

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

На правах рукописи

Степанова Анастасия Евгеньевна

**Ca²⁺-ЗАВИСИМАЯ АГРЕГАЦИЯ И ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИСКУССТВЕННЫХ МЕМБРАН ПРОДУКТАМИ ω -
ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ: МЕХАНИЗМЫ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ
В ПАТОЛОГИИ КЛЕТКИ**

1.5.2 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Дубинин М.В.

Казань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Структура биологических мембран. Фазовое поведение и динамика липидного бислоя мембран.....	13
1.1.1. Фазовые переходы бислойных структур.....	14
1.1.2. Фазовые переходы полиморфной природы.....	18
1.2. Роль митохондрий в клетке.....	22
1.2.1. Феномен перехода проницаемости внутренней мембраны митохондрий	23
1.2.2. Митохондриальная Ca^{2+} -зависимая ЦсА-чувствительная пора.....	24
1.2.3. Влияние МРТ поры на функционирование клеток.....	29
1.2.4. ЦсА-нечувствительная МРТ пора, индуцируемая свободными жирными кислотами.....	32
1.3. ω -Окисление жирных кислот: механизм и физиологическое значение.....	38
1.3.1. Влияние продуктов ω -окисления жирных кислот на липидные мембраны и их проницаемость.....	42
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Эксперименты с эритроцитами.....	46
2.1.1. Выделение эритроцитов крыс.....	46
2.1.2. Оптическая микроскопия эритроцитов.....	47
2.1.3. Оценка проницаемости эритроцитарной мембраны.....	47
2.2. Эксперименты на митохондриях.....	47
2.2.1. Выделение митохондрий.....	47

2.2.2. Оценка функциональных параметров митохондрий.....	48
2.2.3. Оценка состояния пула NAD(P)H	49
2.2.4. Конфокальная микроскопия митохондрий	49
2.2.5. Электронная микроскопия митохондрий	49
2.2.6. Оценка выхода цитохрома <i>c</i> из митохондрий.....	50
2.3. Эксперименты с липосомами.....	50
2.3.1. Приготовление больших однослойных липосом.....	50
2.3.2. Измерение проницаемости СрБ-нагруженных липосом	51
2.3.3. Определение размера липосом	51
2.4. Статистическая обработка результатов исследования.....	52
2.5. Реактивы.....	52
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1. Изучение Ca ²⁺ -зависимых эффектов пальмитиновой кислоты и продуктов ее ω-окисления (ГПК и ГДК) на эритроцитах крыс.....	53
3.2. Влияние ГПК и ГДК на митохондрии печени крыс в присутствии ионов двухвалентных металлов	57
3.2.1. Влияние ГПК и ГДК в присутствии ЦсА на состояние суспензии митохондрий печени, нагруженных ионами кальция	57
3.2.2. Влияние ГПК (ГДК)/Ca ²⁺ -индуцированной пермеабилзации митохондрий печени на выход цитохрома <i>c</i> из органелл.....	58
3.2.3. Влияние ГПК и ГДК в присутствии ЦсА на Ca ²⁺ -зависимую проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени	60
3.3. Возрастная и тканевая особенности ГДК/Ca ²⁺ -зависимой пермеабилзации митохондрий крыс	68
3.3.1. Тканеспецифичность ГДК/Ca ²⁺ -зависимой пермеабилзации митохондрий крыс	68

3.3.2. Зависимость ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации митохондрий печени крыс от возраста животных	70
3.4. Индукция ГПК и ГДК Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабиллизации липосом	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	77
ВЫВОДЫ	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	83

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат;

АТФ – аденозин-5'-трифосфат;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ГДК – α,ω -Гексадекандиоловая кислота;

ГПК – ω -Гидроксипальмитиновая кислота

ДНФ – 2,4-динитрофенол;

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

НАДН – никотиндиамидадениннуклеотид восстановленный;

НАД(Ф)Н – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный;

СЖК – свободные жирные кислоты;

СрБ – сульфородамин Б;

ТДК – α,ω -Тетрадекандиоловая кислота;

Трис-ОН – трис-(гидроксиметил)аминометан;

ТФФ⁺ – катион тетрафенилфосфония;

ТХ-100 – тритон X-100;

ЦсА – циклоспорин А.

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

АНТ – переносчик адениновых нуклеотидов;

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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Длинноцепочечные жирные кислоты играют важную структурную и функциональную роль в эукариотических клетках. В этерифицированной форме они являются основными компонентами фосфолипидов и используются для формирования запасных триглицеридов. В неэтерифицированной форме они образуют комплексы с белками, связывающими жирные кислоты (англ. fatty-acid-binding proteins, FABP). Жирные кислоты входят в состав липидов мембран клеток и органелл, а также представлены свободными жирными кислотами (СЖК). Выяснено, что СЖК могут оказывать протонофорное действие, являться детергентами, а также влиять на упаковку фосфолипидов мембран (Divakaruni *et al.*, 2012; Ibarguren *et al.*, 2014; Самарцев и Дубинин, 2016; Demine *et al.*, 2019). Они способны изменять проницаемость клеточных мембран, что приводит к их лизису (Белослудцев и др., 2019; Mironova and Pavlov, 2021). Подробно изучено влияние СЖК на мембраны митохондрий, где они могут значительно влиять на генерацию энергии в виде трансмембранного потенциала протонов и АТФ. С одной стороны, СЖК являются субстратом дыхания в большинстве типов клеток и благодаря процессу β -окисления, происходящем в матриксе митохондрий, поставляют электроны в дыхательную цепь этих органелл. С другой стороны, жирные кислоты оказывают существенное влияние на состояние внутренней мембраны митохондрий, увеличивая их протонную проводимость и вызывая рассеивание электрохимического протонного градиента в условиях *in vitro* (Самарцев и Дубинин, 2016; Demine *et al.*, 2019), что, как предполагается, играет важную роль в процессе продукции тепла в клетках млекопитающих (Самарцев и Дубинин, 2016; Rajagopal *et al.*, 2019; Ardalan *et al.*, 2022). Кроме того, известно, что СЖК способны, по крайней мере, в условиях *in vitro*, оказывать деспорягающее действие на комплексы дыхательной цепи митохондрий, индуцируя феномен внутреннего разобщения и, таким образом, снижая

эффективность транспорта электронов и синтеза АТФ в органеллах (Samartsev *et al.*, 2020; Semenova *et al.*, 2021).

Большое внимание уделяется способности СЖК разной структуры индуцировать неспецифическую проницаемость липидного бислоя биологических и искусственных (бислойных липидных мембран (БЛМ) и липосом) мембран в присутствии ионов двухвалентных металлов и, прежде всего, кальция. При этом предполагается, что структура СЖК оказывает решающее влияние на механизм Ca^{2+} -зависимого взаимодействия жирной кислоты с липидным бислоем мембран. В лаборатории проф. Г.Д. Мироновой (ИТЭБ РАН, г. Пущино) наиболее детально, на этот процесс, изучено действие монокарбоновых жирных кислот, прежде всего наиболее распространённой пальмитиновой кислоты. Установлено, что пальмитиновая кислота проявляет способность к комплексованию с ионами кальция в липидной фазе мембран, что сопровождается сегрегацией комплексов в твердокристаллические домены и образованием липидных пор (Mironova and Pavlov, 2021). Этот механизм детально описан на искусственных липидных мембранах (БЛМ и липосомы), мембранах эукариотических (эритроциты) и прокариотических (*E. coli*) клеток, а также митохондриях различных органов млекопитающих (Mironova and Pavlov, 2021). Кроме того, выяснено, что продукты, образующиеся в ходе ω -окисления монокарбоновых жирных кислот, а именно, α,ω -дикарбоновые жирные кислоты, также обладают способностью в присутствии ионов кальция инициировать пермеабиллизацию мембран митохондрий и мембран лецитиновых липосом, которая обусловлена полиморфными фазовыми переходами (Дубинин и др., 2013; Dubinin *et al.*, 2014). Стоит отметить, что молекулярный механизм индукции Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации липидных мембран продуктами ω -окисления жирных кислот далек от понимания. Нет данных о тканевой специфичности их эффектов и зависимости их действия от возраста животных. Неизвестно также, способны ли такие жирные кислоты оказывать влияние на цитоплазматическую мембрану клеток. Более того, в настоящее время отсутствуют сведения о влиянии промежуточных продуктов ω -окисления (ω -гидроксикарбоновых кислот) на Ca^{2+} -

зависимую проницаемость липидных мембран. Учитывая все вышеуказанное, а также известные данные об аккумуляции метаболитов процесса ω -окисления жирных кислот, характерного для дисрегуляции липидного обмена (Mortensen, 1992; Reddy, 2001; Reddy and Rao, 2006, Madec *et al.*, 2011; Wanders *et al.*, 2011), представляется актуальным глубокое исследование механизмов взаимодействия этих кислот с липидными мембранами.

Цель работы: выяснение механизмов Ca^{2+} -зависимого воздействия продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты – ω -гидроксипальмитиновой (ГПК) и ω -гексадекандикарбоновой (ГДК) кислот, на биологические и искусственные мембраны.

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

1. Оценить влияние ГПК и ГДК на поведение эритроцитов в суспензии и состояние мембран клеток в присутствии ионов кальция, а также в условиях их инкубации в сыворотке.

2. Рассмотреть эффекты ГПК и ГДК как модуляторов проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени в присутствии ионов кальция. Выяснить возможность выхода цитохрома *c* из органелл в результате такого взаимодействия.

3. Определить основные условия, необходимые для проявления Ca^{2+} -зависимых эффектов ГПК и ГДК на митохондриях клеток печени.

4. Сравнить особенности Ca^{2+} -зависимого действия ГДК на мембраны митохондрий печени, почек и сердца. Исследовать зависимость Ca^{2+} -зависимых эффектов ГДК на митохондриях печени от возраста животных.

5. Оценить влияние ГПК и ГДК на размер и проницаемость липосом для флуоресцентного зонда сульфородамина Б.

Научная новизна работы

Впервые показано, что продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты (ω -гидроксипальмитиновая (ГПК) и α,ω -гексадекандиовая кислоты (ГДК)) способны

индуцировать массивную кальций-зависимую агрегацию эритроцитов лабораторных крыс в суспензии, которая сопровождается нарушением проницаемости клеточных мембран и выбросом содержимого клеток. Установлено, что ГПК и ГДК также способны индуцировать циклоспорин А (ЦсА)-нечувствительную агрегацию митохондрий печени крыс в присутствии ионов Ca^{2+} , а также Sr^{2+} , которая сопровождается пермеабиллизацией мембран органелл. Выявлены условия необходимые для проявления эффекта продуктов ω-окисления пальмитиновой кислоты как индукторов такой агрегации и пермеабиллизации. Показано, что в ходе этих процессов происходит выход из митохондрий печени крыс проапоптотического белка цитохрома *c*. Установлено, что митохондрии сердца лабораторных крыс также подвержены ЦсА-нечувствительной пермеабиллизации в присутствии ГДК и ионов кальция, однако она менее выражена по сравнению с органеллами, полученными из печени или почек. Показано, что чувствительность митохондрий печени крысы к индукции ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации усиливается с возрастом животного. Установлено, что ГПК и ГДК в присутствии ионов кальция вызывают агрегацию и последующий выход флуоресцентного красителя сульфородамина Б из лецитиновых липосом.

Научно-практическое значение работы

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, имеют, прежде всего, фундаментальное значение для биологической науки. Они совершенствуют наше представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе регуляции функционирования и проницаемости мембран митохондрий различных органов с помощью органических метаболитов и неорганических соединений. Результаты работы в перспективе могут найти применение в фундаментальных исследованиях в области биофизики липидных мембран, физиологии и патологии клетки. Действительно, в настоящее время общепризнано, что пермеабиллизация мембран клеток и органелл и, в частности, митохондрий, играет ключевую роль в развитии патофизиологических явлений,

таких как ишемия, нейродегенеративные и нейромышечные заболевания, сахарный диабет и другие. Наряду с этим известно, что содержание метаболитов ω -окисления жирных кислот в гепатоцитах значительно увеличивается при ожирении, голодании и различных формах сахарного диабета. Следует подчеркнуть и прикладное значение работы – выяснение механизмов пермеабиллизации липидных мембран при участии жирных кислот может быть использовано для их направленной модификации с целью регуляции транспортных процессов в клетках и тканях и доставки целевых соединений, обладающих, в том числе, терапевтическим потенциалом.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования

Работа проводилась с 2015 по 2022 г. по тематике работы лаборатории молекулярной биоэнергетики Марийского государственного университета. Исследование по теме диссертации выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке молодых российских ученых-кандидатов наук (МК-61.2019.4, руководитель – к.б.н. М.В. Дубинин).

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и на данных, полученных при его непосредственном участии. Эксперименты по конфокальной микроскопии митохондрий проведены совместно с к.б.н. В.А. Яшиным (ИБК РАН, Пущино). Исследования с применением липосом проведены в лаборатории митохондриального транспорта ИТЭБ РАН совместно с д.б.н. К.Н. Белослудцевым. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем диссертационной работы.

Основные научные положения, выносимые на защиту

1. Продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты (ГПК и ГДК) способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов, митохондрий печени, а

также лецитиновых липосом, которая приводит к неспецифической пермеабиллизации мембран.

2. Механизм действия ГДК как индуктора агрегации и неспецифической пермеабиллизации митохондрий является циклоспорин А-нечувствительным и проявляется также в митохондриях сердца и почек.

3. Накопление продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты (ГПК и ГДК) в кровяном русле и клетках печени может быть одним из факторов гибели клеток крови и гепатоцитов при патологических состояниях, связанных с нарушением метаболизма липидов.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были доложены на 5-ой и 8-ой международных конференциях «Современные проблемы медицины и естественных наук» (Йошкар-Ола, 2016, 2019 г.); XI международном симпозиуме «Биологическая подвижность» (Пушино, 2016 г.); 69-ой и 72-ой Всероссийских школах-конференциях молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016, 2019); VI съезде биофизиков России (Сочи, 2019).

Публикации

По теме научно-квалификационной работы (диссертации) опубликованы 4 статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 7 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций, и симпозиумов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, собственные результаты исследования, а также их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 107 страницах, включая список литературы,

иллюстрационный материал включает 22 рисунка и 5 таблиц. Библиография содержит 212 наименований статей российских и зарубежных авторов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура биологических мембран. Фазовое поведение и динамика липидного бислоя мембран

Еще в конце 70-х годов предыдущего столетия С. Сингер и Г. Николсон подробно описали расположение молекул липидов и белков в биологических мембранах и охарактеризовали их взаимодействие (Singer and Nicolson, 1972). На сегодня постулировано, что бислой липидов представлен амфифильными фосфолипидами, состоящими из гидрофильных и гидрофобных компонентов. В присутствии молекул воды липиды проявляют способность к самоорганизации в различные фазы и агрегаты. В этом случае неполярные углеводородные компоненты перемещаются от воды внутрь мембраны, а полярные группировки ориентированы в водную фазу. В свою очередь белки (поверхностные и интегральные) инкрустрированы в бислой липидов и связываются с ним благодаря наличию гидрофобных участков. Мембраны весьма нестабильны и представляют собой динамичные структуры, в пределах которых молекулы липидов и белков могут диффундировать вдоль плоскости бислоя в латеральном направлении и перемещаться с одной стороны бислоя на другую (флип-флоп переход) (Антонов и др., 1992).

Организационной основой биологических мембран является фосфолипидный бислой. Однако липиды при гидратации самоорганизуются, образуя различные полиморфные липидно-водные формы (фазы) с различной геометрией. Тип образовавшейся полиморфной фазы определяется рядом факторов: состав и концентрацией липидов, ионной силой и pH водного раствора, температурой, давлением и степенью гидратации.

Номенклатура, предложенная Luzzati (1968), наиболее широко используется для обозначения липидных полиморфных фаз. Прописная буква обозначает тип решетки, например, L обозначает ламелярный, H обозначает гексагональный и Q обозначает кубический. Индексы I и II обозначают нормальную (масло в воде) и

обратную (вода в масле) фазы соответственно. Греческий индекс обозначает тип фазовой или гидрофобной конформации цепи, например, α обозначает кристаллическую область, β обозначает упорядоченную гелеобразную область, α обозначает жидкую область, $\alpha\beta$ обозначает сосуществующие гелеобразную и жидкую области, а δ обозначает конформацию спиральной цепи (рис. 1, табл. 1).

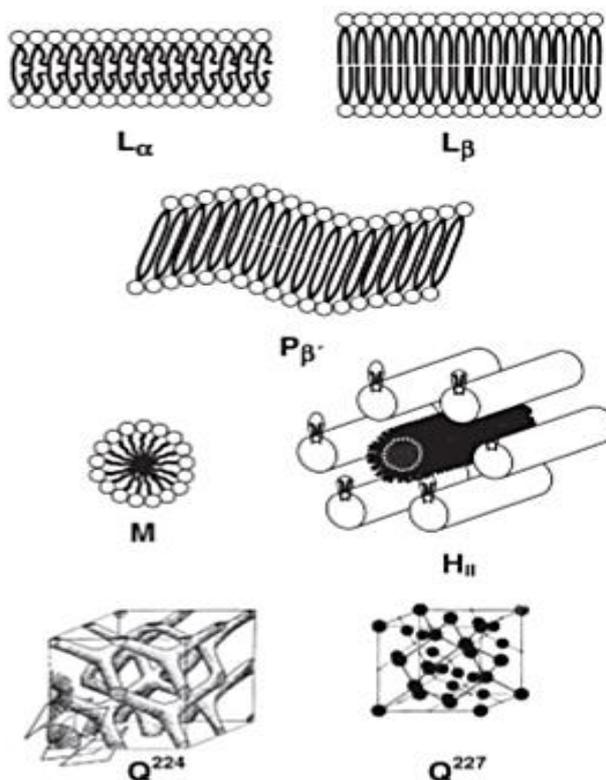


Рисунок 1. Фазы липидов в водной среде (из Антонов и др., 1992)

1.1.1. Фазовые переходы бислоев структур

При изменении физических условий бислоя фосфолипидов, формирующий ламеллярные фазы, может трансформироваться из одной фазы в другую (Геннис, 1997). При этом структура мембраны стабильна, изменению подвергается жидкостность липидного бислоя. В частности, наиболее известны мембраны, сформированные насыщенными фосфолипидами. Они находятся в жидкокристаллическом состоянии (L_{α}) или в твердом геле- (L_{β}) состоянии, трансформируясь из одной в другую в ходе термотропных фазовых переходов (Sevc, 1991).

Таблица 1 – Фазовое состояние липидов (Антонов, 1992, 2006)

Фаза	Организация	Примеры липидов
L, ламеллярная.	Представлена двумя монослоями липидов. Гидрофильные головки липидов, обладающие полярностью, ориентированы в сторону водного раствора. Неполярные гидрофобные хвосты взаимодействуют между собой.	Фосфо- и гликолипиды.
M, мицеллярная.	Представлены сферой. Поверхность такой сферы состоит из полярных головок липидов, а гидрофобные остатки жирных кислот ориентированы во внутреннее пространство.	Лизофосфолипиды, ганглиозиды.
H _{II} , инвертированная гексагональная.	Представлены цилиндрическими структурами (трубочками). Такие цилиндры имеют гексагональную симметрию и выстланы гидрофильными головками липидов, полость заполнена водой. Гидрофобные остатки жирных кислот ориентированы в пространство между трубочками.	Фосфатидилэтаноламин.
Q _{II} , инвертированная кубическая.	Трехмерная структура представлена кубической решеткой. Организованы как инвертированные мицеллы или непрерывные бислои, которые ограничены каналами, содержащими воду.	Диолеилфосфатидилсерин.

L β фосфолипиды характеризуются максимально плотной упаковкой. Известно о двух модификациях L β фазы. Одна из них представлена собственно ламеллярной L β фазой, когда остатки жирных кислот ориентированы

перпендикулярно бислою липидов. Для $L\beta'$ фазы характерно расположение жирнокислотных хвостов под углом 30° к поверхности мембраны. При этом для ряда фосфолипидов мембран, в частности, фосфатидилэтаноламина, не характерно формирование $L\beta'$ фазы. В диапазоне 35°C и 41°C дипальмитоил фосфатидилхолин может формировать риппл-фазу ($P\beta'$) промежуточного характера в виде гофрированной поверхности. Переход между фазами $L\beta'$ и $P\beta'$ имеет название предперехода (Lee, 1977). Важное значение имеет главный переход. Он представляет собой переход между $P\beta'$ и $L\alpha$ фазами, который происходит при более высоких температурах. Необходимо отметить, что остатки жирных кислот в фосфолипидах описываются как разупорядоченные и характеризуются гибкостью в условиях выше температуры главного перехода (Антонов, 2006). Переход от фазы $L\alpha$ к фазе $L\beta$ сопровождается уменьшением площади бислоя фосфолипидов на 20—25%. Но при этом толщина мембраны характеризуется почти таким же увеличением. Благодаря этим разнонаправленным изменениям, объем бислоя сокращается всего на 3-5% (Харакоз, 2001).

С повышением температуры более упорядоченная пластинчатая кристаллическая (субгелевая) фаза L_c превращается в пластинчатую гелевую фазу L_β . Дальнейшее повышение температуры приводит к переходу пластинчатой гелевой L_β -фазы в неупорядоченную пластинчатую жидкокристаллическую L_α -фазу. Этот фазовый переход пластинчатый гель – пластинчатый жидкокристаллический (L_β – L_α) аналогичен переходу твердого тела в жидкость. Это приводит к увеличению беспорядка в углеводородных цепях, гидратации головной группы и межмолекулярной кинетической энергии. Повышенная гидратация головных групп приводит к значительному увеличению площади поверхности липидов (~25%) и объема (~4%).

При дальнейшем повышении температуры происходит ряд фазовых переходов. Некоторые липиды могут образовывать две или более промежуточных фаз, например, наклонную и рифленую пластинчатую гелевую фазу. Важно, что температура ниже точки фазового перехода характеризуется снижением

активности белковых систем мембран, и их повреждением (Антонов и др., 1992; Харакоз, 2001).

