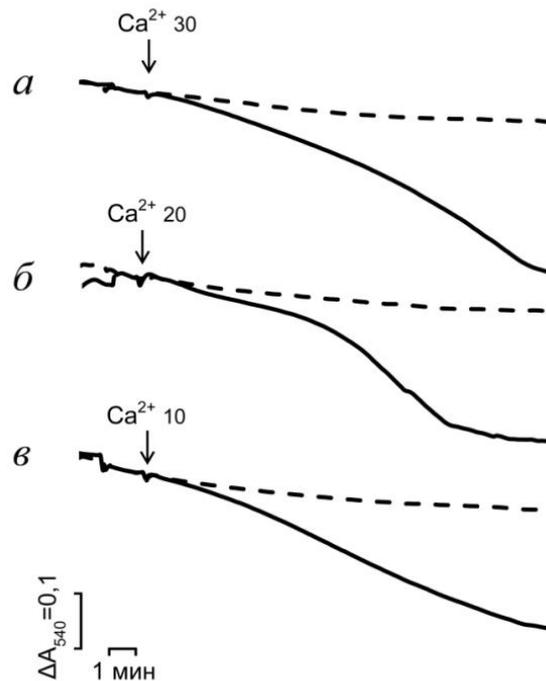
связи с этим более высокая резистентность к индукторам ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени голубей может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в необходимом для индукции поры количестве. В отличие от этого митохондрии печени цесарок способны эффективно поглощать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в существенно большем количестве, чем митохондрии печени млекопитающих. При этом, также как в митохондриях печени млекопитающих, индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры эффективно подавляется ЦсА, что свидетельствует об участии циклофилина D в формировании порового комплекса и в митохондриях печени цесарок. Согласно одной из гипотез, в формировании порового комплекса с циклофилином D может принимать участие  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза, и в этом случае  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с каталитической частью фактора  $F_1$  (Giorgio et al., 2013). Можно предположить, что в митохондриях печени цесарок  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с этим сайтом хуже, чем в митохондриях печени крыс и мышей. Исходя из этого, наименьшая резистентность митохондрий печени кроликов к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры по сравнению с митохондриями других животных может быть обусловлена связыванием этих ионов с каталитической частью фактора  $F_1$  с более высоким сродством. Вместе с тем, известно, что КЕ митохондрий и, соответственно, их резистентность к индукции ЦсА-чувствительной поры может существенно варьировать в зависимости от степени экспрессии антиапоптозных белков семейства Bcl-2 в клетке (Murphy et al., 1996).

### **3.4. Влияние окисляющего агента ТБГ на индукцию $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях животных разных видов**

Хорошо установлено, что индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры значительно усиливается при окислительном стрессе (Скулачев и др., 2010; Zorov et al., 2014). Одним из путей моделирования *in vitro* окислительного стресса в изолированных митохондриях является их инкубация с различными окисляющими агентами, в частности, с ТБГ (Кожина и Самарцев, 2010; Ronchi et al., 2011; Zorov

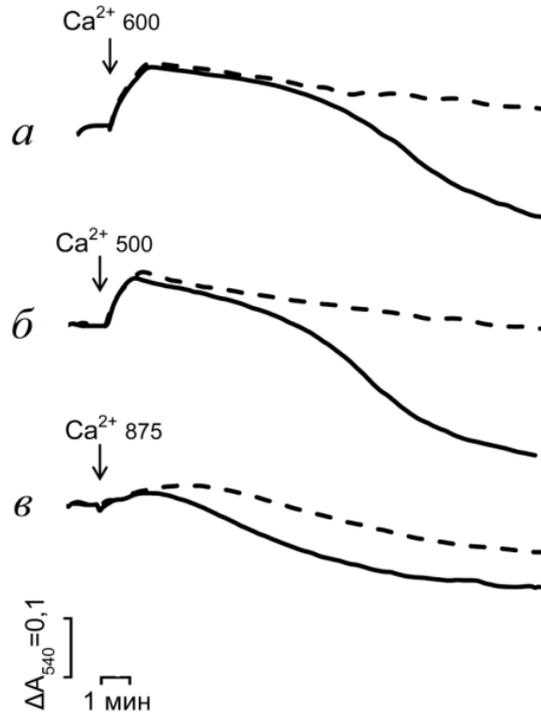
et al., 2014). Отмечено, что действие ТБГ заключается в окислении тиоловых групп белков, пиридиновых нуклеотидов и глутатиона, а также усилению образования АФК в митохондриях, что в конечном итоге снижает пороговую концентрацию ионов кальция и способствует индукции митохондриальной поры (Castilho et al., 1995; Kakkar et al., 1996; Vercesi et al., 1997; Kushnareva and Sokolove, 2000; Kowaltowski et al., 2001; Zavodnik et al., 2012).

Как показано на рис. 20, при снижении количества добавляемого к митохондриям печени крыс, мышей и кроликов  $\text{CaCl}_2$  до 30, 20 и 10 нмоль на 1 мг белка соответственно не наблюдается набухания данных органелл. При тех же условиях предварительная инкубация митохондрий этих животных в присутствии окисляющего агента ТБГ и в отсутствии ЦсА приводит к их высокоамплитудному набуханию.



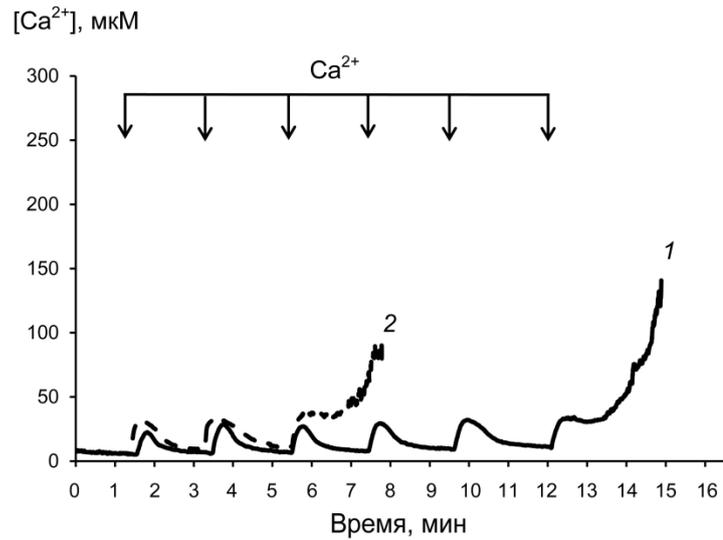
**Рисунок 20.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (а), мышей (б), кроликов (в), инкубируемых в присутствии (сплошная линия) и отсутствии 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка (пунктирная линия), при добавлении  $\text{CaCl}_2$ . Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  (в нмоль на 1 мг белка) указано на рисунке. Концентрация митохондриального белка – 0.8 мг/мл.

Аналогичное влияние ТБГ оказывает и на митохондрии печени птиц. Показано, что инкубация митохондрий печени СКП и ЗБП цесарок, а также голубей с ТБГ в отсутствии ЦсА также приводит к их высокоамплитудному набуханию при меньших количествах  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с контролем (рис. 21).

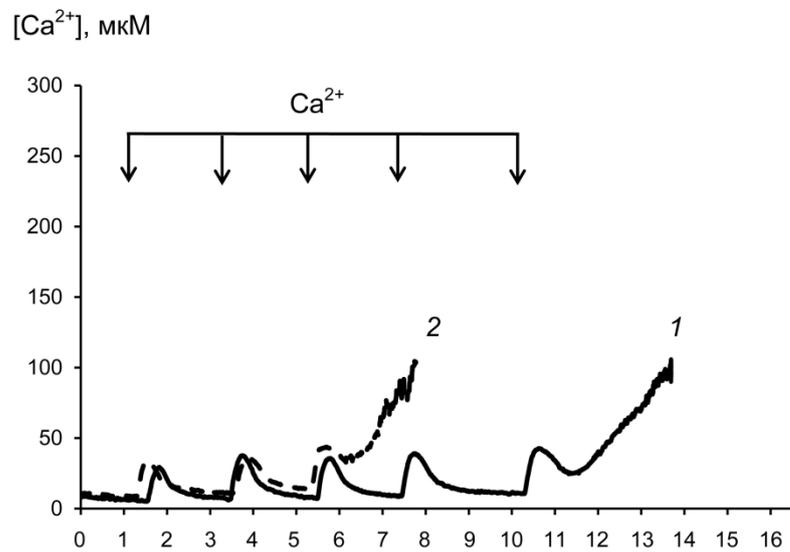


**Рисунок 21.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени СКП (*а*) и ЗБП (*б*) цесарок и голубей (*в*), инкубируемых в присутствии (сплошная линия) и отсутствии 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка (пунктирная линия), при добавлении  $\text{CaCl}_2$ . Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Количество добавляемого  $\text{CaCl}_2$  (в нмоль на 1 мг белка) указано на рисунке. Концентрация митохондриального белка – 0,8 мг/мл.

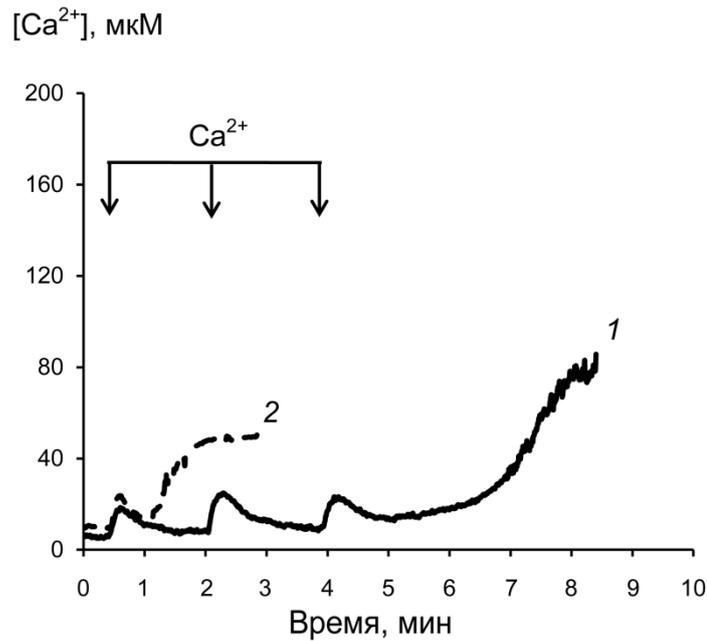
В условиях индуцированного ТБГ окислительного стресса способность митохондрий изученных млекопитающих удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  существенно снижается (рис. 22 – 24). При этом наиболее эффективно ТБГ действует на митохондрии кроликов.



**Рисунок 22.** Сравнительное исследование транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени крыс, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_h$ , в отсутствии (1) и присутствии (2) 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

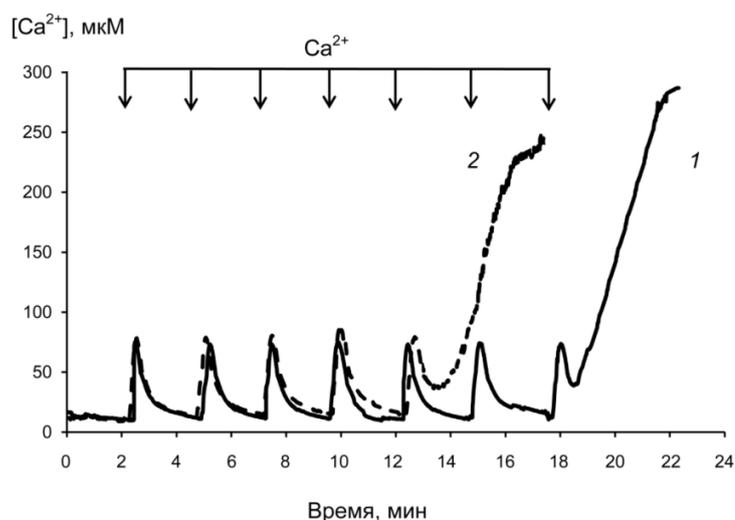


**Рисунок 23.** Сравнительное исследование транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени мышей, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_h$ , в отсутствии (1) и присутствии (2) 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

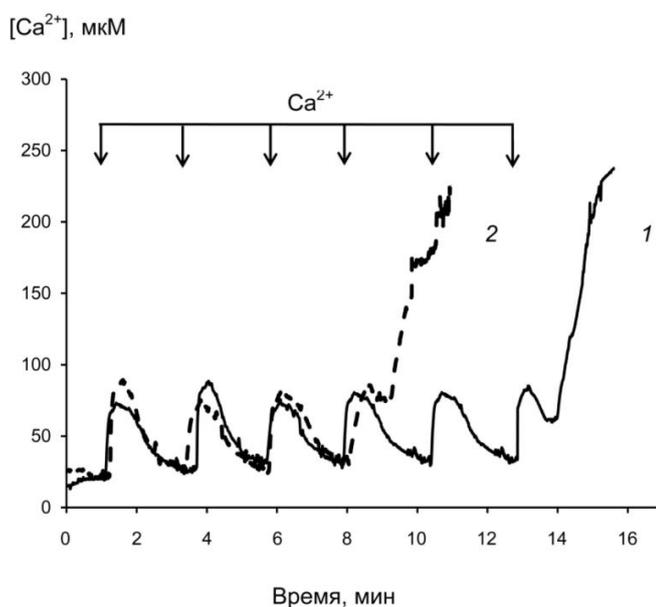


**Рисунок 24.** Сравнительное исследование транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени кроликов, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_h$ , в отсутствии (1) и присутствии (2) 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 13,3 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

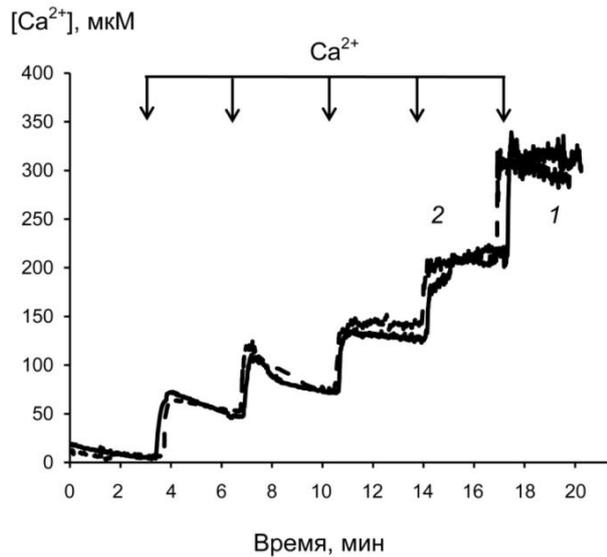
Индуцированный ТБГ окислительный стресс также снижает способность удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени изученных нами птиц (рис. 25 – 27). Интересно отметить, что митохондрии печени голубей существенно отличаются от митохондрий печени других животных, так как не обладают способностью полностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  как в отсутствие, так и в присутствии ТБГ (рис. 27). Это, однако, не препятствует индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, по крайней мере, у части митохондрий этих птиц.



**Рисунок 25.** Сравнительное исследование транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени цесарок СКП, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_n$ , в отсутствии (1) и присутствии (2) 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Рисунок 26.** Сравнительное исследование транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени цесарок ЗБП, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_n$ , в отсутствии (1) и присутствии (2) 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 133 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Рисунок 27.** Сравнительное исследование транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени голубей, инкубируемых в присутствии 1 мМ  $\text{F}_h$ , в отсутствии (1) и присутствии (2) 200 нмоль ТБГ на 1 мг белка. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Концентрация митохондриального белка – 1,5 мг/мл. Добавки:  $\text{CaCl}_2$  по 66 нмоль на 1 мг белка ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

В условиях индуцированного ТБГ окислительного стресса наблюдается снижение КЕ митохондрий печени животных (табл. 6). Наибольший эффект ТБГ наблюдается в митохондриях печени кролика (снижение КЕ на 77%), в меньшей степени – в митохондриях печени мышей и крыс (снижение КЕ на 56 и 57% соответственно). В то время как в митохондриях печени цесарок СКП и ЗБП ТБГ менее эффективен (снижение КЕ на 35 и 38% соответственно).

Следовательно, митохондрии печени цесарок существенно более устойчивы к действию окисляющего агента ТБГ как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, чем митохондрии печени крыс, мышей и кроликов. Как уже отмечалось выше, определить КЕ для митохондрий печени голубей не представляется возможным. Однако, исходя из данных по набуханию митохондрий печени этих птиц (рис. 21) можно также говорить об их высокой устойчивости к действию окисляющего агента ТБГ как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры.

**Таблица 6.** Сравнение кальциевой емкости (нмоль  $\text{CaCl}_2$ /на 1 мг белка) митохондрий печени различных животных в отсутствии добавок и в присутствии 200 мкМ ТБГ

Животные	Без добавок	ТБГ 200 мкМ
Крысы ( $n = 9$ )	$70 \pm 5$	$30 \pm 3$
Мыши ( $n = 9$ )	$57 \pm 7$	$25 \pm 2$
Кролики ( $n = 6$ )	$38 \pm 5^*$	$8,9 \pm 0,2^*$
Цесарки СКП ( $n = 6$ )	$844 \pm 46^*$	$545 \pm 48^*$
Цесарки ЗБП ( $n = 6$ )	$793 \pm 35^*$	$491 \pm 33^*$

*Примечание.* Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия между опытом (присутствие ТБГ) и контролем (их отсутствие) статистически значимы,  $p < 0,01$ .

\*Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий указанных животных и аналогичными показателями митохондрий крыс,  $p < 0,05$ .

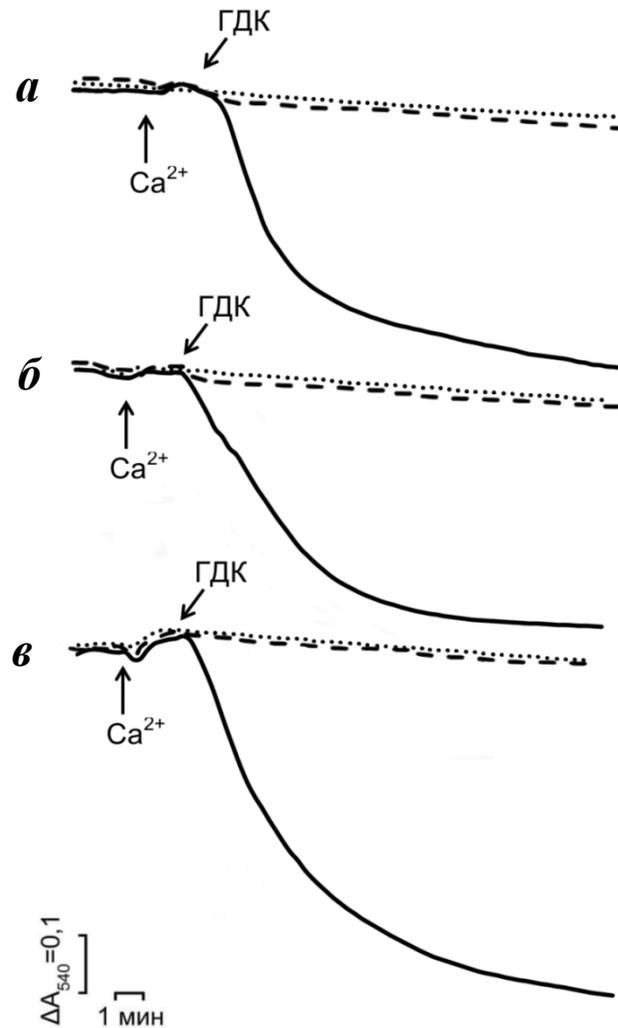
### **3.5. Действие ГДК как индуктора $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц**

Известны различные индукторы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой проницаемости внутренней мембраны митохондрий, действие которых не подавляется ЦсА. Наше внимание привлекли длинноцепочечные  $\alpha, \omega$ -дикарбоновые кислоты, в частности ГДК. Действие этой дикарбоновой кислоты на митохондрии, как предполагается, реализуется по механизму полиморфного фазового перехода, обусловленного слиянием мембран (Dubinin et al., 2014).

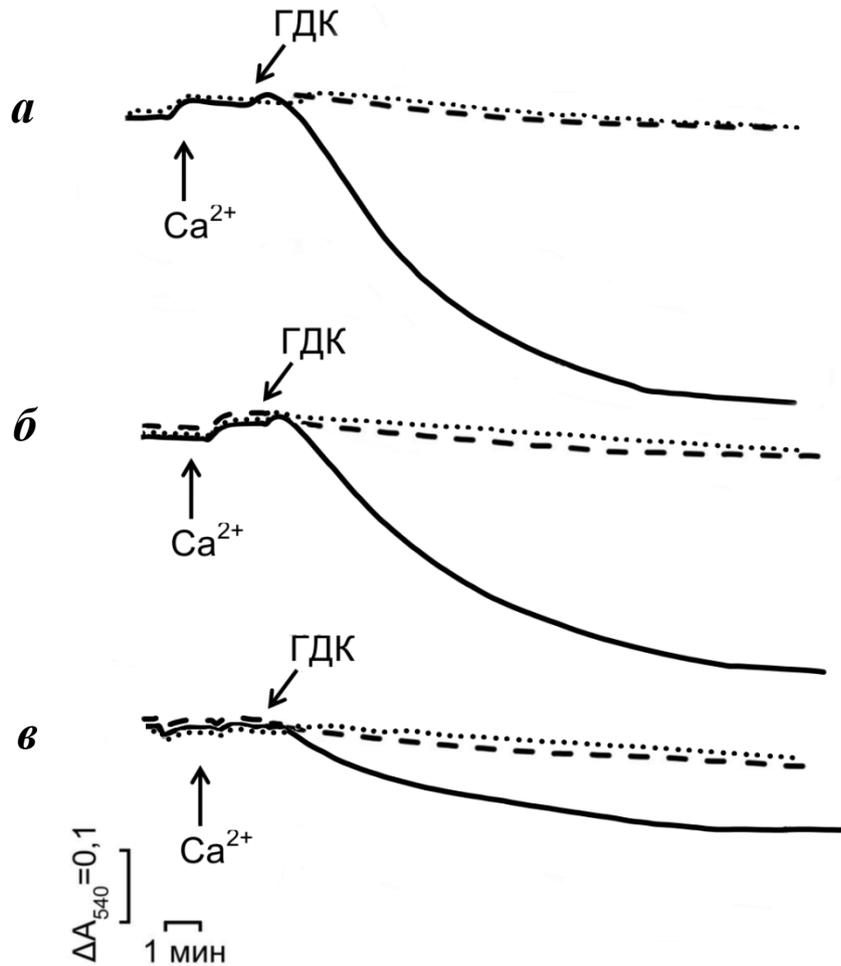
Как показано на рисунке 28, внесение к митохондриям печени крыс, мышей и кроликов последовательно  $\text{CaCl}_2$  (200 нмоль на 1 мг белка) и ГДК (20 нмоль на 1 мг белка) в присутствии ЦсА приводит к снижению оптической плотности суспензии, что свидетельствует о высокоамплитудном набухании этих органелл при формировании ЦсА-нечувствительной поры (Дубинин и др., 2013; Dubinin et al., 2014).