Фазовые переходы также могут быть вызваны изменением степени гидратации при постоянной температуре. С увеличением степени гидратации при постоянной температуре липидные фазовые переходы следуют следующей последовательности:

перевернутые фазы ($M_{II}; Q_{II}^M; H_{II}; Q_{II}^B$) $\rightarrow L_{\alpha}$ \rightarrow нормальные фазы ($Q_I^B; H_I; Q_I^M$) \rightarrow мицеллярный раствор \rightarrow мономеры.

В конце 80-х годов XX века была описана L_0 фаза. Она получила название жидкоупорядоченной ламеллярной фазы. Для этой фазы характерно участие холестерина и ряда фосфолипидов (Ipsen *et al.*, 1987). В этом случае липиды могут диффундировать в латериальном направлении, иначе говоря мембрана жидкая, но хвосты жирных кислот характеризуются плотной упаковкой (Busto *et al.*, 2014). В результате выявления этой фазы, L_{α} -фазу принято называть «жидкоразупорядоченной» L_d -фазой. L_0 -фаза крайне важна, так как лежит в основе мембранных микродоменов (рафтов), необходимых для поддержания работы мембранных систем (Harder *et al.*, 1998; Dietrich *et al.*, 2001). Рафты, сформированные из холестерина и насыщенных липидов, а также обогащенные транспортными белками, характеризуются повышенной температурой плавления. Считается, что рафты обязаны своей структуре определенным белкам мембраны, которые могут формировать липидную капсулу (Anderson and Jacobson, 2002). Уникальность микродоменов обуславливает их специфические функции в клетке, которые заключаются в сортировке и транспорте белков, регуляции клеточной сигнализации и др. (Simons and Ikonen, 1997; Silvius, 2003; Lafont and Van der Goot, 2005).

Общепризнано, что фазовые переходы липидов играют важнейшую роль в регуляции проницаемости мембран. В.Ф. Антоновым описаны одиночные каналы, которые проявляются в бислойных липидных мембранах при переходе гель-фазы в жидкокристаллическую фазу. Предполагается, что формирование каналов, обусловлено образованием доменов в бислое мембраны при фазовом переходе. В

ходе формирования зачатков гель-фазы в жидких кристаллах мембраны происходит развитие упругого напряжения вследствие различной плотности фаз. В итоге в бислое происходит появление липидных пор (Антонов и др., 1992; Антонов и Шевченко, 1995; Antonov *et al.*, 2005). Как экспериментальные, так и теоретические данные показывают, что наблюдается формирование каналов, имеющих гидрофильный характер (Чизмаджев и др., 1982). Процесс, по всей видимости, инициируется в результате дефектов, наблюдаемых в упаковке бислоя (Антонов 2006; Marrink *et al.*, 2009). Сложилось представление, согласно которому, при фазовом переходе формируется энергетически устойчивая структура мембраны, включающая в себя пору. В частности, стабильная пора предполагает радиус порядка 0.7 нм (Leontiadou *et al.*, 2004). Увеличение радиуса поры до 9 нм приводит к разрушению жидкокристаллического бислоя мембраны (Антонов, 1998). Действительно, бислои, которые были получены с помощью дипальмитоилфосфатидилхолина, имеют подобные характеристики (Braganza *et al.*, 1984). Стоит отметить, что причиной образования липидных пор может быть действие различных агентов и физических воздействий. В качестве примеров можно назвать электропорацию, механический стресс, применение антимикробных пептидов (Gurtovenko and Anwar, 2007; Gurtovenko and Vattulainen, 2007; Sengupta *et al.*, 2008; Marrink *et al.*, 2009).

1.1.2. Фазовые переходы полиморфной природы

Биологические мембраны содержат большое разнообразие липидов, которые могут располагаться в различных фазах, которые могут играть важную роль в регуляции важных мембранно-связанных процессов. Кроме того, мембраны организованы в домены, которые имеют различную липидно-белковую композицию, поэтому каждый домен может быть стабильным в другой полиморфной липидной фазе.

Однако клеточные мембраны в стабильном состоянии характеризуются формированием ламелярного бислоя. Экспериментальные данные подтверждают, что небислойные структуры существуют в мембране, по крайней мере, в течение

короткого промежутка времени. В частности, миелиновые оболочки нервных клеток характеризуются формированием по большей части гель-фазы (Антонов, 2006; Caffrey, 1987). Для них показаны переходы из фазы жидкого кристалла в кубическую фазу ($L\alpha \rightarrow Q_{II}$) или в гексагональное состояние ($L\alpha \rightarrow H_{II}$). В этом случае наблюдается утеря структуры бислоя, но жидкость мембраны сохраняется (Cullis *et al.*, 1980).

Полиморфные фазы липидов являются важными детерминантами мембранной архитектуры и функции, которые включают:

1) Искривление мембран. Асимметричный состав липидов в мембранах управляет многими морфологическими превращениями липидного бислоя. Цилиндрические липиды, такие как PC и PS, образуют плоскую форму в монослое, в то время как липиды конической формы, такие как PE, PA, DAG или кардиолипин, с небольшой группой полярных головок, вводят отрицательную кривизну. Монослой, богатый этими липидами конической формы, изгибается таким образом, что головные группы сближаются. И наоборот, перевернутые липиды конической формы, такие как лизофосфатидилхолин (LPC) и фосфатидилинозитолфосфаты (PIPs) с большой головной группой, соотношением ацильных цепей, способствуют положительной кривизне, изгибая монослой от головных групп.

Начало искривления мембраны важно для регуляции многих клеточных процессов, таких как формирование органелл, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, эндосомы, секреторные везикулы. Например, H_I -фаза образует мицеллярные каналы, и, следовательно, липиды, присутствующие в H_I -фазе, способствуют образованию эндоплазматических ретикулумоподобных трубчатых структур. Кроме того, сильно изогнутые мембраны, такие как внутренняя митохондриальная мембрана или границы тилакоидных зерен, благоприятствуют обогащению H_{II} -образующим липидом.

Липидные липазы (АТФазы Р-типа IV типа), которые транслоцируют фосфолипиды, такие как фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, из монослоя на внеклеточной стороне на цитозольную сторону, регулируют искривление

мембраны, генерируя дифференциальное распределение липидов между двумя монослоями. Липидный состав монослоев также может быть модифицирован ферментами, такими как лизофосфолипидацилтрансферазы и фосфолипаза А, вызывающими кривизну мембраны.

Кривизна мембраны дополнительно стабилизируется взаимодействием различных мембранных белков. Кривизна может быть введена путем вставки гидрофобных белковых доменов на одной стороне бислоя. Эти домены могут представлять собой амфипатическую спираль (белки Arf и Sar1) или петли шпильки (кавеолин-1). Ассоциация олигомеризованных периферических белков, таких как клатриновая оболочка, COP I и COP II, с мембраной через адаптерные белки также может вызывать искривление мембраны. Элементы цитоскелета могут создавать искривление мембран путем полимеризации или растяжения мембран с помощью моторных белков, таких как динамин. Изогнутые домены некоторых белков, таких как домены Bin-амфифизин-Rvs, связываются с мембранами для введения кривизны.

Помимо внутриклеточной трубчатой сети мембран, искривление мембраны также требуется в таких процессах, как почкование мембран, нацеливание пузырьков и слияние мембран.

2) Слияние мембран. Липиды с относительно небольшими полярными головными группами имеют коническую форму с критическим параметром упаковки >1 , такие как диолеилфосфотидилэтаноламин или диолеилфосфатидилэтаноламин, диацилглицерол, фосфатидилсерин при $pH < 4$, кардиолипин в присутствии Ca^{2+} и моногалактозилглицерид. Такие липиды образуют инвертированную гексагональную фазу (H_{II}). Ряд факторов, таких как липидный состав, степень гидратации, pH и концентрация катионов, могут модифицировать липидную фазу.

Слияние мембран является важным процессом при везикулярном транспорте в клетке (Chernomordik and Kozlov, 2008; Roy and Sarkar, 2011). Установлено, что ионы кальция играют важную роль в инициации процесса слияния мембран. При этом должны сформироваться условия, которые ведут к

кратковременной дестабилизации липидного бислоя (Helm *et al.*, 1992). При высокой внутриклеточной концентрации Ca^{2+} кислые фосфолипиды, такие как фосфатидилсерин, обладают более высокой вероятностью образования гексагональных структур H_{II} . В настоящее время было продемонстрировано, что Ca^{2+} -индуцированное образование внутримембранных инвертированных мицеллярных или цилиндрических (H_{II}) конфигураций вызывает морфологические изменения в мембране, что приводит к таким процессам, как «выпячивание», наблюдаемое при экзоцитозе, эндоцитозе и слиянии мембран (Papahadjopoulos *et al.*, 1990; Jacobson and Papahadjopoulos, 1975; Knecht and Marrink, 2007; Chernomordik and Kozlov, 2008; Roy and Sarkar, 2011).

Непластинчатые липидные сборки играют важную роль в акросомальной реакции сперматозоидов. Акросомальная реакция начинается со слияния плазматической мембраны с наружной мембраной акросомы с образованием везикул и высвобождением гидролитических акросомальных ферментов. Агенты и физические факторы, способствующие агрегации и слиянию мембран, включают в себя катионы металлов (Papahadjopoulos *et al.*, 1990) и белки (Schekman and Orci, 1996). Кроме того, осмотическое давление также влияет на инициацию агрегации и слияния мембран (Woodbury and Hall, 1988). Тем не менее считается, что именно от мембранных фосфолипидов зависит, в какой фазе находится конкретная мембрана (Knecht and Marrink, 2007). Описаны следующие формы липидов в воде – конус, инвертированный конус, а также цилиндр. Для того, чтобы отличать эти структуры друг от друга, используется параметр упаковки, который описывается как соотношение проекций площади головок липидов и хвостов на поверхность бислоя ($P = V/a_0l$, где V – объем молекулы липида, a_0 – площадь полярной группы и l – длина молекулы липида). Для лизофосфолипидов, имеющих форму инвертированного конуса и $P < 0.5$ характерно формирование мицелл. Цилиндрические липиды (все фосфолипиды кроме этаноламина) имеют P равное 0.5-1 и способны формировать ламеллярные структуры. Конусообразные липиды, например, фосфатидная кислота и фосфатидилэтанолламин, имеющие $P > 1$, способны формировать инвертированные

фазы (Israelachvili *et al.*, 1980). При этом геометрия молекул имеет важнейшее влияние на внутреннюю спонтанную кривизну фосфолипидного монослоя. В частности, конусообразные фосфолипиды образуют отрицательную спонтанную кривизну и, таким образом, способствуют слиянию мембран. С другой стороны, если липиды имеют форму инвертированного конуса, то они образуют положительную спонтанную кривизну монослоя, а это способствует подавлению слияния мембран (Roy and Sarkar, 2011).

1.2. Роль митохондрий в клетке

Митохондрии представляют собой многофункциональные органеллы, организованные в клетках по типу ретикулума. Известно, что, в отличие от других органелл в клетках млекопитающих, митохондрии наследуются по материнской линии, имеют двойную мембранную структуру и обладают собственным геномом (Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017). Предполагается, что эти органеллы произошли от симбиотических бактерий и их эволюция тесно связана с развитием клетки-хозяина, поскольку большинство митохондриальных белков кодируются в ядре. Тем не менее, считается, что митохондрии полуавтономны, так как они сохраняют небольшой геном, кодирующий белки, необходимые для обеспечения процесса дыхания. На сегодня общепризнано, что митохондрии играют решающую роль в производстве энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ) в процессе окислительного фосфорилирования и являются центральным звеном клеточной биоэнергетики. С другой стороны, митохондрии участвуют в биосинтезе макромолекул, в частности нуклеотидов, липидов, гема и железо-серных кластеров. Со временем митохондрии стали важным объектом исследований во многих областях биологии вследствие их участия во множестве клеточных процессов. Помимо метаболизма (анаболизм и катаболизм), митохондрии также задействованы в регуляции сигналов для реализации различных биологических эффектов, включая гибель клеток, Ca^{2+} -гомеостаз, экспрессию генов, дифференцировку, а также специфические аспекты процесса старения, такие как клеточное старение, хроническое воспаление и

возраст-зависимая активность стволовых клеток (Galluzzi *et al.*, 2008). Более того, митохондриальная архитектура очень динамична, и недавно было показано, что ее структура, а также ее протеом демонстрируют значительные различия в типах клеток, что позволяет митохондриям участвовать в адаптации клетки для удовлетворения ее специфических потребностей (Rath *et al.*, 2021). Учитывая многофункциональную роль этих органелл, неудивительно, что нарушение нормальной функции митохондрий связано с патологическими состояниями, включая метаболические нарушения, кардиомиопатии, нейродегенеративные заболевания и онкология, а также дисфункции, тесно связанные с нерегулируемой гибелью клеток (Calvo and Mootha, 2010; Nunnari and Suomalainen, 2012; Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017). Кроме того, учитывая, что запрограммированная гибель клеток сопровождается нарушением метаболических функций, дисрегуляция митохондриальной сигнализации тесно связана с процессами развития и тканевым гомеостазом. При этом широкий спектр митохондриальных функций в клетках реализуется благодаря относительно небольшому количеству белков в этих органеллах (Rath *et al.*, 2021), некоторые из которых выполняют как метаболические функции, так и участвуют в реализации механизмов клеточной гибели. При этом предполагается, что повреждение большого количества митохондрий, способствующее гибели клеток жизненно важных органов может приводить к их дисфункции и, в конце концов, обуславливать гибель организма (Kroemer *et al.*, 2007; Halestrap and Richardson 2015; Kist and Vucic, 2021).

1.2.1. Феномен перехода проницаемости внутренней мембраны митохондрий

Внутренняя митохондриальная мембрана представляет собой чрезвычайно плотный барьер. По этой причине, все сигнальные молекулы и медиаторы, образующиеся внутри митохондрий, нуждаются в специальных переносчиках для транспорта через внутреннюю мембрану органелл. При этом внешняя митохондриальная мембрана более проницаема для ионов и малых растворов благодаря наличию потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) и

специализируется на селективной диффузии белка для разделения биохимических функций и сигнальных событий (Hansen *et al.*, 2019; Rosencrans *et al.*, 2021). Накопление избыточного количества Ca^{2+} в митохондриальном матриксе приводит к изменению свойств внутренней мембраны, она становится проницаемой и теряет свою селективность, способствуя перераспределению различных ионов и растворенных веществ. Это явление известно, как переход митохондриальной проницаемости (или «mitochondrial permeability transition», МРТ). Первоначально предполагалось, что это скорее *in vitro* артефакт, который возникает в результате деградации внутренней мембраны (Hunter and Ford, 1955). Но в настоящее время общепризнано, что феномен перехода митохондриальной проницаемости опосредуется открытием специфической МРТ поры (Белослудцев и др., 2019; Bonora *et al.*, 2021). Открытие mPTP является обратимым, т.е. ее состояние обуславливается равновесием между положительными и отрицательными модуляторами. Однако концентрации этих модуляторов варьируются в зависимости от условий в клетке, предполагая наличие некоего порога, при котором открытие МРТ поры становится необратимым. МРТ пора играет важную роль в функционировании сигнальных путей, которые сходятся на митохондриях или же иницируются в митохондриях и участвует во многих клеточных событиях. Кроме того, благодаря открытию ингибитора МРТ поры циклоспорина А (Haworth and Hunter, 1979a, 1979б, 1979в; Giorgio *et al.*, 2010; Bonora *et al.*, 2021) стало известно, что пора участвует как в регуляции физиологических процессов в клетке, так и проявляется при патологических состояниях (Bonora *et al.*, 2020).

1.2.2. Митохондриальная Ca^{2+} -зависимая ЦсА-чувствительная пора

Установлено существование одного или группы белков, которые ответственны за формирование МРТ поры, хотя ее молекулярная природа все еще является предметом дискуссии. Многие компоненты были предложены в качестве канала поры, включая переносчик адениновых нуклеотидов (ANT), VDAC и митохондриальный переносчик неорганического фосфата. В то же время

последние данные показывают, что модели, основанные исключительно на участии этих белковых структур, маловероятны (Bonora *et al.*, 2021).

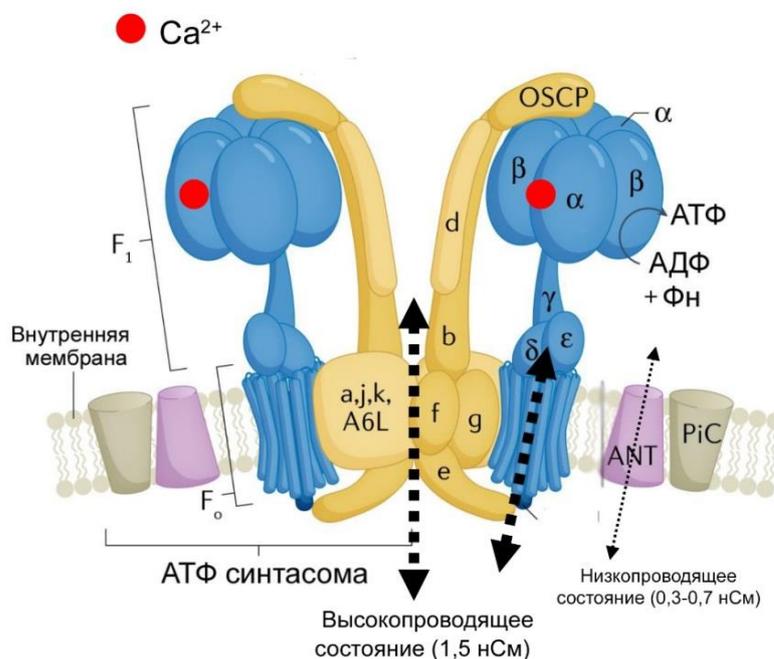


Рисунок 2. Структура АТФ-синтазы и механизм образования МРТ поры в низко- и высокопроводящем состоянии. ANT – переносчик адениновых нуклеотидов, PiC – переносчик неорганического фосфата (адаптировано из Bonora *et al.*, 2021)

В последнее десятилетие внимание исследователей было сосредоточено на митохондриальной F₁/F₀ АТФ-синтазе (или АТФ-синтазе), белковом комплексе, отвечающим за синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата во внутренней мембране митохондрий. АТФ-синтаза представляет собой мультибелковый комплекс, состоящий из двух четко ограниченных областей: растворимой части F₁, ориентированной в митохондриальный матрикс и F₀ части, локализованной во внутренней мембране митохондрий (Spikes *et al.*, 2020). Участие АТФ-синтазы в образовании МРТ поры основано на трех группах данных. Во-первых, изолированная АТФ-синтаза (или ее домен c-кольца), встроенная в искусственный бислой, способна генерировать Ca²⁺-индуцируемые токи высокой проводимости (Urbani *et al.*, 2019; Mnatsakanyan *et al.*, 2019). Во-вторых, генетические манипуляции с субъединицами АТФ-синтазы в живых клетках заметно влияют на МРТ пору (Bonora *et al.*, 2017; Galber *et al.*, 2021). В-третьих,

мутагенез некоторых субъединиц АТФ-синтазы влияет на ответ МРТ поры на некоторые из его регуляторов (Bonora *et al.*, 2017; Carraro *et al.*, 2020).

Исходя из полученных к настоящему времени данных можно полагать, что МРТ пора может открываться в виде различных конфигураций, каждая из которых характеризуется различными проводящими свойствами (Szabo and Zoratti, 1992; Ichas and Mazat, 1998; Bonora *et al.*, 2021). Предполагается, что МРТ индуцируется двумя разными типами пор (разной величины), через которые протекают два вида токов (Рис. 2). Первый тип пор с низкой проводимостью порядка 0,3–0,7 нСм, что позволяет перераспределить ионы (H^+ , Ca^{2+} и K^+) и низкомолекулярные метаболиты (например, глутатион), которые участвуют в основном в регуляции функциональной активности митохондрий в физиологических условиях. Второй тип пор высокой проводимости (примерно 1,5 нСм), которые допускают прохождение более крупных растворенных веществ и, в частности, сахарозы (Neginskaya *et al.*, 2021), и оказывают большое влияние на структуру и функцию митохондрий, индуцируя механизмы клеточной гибели. Оба МРТ феномена являются обратимыми (Bonora *et al.*, 2021). В то время как состояние высокой проводимости МРТ поры вызвано чрезвычайными стрессовыми ситуациями, которые перегружают митохондрии, состояние низкой проводимости возникает спонтанно во время нормальной физиологической активности органелл (например, в возбудимых клетках МРТ запускается накоплением физиологических концентраций Ca^{2+} внутри митохондрии). Это стихийное явление включает в себя переключение МРТ поры от активного состояния в закрытое и называется «мерцанием» поры (Elrod *et al.*, 2010; Boyman *et al.*, 2019). «Мерцающие» события возможны, в этом случае низкопроводящая МРТ может быть быстро отключена вследствие перераспределения ионов между митохондриями и цитоплазмой. Действительно, поры с низкой проводимостью, образующиеся во внутренней мембране митохондрий, позволяют выходить в цитозоль ионам кальция, являющимся универсальным активатором МРТ поры (Giorgio *et al.*, 2018), а также способствовать поступлению H^+ из цитозоля в митохондрии, что приводит к снижению рН митохондриального матрикса и

способствует закрытию пор. ANT в настоящее время считается наиболее вероятным белком, формирующим поры с низкой проводимостью (Neginskaya *et al.*, 2019; Karch *et al.*, 2019), в то время как каналы большей проводимости приписываются поре, возникающей в АТФ-синтазе (Bonora *et al.*, 2017). Тем не менее, считается, что эти два типа МРТ пор тесно связаны между собой, поскольку АТФ-синтаза и ANT взаимодействуют в составе так называемой АТФ-синтасомы (Bonora *et al.*, 2021).