При аналогичных экспериментальных условиях внесение к митохондриям печени обеих популяций цесарок и голубей последовательно  $\text{CaCl}_2$  и ГДК также приводит к снижению оптической плотности суспензии (рис. 29).

В контрольных экспериментах было установлено, что изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени этих млекопитающих и птиц не наблюдается при добавлении только  $\text{CaCl}_2$  или только ГДК в указанных выше концентрациях (рис. 28, 29).



**Рисунок 28.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени крыс (а), мышей (б) и кроликов (в), в присутствии 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  и 20 мкМ ГДК (сплошная линия); в присутствии только 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (пунктирная линия) и в присутствии только 20 мкМ ГДК (точечная линия). Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».



**Рисунок 29.** Кинетика изменения светорассеяния суспензии митохондрий печени цесарок СКП (а), цесарок ЗБП (б) и голубей (в), в присутствии 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  и 20 мкМ ГДК (сплошная линия); в присутствии только 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (пунктирная линия) и в присутствии только 20 мкМ ГДК (точечная линия). Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».

Как видно из представленных в таблице 7 данных, митохондрии печени птиц характеризуются меньшей скоростью набухания, по сравнению с митохондриями печени млекопитающих. Аналогичная закономерность наблюдается и для амплитуды набухания митохондрий (табл. 7).

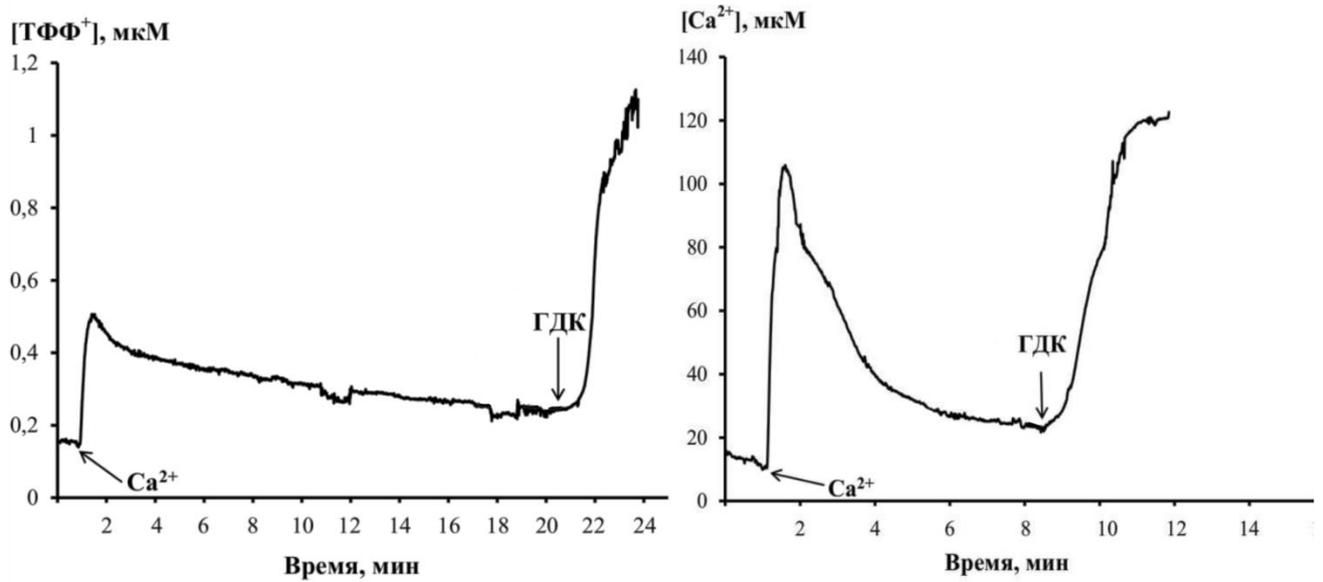
Можно предположить, что меньшая скорость набухания митохондрий печени птиц по сравнению с митохондриями печени млекопитающих может свидетельствовать о меньшей эффективности ГДК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны.

**Таблица 7.** Сравнение скорости ( $\Delta A/\text{мин}$  на 1 мг белка) и амплитуды ( $\Delta A$  на 1 мг белка) набухания митохондрий печени исследуемых животных в условиях индукции ГДК/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны

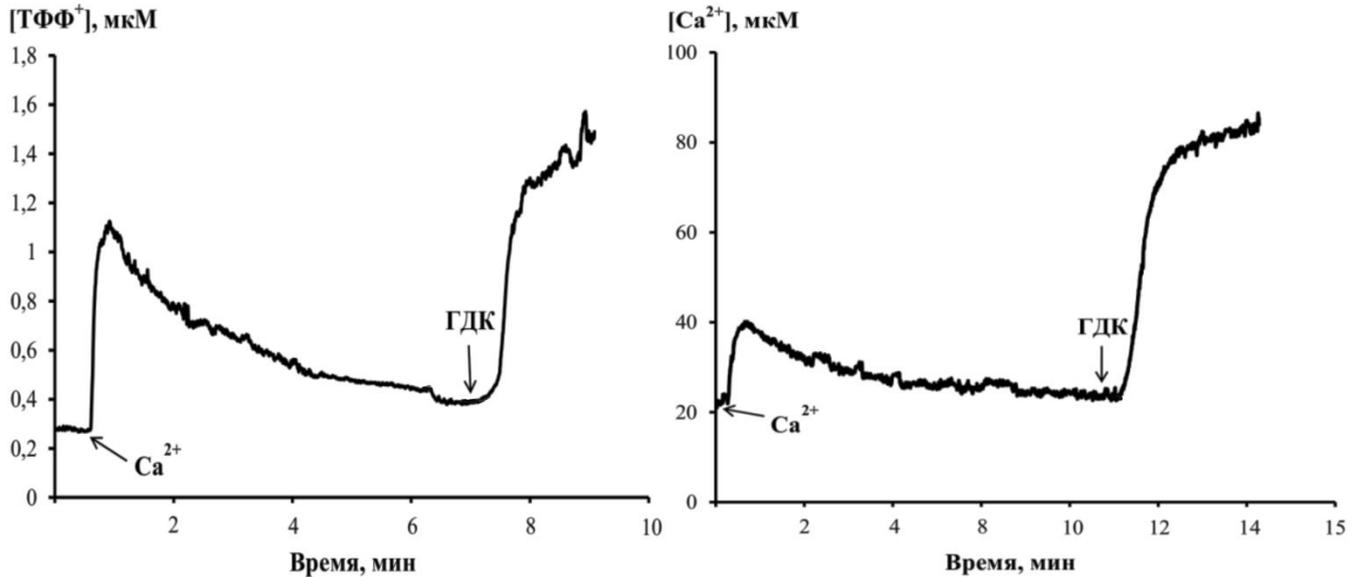
Животные	Скорость набухания	Амплитуда набухания
Крысы ( $n = 9$ )	0,269±0,008	0,828±0,022
Мыши ( $n = 9$ )	0,202±0,013*	0,808±0,013
Кролики ( $n = 6$ )	0,219±0,007*	1,097±0,015*
Цесарки СКП ( $n = 6$ )	0,121±0,020*	0,528±0,053*
Цесарки ЗБП ( $n = 6$ )	0,080±0,005*	0,405±0,017*
Голуби ( $n = 4$ )	0,077±0,005*	0,192±0,011*

*Примечание.* Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы». Концентрация митохондриального белка – 0.8 мг/мл. Добавки, как в подписи к рис. 28-35. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. \*Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий указанных животных и аналогичными показателями митохондрий крыс,  $p < 0,001$ .

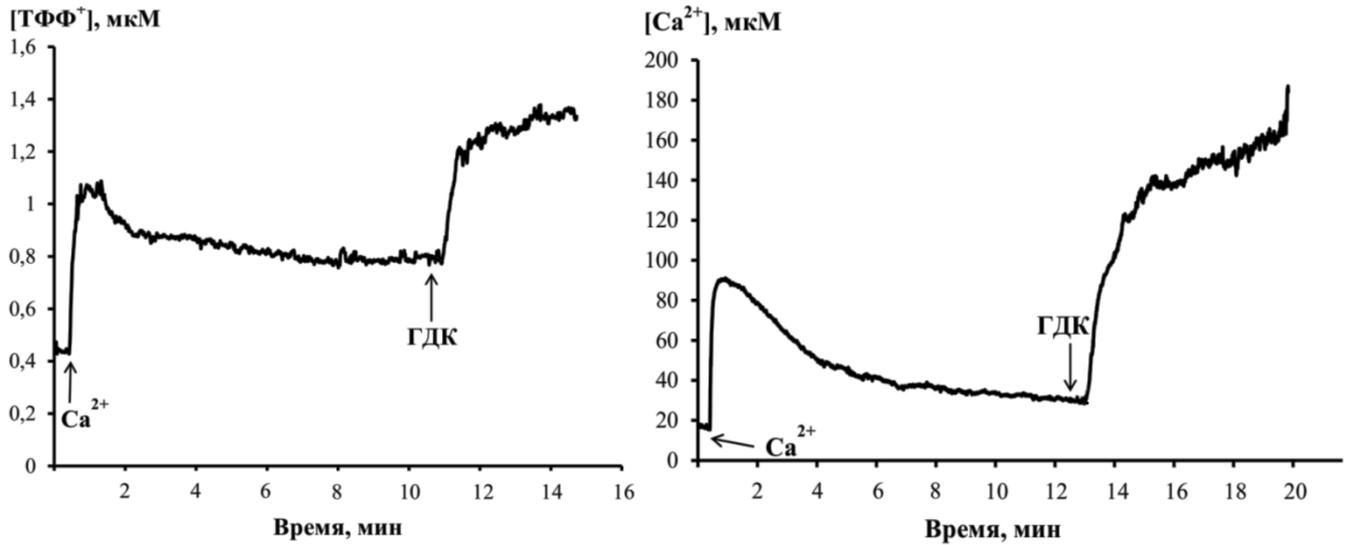
Добавление ГДК к суспензии митохондрий млекопитающих и птиц, предварительно нагруженных  $\text{Ca}^{2+}$ , в присутствии ЦсА во всех случаях приводит к быстрому и полному выходу  $\text{TFF}^+$  из матрикса (рис. 30-34), что свидетельствует о полном падении  $\Delta\psi$  на внутренней мембране органелл. Такое быстрое снижение  $\Delta\psi$  сопровождается таким же быстрым выходом  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса митохондрий этих животных (рис. 30-34).