Механизм открытия поры при участии АТФ-синтазы остается предметом дискуссии. Недавно было показано, что Ca^{2+} способен связываться с участком, расположенным в F_1 компоненте АТФ-синтазы и инициировать открытие МРТ поры (Giorgio *et al.*, 2017; Pinke *et al.*, 2020). В отличие от Ca^{2+} другие двухвалентные катионы, особенно Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} и Ba^{2+} являются мощными ингибиторами МРТ поры. Предполагается, что ингибирование Sr^{2+} , Mn^{2+} и Ba^{2+} происходит путем блокирования Ca^{2+} унипорта внутрь митохондрий, при этом Mg^{2+} подавляет открытие МРТ поры благодаря конкуренции с Ca^{2+} за тот же сайт связывания на поверхности АТФ-синтазы (Haworth and Hunter, 1979a, 1979b, 1979в).

АТФ-синтаза организована в основном в виде ряда димеров, которые располагается на кристах внутренней мембраны митохондрий. Предполагается, что образование МРТ поры начинается на участках, обогащенных димерами АТФ-синтазы, при этом для успешного открытия поры требуется их разделение (Bonora *et al.*, 2017). В настоящее время предложены две рабочие модели образования поры: одна основана на «димерной гипотезе», а другая на «гипотезе *c*-кольца». Согласно первой гипотезе Ca^{2+} -индуцированное изменение конфигурации димера вызывает образование поры на границе двух мономеров АТФ-синтазы. Вторая гипотеза предполагает индукцию ионами кальция конформационных изменений, которые позволяют *c*-кольцу формировать пору. В различных исследованиях обе эти модели подверглись критике, что вызвало сомнения в их достоверности. Генетическая делеция субъединиц АТФ-синтазы, препятствующая образованию *c*-кольца или периферического стебля (участка,

ответственного также за образование димеров, рис. 2), не приводила к блокированию образования Ca^{2+} -зависимых ЦсА-чувствительных неселективных пор во внутренней мембране митохондрий (He *et al.*, 2017; Carroll *et al.*, 2019). Недавно было показано, что ионные токи, наблюдаемые в митохондриях клеток с нокаутированной c-субъединицей, характеризуются значительно меньшей амплитудой, чем высокопроводящее состояние MPT поры (Neginskaya *et al.*, 2019). В настоящее время предполагается, что эти токи низкой амплитуды формируются при участии ANT, поскольку они чувствительны к антагонистам этого переносчика. Генетическая делеция изоформ ANT, белка митохондриального матрикса циклофилина D (Karch *et al.*, 2019) и g-субъединицы АТФ-синтазы укрепила позиции гипотезы, согласно которой ANT и АТФ-синтаза могут быть независимыми порами, ответственными за открытие MPT пор низкой и высокой проводимости, соответственно (Bonora *et al.*, 2021).

При открытии MPT поры все молекулы, формирующие градиент через внутреннюю мембрану митохондрий, могут пассивно диффундировать в межмембранное пространство и далее, через полупроницаемую внешнюю мембрану, в цитоплазму клетки. Отсюда следует, что MPT пора оказывает существенное влияние не только на физиологию митохондрий, но и на всю клетку. Физиологическое «мерцание» MPT поры представляет собой явление, регулирующее потоки Ca^{2+} в митохондриях и, в свою очередь, поддерживающее Ca^{2+} гомеостаз клетки. Более того, открытие низкопроводящих MPT пор может способствовать уменьшению мембранного потенциала митохондрий и, тем самым, снижать уровень эндогенных активных форм кислорода (АФК), оказывающих негативное влияние на клетку в целом. И наоборот, открытие MPT поры в высокопроводящем состоянии может оказывать драматическое влияние на активность митохондрий, особенно на дыхательную цепь, вызывая истощение митохондриального пула НАДН — основного источника электронов для дыхательной цепи органелл (Di Lisa *et al.*, 2001; Dumas *et al.*, 2009). Возникающее в результате нарушение потока электронов, особенно в комплексе I, приводит к

увеличению продукции АФК, которая может превысить физиологический уровень и вызвать деструктивные эффекты (Bonora *et al.*, 2021).

Таким образом, длительное открытие МРТ поры индуцирует дисрегуляцию митохондриальной физиологии и энергетического метаболизма. При открытии высокопроводящей МРТ поры также происходит выравнивание градиента воды. Попадание воды в митохондриальный матрикс приводит к увеличению осмотического давления, что сопровождается частичным растяжением крист митохондрий и увеличением объема матрикса, что может быть зарегистрировано по набуханию митохондрий. Поскольку внутренняя мембрана имеет гораздо большую площадь, чем внешняя, набухание митохондрий приводит к глубокому ремоделированию внешней мембраны. В настоящее время установлено, что потеря целостности внешней мембраны при этом происходит не механически, а обусловлено белками ВАХ и ВАК, которые олигомеризуются с образованием пор, достаточно больших для экструзии внутренней мембраны (Karch *et al.*, 2013; McArthur *et al.*, 2018). При этом рассеивание потенциала митохондриальной мембраны, вызванное притоком протонов в матрикс, механически поддерживает МРТ пору в открытом состоянии. Кроме того, снижение содержания ферментов и метаболитов в матриксе органелл приводит к ингибированию цикла трикарбоновых кислот и функциональной активности дыхательной цепи, которые не способны противодействовать утечке протонов. В отсутствие потенциала митохондриальной мембраны и при снижении концентрации субстратов дыхательной цепи АТФ-синтаза прекращает синтез АТФ, что приводит к быстрой блокаде АТФ-зависимых процессов в клетке. На этом этапе митохондрии не могут поддерживать условия, необходимые для закрытия МРТ поры, что делает этот процесс необратимым и в большинстве случаев приводит к гибели клетки (Bonora *et al.*, 2021).

1.2.3. Влияние МРТ поры на функционирование клеток

Открытие МРТ поры оказывает существенное влияние на структуру и функцию митохондрий. При этом масштабность этих эффектов пропорциональна

интенсивности пермеабиллизации внутренней мембраны органелл. Как указано в предыдущей главе, митохондрии играют ключевую роль в регуляции клеточных функций, от контроля действия внутриклеточных сигнальных молекул (например, Ca^{2+} и активных форм кислорода, АФК) и модуляции метаболических процессов до драматических процессов, таких как участие в программируемой гибели клетки.

Одним из основных последствий открытия МРТ поры является изменение клеточного метаболизма вследствие перераспределения ионов и метаболитов, участвующих в биохимических реакциях, и нарушения функциональной активности митохондрий, которые в норме поддерживают множество биохимических путей в клетке. Нокаут гена циклофилина Д блокирует мерцающий режим функционирования МРТ поры (Boyman *et al.*, 2019), вызывая повышение уровня митохондриального Ca^{2+} , достаточное для активизации цикла Кребса (Tavecchio *et al.*, 2015). В соответствии с этим митохондрии, выделенные из мышей, нокаутированных по гену *Ppif* (кодирующим циклофилин Д), характеризуются изменением уровня метаболитов цикла Кребса (Tavecchio *et al.*, 2015), активности окисления глюкозы (Taddeo *et al.*, 2014), скорости глюконеогенеза и изменением экспрессии генов, участвующих в деградации аминокислот и жирных кислот (Laker *et al.*, 2016). Известно, что открытие МРТ поры способствует генерации АФК. Устойчивое повышение уровня АФК губительно для митохондрий и способствует дальнейшей продукции АФК с помощью разнообразных механизмов (феномен, называемый «АФК-индуцированная продукция АФК»). Например, АФК могут способствовать диссоциации цитохрома *c* и кардиолипина на внутренней мембране митохондрий, что приводит к неспособности цитохрома *c* транспортировать электроны от комплекса III к комплексу IV дыхательной цепи органелл. В этом случае электроны накапливаются в области I и III комплексов дыхательной цепи, что еще способствует дальнейшему увеличению генерации АФК. При этом АФК могут диффундировать и к окружающим митохондриям, которые не подверглись МРТ, что приводит к снижению порога индукции МРТ поры в этих митохондриях и,

тем самым, запускает порочный круг, который в конечном итоге может привести к массивной продукции АФК в клетках и развитию генерализованного окислительного стресса (Zorov *et al.*, 2014).

Масштабная индукция МРТ пор в митохондриях вызывает энергетический кризис в клетке, которой не может быть компенсирован увеличением скорости гликолиза. Кроме того, повышенная гликолитическая активность приводит к накоплению пирувата и, следовательно, лактата, вызывая закисление как цитоплазмы, так и митохондриального матрикса. Снижение уровня доступного АТФ приводит к нарушению работы АТФаз плазматической мембраны, которые активно перекачивают Na^+ , Ca^{2+} и H^+ за пределы цитозоля, а также Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума, перекачивающей Ca^{2+} в эндоплазматический ретикулум. В этом случае градиенты Na^+ и Ca^{2+} могут рассеиваться, а замедление перекачки H^+ приводит к закислению цитоплазмы. Резкая потеря ионных градиентов в конечном итоге приводит к деструкции плазматической мембраны и гибели клеток по типу некроза (Bonora *et al.*, 2015; Bauer and Murphy, 2020). Однако некроз не является единственным негативным последствием открытия МРТ поры. Действительно, нарушение целостности внешней мембраны митохондрий, вызванное набуханием органелл, приводит к высвобождению в цитозоль проапоптотических факторов, таких как цитохром *c*, митохондриальный апоптоз-индуцирующий фактор 1 (AIF1), сериновую пептидазу HTRA2, белок Diablo и эндонуклеазу G. Выход этих факторов из митохондрий инициирует внутренний путь апоптоза, что в конечном итоге также приводит к гибели клетки (Bonora *et al.*, 2015; Bauer and Murphy, 2020). Получены доказательства того, что МРТ пора может индуцировать оба пути гибели клеток (Borutaite *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005), а фактором, определяющим развитие сценария по пути некроза или апоптоза, по-видимому, является уровень клеточного АТФ. Апоптоз является энергозависимым процессом, поэтому при открытии МРТ поры повышение продукции АТФ приводит к переключению пути гибели клетки от некроза к апоптозу (Kim *et al.*, 2003).

Показано, что открытие МРТ поры может способствовать элиминации митохондрий посредством митофагии (Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2006). В различных системах *in vitro* при индукции клеточного голодания наблюдалась деполяризация митохондрий, приводящая к их включению в лизосомы, и это явление блокировалось десенсибилизаторами МРТ поры, такими как ЦсА или его аналоги (Carreira *et al.*, 2010). Повышение уровня цитоплазматического Ca^{2+} и окислительный стресс тесно связаны с открытием МРТ поры и индукцией аутофагии (Medina and Ballabio, 2015) и являются наиболее вероятными факторами МРТ-связанной митофагии. Описаны различные пути доставки поврежденных митохондрий в лизосомы для деградации, лучше всего охарактеризована система PINK1-Parkin (Palikaras *et al.*, 2018). Этот механизм используется для МРТ-индуцированной митофагии в результате делеции митохондриального белка деления DRP1 или сверхгенерации АФК (Song *et al.*, 2015). Митофагия также влияет на МРТ, поскольку ее генетическая инактивация (в первую очередь за счет нокаута или блокирования PINK1 и Parkin) вызывает накопление дисфункциональных митохондрий, которые характеризуется сниженным мембранным потенциалом и повышением продукции АФК. Это состояние снижает порог открытия МРТ поры, делая клетки с нарушением митофагии склонными к спонтанной индукции МРТ (Baechler *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019). При этом применение ЦсА, блокирующего открытие МРТ поры, приводит к восстановлению митохондриальной функции в клетках с нокаутированным PINK1 (Gautier *et al.*, 2012).

1.2.4. ЦсА-нечувствительная МРТ пора, индуцируемая свободными жирными кислотами

Исследования, проведенные за последние два десятилетия, показывают, что открытие ЦсА-чувствительной МРТ поры не является единственным механизмом, с помощью которого митохондриальная мембрана может быть пермеабелизована в условиях избытка Ca^{2+} и окислительного стресса. Группой профессора Г.Д. Мироновой показано, что может существовать принципиально другой механизм,

который, в отличие от классического, не чувствителен к ЦсА и связан с открытием «липидной», а не «белковой» МРТ поры. Механизм основан на образовании комплексов между анионами длинноцепочечных насыщенных жирных кислот (в основном, пальмитиновой кислоты, ПК) и Ca^{2+} , которое происходит на внутренней митохондриальной мембране, обращенной в матрикс органелл и сопровождается появлением переходной липидной поры.

В середине 90-х годов предыдущего столетия группой Г.Д. Мироновой было обнаружено, что мембраны митохондрий соержжат сенсор на ионы кальция, способны при связывании с Ca^{2+} индуцировать канальную активность бислойных липидных мембран (БЛМ) (Mironova *et al.*, 1997). Было установлено, что этот сенсор представляет собой преимущественно длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты (пальмитиновую и стеариновую). Более того, было установлено, что синтетические жирные кислоты характеризуются примерно таким же сродством к ионам кальция, что и нативный гидрофобный митохондриальный экстракт. Был сделан вывод, что Ca^{2+} -связывающие свойства гидрофобной фракции экстракта митохондрий определялись стеариновой и пальмитиновой кислотами (Mironova *et al.*, 2001).

Аналогичный эффект (Ca^{2+} -индуцированная проницаемость мембран, содержащих пальмитиновую и стеариновую кислоты) наблюдался и в экспериментах на липосомах, состоящих из фосфолипидов (Agafonov *et al.*, 2003; 2007). Было установлено, что пальмитиновая кислота в присутствии кальция может индуцировать проницаемость липидных везикул для флуоресцентного красителя сульфородамина Б (СрБ). При этом количество СрБ, высвобожденного из липосом, было пропорционально количеству добавленной пальмитиновой кислоты и Ca^{2+} (Agafonov *et al.*, 2003). Тестирование различных жирных кислот в этих экспериментах выявило закономерность, аналогичную той, которая наблюдалась ранее в анализах связывания Ca^{2+} и жирных кислот. Эксперименты на липосомах также выявили, что везикулы, содержащие пальмитиновую кислоту, могут быть пермеабелизованы и в присутствии других двухвалентных катионов (Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} и Sr^{2+} в порядке убывания). Исключением оказались ионы

магния, эффект которых был намного ниже, чем в случае других двухвалентных катионов. Важно отметить, что благодаря флуоресцентной корреляционной спектроскопии было выявлено, что высвобождение СрБ из липосом не вызвано мицеллизацией везикул и, действительно может быть связано с образованием пор в мембране липосом (Agafonov *et al.*, 2003).

Наконец, было обнаружено, что жирные кислоты вызывают Ca^{2+} -зависимый переход проницаемости и в мембранах митохондрий. При этом такой эффект не подавлялся ЦсА (Mironova *et al.*, 2001; 2004; Sultan and Sokolove, 2001a). В присутствии пальмитиновой кислоты и Ca^{2+} наблюдалась небольшая деполяризация митохондрий, при этом органеллы могли сохранять свою функциональную активность довольно долгое время. Было предположено, что такой феномен может быть характерен для так называемого «мерцающего» режима перехода проницаемости. В этом случае добавление хелатора ионов кальция ЭГТА или рутениевого красного, блокирующего поглощения Ca^{2+} митохондриями, привело к полному восстановлению мембранного потенциала органелл (Mironova *et al.*, 2007), что указывает на восстановление целостности мембраны и закрытие липидной поры.

Мембранная проницаемость, индуцированная жирными кислотами и кальцием, также наблюдалась в экспериментах с эритроцитами, нагруженными СрБ (Belosludtsev *et al.*, 2010). При этом были обнаружены некоторые сходства в характере пермеабиллизации искусственных и биологических мембран этими агентами. Было показано, что пермеабиллизация как липосомальных, так и митохондриальных мембран ингибируется Ca^{2+} -связывающими агентами (ЭГТА), бычьим сывороточным альбумином (БСА), способным связывать жирные кислоты (Белослудцев и др., 2005; Mironova *et al.*, 2007), а также холестеринем, модулятором фазового состояния липидного бислоя мембран (Белослудцева и др., 2009). Кроме того, было показано, что липосомы, обогащенные кардиолипином, легче пермеабиллизируются, а нейтрализация кардиолипина в митохондриях с помощью нонилакридинового оранжевого ингибирует переход проницаемости в органеллах (Belosludtsev *et al.*, 2006; Белослудцев и др., 2008). Эти данные

позволили предположить, что природа мембранной проницаемости, вероятно, одинакова как для искусственных, так и биологических мембран.

Было выдвинуто предположение, что пермеабиллизация мембран при связывании Ca^{2+} с анионами длинноцепочечных насыщенных жирных кислот связана с фазовым переходом в липидном бислое. Эта интерпретация была подтверждена экспериментами с нонилакридиновым оранжевым (НАО), самозатухающим флуоресцентным зондом, который можно использовать для обнаружения изменений в области жидкой фазы липидного бислоя. Включение молекул пальмитиновой кислоты в мембрану липосом вызывало их расширение и соответствующее увеличение интенсивности флуоресценции НАО. При этом последующее добавление Ca^{2+} уменьшало флуоресценцию НАО, предполагая сегрегацию комплексов пальмитиновой кислоты и ионов кальция в мембранные домены твердой фазы (Agafonov *et al.*, 2007). Было предположено, что фазовая сепарация, имеющая место в присутствии пальмитиновой кислоты и ионов кальция, может сопровождаться образованием пор в липидном бислое мембран. Подобный механизм образования пор при таком «хемотропном» фазовом переходе был описан ранее Антоновым и соавторами (Antonov *et al.*, 1992; Антонов и Шевченко, 1995). Что касается жирных кислот и Ca^{2+} , то механизм может быть охарактеризован в следующем виде. Взаимодействие Ca^{2+} с анионами пальмитиновой кислоты на одной стороне мембраны приводит к сегрегации комплексов пальмитиновая кислота/ Ca^{2+} в твердофазные домены (рис. 3А). Поскольку твердофазные домены более плотно упакованы, общая площадь монослоя будет уменьшена. Таким образом, монослой, содержащий твердофазные домены, будет расширяться, а противоположный монослой будет сжиматься (рис. 3Б). В определенный момент, расширенный монослой может разрушиться, и гидрофобные части бислоя будут подвержены воздействию водной фазы, что приведет к формированию очень нестабильной структуры. Следовательно, конденсированный монослой также будет разрушаться, а затем сливаться с расширенным монослоем, закрывая гидрофобные края разрыва. Полученная структура будет представлять собой гидрофильную липидную пору

(рис. 3B) (Rand *et al.*, 1964; Jacobson and Papahadjopoulos, 1975; Schmidt and Knoll, 1985). Образование гидрофильных липидных пор в условиях дестабилизации или растяжения бислоя – хорошо известное явление: поры могут образовываться, например, в процессе температурно-индуцированного фазового перехода, в результате осмотического шока, или могут формироваться в ходе электропорации (Abidor *et al.*, 1982). Одно из важнейших свойств липидных пор – их способность самопроизвольно закрываться через короткий промежуток времени. В случае пальмитиновой кислоты и Ca^{2+} диаметр таких «мерцающих» пор составляет примерно 4 нм, что немного больше диаметра классической МРТ поры, размер которого, как предполагается, находится в диапазоне 2–3 нм (Agafonov *et al.*, 2003; Sultan and Sokolove, 2001a).

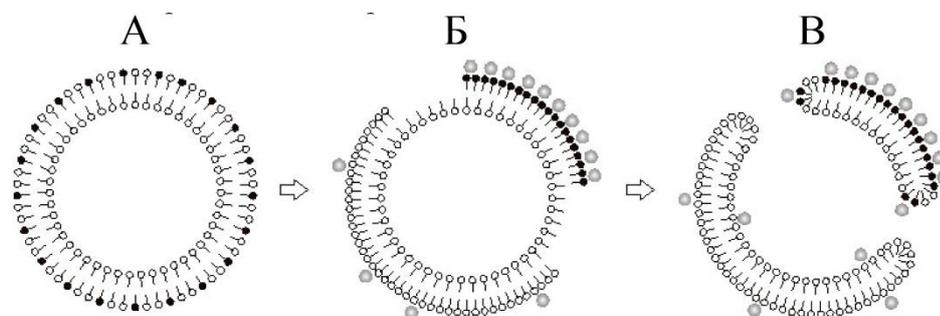


Рисунок 3. Этапы формирования гидрофильной липидной поры в липосомальной мембране в условиях хемотропного фазового перехода (адаптировано из Agafonov *et al.*, 2003)

Как было указано выше, липидная пора, индуцированная жирными кислотами и Ca^{2+} не чувствительна к ЦсА, хорошо известному ингибитору «белковой» МРТ поры. Более того, некоторые другие модуляторы ЦсА-чувствительной поры, включая ее ингибиторы аденозиндифосфат (ADP) и 2,4-динитрофенол (ДНФ), а также и активаторы атрактилозид и неорганический фосфат не влияют на открытие липидной поры (Sultan and Sokolove, 2001a). Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты, которые, как известно, способствуют развитию МРТ поры, не способны индуцировать липидную пору. Более того, их присутствие в митохондриальной мембране снижает вероятность открытия такой поры (Sultan and Sokolove, 2001b; Belosludtsev *et al.*, 2006). Еще одним условием,

необходимым для возникновения липидной поры, является вход и аккумуляция Ca^{2+} в митохондриальном матриксе. При этом ингибирование кальциевого унипортера с помощью рутения красного или деполяризация мембраны, предотвращающие поглощение Ca^{2+} митохондриями, подавляют открытие липидной поры (Mironova *et al.*, 2001; 2004; Sultan and Sokolove, 2001a). Иначе говоря, мембранный потенциал также необходим для появления пор, индуцированных жирными кислотами и кальцием, тогда как открытие МРТ поры может быть, напротив, обусловлено деполяризацией мембраны. Кроме того, липидная пора может индуцироваться не только Ca^{2+} , но также Sr^{2+} и, в меньшей степени, Ba^{2+} (Jacobson and Papahadjopoulos, 1975). Все эти ионы могут транспортироваться в матрикс митохондрий с помощью кальциевого унипортера. Это также отличает липидную пору от классической МРТ поры, которая может инициироваться только Ca^{2+} . Отличительной особенностью липидной поры является ее самопроизвольное затекание в том случае, если ее размер не превышает определенного критического значения. Для жидкой двухслойной фазы это значение составляет ~ 9 нм. Закрывание липидных пор происходит быстро (они существуют в течение доли секунды), что приводит к восстановлению целостности липидного бислоя (Антонов и Шевченко, 1995). Липидные поры, индуцированные жирными кислотами и кальцием, являются примером таких переходных пор. Размер липидных пор оценивается в ~ 4 нм, что немного больше размера МРТ поры ($\sim 2\text{--}3$ нм). Быстрое закрывание липидных пор, индуцированных пальмитиновой кислотой и ионами кальция, было продемонстрировано в экспериментах на липосомах. В случае МРТ поры, быстрое закрывание обычно не наблюдается, пора остается открытой в течение длительного промежутка времени (Sultan and Sokolove, 2001; Agafonov *et al.*, 2003).

Физиологическая роль липидной поры, как и классической ЦсА-чувствительной поры белковой природы, до конца не ясна. Есть предположения, что способность липидных пор закрываться спонтанно и быстро может лежать в основе так называемого «мерцающего» режима перехода митохондриальной проницаемости, который является обратимым и, по-видимому, играет важную

роль в регуляции многих физиологических и патологических процессов, таких как экстренный выброс митохондриального Ca^{2+} или индукция апоптоза и других вариантов клеточной гибели (Liu *et al.*, 1996, Белослудцев и др., 2019).

1.3. ω -Окисление жирных кислот: механизм и физиологическое значение

Жирные кислоты важны не только из-за их роли как источника энергии, но и потому, что они служат важными компонентами природных липидов, таких как сложные эфиры холестерина, фосфолипидов и гликолипидов, которые являются основными компонентами биомембран. В живых организмах имеется несколько путей окисления жирных кислот. Наиболее важным и хорошо известным путем окисления жирных кислот является β -окисление, при котором жирные кислоты превращаются в ацетил-Со-А или пропионил-Со-А (полученный из нечетных цепочек жирных кислот).

Другим путем деградации жирных кислот является их α -окисление, которое заключается в последовательном отщеплении одноуглеродных фрагментов от карбоксильного конца молекулы жирной кислоты. Этот процесс характерен для дрожжей, растений и млекопитающих и происходит в пероксисомах. α -Окисление играет важную роль в метаболизме фитановой кислоты.

Веркаде и соавторы первыми показали существование другого пути *in vivo* деградации жирных кислот, впоследствии названного путем ω -окисления. Они показали, что значительное количество дикарбоновых кислот выводится с мочой при введении средне- и длинноцепочечных жирных кислот животным или людям (Verkade *et al.*, 1933). Было показано, что процесс ω -окисления жирных кислот состоит из нескольких стадий (Verkade, 1938) (рис. 4). На первой стадии концевая CH_3 -группа жирных кислот окисляется до гидроксипроизводной $-\text{CH}_2\text{OH}$ группы при участии цитохрома P-450 микросом и впоследствии путем воздействия алкоголь- и альдегиддегидрогеназ цитозоля до карбоксильной группы. Далее образовавшиеся ω -кислоты окисляются с обоих концов цепи до более коротких дикарбоновых кислот. Впоследствии эти короткие кислоты деградируют путем β -окисления. Об ω -окислении коротко- и среднецепочечных жирных кислот в

условиях *in vitro* первые сообщили Вакабаяши и Шимазоно (Wakabayashi and Shimazono, 1961). Они предположили, что оксидаза со смешанными функциями участвует в ω -окислении. Роббинс также показал, что первая стадия этого процесса (ω -гидроксилирование) осуществляется в микросомальной фракцией печени свиньи, собаки и крысы (Robbins, 1968). Хотя характеристики ферментов, которые катализируют ω -окисление, не выяснены подробно этими исследователями, Лу и Кун ясно продемонстрировали, что в печени микросомальный цитохром P-450 и НАДФН-цитохром *c*-редуктаза задействованы в ω -окислении лауриновой кислоты. В том же году Вада и соавторов также продемонстрировали участие цитохрома P-450 и НАДФН-цитохром *c*-редуктазы в ω -окислении стеариновой кислоты (Wada *et al.*, 1968). С тех пор многие исследователи сообщили, что ферментные системы, включающие микросомальный или митохондриальный цитохром P-450, катализируют ω -окисление различных жирных кислот, и было установлено, что цитохром P-450 играет важную роль в ω -окислении жирных кислот. Кроме того, было показано, что цитохром P-450, который катализирует ω -окисление жирных кислот, принадлежит к семейству CYP4A.

Ишихара и коллеги сообщили о распространении процесса ω -окисления жирных кислот: ω -гидроксилирование каприновой и лауриновой кислот осуществляется микросомальными препаратами печени, почек и легких крыс, кроликов, мышей, быка, голубя, лягушки и карпа. Миура и соавторы подробно описали некоторые свойства системы ω -гидроксилирования жирных кислот у амфибий (Miura, 1981; 1982a; 1982b; 1985; Miura *et al.*, 1978; 1980). Поскольку ω -окисление жирных кислот также обнаружилось у грибов, высших растений (Benveniste *et al.*, 1977) и насекомых (Capdevila *et al.*, 1975), было предположено, что ω -окисление может быть универсальным природным явлением. Более того, окисления ω -типа, такие как (ω -1)-, (ω -2)- и (ω -3)-окисление, были обнаружены у множества живых организмов (Miura *et al.*, 1974; 1975; Salaun *et al.*, 1978; Shoun *et al.*, 1985).

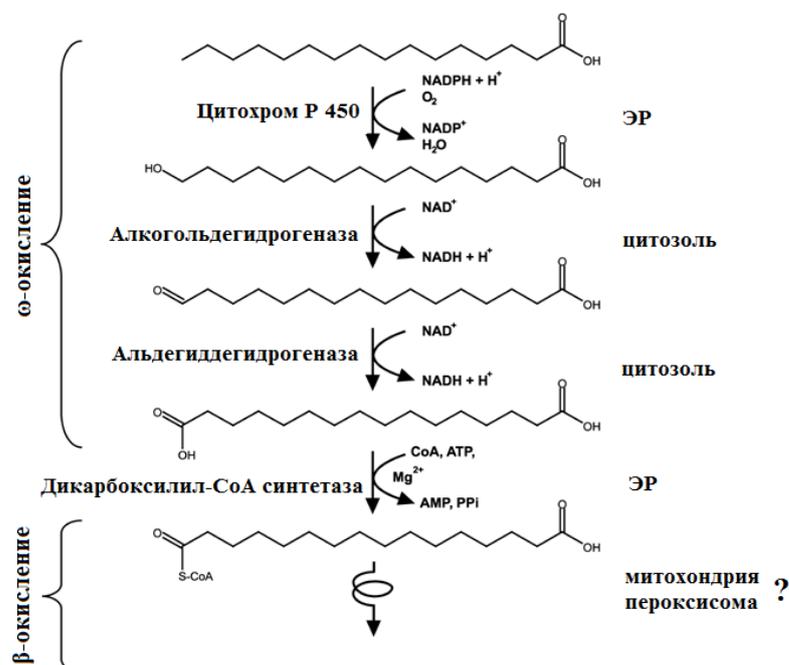


Рисунок 4. Схема, иллюстрирующая образование α,ω -дикарбоновых жирных кислот, в ходе ω -окисления монокарбоновых аналогов и их дальнейшее β -окисление. ЭР – эндоплазматический ретикулум (по: Verkade *et al.*, 1938 и Ferdinandusse *et al.*, 2004, с изменениями)

Впоследствии было выяснено, что ω -окисление у млекопитающих происходит, преимущественно, в печени и почках и заканчивается образованием последовательно ω -гидроксикарбоновых и α,ω -дикарбоновых кислот (Sanders *et al.*, 2005; Reddy and Rao, 2006; Wanders *et al.*, 2011). Предполагается, что ведущую роль в β -окислении дикарбоновых кислот принадлежит пероксисомам. Однако, по мнению ряда ученых, в деградации дикарбоновых кислот могут участвовать и митохондрии (Ferdinandusse *et al.*, 2004).

В норме на ω -окисление жирных кислот приходится не более 10% от общей метаболической активности гепатоцитов, что свидетельствует о минорном характере этого процесса (Sanders *et al.*, 2005; Reddy and Rao, 2006; Wanders *et al.*, 2011). Однако активность ω -окисления существенно увеличивается под влиянием ксенобиотиков и избыточного количества алкоголя (Orellana *et al.*, 1998). Кроме того, состояния, связанные с увеличением содержания свободных монокарбоновых кислот (неалкогольная жировая болезнь печени, цирроз, различные формы сахарного диабета, вирусные заболевания и др.) и нарушения

метаболических путей (неалкогольный стеатогепатит, аутоиммунные заболевания печени, наследственные заболевания), также сопровождаются увеличением интенсивности ω -окисления (Cullis *et al.*, 1980; Lemasters *et al.*, 2009). Известен синдром Рея у детей, который характеризуется развитием острой энцефалопатии, а также жировой инфильтрацией печени (Tonsgard, 1986). Считается, что развитие этой патологии обусловлено увеличением концентрации свободных жирных кислот в сыворотке и тканевой жидкости, при этом более 50% из них представлены α,ω -дикарбоновыми кислотами (Tonsgard, 1986). При тяжелом протекании заболевания у пациентов α,ω -дикарбоновые длинноцепочечные кислоты составляют до 90% от их общего количества в сыворотке крови, и их концентрация может возрастать до 120 мкг/мл (Tonsgard, 1986). Установлено, что накопление в гепатоцитах сусликов α,ω -гексадекандикарбоновой кислоты (ГДК, Рис. 5), относящейся к α,ω -дикарбоновым кислотам, наблюдается на поздних стадиях гибернации. Считается, что увеличение количества α,ω -диовых кислот в гепатоцитах ассоциировано с дисфункцией печени и патологическими явлениями. С другой стороны, показано, что активация ω -окисления монокарбоновых кислот при условии подавления или блокирования других путей метаболизма может оказывать положительное влияние на выживаемость клеток печени (Xu *et al.*, 2006; Wanders *et al.*, 2011).

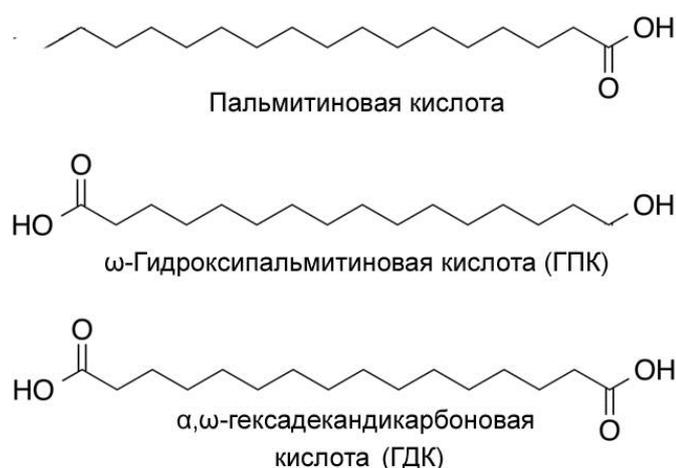


Рисунок 5. Структуры пальмитиновой кислоты и продуктов ее ω -окисления

Установлено, что патологии, связанные с нарушением обмена липидов, также могут сопровождаться накоплением промежуточного продукта ω -

окисления пальмитиновой кислоты – ω -гидроксипальмитиновой кислоты (ГПК, Рис. 5), в сыворотке пациентов (Tonsgard *et al.*, 1986; Orellana *et al.*, 1998; Wanders *et al.*, 2011).

1.3.1. Влияние продуктов ω -окисления жирных кислот на липидные мембраны и их проницаемость

Данные об эффектах продуктов ω -окисления жирных кислот на состояние липидных мембран, их проницаемость и, в том числе, на функционирование мембран митохондрий могут быть охарактеризованы как фрагментарные. Так было показано, что ГПК способна вызывать апоптоз в культуре клеток меланомы, аденокарциномы и аденокарциномы, проявляя, таким образом, цитотоксичность (Abe *et al.*, 2002, 2005). Другие жирные кислоты, содержащие дополнительную гидроксильную группу в ω -положении, также оказывали подобное влияние (Abe *et al.*, 2005). Отмечается, что апоптоз, индуцируемый ГПК был каспаз-зависимым, что предполагает участие цитохрома *c* митохондрий в запуске этого процесса (Abe *et al.*, 2002).

На изолированных митохондриях печени крыс окисляющих сукцинат группой В.Н. Самарцева было установлено, что ГДК и α,ω -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК), способны в отсутствие синтеза АТФ стимулировать дыхание, и такой их эффект не связан с усилением пассивной утечки протонов (Маркова и др., 1999; Адакеева и др., 2015; Семенова и др., 2019; Samartsev *et al.*, 2020). Действие этих жирных кислот схоже с действием десопрягающих агентов (Rottenberg, 1983; Terada *et al.*, 1990), что позволило рассматривать их в качестве десопрягающих агентов природного происхождения (Семенова и др., 2019; Samartsev *et al.*, 2020). Было показано, что при окислении сукцината в митохондриях печени десопрягающий эффект ГДК осуществляется в основном на уровне комплекса bc_1 дыхательной цепи митохондрий. Предположено, что ГДК способна перехватывать освобождающиеся при окислении убихинола в центре Р протоны и содействовать их перемещению в сторону матрикса к центру N где они вновь могли бы использоваться при

восстановлении убихинона с последующим перемещением его восстановленной молекулы в центр Р. Такое катализируемое ГДК циклическое перемещение протонов в пределах bc_1 -комплекса можно рассматривать как внутреннее разобщение, что позволяет рассматривать ГДК как внутренний разобщитель. Интересно отметить, что ГДК и пальмитиновая кислота одинаково эффективно ингибируют генерацию пероксида водорода (Семенова и др., 2019), что предполагает участие α,ω -дикарбоновых кислот в защите клеток от повреждающего действия активных форм кислорода и в редокс регуляции метаболических процессов. Ранее ω -окисление жирных кислот уже рассматривалось как один из «путей спасения» (rescue pathway) при различных нарушениях метаболизма, связанных с избыточным накоплением свободных жирных кислот (Wanders *et al.*, 2011; Ribel-Madsen *et al.*, 2016).

В сравнении с этими кислотами неметаболизирующийся аналог длинноцепочечных α,ω -диовых кислот MEDICA16 в митохондриях гепатоцитов не только стимулирует дыхание, но и вызывает коллапс мембранного потенциала органелл (Hermesh *et al.*, 1998). ЦсА блокировал влияние этой кислоты на мембранный потенциал, что может свидетельствовать об индукции пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий в присутствии MEDICA16 (Hermesh *et al.*, 1998; Samovski *et al.*, 2010).

Группой В.Н. Самарцева было установлено, что митохондрии печени, нагруженные Ca^{2+} или Sr^{2+} , могут подвергаться ЦсА-нечувствительному набуханию в присутствии ГДК, что сопровождается выбросом ионов из матрикса и коллапсом $\Delta\Psi$ (Дубинин и др., 2013а; Dubinin *et al.*, 2014). Исходя из этих сведений, был сделан вывод, что ГДК обладает способностью инициировать нечувствительную к ЦсА пермеабилзацию внутренней мембраны митохондрий. При этом отмечено, что ГДК не уступает по эффективности пальмитиновой кислоте, другому известному индуктору ЦсА-нечувствительной митохондриальной поры (Дубинин и др., 2013а; Dubinin *et al.*, 2014). Меньшая эффективность была продемонстрирована для α,ω -дикарбоновых кислот, которые

отличаются от ГДК более короткой ацильной цепью (ГДК и α,ω -додекандикарбоновая кислоты) (Dubinin *et al.*, 2014).

Ранее было показано, что индукция Ca^{2+} -зависимой ЦсА-нечувствительной неспецифической пермеабиллизации внутренней митохондриальной мембраны печени ГДК приводит к освобождению цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму (Дубинин и др., 2014). Это говорит о том, что аккумуляция длинноцепочечных α,ω -дикарбоновых кислот в клетках печени может служить фактором их гибели при дисрегуляции липидного обмена.

Установлено, что важным условием индукции ГДК ЦсА-нечувствительной поры в митохондриях печени, нагруженных ионами кальция, является наличие субстратов, обеспечивающих энергизацию органелл, что необходимо для поддержания работы кальциевого унипортера, обеспечивающего аккумуляцию Ca^{2+} в матриксе митохондрий. Выяснено, что непредельные жирных кислоты (олеиновая и линолевая) могут подавлять действие ГДК, что, как предполагается, обусловлено дезэнергизацией органелл и невозможностью эффективного транспорта Ca^{2+} в матрикс органелл (Дубинин и др., 2013б). Ранее было показано, что для синдрома Рея наряду с увеличением содержания α,ω -дикарбоновых кислот в сыворотке детей характерно увеличение уровня непредельных СЖК (Kroesen *et al.*, 2001). Исходя из этого, олеиновая и линолевая кислоты могут быть рассмотрены как природные модуляторы, которые подавляют развитие митохондриальной дисфункции, обусловленной α,ω -дикарбоновыми кислотами.

При проведении экспериментов на липосомах (модельных липидных везикулах) было выяснено, что α,ω -дикарбоновые кислоты (среди них наиболее эффективно ГДК) в присутствии Ca^{2+} могут инициировать неспецифическую проницаемость мембран везикул и выброс из них предварительно загруженного флуоресцентного красителя сульфородамина Б (Dubinin *et al.*, 2014). При этом отмечено, что в отличие от монокарбоновых предшественников, действие ГДК на липосомы не связано с изменением фазового состояния липидов, составляющих мембрану везикул (Dubinin *et al.*, 2014). При этом показано, что липосомы, модифицированные ГДК, подвергаются агрегации в присутствии Ca^{2+} , что

сопровождается пертурбацией мембран везикул и выбросом содержимого липосом (Dubinin *et al.*, 2014). Авторами работы была выдвинута гипотеза о формировании так называемой поры слияния между внешней и внутренней мембранами митохондрий (Dubinin *et al.*, 2014).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была проведена на цельной крови и на митохондриях печени, почек и сердец крыс-самцов линии Вистар (вес животных составлял 210–250 г); в отдельных опытах использованы животные в возрасте 1, 4, 8 и 18 месяцев. Все манипуляции с животными соответствовали международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals» и локальным актам, утвержденным комиссией по биологической безопасности и биоэтике Мариского государственного университета.

2.1. Эксперименты с эритроцитами

2.1.1. Выделение эритроцитов крыс

Использовалась цельная кровь крыс весом 210–250 г. Кровь собирали в центрифужную пробирку, стенки которой смачивали 3 мл 3,5% цитрата натрия и 1 мг/мл ЭДТА. Пробирку центрифугировали 10 мин при 500 g и 4°C. Плазму и лейкоциты отделяли, а эритроциты промывали три раза в пяти объемах фосфатного буфера (138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄ и 5 мМ глюкозы, рН 7,4) при 500 g в течение 10 минут при 4°C. каждый раз с удалением лейкоцитарного слоя. Полученную суспензию эритроцитов разбавляли фосфатным буфером, так что конечная концентрация клеток составляла ~5-9 x 10⁹ клеток/мл. Подсчет эритроцитов проводили в двухсеточной камере Горяева. Камеру и покровное стекло несколько раз промывали дистиллированной водой и насухо вытирали, после чего покровное стекло притирали к камере до появления колец Ньютона. Одиночно стоящие клетки считали в пяти больших квадратах сетки, нанесенной на камеру. Количество клеток в 1-мл суспензии рассчитывали по уравнению:

$$C = \frac{a}{20} * 10^6 ,$$

где C - концентрация клеток в суспензии объемом 1 мл, a - сумма клеток в пяти больших квадрантах камеры Горяева, 20 - объем пяти больших квадрантов в нл.

2.1.2. Оптическая микроскопия эритроцитов

Эритроциты ($8-10 \times 10^6$ клеток/мл) инкубировали в фосфатном буфере в присутствии различных добавок (100 мкМ Ca^{2+} + 30 мкМ ПК , ГПК или ГДК). После инкубации в течение 10 мин с исследуемыми агентами 10 мкл суспензии эритроцитов помещали на предметное стекло и накрывали покровным стеклом для получения изображений с помощью компьютеризированной камеры САМ V500 и бинокулярного микроскопа Meiji MT4000 (Meiji Techno).

2.1.3. Оценка проницаемости эритроцитарной мембраны

Проницаемость мембраны эритроцитов оценивали по выходу K^+ с помощью K^+ -селективного электрода и оригинальной многоканальной электрометрической системы Record 4usb в ячейке объемом 1 мл при постоянном перемешивании и температуре 25°C . В этом случае среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), концентрация эритроцитов $8-10 \times 10^6$ клеток/мл.

2.2. Эксперименты на митохондриях

2.2.1. Выделение митохондрий

Выделений митохондрий из различных органов крыс (печень, почка и сердце) осуществляли с помощью общепринятого метода дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Самарцев и др., 1997; Маркова и др., 1999; Dubinin et al., 2014;). Охлажденный в снегообразной среде выделения орган 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 g. Митохондрии

осаждали 10 минут при 9800 g и суспендировали в 2 мл среды выделения, дополнительно содержащей БСА (2 мг/мл), затем добавляли 15 мл среды выделения без БСА и вновь центрифугировали 10 мин при 9800 g. Среда для выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА (2 мМ для митохондрий сердца) и 5 мМ буфера Мопс-трис (рН 7,4). Суспензия органелл, содержащая 60 - 70 мг белка в 1 мл хранилась во время проведения эксперимента в узкой тefлоновой пробирке, помещенной на лед. Для определения концентрации белка митохондрий использовали биуретовый метод, раствор БСА в дистиллированной воде использовался для построения калибровочной кривой.