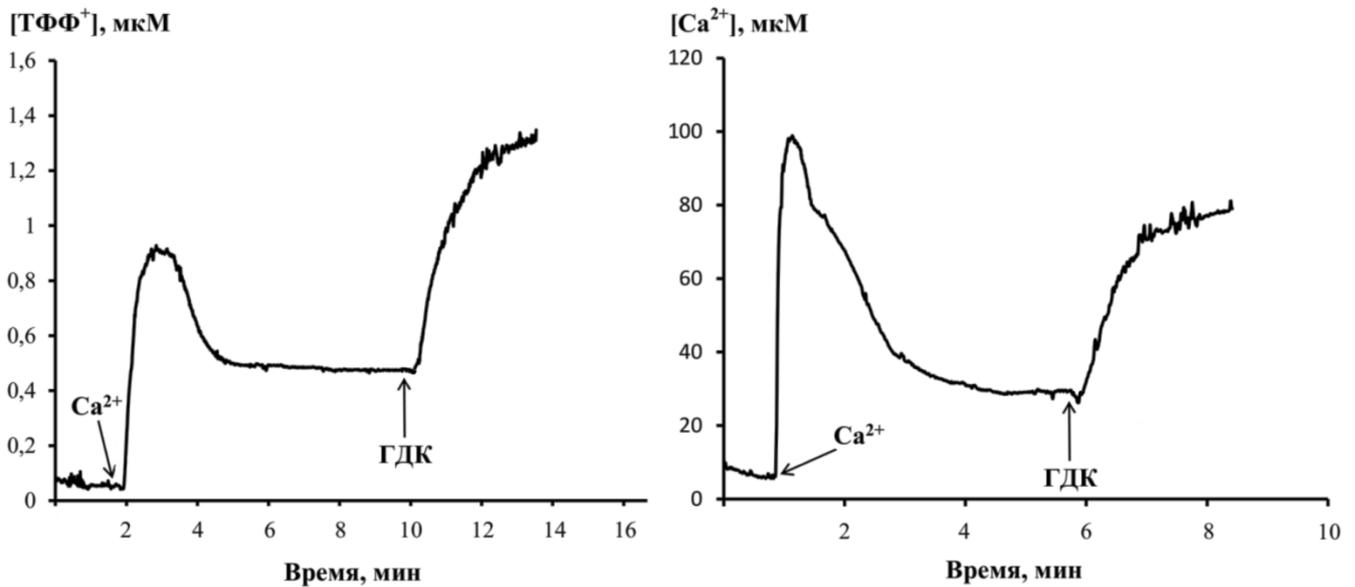
**Рисунок 30.** Кинетика выхода  $TFF^+$  и  $Ca^{2+}$  из митохондрий печени крыс, индуцированная добавлением ГДК. Добавки: 200 мкМ  $Ca^{2+}$ ; 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».



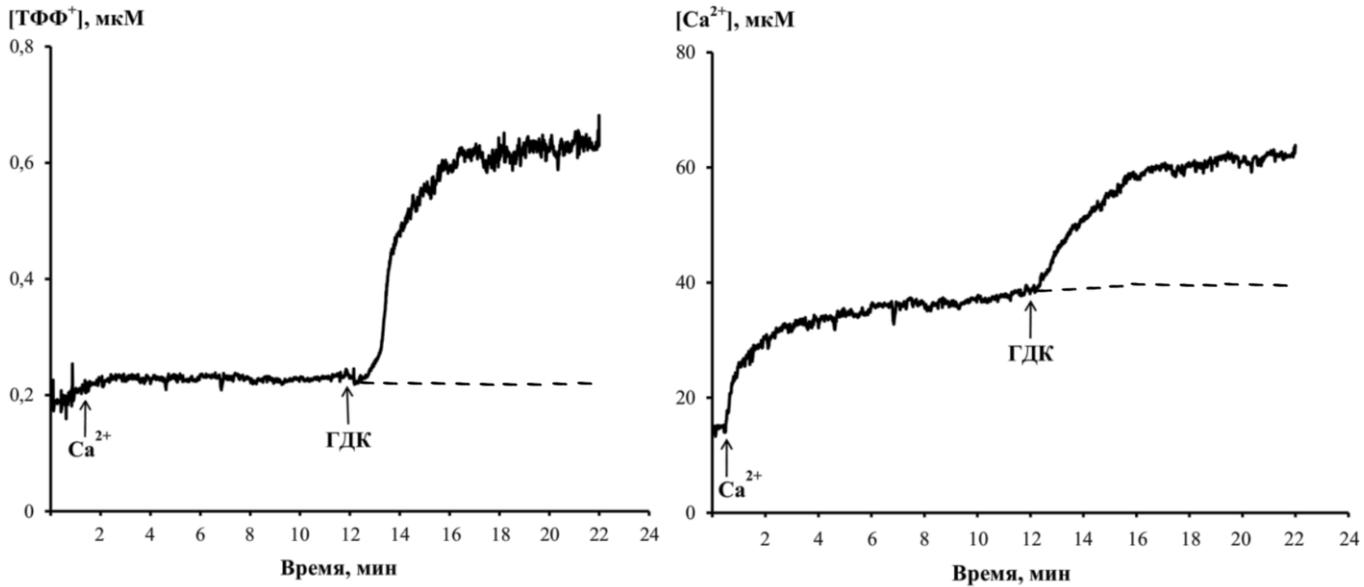
**Рисунок 31.** Кинетика выхода  $TFF^+$  и  $Ca^{2+}$  из митохондрий печени мышей, индуцированная добавлением ГДК. Добавки: 200 мкМ  $Ca^{2+}$ ; 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».



**Рисунок 32.** Кинетика выхода  $TFF^+$  и  $Ca^{2+}$  из митохондрий печени кроликов, индуцированная добавлением ГДК. Добавки: 200 мкМ  $Ca^{2+}$ ; 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».



**Рисунок 33.** Кинетика выхода  $TFF^+$  и  $Ca^{2+}$  из митохондрий печени цесарок, индуцированная добавлением ГДК. Добавки: 200 мкМ  $Ca^{2+}$ ; 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования».



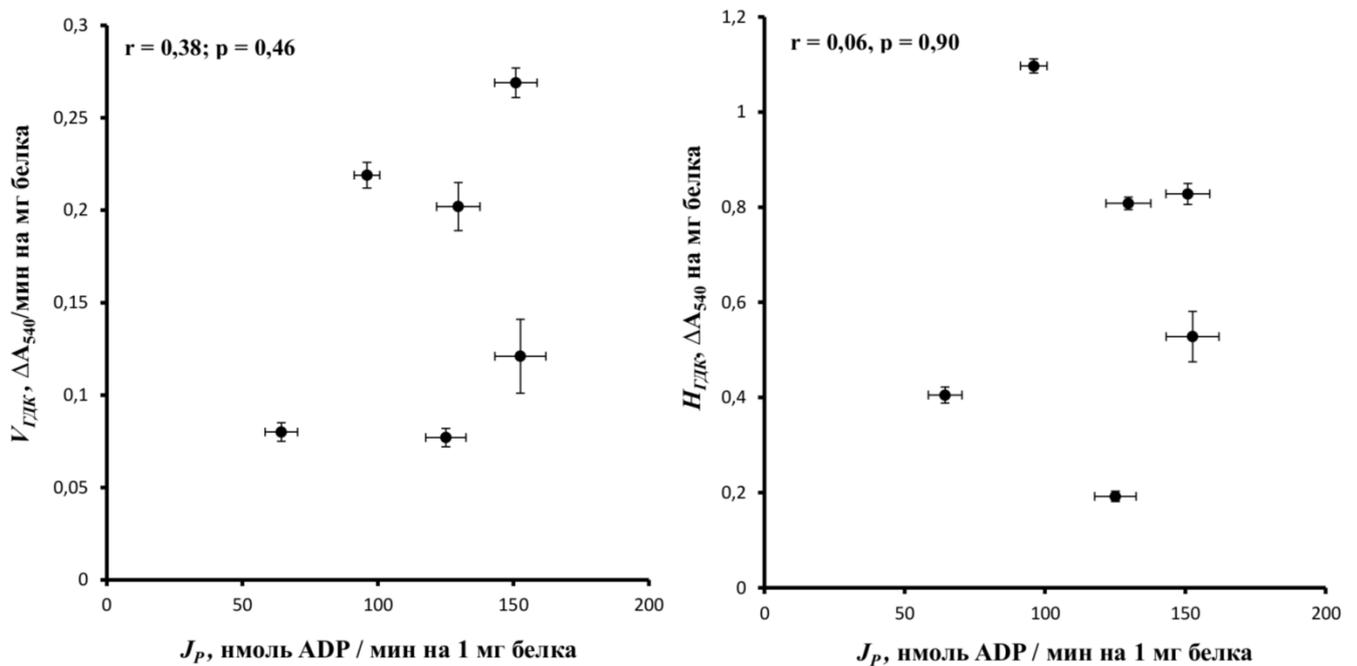
**Рисунок 34.** Кинетика выхода  $TFF^+$  и  $Ca^{2+}$  из митохондрий печени голубей, индуцированная добавлением ГДК. Добавки: 200 мкМ  $Ca^{2+}$ ; 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Пунктирной линией обозначен контроль (отсутствие добавки ГДК).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей ГДК, так же как в митохондриях печени млекопитающих, индуцирует  $Ca^{2+}$ -зависимую ЦсА-нечувствительную неспецифическую проницаемость внутренней мембраны. Однако, если судить по скорости и амплитуде набухания митохондрий, эффективность действия ГДК как индуктора такой проницаемости в митохондриях печени этих птиц меньше, чем в митохондриях млекопитающих. В этом случае наименьшая эффективность действия ГДК выявлена в митохондриях печени голубей. По-видимому, более высокая резистентность к ГДК митохондрий печени этих птиц может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе  $Ca^{2+}$  в необходимом для индукции проницаемости внутренней мембраны количестве.

Представляет интерес выяснить, связано ли различие в резистентности к действию ГДК как индуктору  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени животных указанных

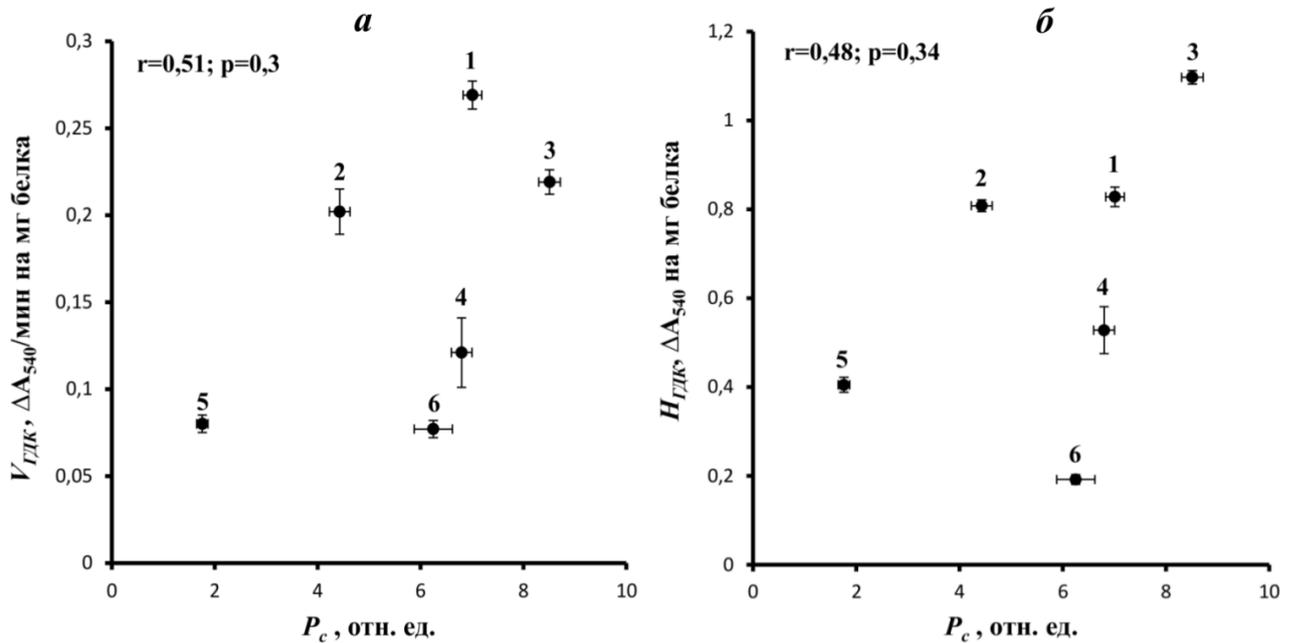
видов с изменением основной функции этих органелл – окислительного синтеза АТФ. Эффективность ГДК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны оценивали как по скорости, так и по амплитуде набухания митохондрий.

Проведенные исследования не выявили связи между указанными параметрами эффективности индукции ГДК/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны и скоростью синтеза АТФ ( $J_P$ ) для митохондрий печени крыс, мышей, кроликов, цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей (рис. 35).



**Рисунок 35.** Отсутствие зависимости скорости ( $V_{ГДК}$ ; рис. а) и амплитуды ( $H_{ГДК}$ ; рис. б) набухания митохондрий в присутствии 200 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  и 20 мкМ ГДК от величины скорости синтеза АТФ ( $J_P$ ) митохондрий печени животных разных видов. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в тексте. Каждая точка на графике – средние значения величин  $V_{ГДК}$ ,  $H_{ГДК}$  и  $J_P$  митохондрий печени одного вида животных  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На графике цифрами обозначены митохондрии печени: крыс (1), мышей (2), кроликов (3), цесарок СК (4), цесарок ЗБ (5), голубей (6).

Наряду с этим, не выявлено наличие связи между амплитудой и скоростью набухания митохондрий с эффективностью окислительного синтеза АТФ (коэффициент  $P_C$ ) для митохондрий печени этих животных (рис. 36).



**Рисунок 36.** Отсутствие зависимости скорости ( $V_{ГДК}$ ; рис. а) и амплитуды ( $H_{ГДК}$ ; рис. б) набухания митохондрий в присутствии 200 мкМ  $Ca^{2+}$  и 20 мкМ ГДК от отношения величин скоростей синтеза АТФ и дыхания в состоянии 4 ( $P_C$ ) митохондрий печени животных разных видов. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в тексте. Каждая точка на графике – средние значения величин  $V_{ГДК}$ ,  $H_{ГДК}$  и  $P_C$  митохондрий печени одного вида животных  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На графике цифрами обозначены митохондрии печени: крыс (1), мышей (2), кроликов (3), цесарок СК (4), цесарок ЗБ (5), голубей (6).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в митохондриях печени животных разных видов различие в резистентности к действию ГДК как индуктору  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны не связана с изменением эффективности сопряженного с потреблением кислорода синтеза АТФ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящей работы заключалась в сравнительном исследовании механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации митохондрий печени разных видов млекопитающих (мыши, крысы и кролики) и птиц (голуби, цесарки СКП и цесарки ЗБП).

При выполнении первой задачи работы были рассмотрены особенности окислительного синтеза АТФ и свободного окисления в митохондриях печени указанных выше животных. Показано, что митохондрии печени крыс, голубей и цесарок СКП не отличаются по показателям дыхания и окислительного синтеза АТФ, за исключением скорости разобщенного 2,4-динитрофенолом дыхания. Митохондрии печени мышей отличаются от митохондрий этих животных более высокой скоростью дыхания в отсутствии синтеза АТФ (свободное окисление) и вследствие этого меньшей степенью сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования. В отличие от этого митохондрии печени кроликов характеризуются как меньшей скоростью дыхания в различных состояниях, так и большей степенью сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования. Митохондрии печени цесарок ЗБП характеризуются более низкой скоростью дыхания в состоянии 2 и более высокой в состоянии 4, меньшей скоростью окислительного синтеза АТФ, а также наиболее слабым сопряжением дыхания и окислительного синтеза АТФ.

Установлено, что в митохондриях печени указанных животных скорость свободного окисления как составная часть скорости дыхания в состоянии 3 равна скорости дыхания в состоянии 4. Это свидетельствует о том, что окислительный синтез АТФ не оказывает ингибирующего действия на свободное окисление в состоянии 3. В качестве коэффициента, характеризующего способность митохондрий эффективно синтезировать АТФ, предложено использовать отношение скорости окислительного синтеза АТФ и скорости дыхания в состоянии 4 – коэффициент  $P_C$ .

При выполнении второй задачи работы установлено, что в митохондриях печени птиц: цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей, также как в митохондриях печени крыс, мышей и кроликов имеется ЦсА-чувствительный механизм индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры. Вместе с тем для индукции такой поры в митохондриях печени указанных птиц необходимы более высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , чем в митохондриях печени млекопитающих.

При выполнении третьей задачи работы показано, что митохондрии указанных животных, но не голубей, способны в присутствии  $\Phi_n$  эффективно поглощать и удерживать ионы кальция в матриксе. Способность  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировать открытие поры в митохондриях была выражена количественно как КЕ митохондрий, т.е. то максимальное количество  $\text{Ca}^{2+}$ , которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры. КЕ митохондрий печени крыс, мышей, кроликов, цесарок СКП и ЗБП составляет соответственно 70, 57, 38, 844 и 739 нмоль на 1 мг белка. Под влиянием ЦсА КЕ митохондрий указанных животных значительно увеличивается. Митохондрии печени голубей в отличие от митохондрий печени других животных не обладают способностью полностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$ . В связи с этим определить КЕ для митохондрий печени этих птиц не представляется возможным.

Полученные при выполнении второй и третьей задач работы данные свидетельствуют о том, что митохондрии печени цесарок и голубей по сравнению с митохондриями печени указанных млекопитающих в присутствии  $\Phi_n$  обладают значительно более высокой резистентностью по отношению к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как к индуктору открытия ЦсА-чувствительной поры. Более высокая резистентность к индукторам ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени голубей может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в необходимом для индукции поры количестве. Отмечено, что в митохондриях печени животных разных видов различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

Известно, что в формировании порового комплекса с циклофилином D может принимать участие  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза, и в этом случае  $Ca^{2+}$  связывается с каталитической частью фактора  $F_1$  (Giorgio et al., 2013). Предполагается, что в митохондриях печени цесарок  $Ca^{2+}$  связывается с этим сайтом хуже, чем в митохондриях печени крыс, мышей и кроликов. Также предполагается, что вариабельность резистентности к  $Ca^{2+}$  как к индуктору ЦсА-чувствительной поры в митохондриях животных разных видов может быть обусловлена различной степенью экспрессии антиапоптозных белков семейства Bcl-2 в клетке.

При выполнении четвертой задачи работы исследовано влияние окисляющего агента ТБГ на индукцию  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры во внутренней мембране митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц. Выяснено, что в присутствии ТБГ индукция  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени указанных животных наблюдается при добавлении  $CaCl_2$  в существенно меньших количествах, чем в отсутствие этого окисляющего агента. Наибольший эффект ТБГ наблюдается в митохондриях печени кролика (снижение КЕ на 77%), в меньшей степени – в митохондриях печени мышей и крыс (снижение КЕ на 56 и 57% соответственно). В то время как в митохондриях печени цесарок СКП и цесарок ЗБП этот окисляющий агент менее эффективен (снижение КЕ на 35 и 38% соответственно). Как уже отмечалось выше, определить КЕ для митохондрий печени голубей не представляется возможным. Однако, данные по набуханию митохондрий печени этих птиц свидетельствуют об их высокой устойчивости к действию окисляющего агента ТБГ как индуктору  $Ca^{2+}$ -зависимой поры.

При выполнении пятой задачи работы исследовано действие ГДК как индуктора  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени указанных млекопитающих и птиц. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в митохондриях печени указанных птиц ГДК, так же как в митохондриях печени млекопитающих, индуцирует  $Ca^{2+}$ -зависимую ЦсА-нечувствительную неспецифическую проницаемость внутренней мембраны, однако, с меньшей

эффективностью. Наименьшая эффективность действия ГДК как индуктора такой проницаемости выявлена в митохондриях печени голубей. Более высокая резистентность к ГДК митохондрий печени этих птиц может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе  $\text{Ca}^{2+}$  в необходимом для индукции проницаемости внутренней мембраны количестве. Отмечено, что в митохондриях печени животных указанных видов различие в резистентности к действию ГДК как индуктору  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

## ВЫВОДЫ

1. Митохондрии печени крыс, голубей и цесарок СКП не отличаются по показателям дыхания и окислительного синтеза АТФ. Митохондрии печени мышей и цесарок ЗБП отличаются от митохондрий этих животных более высокой скоростью дыхания в состоянии 4 и меньшей степенью сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ, а митохондрии печени кроликов – меньшими скоростями дыхания, но большей степенью сопряжения дыхания и окислительного синтеза АТФ.