2.2.2. Оценка функциональных параметров митохондрий

Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (A) при длине волны 540 нм в кювете с перемешиванием при комнатной температуре (~22°C) с использованием спектральной установки Ocean Optics FLAME-T-UV-VIS (Ocean Insight, США). Концентрация митохондриального белка во время эксперимента составляла 0,4–0,45 мг/мл. Инкубационная среда содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 20 мкМ ЭГТА, 5 мМ янтарной кислоты, 2 мкМ ротенона, 1 мкМ ЦсА и 10 мМ буфера Мопс-трис, рН 7,4. Скорость набухания митохондрий ($V = \Delta A_{540} / \text{мин на мг белка}$) рассчитывали по изменению оптической плотности раствора в течение первых 30 с.

При использовании различных модуляторов скорость набухания выражена в процентах от средней скорости набухания, регистрируемой в серии контрольных экспериментов.

Концентрацию Ca^{2+} в инкубационном растворе оценивали с помощью электрода на основе Ca^{2+} -селективной смолы. Трансмембранный электрический потенциал ($\Delta\psi$) оценивали по распределению тетрафенилфосфония (TFF^+) через мембрану митохондрий, в этом случае инкубационная среда дополнительно содержала 1 мкМ этого катиона. Концентрацию TFF^+ измеряли с помощью TFF^+ -селективного электрода (Kamo *et al.*, 1979). Изменение $[\text{TFF}^+]$ и $[\text{Ca}^{2+}]$

оценивали во время одного эксперимента в ячейке объемом 1,2 мл при постоянном перемешивании и температуре (25°C) с помощью электрометрической установки Record-4usb (ИБК РАН, Россия).

2.2.3. Оценка состояния пула НАД(Ф)Н

Автофлуоресценцию NAD(P)H измеряли при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны излучения 450 нм с использованием спектрофлуориметра Fluorat-02-Panorama (Lumex Instruments, Россия). FCCP добавляли в конце измерений, чтобы вызвать максимальное окисление НАД(Ф)Н.

2.2.4. Конфокальная микроскопия митохондрий

Митохондрии (0,4 мг белка/мл) инкубировали в течение 10 минут в инкубационной среде с добавлением 0,5 мкМ Mitotracker red в присутствии различных добавок (50 мкМ Ca^{2+} , 30 мкМ ГПК, 50 мкМ Ca^{2+} + 30 мкМ ГПК). Образцы (10 мкМ суспензии митохондрий) помещали на предметные стекла и проверяли с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SP5 (Германия) с объективом PL APO 63×/1,40 Oil λ bl (лямбда-синий). Флуоресценция возбуждалась лазером с $\lambda=543$ нм и регистрировалась в канале спектрального диапазона 591–716 нм.

2.2.5. Электронная микроскопия митохондрий

Для исследования с помощью электронной микроскопии образцы митохондрий фиксировали в течение 2 часов в 2,5% глутаральдегиде, растворенном в среде, содержащей 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 20 мкМ ЭГТА, 5 мМ янтарной кислоты, 2 мкМ ротенона, 1 мкМ ЦсА и 10 мМ буфера Мопс-трис (рН 7,4). После фиксирования в 1% тетроксиде осмия (OsO_4) образцы заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Микроскопические срезы были нарезаны на ультрамикротоме LKB-III и окрашены цитратом свинца и уранилацетатом. Электронную микроскопию проводили на микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония).

2.2.6. Оценка выхода цитохрома *c* из митохондрий

Вышедший из митохондрий цитохром *c* измеряли в нмоль/мг митохондриального белка спектрометрическим методом при длине волны 414 нм (Arraix *et al.*, 2000). В этом случае митохондрии печени (~1,0 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 20 мкМ ЭГТА, 5 мМ янтарной кислоты, 2 мкМ ротенона, 1 мкМ ЦсА и 10 мМ буфера Мопс-трис, рН 7,4 в течение 15 мин при 25°C в отсутствие или в присутствии ГПК, Ca²⁺ и ГПК/Ca²⁺, наименование и последовательность внесения которых к суспензии органелл указана в подписях к рисункам. Максимальное высвобождение цитохрома *c* из митохондрий было индуцировано добавлением 1% SDS. После инкубации в указанных условиях митохондрии подвергались центрифугированию (10000 g в течение 30 мин). Супернатант фильтровали с помощью мембраны Millipore с диаметром пор 0,2 мкм. Оптическую плотность очищенного таким образом супернатанта оценивали при 414 нм на планшетном ридере Multiskan Go (Thermo, США). Используя предварительно построенную калибровочную кривую, находили концентрацию цитохрома *c*.

2.3. Эксперименты с липосомами

2.3.1. Приготовление больших однослойных липосом

Липосомы (большие однослойные везикулы) были приготовлены с применением метода экструзии (Agafonov *et al.*, 2003). В этом случае сухой яичный фосфатидилхолин (лецитин) (7,5 мг) инкубировали в 0,75 мл буфера, состоящего из 10 мМ трис-HCl (рН 8,5), 40 мМ KCl и 50 мкМ ЭГТА в течение 3 часов с периодическим вортексированием. После трех циклов замораживания и оттаивания при -20/+30°C суспензию, содержащую многослойные липосомы, 10 раз продавливали через поликарбонатную мембрану с диаметром пор 0,1 мкм используя микроэкструдер фирмы «Avanti» (Avanti Polar Lipids, Birmingham, Великобритания). Полученные липосомы в ходе экспериментов хранились при комнатной температуре.

2.3.2. Измерение проницаемости СрБ-нагруженных липосом

Липосомы, содержащие сульфородамин Б (СрБ) получали из лецитина согласно вышеописанной методике, за исключением того, что (1) буфер содержал 50 мМ СрБ вместо 40 мМ КСl и (2) полученные липосомы были очищены от внешнего СрБ на колонке, забитой сефадексом G-50 (10*1 см). Буфер для гель-фильтрации содержал 10 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 50 мкМ ЭГТА и 40 мМ КСl. Выход СрБ из везикул определяли по росту интенсивности его флуоресценции, обусловленному диссоциацией димеров СрБ во внешнем растворе (Agafonov *et al.*, 2003). Среда для работы с липосомами содержала 10 мМ Трис/НСl (рН 7,5), 50 мкМ ЭГТА и 40 мМ КСl. Флуоресценцию измеряли с помощью спектральной установки «Ocean Optics FLAME-T-UV-VIS» (Ocean Insight, США) (длина волны возбуждения при 565 нм, длина волны флуоресценции при 586 нм). Общее высвобождение красителя оценивали путем добавления 0,1% Triton X-100 (ТХ-100). Концентрация СрБ во внешнем буфере рассчитывалась с использованием калибровочной кривой.

2.3.3. Определение размера липосом

Размер липосом оценивали исходя из подхода, основанного на измерении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости, путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света при 25°C с использованием Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments» Ltd.) (Dubinin *et al.*, 2014). Эксперименты проводили на везикулах, сформированных из фосфатидилхолина, согласно методике, описанной выше (Agafonov *et al.*, 2003). Концентрация липида в образцах составляла 50 мкМ. Среда содержала 10 мМ Трис/НСl-буфер (рН 7,5), 50 мкМ ЭГТА и 40 мМ КСl. Результаты ДРС были также выражены в виде значений z-среднее. Этот параметр был рассчитан на основе совокупного анализа корреляционной функции (с использованием стандартного программного пакета «Zetasizer nano») и характеризует средний эффективный гидродинамический диаметр частиц. Таким образом, используя

один параметр (z-среднее), можно продемонстрировать, например, тенденцию частиц к увеличению со временем.

2.4. Статистическая обработка результатов исследования

Данные были проанализированы с использованием программ Microsoft Office Excel и Graph Pad Prizm 5. Каждый эксперимент проводили минимум в трех повторах и добивались совпадения результатов, по крайней мере, в трех независимых параллельных экспериментах на разных животных. Находили среднее, ошибку среднего, стандартное отклонение, 95% доверительный интервал. Множественные сравнения проводили с помощью критерия Краскелла-Уоллиса. Дальнейшие попарные сравнения (post-hoc) проводили с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

2.5. Реактивы

В работе использовалась пальмитиновая кислота, ω -гидроксипальмитиновая кислота (ГПК), α,ω -гексадекандиовая кислота (ГДК), янтарная кислота, 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота (МОПС), циклоспорин А, очищенный от жирных кислот бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V, трис (гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (Трис-HCl), хлорид тетрафенилфосфония, яичный фосфатидилхолин (лецитин), сульфородамин Б, Mitotracker red («Sigma», США), ротенон, ЭГТА («Serva», Германия), сахароза, NaCl, Na₂HPO₄, KCl («Fluka» Швейцария), CaCl₂, ("Merck", Германия), глюкоза, поликарбонатная мембрана. Использовались растворы пальмитиновой кислоты (30 мМ), ГПК (30 мМ) и ГДК (30 мМ) в дважды перегнанном этаноле. 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. Изучение Ca^{2+} -зависимых эффектов пальмитиновой кислоты и продуктов ее ω -окисления (ГПК и ГДК) на эритроцитах крыс

В соответствии с поставленной задачей необходимо было исследовать способность пальмитиновой кислоты и продуктов ее ω -окисления (ГПК и ГДК) индуцировать Ca^{2+} -зависимую неспецифическую проницаемость (открытие поры) эритроцитов крыс. В экспериментах была использована пальмитиновая кислота как одна из наиболее распространенных природных жирных кислот (Wojtczak and Schönfeld, 1993), а также промежуточный и конечный продукты ее ω -окисления – ω -гидроксипальмитиновая и α,ω -гексадекандиовая кислоты соответственно (Ferdinandusse *et al.*, 2004). Как видно из данных таблицы 2 и рис. 6Б внесение пальмитиновой кислоты (ПК) к суспензии эритроцитов в присутствии Ca^{2+} вызывает значительное уменьшение количества клеток в суспензии. Такое уменьшение количества клеток сопровождается значительным увеличением концентрации K^+ в инкубационной среде (рис. 7). Все это говорит о том, что происходит гемолиз эритроцитов. В основе гемолиза лежит, как показано ранее, образование липидных пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированных пор в плазматической мембране эритроцитов (Belosludtsev *et al.*, 2010).

Как видно из рис. 6 (В и Г), продукты ω -окисления ПК – ГПК и ГДК в присутствии Ca^{2+} иначе взаимодействуют с эритроцитами. Инкубация с этими кислотами приводит к массивной Ca^{2+} -зависимой агрегации эритроцитов (табл. 2). Этот процесс сопровождается уменьшением количества одиночных клеток. С другой стороны, можно предположить, что небольшое снижение количества клеток может происходить и вследствие гемолиза эритроцитов. Как видно из рис. 7, добавление ГДК (ГПК) и Ca^{2+} к суспензии эритроцитов, как и в случае с ПК, также приводит к выходу ионов K^+ из клеток. Однако, ГДК и ГПК существенно уступают ПК по способности индуцировать Ca^{2+} -зависимую проницаемость эритроцитов (рис. 7).

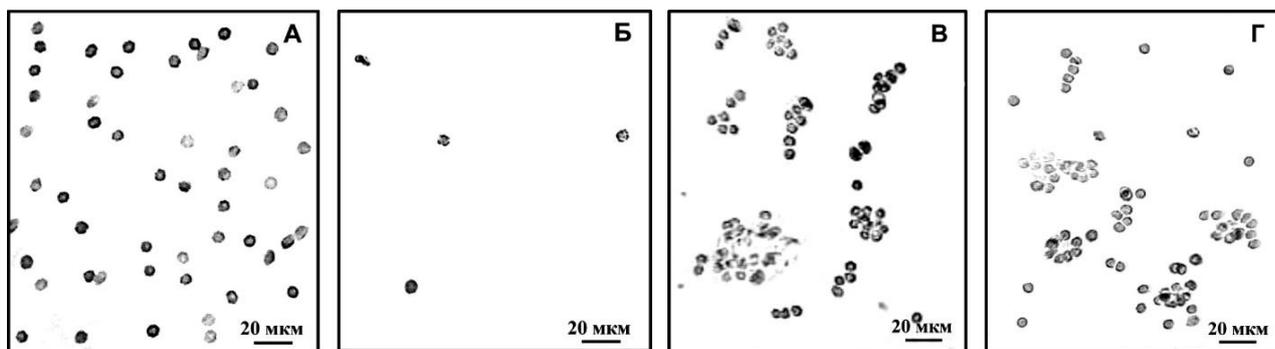


Рисунок 6. Эритроциты крысы в отсутствие добавок (А), в присутствии ПК и Ca^{2+} (Б), ГДК и Ca^{2+} (В), ГПК и Ca^{2+} (Г). Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: эритроциты ($8-10 \times 10^6$ клеток/мл); по 30 мкМ ПК, ГДК и ГПК; 100 мкМ CaCl_2 (Ca^{2+}). Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате эритроцитов. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Можно предположить, что в основе ГДК(ГПК)/ Ca^{2+} -индуцированного выброса K^+ из клеток (и, соответственно их лизиса) могут лежать несколько процессов. С одной стороны, во время агрегации эритроцитов плазматические мембраны соседних клеток будут взаимодействовать друг с другом, что может приводить к их слиянию. Процесс слияния, в этом случае, может сопровождаться массивными перестройками мембран, появлением небислойных фаз, что, по всей видимости, будет приводить к появлению различных мембранных дефектов и ее пермеабилзации для различных соединений и ионов (в том числе и K^+) (Chernomordik and Kozlov, 2008). В результате такого типа пермеабилзации может происходить и лизис части эритроцитов. С другой стороны, нельзя исключать и то, что выброс ионов калия, индуцированный ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} , происходит вследствие активации калиевых каналов цитоплазматической мембраны эритроцитов (Browning *et al.*, 2006).

Таблица 2 – Изменение относительного количества эритроцитов (в %) при добавлении жирных кислот и Ca^{2+} в присутствии и в отсутствие альбумина, а также при их инкубации в сыворотке крови

Добавки	Относительное количество одиночных клеток (в %)		
	Среда инкубации	Среда инкубации + альбумин	Сыворотка
Контроль (без добавок)	100,0 ± 2,2	100,0 ± 2,2	100 ± 1,2
+ ПК	73,9 ± 2,2*	91,4 ± 1,1* [#]	92,8 ± 1,2*
+ Ca^{2+}	90,2 ± 1,1*	90,3 ± 1,1*	95,2 ± 1,2
+ ПК + Ca^{2+}	22,8 ± 2,2*	78,5 ± 2,2* [#]	88 ± 2,4*
+ ГДК	89,1 ± 1,1*	101,1 ± 1,1 [#]	80,7 ± 1,2*
+ ГДК + Ca^{2+}	71,7 ± 2,2*	76,3 ± 1,1*	75,9 ± 1,2*
+ ГПК	84,8 ± 2,2*	102,2 ± 1,1* [#]	84,3 ± 2,4*
+ ГПК + Ca^{2+}	75,0 ± 2,2*	95,7 ± 1,1 [#]	78,3 ± 2,4*

Примечание. Состав среды инкубации: 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ глюкозы (pH 7,4). Добавки: эритроциты ($8-10 \times 10^6$ клеток/мл); по 30 мкМ ПК, ГДК и ГПК; 100 мкМ CaCl_2 , 10 мг/мл альбумина. За 100% принято количество одиночных клеток/мл в отсутствие добавок. Приведены средние значения ± ошибка средней ($n=6-7$); * – различия между опытом (в присутствии добавок) и контролем, $p<0,05$; [#] – различия между опытом (в присутствии альбумина) и контролем (в отсутствие альбумина), $p<0,05$.

Полученные результаты позволяют полагать, что при аккумуляции продуктов ω -окисления жирных кислот в сыворотке крови, которое имеет место при ряде указанных выше патологий, могут наблюдаться процессы агрегации эритроцитов вследствие изменения их поверхностных свойств. Агрегация эритроцитов, в свою очередь будет приводить к нарушению проницаемости цитоплазматической мембраны клеток и, в конечном счете, к их гибели. Кроме того, хорошо известно, что образование эритроцитарных агрегатов может приводить к нарушению процессов микроциркуляции (Baskurt *et al.*, 2011).

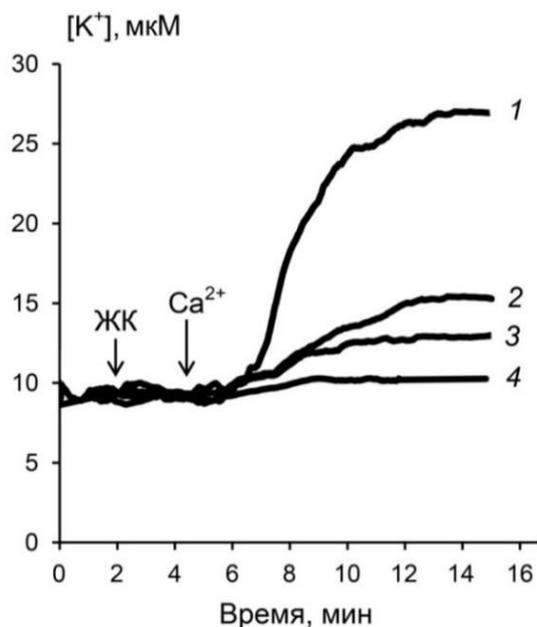


Рисунок 7. Выход K^+ из эритроцитов, индуцированный жирными кислотами (ЖК) и Ca^{2+} . Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: эритроциты ($8-10 \times 10^6$ клеток/мл). 1, 30 мкМ ПК + 100 мкМ $CaCl_2$. 2, 30 мкМ ГДК + 100 мкМ $CaCl_2$. 3, 30 мкМ ГПК + 100 мкМ $CaCl_2$. 4, 100 мкМ $CaCl_2$. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате эритроцитов. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Одним из механизмов, препятствующих индукции жирными кислотами проницаемости биологических мембран, является связывание их специальными белками, в частности, альбумином (Zoratti and Szabo, 1995), который, как известно, содержится в сыворотке крови. В настоящей работе нами был использован бычий сывороточный альбумин (БСА, фракция V). Из данных таблицы 2 можно видеть, что в присутствии БСА пальмитиновая кислота гораздо слабее индуцирует Ca^{2+} -зависимый лизис эритроцитов (снижение числа эритроцитов в отсутствие БСА на $\sim 77\%$, в присутствии БСА на $\sim 22\%$). В то же время БСА полностью предотвращает ГПК/ Ca^{2+} индуцированное снижение количества одиночных эритроцитов, но не влияет на эффект ГДК/ Ca^{2+} (табл. 2). Схожие результаты были получены ранее при исследовании влияния БСА на Ca^{2+} -зависимую проницаемость митохондрий печени крыс, индуцированную ГДК

(Дубинин и др., 2013б). Считается, что БСА имеет меньшее сродство к α,ω -дикарбоновым кислотам, чем к их монокарбоновым аналогам (Tonsgard and Meredith, 1991). Следовательно, наблюдаемое нами различие в ингибирующем действии БСА может быть связано с тем, что БСА имеет более низкое сродство к ГДК, чем к пальмитиновой кислоте. Интересно отметить, что при условии замены среды инкубации эритроцитов на сыворотку пальмитиновая кислота практически не влияет на количество эритроцитов как в отсутствие, так и в присутствии Ca^{2+} (табл. 2). В то же время эффективность ГДК и ГПК как индукторов Ca^{2+} -зависимого снижения количества одиночных эритроцитов не изменяется относительно контроля (табл. 2). Отсюда можно полагать, что белки и липопротеины сыворотки крови, эффективно связывающие пальмитиновую кислоту, в то же время будут менее эффективно связывать продукты ее окисления – ГДК и ГПК и, тем самым, не будут препятствовать агрегации и пермеабиллизации эритроцитов в случае их накопления в сыворотке.

3.2. Влияние ГПК и ГДК на митохондрии печени крыс в присутствии ионов двухвалентных металлов

3.2.1. Влияние ГПК и ГДК в присутствии ЦсА на состояние суспензии митохондрий печени, нагруженных ионами кальция

Нами предположено, что ГПК и ГДК в присутствии Ca^{2+} могут индуцировать агрегацию и других мембранных структур, в частности, митохондрий. Для изучения процессов, происходящих непосредственно в суспензии митохондрий, мы использовали метод конфокальной микроскопии.

Можно увидеть, что в отсутствие добавок митохондрии расположены отдельно друг от друга (рис. 8А). В этом случае добавление ГПК или ГДК к нагруженным Ca^{2+} митохондриям печени крыс приводит к образованию массивных агрегатов органелл (рис. 8Г и Д). В то же время, ГПК сама по себе изменила поверхностные свойства органелл таким образом, что они проявляли тенденцию к агрегации (рис. 8Б). Стоит отметить, что добавление только ГДК к митохондриям не оказывает влияния на поведение митохондрий (рис. 8В).

Присутствовавший в среде инкубации ЦсА не оказывал влияния на агрегацию органелл. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГПК и ГДК способны индуцировать ЦсА-нечувствительную Ca^{2+} -зависимую агрегацию митохондрий печени. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГПК и ГДК способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию не только клеток (эритроцитов), но и внутриклеточных органелл и, в частности, митохондрий.

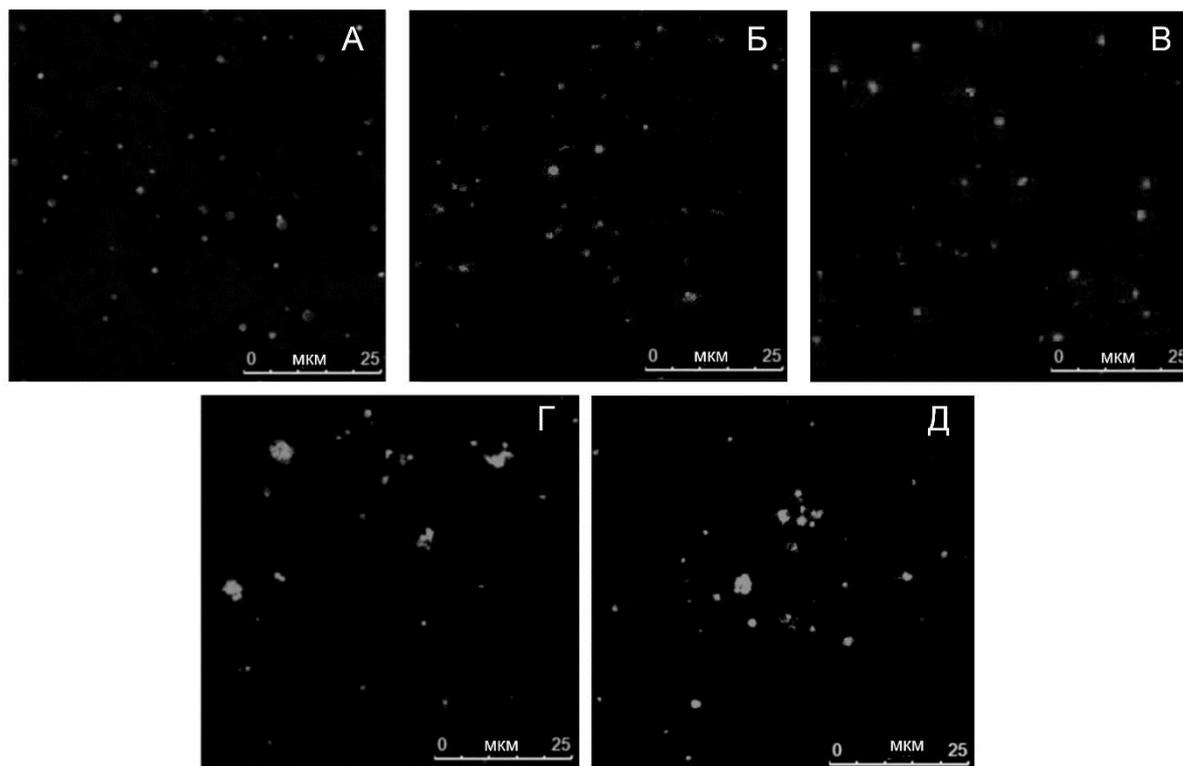


Рисунок 8. Конфокальное микроскопическое изображение суспензии митохондрий в отсутствие (А) и присутствии ГПК (Б), ГДК (В), Ca^{2+} и ГПК (Г), Ca^{2+} и ГДК (Д) с использованием MitoTracker Red. Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

3.2.2. Влияние ГПК (ГДК)/ Ca^{2+} -индуцированной пермеабилзации митохондрий печени на выход цитохрома c из органелл

Ранее было показано, что продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты способны вызывать апоптоз в культуре клеток меланомы, проявляя, таким

образом, цитотоксичность (Abe *et al.*, 2002, 2005). При этом отмечено, что ГПК индуцирует апоптоз по каспаз-зависимому пути, а это предполагает участие цитохрома *c* в запуске этого процесса (Abe *et al.*, 2002). Представляет интерес выяснить, может ли индуцированная ГПК или ГДК Ca^{2+} -зависимая агрегация митохондрий печени приводить к нарушению проницаемости внешней мембраны органелл и выходу этого белка в цитоплазму.

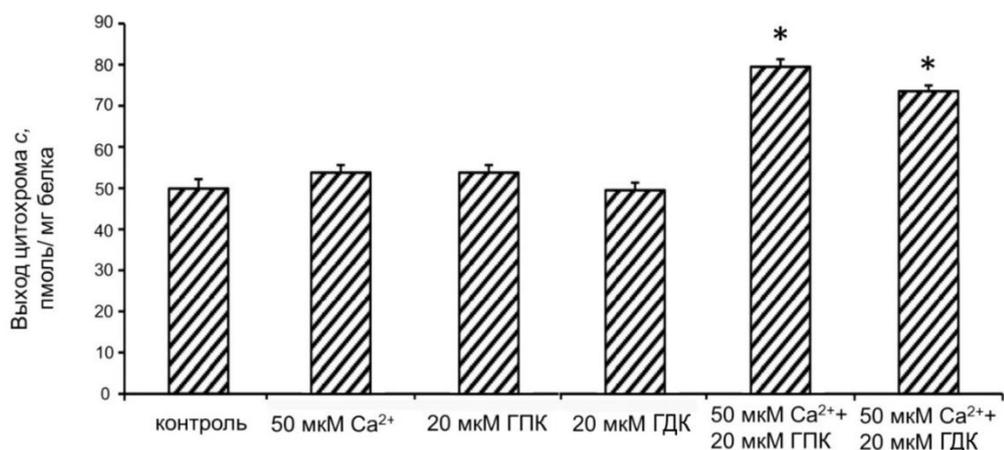


Рисунок 9. Количество цитохрома *c*, высвобожденного из митохондрий печени, в отсутствии (контроль) и в присутствии: 50 мкМ хлорида кальция (Ca^{2+}), 20 мкМ ГПК, 20 мкМ ГДК, 50 мкМ хлорида кальция (Ca^{2+}) и 20 мкМ ГПК, 50 мкМ Ca^{2+} и 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения \pm ошибка средней ($n = 9$). *- различия между опытом (Ca^{2+} +ГПК; Ca^{2+} +ГДК) и контролем (отсутствие добавок) статистически значимы, $p < 0,01$

Как видно из данных рис. 9, ГПК и ГДК вызывают выход цитохрома *c* из митохондрий печени в присутствии Ca^{2+} . При этом внесение только ГПК, только ГДК или только Ca^{2+} не оказывает существенного влияния на количество цитохрома *c*, высвобожденного из органелл (рис. 9). Количество цитохрома *c*, вышедшего из митохондрий печени, значимо увеличивается при одновременном действии Ca^{2+} и ГПК или Ca^{2+} и ГДК. В этом случае выход составляет около 80 пмоль цитохрома *c* на мг белка митохондрий (Рис. 9). Максимальное высвобождение цитохрома *c* из митохондрий, индуцированное 1% SDS, в наших экспериментальных условиях составляло около 124 ± 4 пмоль / мг белка ($n=9$).

Таким образом, ГПК- и ГДК-индуцированная Ca^{2+} -зависимая агрегация митохондрий печени сопровождается выделением цитохрома *c* из органелл (около 65% от максимального выделения), что может быть результатом пермеабиллизации наружной мембраны.

Этот результат свидетельствует о том, что Ca^{2+} -зависимая агрегация митохондрий в присутствии ГПК или ГДК сопровождается выходом цитохрома *c*. Поэтому накопление продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты в гепатоцитах может быть одним из факторов их гибели при патологиях, связанных дисрегуляцией липидного обмена

3.2.3. Влияние ГПК и ГДК в присутствии ЦсА на Ca^{2+} -зависимую проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени

Как было показано выше (рис. 8 и 9), ГПК или ГДК, будучи добавленные к нагруженным Ca^{2+} митохондриям печени, индуцируют агрегацию органелл и выход цитохрома *c*, по-видимому, вследствие повреждения внешней мембраны. В то же время длительная инкубация органелл в этих условиях приводила к их лизису, что предполагает также разрушение внутренней мембраны. В этом случае в условиях инкубации нагруженных Ca^{2+} митохондрий с ГПК или ГДК следует ожидать пермеабиллизации и внутренней мембраны как начального этапа разрушения органелл. Подобные процессы показаны нами и на эритроцитах – добавление ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} к этим клеткам приводило не только к их агрегации клеток, но и к пермеабиллизации их мембран.

Известно, что пермеабиллизация внутренней мембраны в митохондриях сопровождается их высокоамплитудным набуханием (Sultan and Sokolove 2001; Mironova *et al.*, 2004; Belosludtsev *et al.*, 2014). Это, в свою очередь, приводит к уменьшению рассеивания проходящего через суспензию света, и это может быть зарегистрировано по снижению оптической плотности суспензии, содержащей митохондрии (Sultan and Sokolove 2001; Mironova *et al.*, 2004; Belosludtsev *et al.*, 2014). В ходе работы мы выяснили, что в условиях сукцинат-зависимого дыхания митохондрий предварительная инкубация органелл последовательно с 50 мкМ

хлорида кальция (125 нмоль/мг белка) и далее с 20 мкМ ГПК (50 нмоль/мг белка) вызывает снижение оптической плотности суспензии митохондрий (рис. 10А, кривая 3). При этом внесение только хлорида кальция не оказывает влияния на оптическую плотность суспензии органелл (рис. 10А, кривая 2). Инкубация только с ГПК не оказывает значительного влияния на этот параметр (рис. 10А, кривая 1). Схожие результаты получены и в случае применения ГДК, как индуктора Ca^{2+} -зависимой агрегации органелл. Как показано на рис. 10А, Б (кривые 4), ЦсА не влияет на индуцированное Ca^{2+} и ГПК или ГДК снижение оптической плотности суспензии органелл, следовательно, исключается участие «классической» белковой МРТ поры в этом процессе. Показано, что ингибитор митохондриального кальциевого унипортера рутений красный существенно подавляет эффекты ГПК и ГДК (рис. 10А, Б, кривые 5). Это свидетельствует о необходимости присутствия Ca^{2+} в матриксе органелл для индукции их агрегации и пермеабилзации ГДК и ГПК.

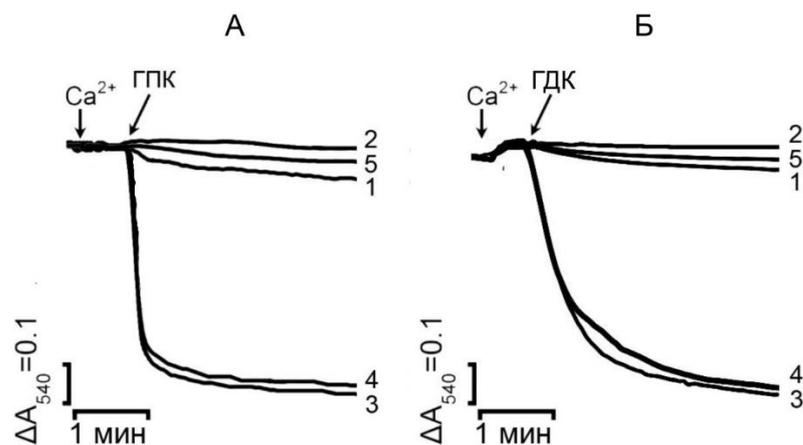


Рисунок 10. Эффекты ГПК (А) и ГДК (Б) на оптическую плотность суспензии митохондрий печени при различных экспериментальных условиях. Последовательность добавок: (1) ГПК или ГДК; (2) Ca^{2+} ; (3) Ca^{2+} и ГПК (или ГДК); (4) ЦсА, Ca^{2+} и ГПК (или ГДК); (5) рутений красный, ЦсА, Ca^{2+} и ГПК (или ГДК). Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: 50 мкМ CaCl_2 ; 20 мкМ ГПК; 20 мкМ ГДК, 1 мкМ ЦсА, 0,5 мкМ рутений красный. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

На рис. 11 показаны типичные электронные микрофотографии митохондрий в отсутствие добавок, для которых характерно наличие плотного матрикса и хорошо видимых крист по сравнению с органеллами, которые были проинкубированы с 50 мкМ Ca^{2+} и 20 мкМ ГПК в присутствии ЦсА. В последнем случае (после 5 мин инкубации) видна типичная картина митохондриального набухания: плотность митохондриального матрикса снижается, а часть органелл теряет свою внешнюю мембрану. Следует отметить, что в некоторых митохондриях кристы исчезли, а в других органеллах видна внутренняя мембрана, что свидетельствует о сохранении целостности внешней мембраны.

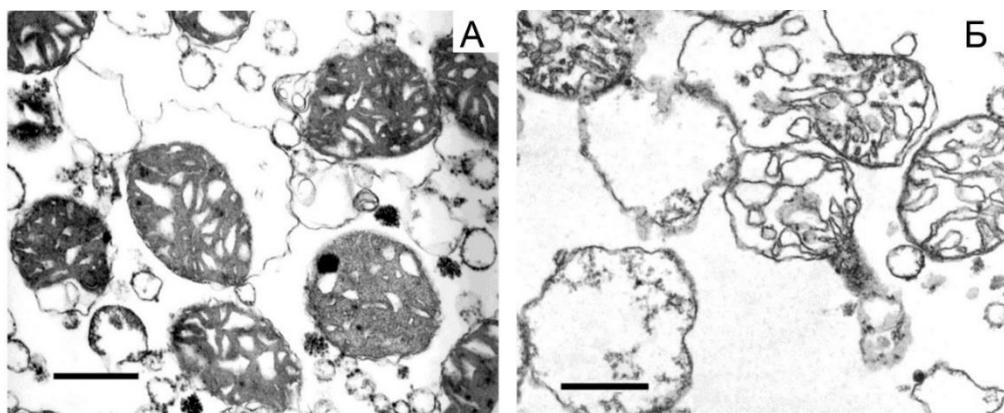


Рисунок 11. Электронно-микроскопическое изображение митохондрий печени крысы до (А) и после (Б) обработки 50 мкМ CaCl_2 и 20 мкМ ГПК в присутствии 1 мкМ ЦсА. Масштабная линейка - 1 мкм. Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах

ГПК (ГДК)-индуцированное снижение оптической плотности митохондриальной суспензии не является специфичным к Ca^{2+} . Как видно из рис. 12А и 13А, когда CaCl_2 был заменен на SrCl_2 , те же концентрации ГПК или ГДК вызывали нечувствительное к ЦсА уменьшение оптической плотности митохондриальной суспензии. В то же время другие двухвалентные катионы: Mg^{2+} и Ba^{2+} (которые не транспортируются Ca^{2+} унипортером в

митохондриальный матрикс) – оказались неэффективными (рис. 12Б и В, рис. 13Б и В).

В настоящей работе нами также рассмотрена зависимость изменения скорости оптической плотности от концентраций ГПК и CaCl_2 . Было установлено, что в митохондриях, нагруженных Ca^{2+} (50 мкМ), эффект ГПК как индуктора нечувствительной к ЦсА агрегации/набухания органелл проявляется при 5 мкМ ГПК и достигает максимума при 30 мкМ этой кислоты (рис. 14А). Концентрация CaCl_2 , при которой эффект от добавления 20 мкМ ГПК был максимальным, составляла 100 мкМ (рис. 14Б).

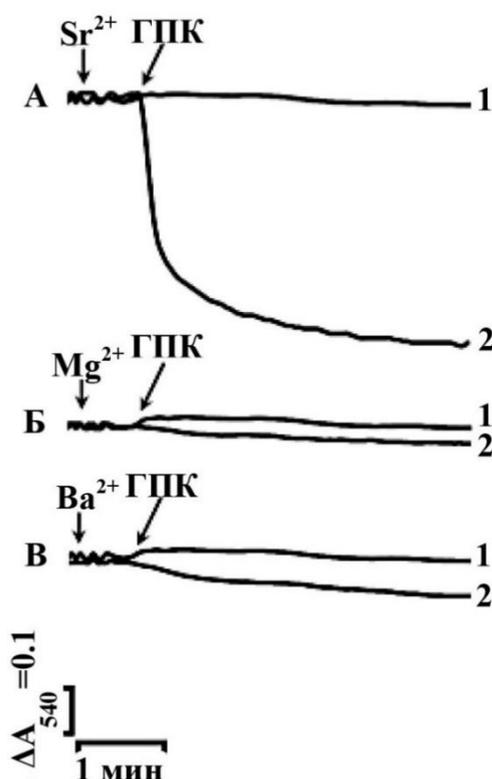


Рисунок 12. Динамика изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени в ответ на добавление: (А) Sr^{2+} (1) и Sr^{2+} + ГПК (2); (Б) Mg^{2+} (1) и Mg^{2+} + ГПК (2); (В) Ba^{2+} (1) и Ba^{2+} ГПК (2). Измерения проводились в присутствии ЦсА. Добавки: 50 мкМ CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 или MgCl_2 ; 20 мкМ ГПК; 1 мкМ ЦсА (не показано). Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

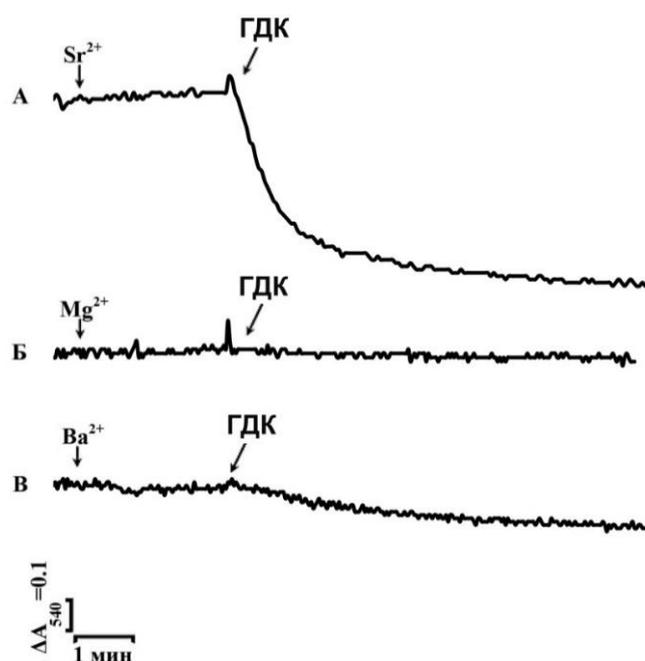


Рисунок 13. Динамика изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени в ответ на добавление: (А) Sr^{2+} + ГДК (2); (Б) Mg^{2+} + ГДК (2); (В) Ba^{2+} + ГДК (2). Измерения проводились в присутствии ЦсА. Добавки: 50 мкМ CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 или MgCl_2 ; 20 мкМ ГДК; 1 мкМ ЦсА (не показано). Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах

Кроме того, нами оценена зависимость изменения скорости оптической плотности от концентраций ГДК и CaCl_2 . Было установлено, что в митохондриях, нагруженных Ca^{2+} (50 мкМ), эффект ГДК как индуктора нечувствительной к ЦсА агрегации/набухания органелл проявлялся при концентрации ГДК 5 мкМ и достигал своего максимального уровня при концентрации ГДК 30 мкМ (рис. 14А). Концентрация CaCl_2 , при которой эффект от добавления 20 мкМ ГДК достигал максимального, составляла порядка 20 мкМ (рис. 14Б).

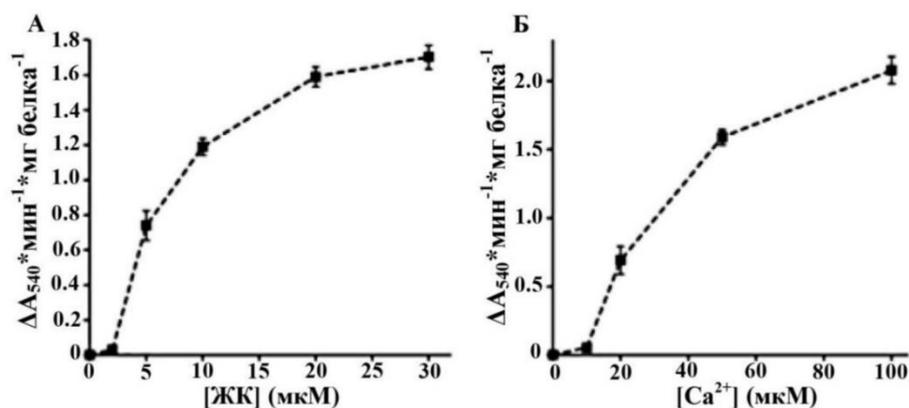


Рисунок 14. Зависимость скорости изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени от концентрации ГПК (А) и CaCl₂ (Б). Добавки: (А) 1 мкМ ЦсА, 50 мкМ CaCl₂ и различные концентрации ГПК; (Б) 1 мкМ ЦсА, различные концентрации CaCl₂ и 20 мкМ ГПК. Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения ± ошибка средней ($n = 9$).

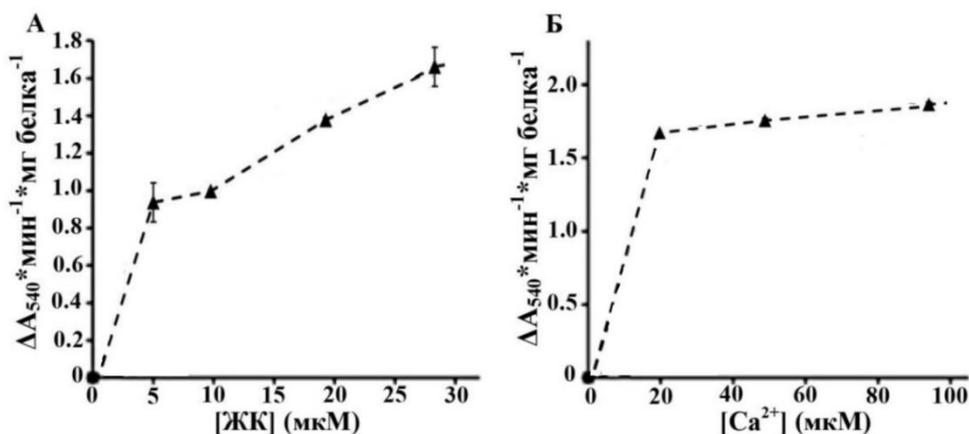


Рисунок 15. Зависимость скорости изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени от концентрации ГДК (А) и CaCl₂ (Б). Добавки: (А) 1 мкМ ЦсА, 50 мкМ CaCl₂ и различные концентрации ГДК; (Б) 1 мкМ ЦсА, различные концентрации CaCl₂ и 20 мкМ ГДК. Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения ± ошибка средней ($n = 9$).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в митохондриях, ГПК и ГДК вызывают набухание органелл в том же диапазоне концентраций, что и их агрегацию. Следовательно, можно предположить, что

более выраженный эффект ГПК и ГДК как индукторов Ca^{2+} -зависимой проницаемости митохондрий зависит от нескольких факторов: липидного состава органелл и присутствия белков, которые в сочетании определяют поверхность заряд мембраны.