2. Для митохондрий печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей характерен ЦсА-чувствительный механизм индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, как в митохондриях печени млекопитающих. Для индукции такой поры в митохондриях печени этих птиц необходимы более высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , чем в митохондриях печени млекопитающих.

3. Митохондрии печени млекопитающих и цесарок, но не голубей, в присутствии  $\Phi_n$  способны эффективно поглощать и удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе. КЕ митохондрий цесарок СКП, цесарок ЗБП существенно больше, чем митохондрий млекопитающих. Различие в резистентности к действию  $\text{Ca}^{2+}$  как индуктору ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени указанных животных не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

4. В присутствии ТБГ индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры в митохондриях печени указанных животных наблюдается при добавлении  $\text{CaCl}_2$  в существенно меньших количествах, чем в отсутствие этого окисляющего агента. Наибольший эффект ТБГ наблюдается в митохондриях печени кролика, в то время как в митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей этот окисляющий агент наименее эффективен.

5. В митохондриях печени цесарок СКП, цесарок ЗБП и голубей ГДК индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую ЦсА-нечувствительную пермеабиллизацию внутренней мембраны, но с меньшей эффективностью, чем в митохондриях печени млекопитающих. Различие в резистентности к действию ГДК

митохондрий печени указанных животных не связано с особенностями окислительного синтеза АТФ.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Белослудцев К.Н. Возможный механизм образования и регуляции пальмитат-индуцированной циклоспорин А-нечувствительной митохондриальной поры / Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – № 7. – С. 987-994.
2. Гусев, Н.Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Часть 1. Классификация и структура / Н.Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 2-9.
3. Дубинин, М.В. Длинноцепочечные  $\alpha,\omega$ -диоловые кислоты как индукторы циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени, нагруженных ионами кальция или стронция / М.В. Дубинин, С.И. Адакеева, В.Н. Самарцев // Биохимия. – 2013. – № 78. – С. 533–540.
4. Забиякин, В.А. Поливариантность пигментации оперения цесарок / В.А. Забиякин // Птицеводство. – 2005. – № 10. – С. 14–17.
5. Зоров, Д.Б. Феноптозная проблема: от чего гибнет организм? Уроки по почечной недостаточности / Д.Б. Зоров [и др.] // Биохимия. – 2012. – № 77. – С. 893–906.
6. Кожина, О.В. Разобщающая активность жирных кислот в митохондриях печени в присутствии субстратов ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров усиливается при окислительном стрессе / О.В. Кожина, В.Н. Самарцев // Биол. мембраны. – 2010. – № 27. – С. 184–188.
7. Левицкий, Д.О. Биохимия мембран. Кн. 7. Кальций и биологические мембраны: Учеб. Пособие / Д.О. Левицкий; под ред. А.А. Болдырева. – М.: Высш. шк., 1990. – 124 с.
8. Ленинджер, А. Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1966. – С.316.
9. Лукьянов, А.С. Биоэтика с основами биоэтики: учебное пособие / А.С. Лукьянов. – М.: Научный мир, 2008. – 360 с.

10. Пермяков, Е.А. Металлсвязывающие белки: структура, свойства, функции / Е.А. Пермяков. – М.: Научный мир, 2012. – 544 с.
11. Самарцев, В.Н. Соотношение между дыханием и синтезом АТФ в митохондриях при различной степени разобщения окислительного фосфорилирования / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – С. 660–667.
12. Сарис, Н.-Э. Роль митохондрий в перераспределении внутриклеточного кальция: исторический обзор / Н.-Э. Сарис, Э. Карафоли // Биохимия. – 2005. – № 70. – С. 231-239.
13. Скулачев, В.П. Мембранная биоэнергетика / Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. – М.: Изд-во Московского университета, 2010. – 368 с.
14. Скулачев, В.П. Что такое «феноптоз» и как с ним бороться? / В.П. Скулачев // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 7. – С. 827-846.
15. Adiele, R.C. Features of cadmium and calcium uptake and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mitochondria / R.C. Adiele, D. Stevens, C. Kamunde // Toxicol In Vitro. – 2012. – V. 26. – P. 164-173.
16. Agafonov, A.V. A permeability transition in liposomes induced by the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /palmitic acid complexes / A. V. Agafonov [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol. 1609. – P. 153-160.
17. Agafonov, A.V.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phase separation in the membrane of palmitate-containing liposomes and its possible relation to membrane permeabilization / A. V. Agafonov [et al.] // J. Membr. Biol. – 2007. – Vol. 215. – P. 57-68.
18. Azzolin, L. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals / L. Azzolin [et al.] // FEBS Lett. – 2010. – V. 584. – P. 2504-2509.
19. Baines, C.P. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death / C.P. Baines [et al.] // Nature – 2005. – Vol. 434. – P. 658–662.
20. Baines, C.P. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death / C.P. Baines [et al.] // Nat. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 9. – № 5. – P. 550-555.

21. Barja, G. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity / G. Barja // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33. – P. 1167–1172.
22. Basso, E. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation / E. Basso [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 26307–26311.
23. Basso, E. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D / E. Basso [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 18558–18561.
24. Belosludtsev, K.N.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study / K.N. Belosludtsev [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1838. – P. 2600-2606.
25. Belyaeva E.A. On the mechanism(s) of membrane permeability transition in liver mitochondria of lamprey, *Lampetra fluviatilis* L.: insights from cadmium / E.A. Belyaeva [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – V. 2014. doi: 10.1155/2014/691724.
26. Bernardes, C.F.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) / C.F. Bernardes [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1188. – P. 93-100.
27. Bernardi, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization / P. Bernardi // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 8834-8839.
28. Bernardi, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations / P. Bernardi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 2934–2939.
29. Bernardi, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations / P. Bernardi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 2934-2939.
30. Bernardi, P. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial

membrane / P. Bernardi, K.M. Broekemeier, D.R. Pfeiffer // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1994. – V. 26. – P. 509-517.

31. Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? / P. Bernardi // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – № 95. – P. 1–12.

32. Bernardi, P. The permeability transition pore as a  $\text{Ca}^{2+}$  release channel: New answers to an old question / P. Bernardi, S. von Stockum // *Cell Calcium.* – 2012. – V.52. – P. 22-27.

33. Bernardi, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death / P. Bernardi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – V. 1275. – P. 5-9.

34. Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target / P. Bernardi [et al.] // *FEBS J.* – 2006. – Vol. 273. – P. 2077–2099.

35. Berridge, M.J. Calcium signalling remodelling and disease / M.J. Berridge // *Biochem. Soc. Trans.* – 2012. – Vol. 40. – P. 297-309.

36. Berridge, M.J. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling / M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 517-529.

37. Berridge, M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle / M.J. Berridge // *Cell Calcium.* – 2002. – Vol. 32. – P. 235-249.

38. Blinks, J.R. Measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in living cells / J.R. Blinks [et al.] // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1982. – Vol. 40. – P. 1-114.

39. Bodrova, M. Role of the ADP/ATP antiporter in fatty acid-induced uncoupling of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded rat liver mitochondria / M. Bodrova [et al.] // *IUBMB Life.* – 2000. – Vol. 50. – P. 189–194.

40. Bonora, M. Role of the c subunit of the  $\text{F}_0$  ATP synthase in mitochondrial permeability transition / M. Bonora [et al.] // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12. – № 4. – P. 674-683.

41. Brenner-Holzach, O. Die korrelation zwischen der schwellung isolierter mitochondrien und dem abbau intramitochondrialen adenosinnucleotide (ATP, ADP,

AMP, CoA) / O. Brenner–Holzach, J. Raaflaub // *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* – 1954. – Vol. 12. – P.242–252.

42. Brini, M. Intracellular calcium homeostasis and signaling / M. Brini [et al.] // *Met. Ions Life Sci.* – 2013. – Vol. 12. – P. 119-168.

43. Broekemeier, K. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria / K. Broekemeier, M. Dempsey, D. Pfeiffer // *J.Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 7826-7830.

44. Brustovetsky, N. Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane / N. Brustovetsky [et al.] // *J. Neurochem.* - 2002. - Vol. 80. - P. 207–218.

45. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis / E. Carafoli // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – V. 56. – P. 395-433.

46. Carafoli, E. Generation, control, and processing of cellular calcium signals / E. Carafoli [et al.] // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 36. – P. 107-260.

47. Carafoli, E. Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship / E. Carafoli // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28. – P. 175-181.

48. Carraro, M. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition / M. Carraro [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 289. – P. 15980-15985.

49. Chalmers, S. Nicholls D.G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria / S. Chalmers, D.G. Nicholls // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 19062–19070.

50. Chen, C. Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP / C. Chen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 31761-31768.

51. Cheng, H.P. Calcium signaling in physiology and pathophysiology / H.P. Cheng [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2006. – Vol. 27. – P. 767-772.

52. Chevrollier, A. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism / A. Chevrollier [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1807. – P. 562-567.
53. Crompton, M. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore / M. Crompton, S. Virji, J.M.Ward // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 258. – P. 729-735.
54. Crompton, M. Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress / M. Crompton, H. Ellinger, A. Costi // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 255. – P. 357-360.
55. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death / M. Crompton // *Biochem. J.* – 1999. – Vol. 341. – P. 233-249.
56. Csordás, G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria / G. Csordás [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 174. – P. 915-921.
57. De Brito, O.M. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria / O.M. De Brito, L. Scorrano // *Nature.* – 2008. – Vol. 456. – P. 605-610.
58. Deryabina, Y.I.  $\text{Ca}^{2+}$  efflux in mitochondria from the yeast *Endomyces magnusii* / Y.I. Deryabina [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 47801-47806.
59. Deryabina, Y.I.  $\text{Ca}^{2+}$ -release pathways from mitochondria of the yeast *Endomyces magnusii* / Y.I. Deryabina, E.N. Bazhenova, R.A. Zvyagilskaya // *Biochemistry (Mosc).* – 2000. – V. 65. – P. 1167-1174.
60. Deryabina, Y.I. Calcium-dependent nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane is not induced in mitochondria of the yeast *Endomyces magnusii* / Y.I. Deryabina [et al.] // *Biochemistry (Mosc).* – 2000. – V. 69. – P. 1025-1033.
61. Deryabina, Y.I. The  $\text{Ca}^{2+}$ -transport system of yeast (*Endomyces magnusii*) mitochondria: independent pathways for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and release / Y.I. Deryabina, R.A. Zvyagilskaya // *Biochemistry (Mosc).* – 2000. – V. 65. – P. 1352-1356.