Можно предположить, что вышеописанное Ca^{2+} /ГПК(ГДК)-индуцированное снижение оптической плотности суспензии митохондрий может быть результатом как набухания, так и агрегации органелл (Lemeshko *et al.*, 2003а, б; Dubinin *et al.*, 2014). Необходимо также отметить, что описанное снижение оптической плотности митохондрий печени в ответ на добавку Ca^{2+} и ГПК или ГДК может быть вызвано как набуханием, так и агрегацией органелл. Это не позволяет, основываясь только на этом методе дать однозначную оценку индукции ГПК или ГДК Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования Ca^{2+} -зависимого действия ГПК и ГДК на митохондрии с применением альтернативных методов оценки пермеабилзации органелл, например, оценки проницаемости внутренней мембраны митохондрий для Ca^{2+} , изменения мембранного потенциала органелл ($\Delta\psi$) и окисления пула НАД(Ф)Н.

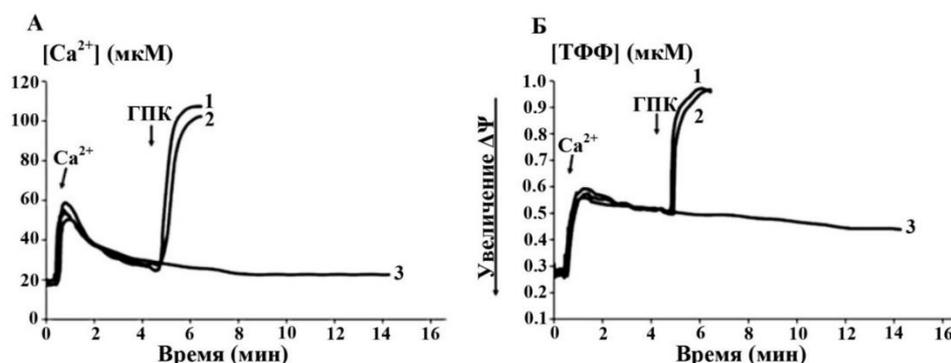


Рисунок 16. Влияние ГПК в отсутствии (1) и присутствии ЦсА (2) на динамику высвобождения (А) Ca^{2+} и (Б) TFF^+ из митохондрий. Кривая (3) показывает измерения, когда Ca^{2+} был добавлен к образцу без ЦсА и ГПК. Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Как видно из рис. 16, 20 мкМ ГПК вызывает быстрое высвобождение Ca^{2+} из митохондрий (рис. 16А), а также индуцирует полный коллапс $\Delta\psi$, который сопровождается выходом ТФФ⁺ в среду инкубации (Рис. 16Б). В этом случае 20 мкМ ГДК также эффективно вызывает быстрый выброс Ca^{2+} из органелл (рис. 17А) и коллапс $\Delta\psi$ (Рис. 17Б). Кроме того, считается, что неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий приводит к окислению пула НАД(Ф)Н органелл, что может быть зарегистрировано по уменьшению флуоресценции восстановленных форм нуклеотидов (Tonin *et al.*, 2014).

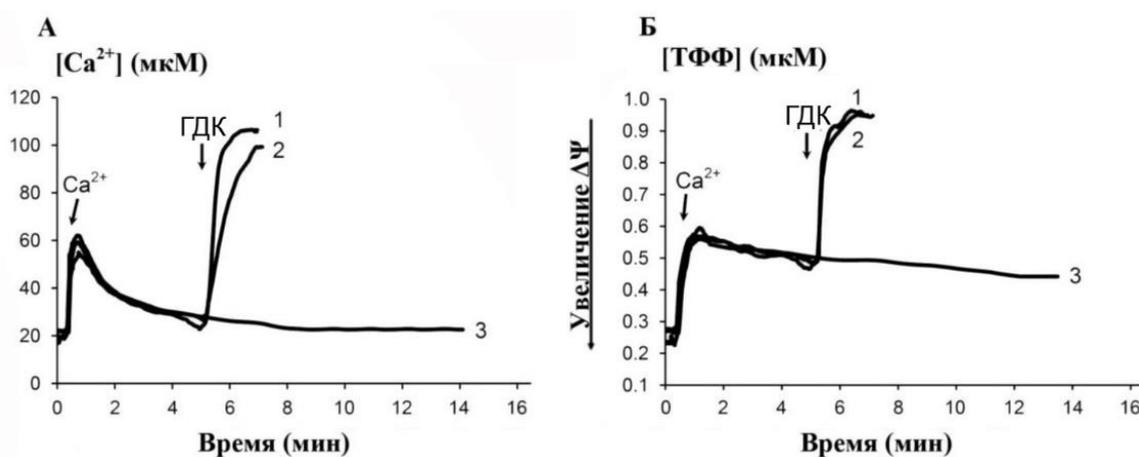


Рисунок 17. Влияние ГДК в отсутствии (1) и присутствии ЦсА (2) на динамику высвобождения (А) Ca^{2+} и (Б) ТФФ⁺ из митохондрий. Кривая (3) показывает измерения, когда Ca^{2+} был добавлен к образцу без ЦсА и ГДК. Условия эксперимента и состав среды описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах

Как видно из рис. 18, последовательное добавление Ca^{2+} и ГПК или Ca^{2+} и ГДК к суспензии митохондрий печени приводит к резкому уменьшению флуоресценции НАД(Ф)Н. При этом последующее добавление 5 мкМ FCCP не приводит к дальнейшему снижению активности флуоресценции, что свидетельствует о полном окислении НАД(Ф)Н, индуцированном Ca^{2+} и ГПК и или Ca^{2+} и ГДК.

Следовательно, ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} в матриксе митохондрий индуцирует пермеабиллизацию внутренней мембраны, которая сопровождается снижением оптической плотности суспензии митохондрий, вследствие их набухания, а также выходом Ca^{2+} из матрикса, падением мембранного потенциала и окислением пула НАД(Ф)Н.

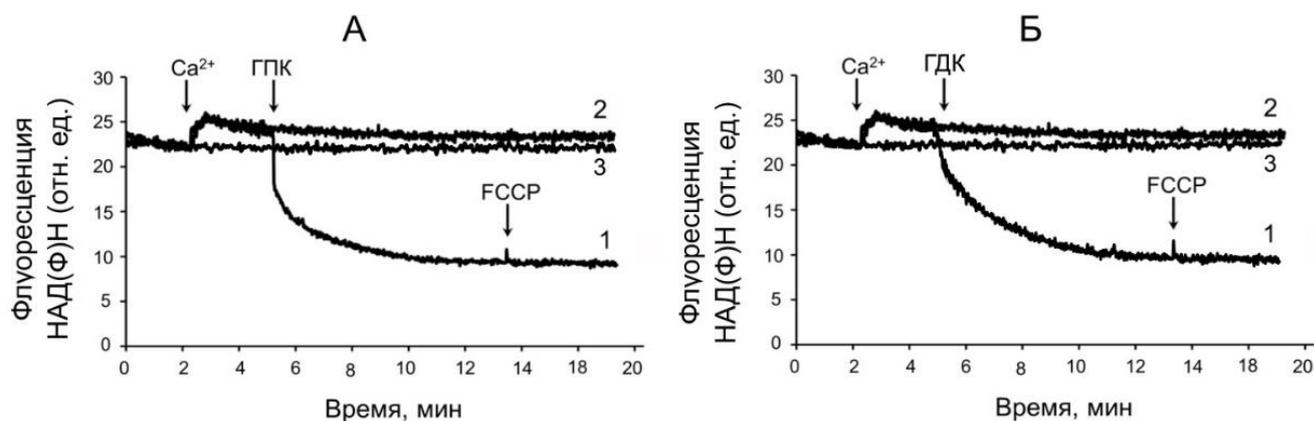


Рисунок 18. Влияние ГПК (А) и ГДК (Б) на автофлуоресценцию НАД(Ф)Н в присутствии Ca^{2+} (1). Кривая (2) – Ca^{2+} был добавлен без ГПК или ГДК, кривая (3) – ГПК или ГДК добавлены в отсутствии Ca^{2+} . Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». FCCP (5 мкМ) был добавлен в конце эксперимента для индукции полного окисления НАДФ(Н). Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах

3.3. Возрастная и тканевая особенности ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации митохондрий крыс

3.3.1. Тканеспецифичность ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации митохондрий крыс

Известно, что липидный и белковый состав митохондриальных мембран, а, следовательно, и их физические свойства, зависят от типа ткани и возраста животного (Daum, 1985). Предполагается, что это может оказывать существенное влияние на пермеабиллизацию мембран. Также известно, что пермеабиллизация

мембран в митохондриях печени крысы существенно облегчается с увеличением возраста животного (Belosludtsev *et al.*, 2009).

Как видно из рис. 19, добавление 20 мкМ ГДК к митохондриям печени половозрелых крыс-самцов, инкубируемых в сахарозной среде, в присутствии 50 мкМ Ca^{2+} и 1 мкМ ЦсА приводит к высокоамплитудному набуханию органелл при формировании неспецифической ЦсА-нечувствительной проницаемости внутренней мембраны. Подобная картина наблюдается и в случае добавления хлорида кальция и ГДК к митохондриям, выделенным из почек и сердца (рис. 19). Как видно из данных таблицы 3, скорость набухания митохондрий сердца ниже, по сравнению с таковой митохондрий почек и печени крыс.

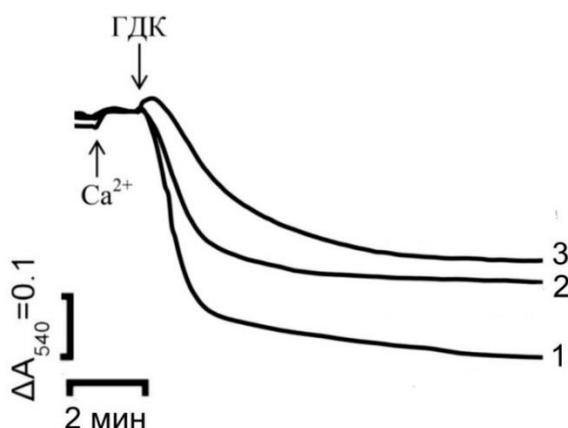


Рисунок 19. Влияние Ca^{2+} и ГДК на кинетику ЦсА-нечувствительного изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени (1), почек (2) и сердца (3) крыс. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах

Полученные результаты свидетельствуют о том, что митохондрии сердца проявляют большую резистентность к ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации, чем митохондрии печени и почек крыс. Это может быть обусловлено разным как липидным, так и белковым составом митохондриальных мембран этих тканей. В частности, в митохондриях печени и почек крыс, по сравнению с митохондриями сердца, увеличено соотношение кардиолипина к

общим фосфолипидам (Daum, 1985), который, как известно, способствует образованию подобного типа липидных пор в мембране (Belosludtsev *et al.*, 2009). Кроме того, различия в амплитуде набухания митохондрий сердца, почек и печени, по литературным данным, могут быть обусловлены существенно большим содержанием АТФ: креатин-*N*-фосфотрансферазы – белка, участвующего в формировании контактных сайтов между митохондриальными мембранами, в митохондриях сердца и почек, по сравнению с митохондриями печени.

Таблица 3 – Сравнение скорости ЦсА-нечувствительного набухания митохондрий (МХ) печени, почек и сердца крысы, индуцированного 50 мкМ Ca^{2+} и 20 мкМ ГДК. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения \pm ошибка средней ($n = 12$)

	Скорость набухания митохондрий ($\Delta A/\text{мин}$ на 1 мг белка)
МХ печени крысы	0.240 \pm 0.008
МХ почек крысы	0.162 \pm 0.002*
МХ сердца крысы	0.087 \pm 0.004* [#]

Примечание. *Выявлены статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий почек, сердца и аналогичным показателем митохондрий печени крыс, $p < 0,01$; [#] - статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} - индуцированного набухания митохондрий почек и сердца крыс, $p < 0,05$

3.3.2. Зависимость ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий печени крыс от возраста животных

Нами также были изучены параметры индукции ГДК/ Ca^{2+} -активируемой пермеабилзации внутренней мембраны в митохондриях, выделенных из печени крыс 4-х возрастных групп: 1, 4, 8 и 18 месяцев. Известно, что с возрастом в

митохондриях снижается мембранный потенциал, активность электрон-транспортной цепи в целом и ее отдельных комплексов, меняются состав и свойства митохондриальных мембран (Daum, 1985; Hagen *et al.*, 1997).

В таблице 4 приведены значения скоростей ЦсА-нечувствительного Ca^{2+} -зависимого набухания митохондрий печени крыс разного возраста, индуцированного ГДК в концентрации 5, 10, 20 и 40 мкМ. Видно, что митохондрии печени молодых неполовозрелых крыс в возрасте 1 и 4 месяцев проявляют значительно большую резистентность к ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации, по сравнению с митохондриями печени половозрелых особей возрастом 8 месяцев и старых крыс возрастом 18 месяцев. В то же время для индукции пермеабиллизации в митохондриях печени старых крыс необходима меньшая концентрация ГДК. Полученные данные указывают на существенное снижение резистентности митохондрий к действию ГДК как к индуктору такой пермеабиллизации с возрастом.

Можно предположить, что это может быть связано со структурно-функциональными изменениями, облегчающими пермеабиллизацию мембран, в частности, с развитием окислительного стресса. 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). Как известно, инкубация митохондрий с ТБГ приводит к окислению пиридиновых нуклеотидов и глутатиона и сопровождается образованием метильного и других свободных радикалов, а также повышением уровня продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (Кожина и Самарцев, 2010). В настоящей работе мы применяли ТБГ в концентрации 200 мкМ, известно, что в этой концентрации этот агент не оказывает влияния на дыхание и окислительный синтез АТФ (Кожина и Самарцев, 2010). Установлено, что предварительная инкубация митохондрий печени крыс возрастом 4 месяца с 200 мкМ ТБГ приводит к увеличению скорости набухания митохондрий (табл. 5). Таким образом,

окислительный стресс, индуцированный ТБГ, оказывает слабое влияние на индукцию митохондриальной ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации.

Можно предположить, что снижение резистентности митохондрий к действию ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации с возрастом обусловлено и другими факторами, в частности, с увеличением содержания холестерина и свободных жирных кислот в митохондриальных мембранах с возрастом (Daum, 1985), которые, как считается, облегчают индукцию липидных пор (Belosludtsev *et al.*, 2009).

Таблица 4 – Сравнение скоростей ЦсА-нечувствительного набухания митохондрий (МХ) печени крыс в возрасте 1, 4, 8 и 18 месяцев, индуцированного 50 мкМ Ca^{2+} и различными концентрациями ГДК. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения \pm ошибка средней ($n = 12$)

	Скорость набухания митохондрий ($\Delta A/\text{мин}$ на 1 мг белка)			
	5 мкМ ГДК	10 мкМ ГДК	20 мкМ ГДК	40 мкМ ГДК
МХ печени крысы 1 мес.	0.099 \pm 0.001*	0.185 \pm 0.001	0.238 \pm 0.001*	0.282 \pm 0.006*
МХ печени крысы 4 мес.	0.139 \pm 0.005*	0.194 \pm 0.003	0.263 \pm 0.001	0.307 \pm 0.001*
МХ печени крысы 8 мес.	0.169 \pm 0.004	0.181 \pm 0.024	0.281 \pm 0.016	0.417 \pm 0.003
МХ печени крысы 18 мес.	0.171 \pm 0.006	0.237 \pm 0.020*	0.373 \pm 0.015*	0.482 \pm 0.021*

Примечание. * Выявлены статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} - индуцированного набухания митохондрий печени половозрелых крыс возрастом 8 месяцев и указанных групп животных, $p < 0,05$

Таблица 5 – Влияние ТБГ на скорость набухания митохондрий печени, индуцированного 50 мкМ Ca^{2+} и 5 мкМ ГДК. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Приведены средние значения \pm ошибка средней ($n = 9$)

	Скорость набухания митохондрий ($\Delta A/\text{мин}$ на 1 мг белка)
контроль	0,092 \pm 0,006
+ 200 мкМ ТБГ	0,131 \pm 0,004*

Примечание. *Выявлены статистически значимые различия между скоростями ГДК/ Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий печени 4-месячных крыс в отсутствие (контроль) и в присутствии 200 мкМ ТБГ, $p < 0,05$

3.4. Индукция ГПК и ГДК Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабиллизации липосом

Для проверки нашего предположения о механизме действия ГПК и ГДК как индукторов Ca^{2+} -зависимой агрегации мембран нами проведены эксперименты на липосомах с использованием метода динамического рассеяния света. Как видно на рис. 20, средний гидродинамический диаметр однослойных лецитиновых липосом при данных условиях составляет порядка 140 нм (рис. 20, кривая 1). При внесении ГПК или ГДК наблюдаются процессы, схожие с теми, которые мы наблюдали на эритроцитах и митохондриях. В отсутствие Ca^{2+} эти кислоты не влияли на размер липосом. Однако добавление Ca^{2+} к липосомам, содержащим эти кислоты, приводит к существенному (до 520 нм в случае ГДК и до 1990 нм в случае ГПК) увеличению гидродинамического диаметра липосом (рис. 20, кривые 3 и 4). Это говорит о том, что в присутствии ГПК (ГДК) и Ca^{2+} происходят динамические процессы, в результате которых изменяется размер липосом, что может быть обусловлено, в том числе, и агрегацией везикул. Необходимо отметить, что Ca^{2+} в использованной нами концентрации 1 мМ, добавленный к липосомам без жирных кислот, не индуцировал изменение их размера (рис. 20,

кривая 2), что соответствует литературным данным по влиянию Ca^{2+} на слияние и агрегацию липидных везикул (Papaadjopoulos *et al.*, 1990). На рис. 20Б приведены данные изменения параметра z-average от времени экспозиции липосом, которые наглядно демонстрируют тенденцию к укрупнению частиц образца со временем после добавления ГПК и Ca^{2+} . Таким образом ГПК в присутствии Ca^{2+} индуцирует процессы агрегации и (или) слияния липосом, которые развиваются во времени.

Известно, что перестройка мембраны липосом, сопровождающая процессы агрегации и (или) слияния может приводить к выходу содержимого липосом (Papaadjopoulos *et al.*, 1990). В нашем случае также наблюдаются подобные процессы. Действительно, внесение Ca^{2+} к липосомам, модифицированным ГПК или ГДК, сопровождается не только агрегацией и и/или слиянием везикул, но и пермеабиллизацией мембраны липосом и выходом флуоресцентного зонда СрБ, предварительно загруженного в липосомы (рис. 21, рис. 22 кривая 3). При этом Ca^{2+} и ГПК (или ГДК) добавленные по отдельности, не индуцировали выход СрБ из везикул (рис. 21 А, кривые 1 и 2).

Необходимо отметить, что ГПК как индуктор проницаемости мембраны липосом гораздо менее эффективна, чем ее аналоги – пальмитиновая кислота и ГДК (рис. 21) (Agafonov *et al.*, 2003; Dubinin *et al.*, 2014). Стоит отметить кинетику выхода СрБ индуцированного ГПК и ГДК – по аналогии с агрегацией везикул этот процесс развивается во времени. На рис. 22 Б показана зависимость высвобождения СрБ из липосом от концентрации ГПК. Полумаксимальный эффект достигается при концентрации ГПК ~ 200 мкМ, которая намного выше, чем эффективные концентрации пальмитиновой кислоты и α,ω -гексадекандиовой кислоты, которые также вызывают проницаемость липосом (Dubinin *et al.*, 2014).

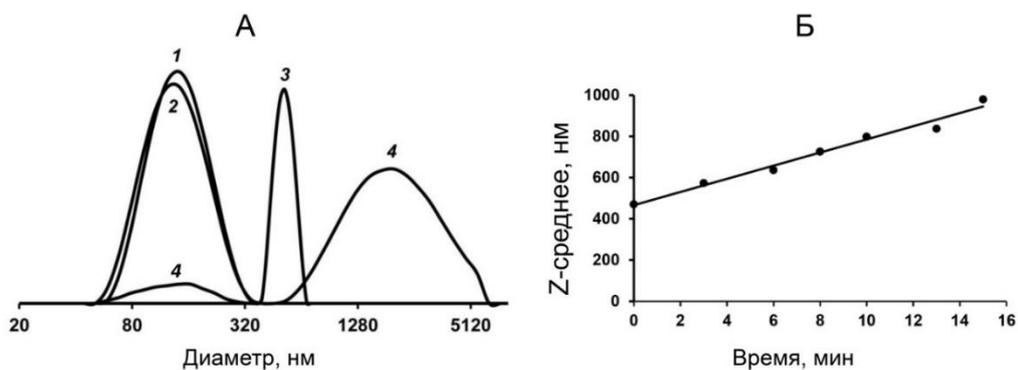


Рисунок 20. Изменение размера лецитиновых липосом при добавлении к ним жирных кислот и Ca^{2+} (А). 1, липосомы (50 мкМ лецитина). 2, липосомы (50 мкМ лецитина) + 1 мМ Ca^{2+} . 3, липосомы (50 мкМ лецитина) +50 мкМ ГДК+1 мМ Ca^{2+} . 4, липосомы (50 мкМ лецитина) +50 мкМ ГПК+1 мМ Ca^{2+} . Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате липосом. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. (В) Зависимость параметра z-среднее липосом от времени их инкубации в присутствии 50 мкМ ГПК и 1 мМ Ca^{2+}

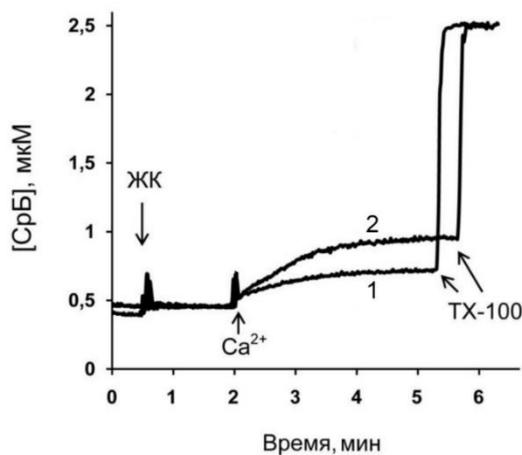


Рисунок 21. Выход СрБ из однослойных липосом, индуцированный Ca^{2+} и ГПК (1), Ca^{2+} и ГДК (2). Условия эксперимента и состав среды инкубации приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Добавки: 50 мкМ ГПК; 50 мкМ ГДК; 1 мМ хлорида кальция (Ca^{2+}); 0.1% TX-100. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате липосом. Аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах.