62. Di Paola, M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: Coupling, uncoupling and permeability transition / M. Di Paola, M. Lorusso M. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 1330-1337.
63. Drahota, Z. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress / Z. Drahota [et al.] // *Physiol Res.* – 2012. – V. 61. – Suppl. 1. – P. 165-172.
64. Dubinin, M.V. A permeability transition in liver mitochondria and liposomes induced by  $\alpha,\omega$ -dioic acids and  $\text{Ca}^{2+}$  / M.V. Dubinin [et al.] // *Eur. Biophys. J.* – 2014. – Vol. 43. – P. 565–572.
65. Duszyński, J. The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry / J. Duszyński [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 380-387.
66. Emel'ianova, L.V. Peculiarities of functioning of liver mitochondria of river lamprey *Lampetra fluviatilis* and common frog *Rana temporaria* at periods of suppression and activation of energy metabolism / L.V. Emel'ianova // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* – 2007. – V. 43. – № 6. – P. 564—572.
67. Endlicher, R. Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to  $\text{Ca}^{2+}$  ions / R. Endlicher [et al.] // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2009. – V. 52. – P. 69-72.
68. Ferdinandusse, S. Identification of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids / S. Ferdinandusse [et al.] // *J. Lipid. Res.* – 2004. – Vol. 45. – P. 1104–1111.
69. Fernández-Morales, J.C. Stabilizers of neuronal and mitochondrial calcium cycling as a strategy for developing a medicine for Alzheimer's disease / J.C. Fernández-Morales [et al.] // *ACS Chem. Neurosci.* – 2012. – Vol. 3. – P. 873-883.
70. Fortea, M.I. Unravelling the interaction of thapsigargin with the conformational states of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal sarcoplasmic reticulum / M.I. Fortea [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 37266-37272.

71. Fournier, N. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes / N. Fournier, G. Ducet, A. Crevat // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1987. – Vol. 19. – № 3. – P. 297-303.
72. Fu, S. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity / S. Fu [et al.] // *Nature.* – 2011. – V. 473. – P. 528–531.
73. Furness, L.J. Energetics and longevity in birds / L.J. Furness, J.R. Speakman // *Age (Dordr.)*. – 2008. – Vol. 30. – P. 75–87.
74. Galli, G.L. Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen / G.L. Galli, J.G. Richards // *J. Comp. Physiol. B.* – 2014. – V. 184. – P. 285-302.
75. Gellerich, F.N. The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal / F.N. Gellerich [et al.] // *IUBMB Life.* – 2013. – Vol. 65. – P. 180–190.
76. Gincel, D. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function / D. Gincel, H. Zaid, V. Shoshan-Barmatz // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 358. – P. 147–155.
77. Gincel, D. Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore / D. Gincel, V. Shoshan-Barmatz // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2004. – Vol. 36. – P. 179–186.
78. Giorgio, V. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore / V. Giorgio [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 5887–5892.
79. Gomez-Villafuertes, R. Searching for a role of NCX/NCKX exchangers in neurodegeneration / R. Gomez-Villafuertes, B. Mellström, J.R. Naranjo // *Mol. Neurobiol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 195-202.
80. Gostimskaya, I.S. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria / I.S. Gostimskaya [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2003. – Vol. 313. – P. 46–52.

81. Gudz, T. Effect of butylhydroxytoluene and related compounds on permeability of the inner mitochondrial membrane / T. Gudz [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1997. – Vol. 342. – P. 143-156.
82. Guicciardi, M.E. Apoptosis and necrosis in the liver / M.E. Guicciardi [et al.] // Compr. Physiol. – 2013. – Vol. 3. – № 2. – P. 1977-1010.
83. Gunter, T. Mechanisms by which mitochondria transport calcium / T. Gunter, D. Pfeiffer // Physiol. – 1990. – Vol. 258. – P. 755–786.
84. Gutiérrez-Aguilar, M. In yeast, Ca<sup>2+</sup> and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition // M. Gutiérrez-Aguilar [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1767. – P. 1245-1251.
85. Halestrap, A. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart / A. Halestrap [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1366. – P. 79-94.
86. Halestrap, A. The permeability transition pore complex: another view / A. Halestrap, G. McStay, S. Clarke // Biochimie. – 2002. – Vol. 84. – P. 153-166.
87. Halestrap, A.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase / A.P. Halestrap, K.Y. Woodfield, C.P. Connern // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 3346-3354.
88. Halestrap, A.P. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death / A.P. Halestrap, C. Brenner // Curr Med Chem. – 2003. – Vol. 10. – P. 1507–1525.
89. Hanada, H. Cyclosporin A inhibits thyroid hormone-induced shortening of the tadpole tail through membrane permeability transition / H. Hanada [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. – 2003. – V. 135. – P. 473-483.
90. Haworth, R.A. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site / R.A. Haworth, D.R. Hunter // Arch. Biochem. Biophys. – 1979b. – Vol. 195. – P. 460-467.

91. He, L. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? / L. He, J.J. Lemasters // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 512. – № 1-3. – P. 1-7.
92. Hinkle, P.C. The phosphorous/oxygen ratio of mitochondrial oxidative phosphorylation / P.C. Hinkle, M.L. Yu // *J. Biol. Chem.* – 1979. – V. 254. – P. 2450–2455.
93. Holman, J.D. Metabolic Depression is Delayed and Mitochondrial Impairment Averted during Prolonged Anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935) / J.D. Holman, S.C. Hand // *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* – 2009. – V. 376. – P. 85-93.
94. Hoth, M. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells / M. Hoth, R. Penner // *Nature.* – 1992. – Vol. 355. – P. 353-356.
95. Hulbert, A. J. Metabolism and longevity: Is there a role for membrane fatty acids? / A. J. Hulbert // *Integrative and Comparative Biology.* – 2010. – Vol. 50. – № 5. – P. 808-817.
96. Hulbert, A.J. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals / A.J. Hulbert [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 1175–1213.
97. Hunter, D. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria / Hunter D., Haworth R., Southard J. // *Biol. Chem.* – 1976. – V. 251. – P. 5069–5077.
98. Hunter, D.R. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria / D.R. Hunter, R.A. Haworth, J.H.Southard // *J. Biol. Chem.* – 1976. – Vol. 251. – P. 5069-5077.
99. Hunter, D.R. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms / D.R. Hunter, R.A. Haworth // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1979a. – Vol. 195. – P. 453-459.
100. Hunter, D.R. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release / D.R. Hunter, R.A. Haworth // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1979b. – Vol. 195. – P. 468-477.

101. Hunter, F.E. Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions / F.E. Hunter, L. Ford // *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol. 216. – P.357–369.

102. Jonckheere, A.I. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology / A.I. Jonckheere, J.A. Smeitink, R.J. Rodenburg // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35. – P. 211-225.

103. Jung, D.W. Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria / D.W. Jung, P.C. Bradshaw, D.R. Pfeiffer // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 21104-21112.

104. Kamo, N. Membrane potential measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state / N. Kamo [et al.] // *J. Membr. Biol.* – 1979. – Vol. 48. – P. 105-121.

105. Kato, H. Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer / H. Kato, H. Nishitoh // *Front. Oncol.* – 2015. – V. 5. – №93. doi: 10.3389/fonc.2015.00093.

106. Klingenberg, M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier / M. Klingenberg // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778. – P. 1978-2021.

107. Ko, Y.H. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP / Y.H. Ko [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 12305-12309.

108. Kokoszka J. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore / J. Kokoszka [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 427. – P. 461-465.

109. Kottke, M. Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points of hexokinase and creatine kinase location, and control of Ca<sup>2+</sup> transport / M. Kottke [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 935. – P. 87–102.

110. Kovaleva, M.V. Induction of a non-specific permeability transition in mitochondria from *Yarrowia lipolytica* and *Dipodascus (Endomyces) magnusii* yeasts / M.V. Kovaleva [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2009. – V. 41. – P. 239–249.
111. Kowaltowski, A.J. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress / A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 495. – № 1-2. – P. 12-15.
112. Krause, E. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells / E. Krause [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 32523-32528.
113. Krauskopf, A. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria / A. Krauskopf [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – № 5-6. – P. 590-595.
114. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 99-163.
115. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 99-163.
116. Le Quoc, D. Energy-dependent variation of thiol groups reactivity or accessibility in rat liver mitochondria, revealed by measurements of labelled thiol reagents incorporation / D. Le Quoc, K. Le Quoc, Y. Gaudemer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1976. – V. 68. – P. 106-113.
117. Lehninger A.L. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate / A.L. Lehninger // *J. Biol. Chem.* – 1959. – Vol. 234. – P. 2465-2471.
118. Lehninger, A.L. An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation / A.L. Lehninger, L.F. Remmert // *J. Biol. Chem.* – 1959. – Vol. 234. – P. 2459-2464.
119. Lehninger, A.L. Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides / A.L. Lehninger, A. Vercesi, E.A. Bababunmi // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1978. – V. 75. – P. 1690-1694.

120. Lemasters, J.J. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death / J.J. Lemasters [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2009. – Vol. 1787. – P. 1395–1401.
121. Lê-Quôc, K. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure / K. Lê-Quôc, D. Lê-Quôc // *J Biol Chem.* – 1985. – Vol. 260. – № 13. – P. 7422-7428.
122. Leung A.W. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore / A.W. Leung, A.P. Halestrap // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1777. – № 7-8. – P. 946-52.
123. Leung, A.W. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition / A.W. Leung, P. Varanyuwatana, A.P. Halestrap // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 26312–26323.
124. Madec, S. CYP4F3B expression is associated with differentiation of HepaRG human hepatocytes and unaffected by fatty acid overload / S. Madec [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* – 2011. – Vol. 39. – P. 1987-1996.
125. Majewski, N. Hexokinase–mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak / N. Majewski [et al.] // *Mol. Cell.* – 2004. – Vol. 16. – P. 819–830.
126. Malhi H. Hepatocyte death: a clear and present danger / Malhi H., Guicciardi M.E., Gores G.L. // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90. – P. 1165-1194.
127. Manon, S. Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? / S. Manon [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1998. – V. 30. – P. 419-429.
128. Manon, S. Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts / S. Manon, M. Guérin // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – V. 44. – P. 565-575.
129. Marzo, I. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2 related proteins / I. Marzo [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 1261-1271.

130. McEnery M. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier / M. McEnery [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 3170-3174.

131. McGuinness, O. The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria. Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore / O. McGuinness // Eur. J. Biochem. – 1990. – Vol. 194. – P. 671–679.

132. McStay, G.P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore / G.P. McStay, S.J. Clarke, A.P. Halestrap // Biochem. J. – 2002. – V. 367. – P. 541-548.

133. Menze, M.A. Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage / M.A. Menze [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2005. – V. 289. – P. 68-76.

134. Mignen, O. IARC, a novel arachidonate-regulated, noncapacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel / O. Mignen, T.J. Shuttleworth // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 9114-9119.

135. Milerova, M. Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury / M. Milerova [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 2010. – V. 335. – P. 147-153.

136. Milerová, M. Sex difference in the sensitivity of cardiac mitochondrial permeability transition pore to calcium load / M. Milerova [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 2016. – V. 412. – P. 147-154.

137. Mironova G.D. Formation of palmitic acid/ $\text{Ca}^{2+}$  complexes in the mitochondrial membrane: a possible role in the cyclosporin-insensitive permeability transition / Mironova G.D. [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2004. – Vol. 36. – № 2. – P. 171-178.

138. Mironova, G.D. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  cycle mediated by the palmitate-activated cyclosporin A-insensitive pore / G.D. Mironova [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2007. – Vol. 39. – P. 167–174.

139. Mironova, G.D. Palmitic and stearic acids bind  $\text{Ca}^{2+}$  with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to  $\text{Ca}^{2+}$ -activated mitochondrial pores / G.D. Mironova [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2001. – Vol. 33. – P. 319-331.

140. Montgomery, M.K. The long life of birds: an examination of the oxidative stress theory of aging: Doctor of Philosophy thesis / Magdalene K. Montgomery. – School of Biological Science, University of Wollongong, 2011. – 268 pp.

141. Mortensen, P.B. Formation and degradation of dicarboxylic acids in relation to alterations in fatty acid oxidation in rats / P.B. Mortensen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1124. – P. 71-79.

142. Murphy, A.N. 1996. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria / A.N. Murphy [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 9893-9898.

143. Nakagawa, T. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death / T. Nakagawa [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – P. 652–658.

144. Nicholls, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria / D.G. Nicholls // *Biochem J.* – 1978. – V. 15. – P. 176. – P. 463-74.

145. Nishi, Y. Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1 / Y. Nishi [et al.] // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 435. – P. 421-430.

146. Ostádal, B. Ontogenetic development of cardiac tolerance to oxygen deprivation - possible mechanisms / B. Ostádal [et al.] // *Physiol Res.* – 2009. – V. 58. – Suppl 2. – P. 1-12.

147. Ozcan, U. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes / U. Ozcan [et al.] // *Science.* – 2004. – V. 306. – P.457–461.

148. Panov, A. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats

and mice / A. Panov [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2007. – V. 292. – P. 708-718.

149. Papa, S. Cooperativity and flexibility of the protonmotive activity of mitochondrial respiratory chain / S. Papa, M. Lorusso, M. Di Paola // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1757. – P. 428–436.

150. Pastorino, J.G., Shulga N. Hoek J.B. (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis / J.G. Pastorino, N. Shulga, J.B. Hoek // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 7610–7618.

151. Pestana, C.R.  $\text{Ca}^{2+}$  binding to c-state of adenine nucleotide translocase (ANT)-surrounding cardiolipins enhances (ANT)-Cys(56) relative mobility: a computational-based mitochondrial permeability transition study / C.R. Pestana [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1787. – P. 176-182.

152. Petronilli, V. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporine A-sensitive permeability transition pore of mitochondria / V. Petronilli [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1993. – Vol. 268. – P. 21939–21945.

153. Petronilli, V. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin

154. Petronilli, V. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria / V. Petronilli [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 21939-21945.

155. Pfeiffer, D.R. Some effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  on the ultrastructure, light-scattering properties, and malic enzyme activity of adrenal cortex mitochondria / D.R. Pfeiffer, T.H. Kuo, T.T.Tchen // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1976. – Vol. 176. – P. 556-563.

156. Putney, J.W. Jr. A model for receptor-regulated calcium entry / J.W. Jr. Putney // *Cell Calcium.* – 1986. – Vol. 275. – P. 1-12.

157. Raaflaub, J. Swelling of isolated mitochondria of the liver and their susceptibility to physicochemical influences / J. Raaflaub // *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* – 1953. – Vol. 11. – №2. – P.142–156.

158. Rasola, A. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis / A. Rasola, P. Bernardi // *Apoptosis*. – 2007. – Vol. 12. – № 5. – P. 815-833.
159. Rasola, A. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells / A. Rasola, P. Bernardi // *Cell Calcium*. – 2014. – Vol. 56. – P. 437–445.
160. Rasola, A. Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis / A. Rasola, P. Bernardi // *Cell Calcium*. – 2011. – Vol. 50. – P. 222-233.
161. Reddy, J.K. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation / J.K. Reddy, M.S. Rao // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. – 2006. – Vol. 290. – P.852–858.
162. Reddy, J.K. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis / J.K. Reddy // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. – 2001. – Vol. 281. – P.1333- 1339.
163. Reuter, H. A variety of calcium channels / H. Reuter // *Nature*. – 1985. – Vol. 316. – P. 391.
164. Rizzuto, R. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  responses / R. Rizzuto [et al.] // *Science*. – 1998. – V. 280. – P. 1763-1766.
165. Ronchi, J.A. Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts / J.A. Ronchi, A.E. Vercesi, R.F. Castilho // *J. Bioenerg. Biomembr*. – 2011. – Vol. 43. – P. 709–715.
166. Sanders, R.J. Evidence for two enzymatic pathways for  $\omega$ -oxidation of docosanoic acid in rat liver microsomes / R.J. Sanders [et al.] // *J. Lipid. Res*. – 2005. – Vol. 46. – P. 1001–1008.
167. Schinzel, A.C. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia / A.C. Schinzel [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 102. – P. 12005–12010.

168. Schönfeld, P. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier / P. Schönfeld, R. Bohnensack // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 420. – P. 167–170.

169. Schultheiss, H.P. Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity / H.P. Schultheiss, M. Klingenberg // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – Vol. 143. – № 3. – P. 599–605.

170. Scorrano, L. On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal / Scorrano L, Petronilli V, Bernardi // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 12295–12299.

171. Siemen D., Ziemer M. What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not? // *IUBMB Life.* – 2013. – Vol. 65. – № 3. – P. 255–262.

172. Siemen, D. What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not? / D. Siemen, M. Ziemer // *IUBMB Life* – 2013. – Vol. 65. – P. 255–262.

173. Sokolova, I.M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition / I.M. Sokolova, S. Evans, F.M. Hughes // *J. Exp. Biol.* – 2004. – V. 207. – P. 3369–3380.

174. Sokolove, P.M. A mitochondrial signal peptide from *Neurospora crassa* increases the permeability of isolated rat liver mitochondria / P.M. Sokolove, K.W. Kinnally // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1996. – Vol. 336. – P. 69–76.

175. Sokolove, P.M. Butylated hydroxytoluene and inorganic phosphate plus  $\text{Ca}^{2+}$  increase mitochondrial permeability via mutually exclusive mechanisms / P.M. Sokolove, L.M. Haley // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1996. – Vol. 28. – P. 199–206.

176. Solem, L. Selective activation of the sodium-independent, cyclosporin A-sensitive calcium pore of cardiac mitochondria by doxorubicin / L. Solem, K. Wallace // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 121. – P. 50–57.

177. Speakman, J.R. Body size, energy metabolism and lifespan / J.R. Speakman // *J. Exp. Biol.* – 2005. – Vol. 208. – P. 1717–1730.

178. Sultan, A. Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview / A. Sultan, P.M. Sokolove // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001a. – V. 386. – P. 52–61.
179. Sultan, A. Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane / A. Sultan, P.M. Sokolove // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001b. – V. 386. – P. 37-51.
180. Szabadkai, G. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  channels / G. Szabadkai [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 175. – P. 901-911.
181. Szabó, I. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore / I. Szabó, M. Zoratti // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 330. – P. 201–205.
182. Szabó, I. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel / I. Szabó, V. De Pinto, M. Zoratti // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 330. – P. 206–210.
183. Takeyama, N. Oxidative damage to mitochondria is mediated by the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inner-membrane permeability transition / N. Takeyama, N. Matsuo, T. Tanaka // *Biochem. J.* – 1993. – V. 294. – P. 719-725.
184. Terlau, H. Structure and function of voltage-gated ion channels / H. Terlau, W. Stühmer // *Naturwissenschaften.* – 1998. – Vol. 85. – P. 437-444.
185. Toninello, A. The membrane permeability transition in liver mitochondria of the great green goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas) / A. Toninello, M. Salvi, L. Colombo // *J. Exp. Biol.* – 2000. – V. 203. – P. 3425-34234.
186. Tonsgard, J.H. Serum dicarboxylic acids in patients with Reye syndrome / J.H. Tonsgard // *J. Pediatr.* – 1986. – Vol.109. – P.440-445.
187. Trendeleva, T. Mitochondria from *Dipodascus (Endomyces) magnusii* and *Yarrowia lipolytica* yeasts did not undergo a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent permeability transition even under anaerobic conditions / T. Trendeleva [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2011. – V. 43. – P. 623–631.

188. Tubbs, E. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance / E. Tubbs [et al.] // *Diabetes*. – 2014. – V. 63. – P. 3279–3294.

189. Varanyuwatana, P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore / P. Varanyuwatana, A.P. Halestrap // *Mitochondrion*. – 2012. – Vol. 12. – P. 120–125.

190. Vercesi, A.E. Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of  $\text{NAD(P)}^+$ -stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from mitochondria / A.E. Vercesi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1984. – V. 119. – P. 305-310.

191. Vial, G. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver /G. Vial [et al.] // *J. Hepatol.* – 2011. – V. 54. – P. 348–356.

192. Vinogradov, A. Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes / A. Vinogradov, A. Scarpa, B. Chance // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1972. – Vol. 152. – P. 646-654.

193. Von Stockum, S. F-ATPase of *Drosophila melanogaster* forms 53-picosiemens (53-pS) channels responsible for mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release / S. von Stockum [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – P. 4537-4544.

194. Von Stockum, S. Properties of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in mitochondria of *Drosophila melanogaster* / S. von Stockum [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – P. 41163-41170.

195. Wanders, R.J. Fatty acid  $\omega$ -oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans / R.J. Wanders, J. Komen, S. Kemp // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 182–194.

196. Wanders, R.J. Fatty acid  $\omega$ -oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans / R.J. Wanders, J. Komen, S. Kemp // *FEBS J.* –2011. – Vol. 278. – P. 182–194.

197. Wojtczak, L. Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria / L. Wojtczak, A.L. Lehninger // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1961. – Vol. 51. – P. 442-456.

198. Xu, F. CYP4 isoform specificity in the  $\omega$ -hydroxylation of phytanic acid, a potential route to elimination of the causative agent of Refsum's disease / F. Xu [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 318. – P.835–839.
199. Zago, E.B. 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 / E.B. Zago, R.F. Castilho, A.E. Vercesi // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 478. – P. 29-33.
200. Zamzami, N. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens / N. Zamzami, G.Kroemer // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 67–71.
201. Zavodnik, I.B. Oxidative damage of rat liver mitochondria during exposure to t-butyl hydroperoxide. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in oxidative processes / I.B. Zavodnik [et al.] // *Life Sci.* – 2013. – Vol. 92. – P. 1110-1117.
202. Zizi, M. NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel / M. Zizi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 1614–1616.
203. Zoratti, M. Mitochondrial permeability transition / M. Zoratti, I. Szabo // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1241. – P. 139–176.
204. Zoratti, M. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? / M. Zoratti, I. Szabo, U. De Marchi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1706. – P. 40-52.
205. Zorov, D.B. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott // *Physiol. Rev.* – 2014. – Vol. 94. – P. 909–950.