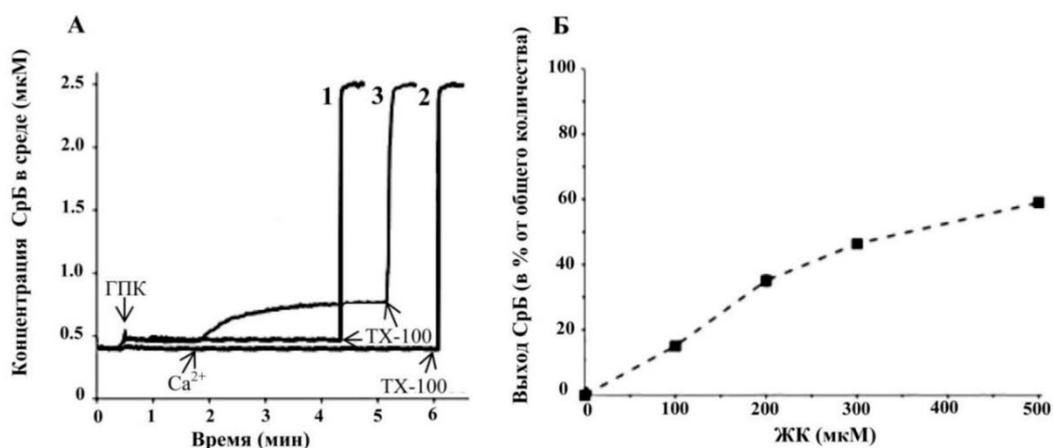


Рисунок 22. Выход СрБ из липосом (А), индуцированный: (1) ГПК; (2) Ca²⁺; (3) ГПК и Ca²⁺. Добавки: 50 мкМ ГПК, 1 мМ CaCl₂, 0,1% ТХ-100. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате липосом. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. (Б) Зависимость выхода СрБ из липосом от концентрации ГПК. Приведены средние значения ± ошибка средней (*n* = 9)

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что процесс агрегации липосом является первичным по отношению к пермеабиллизации. Можно видеть, что агрегация липосом происходит при таких концентрациях кислот, которые вызывают очень незначительную проницаемость везикул. Гораздо более высокие концентрации необходимы, чтобы вызвать увеличение неспецифической проницаемости лецитиновых липосом. Таким образом, основным эффектом изучаемых жирных кислот является агрегация везикул, одним из последствий которой является нарушение структуры мембраны и потеря ее целостности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью работы являлось выяснение механизмов Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации биологических и искусственных мембран, индуцированной продуктами ω -окисления свободных жирных кислот, изучение путей регуляции такой неспецифической проницаемости, а также оценка ее возможной роли в развитии патологий липидного обмена. Получены следующие основные результаты.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты (ГПК и ГДК) способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов крыс (Рис. 6). По-видимому, этот процесс инициируется агрегацией внешних мембран контактирующих клеток, что сопровождается нарушением их целостности и приводит к снижению количества эритроцитов в суспензии (табл. 2). Нами установлено, что снижение количества клеток в суспензии под действием ГПК и ГДК в присутствии Ca^{2+} может быть обусловлено лизисом части эритроцитов, что сопровождается выходом ионов K^+ из клеток (Рис. 7). Однако мы не исключаем возможной активации калиевых каналов цитоплазматической мембраны эритроцитов крыс в изучаемых условиях (Browning *et al.*, 2006). Нами отмечено, что БСА, способный эффективно связывать монокарбоновые жирные кислоты, не оказывает влияния на агрегирующие и пермеабиллизирующие свойства ГПК и ГДК (табл. 2). Предположено, что патологии, при которых происходит накопление продуктов ω -окисления жирных кислот в сыворотке, могут сопровождаться агрегацией эритроцитов и других клеток крови вследствие изменения их поверхностных свойств, что, в свою очередь, может приводить к нарушению проницаемости цитоплазматической мембраны клеток и, в конечном счете, к их лизису. Более того, можно предполагать, что формирование агрегатов клеток под действием таких кислот может вызывать нарушение микроциркуляции в кровяном русле (Baskurt *et al.*, 2011).

Проведенные исследования показали, что ГПК и ГДК способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию не только клеток, но и внутриклеточных органелл и, в частности, митохондрий. Действительно, нами установлено, что добавление ГПК или ГДК к нагруженным Ca^{2+} митохондриям печени крыс приводит к образованию массивных агрегатов органелл (Рис. 8). При этом индуцированная ГПК или ГДК Ca^{2+} -зависимая агрегация митохондрий печени сопровождалась выходом проапоптотического белка цитохрома *c* из органелл, что свидетельствует о возможной пермеабиллизации внешней мембраны митохондрий (Рис. 9). Учитывая важную роль цитохрома *c* в индукции клеточной гибели, а также известную способность ГПК индуцировать гибель клеток меланомы (Abe *et al.*, 2002, 2005), нами предположено, что аккумуляция продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты в гепатоцитах может быть одной из причин их гибели при патологиях, связанных с дисрегуляцией липидного обмена.

Исходя из того, что длительная инкубация митохондрий печени крыс в присутствии ГПК/ГДК и Ca^{2+} сопровождалась их лизисом, нами предположено, что в этих условиях происходит также разрушение внутренней мембраны органелл. Действительно, нами установлено, что добавление ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} к суспензии митохондрий печени крыс приводит к значительному снижению оптической плотности суспензии органелл, которое было нечувствительно к действию ЦсА, что исключает участие неспецифической пермеабиллизации внутренней мембраны органелл, связанной с индукцией «белковой» МРТ поры в этом процессе (Рис. 10). При этом данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что ГПК в присутствии Ca^{2+} индуцирует типичное набухание органелл: плотность митохондриального матрикса снижалась, а часть митохондрий характеризовалась разрушением внешней мембраны (Рис. 11). Однако это не позволило нам уже на основании полученных данных сделать вывод о нарушении проницаемости внутренней мембраны органелл. Последующие эксперименты показали, что действие ГПК и ГДК в присутствии ионов кальция сопровождается также быстрым высвобождением

Ca^{2+} из митохондриального матрикса (Рис. 16А и 17А), полным коллапсом мембранного потенциала органелл $\Delta\psi$ (Рис. 16Б и 17Б) и окислением пула НАД(Ф)Н, что зарегистрировано нами по резкому уменьшению флуоресценции восстановленных форм нуклеотидов (Рис. 18). Комбинация указанных событий подтверждают способность ГПК и ГДК индуцировать неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени, нагруженных ионами кальция.

В ходе работы нами также установлены условия, необходимые для индукции неспецифической пермеабилзации митохондрий печени продуктами ω -окисления жирных кислот. Показано, что подавление транспорта кальция в матрикс органелл с помощью рутениевого красного (специфический ингибитор митохондриального кальциевого унипортера) существенно подавляет эффекты ГПК и ГДК (рис. 10), что свидетельствует о необходимости присутствия Ca^{2+} в матриксе для проявления эффектов ГДК и ГПК. Важно отметить, что эффекты ГПК и ГДК не были специфичны по отношению к ионам кальция и проявлялись и при условии замены CaCl_2 на SrCl_2 , что вновь свидетельствует о том, что «классическая» белковая МРТ пора не задействована в исследуемом феномене. При этом в присутствии непроникающих через унипортер двухвалентных катионов Mg^{2+} и Ba^{2+} действие продуктов ω -окисления жирных кислот практически не проявлялось (рис. 12).

Кроме того, нами выявлены тканевые особенности эффектов продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты, в частности, ГДК, как индуктора ЦсА-нечувствительной Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабилзации митохондрий. Установлено, что ГДК также способна индуцировать эти процессы в митохондриях почек и сердца крысы. Однако по сравнению с митохондриями, выделенными из печени и почек животных, набухание митохондрий сердца, индуцированное этими агентами, характеризуется меньшей амплитудой и скоростью (рис. 19 и табл. 3). Это, как мы полагаем, может быть обусловлено разным как липидным, так и белковым составом мембран митохондрий в исследуемых тканях.

Проведенные исследования также показали, что чувствительность митохондрий печени крыс к индукции ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации усиливается с возрастом. Действительно, митохондрии старых крыс (возраст 18 мес.) обнаружили существенное снижение резистентности к ГДК как индуктору Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации, по сравнению с митохондриями печени молодых животных (возраст 1 и 4 мес.). Нами предположено, что это может быть также обусловлено особенностями белкового и липидного состава мембран митохондрий у животных разного возраста, а также развитием окислительного стресса у старых животных, который способствует нарушению целостности мембран. В модельном эксперименте нами продемонстрировано, что предварительная инкубация митохондрий печени молодых крыс возрастом 4 мес. с окисляющим агентом *трет*-бутилгидропероксидом (ТБГ) приводит к увеличению скорости набухания митохондрий (табл. 5). Это свидетельствует о том, что окислительный стресс, может способствовать снижению устойчивости митохондрий к ГДК/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации мембран.

Наконец, в опытах на модельных мембранных системах – лецитиновых липосомах установлено, что ГПК и ГДК способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию везикул, что сопровождается увеличением гидродинамического диаметра липосом (Рис. 20А). Действительно, нами установлено, что внесение к липосомам ГПК в присутствии Ca^{2+} приводит к укрупнению частиц в экспериментальной ячейке и этот процесс развивается во времени (Рис. 20Б). Важно отметить, что в этом случае динамические процессы, имеющие место в липосомах, сопровождаются пермеабиллизацией мембраны везикул и выходом флуоресцентного зонда СрБ, предварительно загруженного в липосомы (Рис. 21). Отмечено, что ГПК как индуктор проницаемости мембраны липосом гораздо менее эффективна, чем ГДК. При этом по аналогии с агрегацией везикул процесс ГПК-индуцированного выхода СрБ из липосом также развивался во времени. Полученные на этом этапе результаты свидетельствуют о том, что агрегация липосом была первичной по отношению к пермеабиллизации.

Учитывая схожесть эффектов ГПК и ГДК на эритроцитах, митохондриях и липосомах нами предположено наличие универсального механизма, лежащего в основе Ca^{2+} -зависимых эффектах продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты, который заключается в агрегации липидных мембран, сопровождающейся их пермеабиллизацией. Мы предполагаем, что описанные эффекты могут лежать в основе токсического действия этих соединений, наблюдаемого при патологиях липидного обмена.

ВЫВОДЫ

1. ГПК и ГДК индуцируют Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов в суспензии, которая сопровождается нарушением проницаемости мембран клеток и их лизисом.

2. ГПК и ГДК вызывают циклоспорин А (ЦсА)-нечувствительную Ca^{2+} -зависимую агрегацию и пермеабиллизацию митохондрий печени, которая приводит к нарушению гомеостаза Ca^{2+} , коллапсу мембранного потенциала, окислению пула НАДФ(Н) органелл и выходу цитохрома *c*.

3. Наличие Ca^{2+} в матриксе митохондрий является основным условием индукции ГПК (ГДК)/ Ca^{2+} -зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий печени. При этом Ca^{2+} может быть замещен ионами Sr^{2+} , но не Mg^{2+} и Ba^{2+} .

4. ЦсА-нечувствительная ГДК/ Ca^{2+} -индуцируемая пермеабиллизация митохондрий характеризуется ткань-специфичностью. Митохондрии сердца крыс более устойчивы к индукции этого процесса, чем митохондрии печени и почек.

5. Эффективность ГДК/ Ca^{2+} -индуцируемой пермеабиллизации митохондрий печени крыс увеличивается с возрастом животных, что может быть обусловлено дополнительным вкладом окислительного стресса в устойчивость органелл к этому процессу.

6. ГПК и ГДК способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую агрегацию липосом, с последующей пермеабиллизацией их мембран и выходу флуоресцентного зонда сульфородамина Б из везикул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Адакеева, С.И.** Малонат как ингибитор индуцированного жирными кислотами циклоспорин А-чувствительного кальций-независимого свободного окисления в митохондриях печени [Текст] / С.И. Адакеева, М.В. Дубинин, В.Н. Самарцев // Биол. мембраны. – 2015. – Т.32. – №1. – С. 41-51.
2. **Антонов, В. Ф.** Эволюция липидных пор в бислое при фазовом переходе липидов [Текст] / В. Ф. Антонов // Проблемы регуляции в биологических системах / Под общей ред. А. Б. Рубина. – М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». – 2006. – 480 с.
3. **Антонов, В.Ф.** Липидные мембраны при фазовых превращениях [Текст] / В.Ф. Антонов, Е.Ю. Смирнова, Е.В. Шевченко; Рос. акад. наук, Моск. о-во испытателей природы. – М.: Наука. – Москва, 1992. – 135 с.
4. **Антонов, В.Ф.** Липидные поры и стабильность клеточных мембран [Текст] / В.Ф. Антонов, Е.В. Шевченко // Вестн. РАМН. – 1995. – №10. – С. 48-55.
5. **Антонов, В.Ф.** Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран [Текст] / В.Ф. Антонов // Соросовский Образовательный журнал. – 1998. – №10. – С. 10-17.
6. **Белослудцев, К.Н.** Возможный механизм образования и регуляции пальмитат-индуцированной циклоспорин А-нечувствительной митохондриальной поры [Текст] / К.Н. Белослудцев, Н.В. Белослудцева, Г.Д. Миронова // Биохимия. – 2005. – Т.70. – №7. – С. 987-994.
7. **Белослудцев, К.Н.** Роль митохондриальной пальмитат/ Ca^{2+} -активируемой поры в пальмитат-индуцированном апоптозе [Текст] / К.Н. Белослудцев, Н.В. Белослудцева, Г.Д. Миронова // Биофизика. –2008. – Т. 53. – № 6. – С. 967-971.
8. **Белослудцев, К.Н.** Транспорт ионов Ca^{2+} митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки [Текст] / К.Н. Белослудцев, М.В. Дубинин, Н.В. Белослудцева, Г.Д. Миронова // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 6. – С. 759-775.
9. **Белослудцева, Н.В.** Влияние холестерина на формирование в митохондриях и липосомах пальмитат/ Ca^{2+} -активируемой поры [Текст] / Н.В. Белослудцева,

- К.Н. Белослудцев, А.В. Агафонов, Г.Д. Миронова // Биофизика. – 2009. – Т. 54. – № 3. – С. 464-470.
10. **Геннис, Р.** Биомембраны: молекулярная структура и функции [Текст] / Р. Геннис; Перевод с англ. Л. И. Барсукова и др. – М.: Мир: – Москва, 1997. – 622 с.
 11. **Дубинин, М.В.** Длинноцепочечные α,ω -диоловые кислоты как индукторы циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени, нагруженных ионами кальция или стронция [Текст] / М.В. Дубинин, С.И. Адакеева, В.Н. Самарцев // Биохимия. – 2013а. – Т. 78. – № 4. – С. 533-540.
 12. **Дубинин, М.В.** Индукция α,ω -гексадекандиоловой кислотой кальций-зависимой циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени и освобождения цитохрома с в средах различной ионной силы [Текст] / М.В. Дубинин, А.А. Ведерников, Е.И. Хорошавина, В.Н. Самарцев // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – № 6. – С. 724-731.
 13. **Дубинин, М.В.** Физиологические модуляторы циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени, индуцированной ионами кальция и α,ω -гексадекандиоловой кислотой [Текст] / М.В. Дубинин, А.А. Ведерников, С.И. Адакеева, Е.И. Хорошавина, В.Н. Самарцев // Биологические мембраны. – 2013б. – Т. 30. – № 5-6. – С. 364-371.
 14. **Кожина, О.В.** Разобщающая активность жирных кислот в митохондриях печени в присутствии субстратов ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров усиливается при окислительном стрессе [Текст] / О.В. Кожина, В.Н. Самарцев // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27. – С. 184-188.
 15. **Маркова, О.В.** Опосредованное анионными переносчиками разобщающее действие дикарбоновых жирных кислот зависит от расположения второй карбоксильной группы [Текст] / О.В. Маркова, Д.И. Бондаренко, В.Н. Самарцев // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 679-685.

16. **Самарцев, В.Н.** Взаимодействие жирных кислот с митохондриями: индукция свободного окисления и кальций-зависимой проницаемости внутренней мембраны [Текст] / В.Н. Самарцев, М.В. Дубинин // Йошкар-Ола: издательство Марийский государственный университет. – Йошкар-Ола, 2016. – С. 176.
17. **Семенова, А.А.** ω -Гидроксипальмитиновая и α,ω -гексадекандикарбоновая кислоты как активаторы свободного дыхания и ингибиторы генерации H_2O_2 в митохондриях печени [Текст] / А.А. Семенова, В.Н. Самарцев, С.И. Павлова, М.В. Дубинин // Биол. мембраны. – 2019. – Т. 36. – С. 428-438.
18. **Харакоз, Д.П.** О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах [Текст] / Д.П. Харакоз // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 333-364.
19. **Чизмаджев, Ю.А.** Электрический пробой бислойных липидных мембран [Текст] / Ю.А. Чизмаджев, Л.В. Черномордик, В.Ф. Пастушенко, И.Г. Абидор // В сб.: Итоги науки и техники. Биофизика мембран. – М.: ВИНТИ. – 1982. – Т. 2. – С. 161-266.
20. **Abe, A.** Growth inhibition and apoptosis induction of human melanoma cells by omega-hydroxy fatty acids [Text] / A.Abe, K. Sugiyama // Anti-Cancer Drugs. – 2005. – Vol. 16. – № 5. – P. 543-549.
21. **Abe, A.** The omega-hydroxy palmitic acid induced apoptosis in human lung carcinoma cell lines H596 and A549 [Text] / A. Abe, M. Yamane, H. Yamada, I. Sugawara // J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. –2002. – Vol. 6. – № 1. – P. 37-43.
22. **Abidor, I.G.** The Reversible Electrical Breakdown of Bilayer Lipid-Membranes Modified by Uranyl Ions [Text] / I.G. Abidor, L.V. Chernomordik, S.I. Sukharev, Y.A. Chizmadzhev // Bioelectroch. Bioener. – 1982. – Vol. 9. – P. 141-148.
23. **Agafonov, A.** A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca^{2+} /palmitic acid complexes [Text] / A. Agafonov, E. Gritsenko, K. Belosludtsev, A. Kovalev, O. Gateau-Roesch, N.-E.L. Saris, G.D. Mironova // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol. 1609. – P. 153-160.

24. **Agafonov, A.V.** Ca²⁺-induced phase separation in the membrane of palmitate-containing liposomes and its possible relation to membrane permeabilization [Text] / A.V. Agafonov, E.N. Gritsenko, E.A. Shlyapnikova, D.P. Kharakoz, N.V. Belosludtseva, E.I. Lezhnev, N.E. Saris, G.D. Mironova // *J. Membr. Biol.* – 2007. – Vol. 215. – P. 57-68.
25. **Anderson, R.G.** A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains [Text] / R.G. Anderson, K. Jacobson // *Science.* – 2002. – Vol. 296. – P. 1821-1825.
26. **Antonov, V.F.** Soft perforation of planar BLM from DPPC at the temperature of phase transition from the liquid crystalline to the gel state [Text] / V.F. Antonov, A.A. Anosov, V.P. Norik, E.Yu. Smirnova // *Eur. Biophys. J.* – 2005. – Vol. 34. – № 2. – P. 155-162.
27. **Antonov, V.F.** Stable cupola-shaped bilayer lipid membranes with mobile Plateau-Gibbs border: Expansion-shrinkage of membrane due to thermal transitions [Text] / V.F. Antonov, E.V. Shevchenko, E. Smirnova, E.V. Yakovenko, A.V. Frolov // *Chem. Phys. Lipids.* – 1992. – Vol. 61. – P. 219-224.
28. **Ardalan, A.** Uncoupling Proteins and Regulated Proton Leak in Mitochondria. [Text] / A. Ardalan, M.D. Smith, M. Jelokhani-Niaraki // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23: 1528.
29. **Azzi, A.** Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. I. Large amplitude swelling induced by inorganic phosphate and by ATP [Text] / A. Azzi, G. Azzone // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1965. – Vol. 105. – P. 253-264.
30. **Azzolin, L.** The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals [Text] / L. Azzolin, S. von Stockum, E. Basso, V. Petronilli, M.A. Forte, P. Bernardi // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584. – № 12. – P. 2504-2509.
31. **Baechler, B.L.** Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [Text] / B.L. Baechler, D. Bloemberg and J. Quadrilatero // *Autophagy.* – 2019. – Vol. 15. – P. 1606-1619.
32. **Baskurt, O.** Red blood cell aggregation [Text] / O. Baskurt, B. Neu, H.J. Meiselman // *CRC Press: Boca Raton.* – FL. – 2011.

33. **Bauer, T.M.** Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death [Text] / T.M. Bauer and E. Murphy // *Circ. Res.* – 2020. – Vol. 126. – P. 280-293.
34. **Belosludtsev, K.** On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and Ca^{2+} in mitochondria [Text] / K. Belosludtsev, N.–E.L. Saris, L.C. Andersson, N. Belosludtseva, A. Agafonov, A. Sharma, D.A. Moshkov, G.D. Mironova // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2006. – Vol. 38. –P. 113-120.
35. **Belosludtsev, K.N.** $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study [Text] / K.N. Belosludtsev, N.V. Belosludtseva, A.V. Agafonov, M.E. Astashev, A.S. Kazakov, N.E. Saris, G.D. Mironova // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1838. – № 10. – P. 2600-2606.
36. **Belosludtsev, K.N.** Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca^{2+} -dependent permeability transition pore [Text] / K.N. Belosludtsev, N.V. Belosludtseva, M.V. Dubinin // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – Vol. 21. – № 18. – P. 1-32.
37. **Belosludtsev, K.N.** Palmitic acid induces the opening of a Ca^{2+} -dependent pore in the plasma membrane of red blood cells: The possible role of the pore in erythrocyte lysis [Text] / K.N. Belosludtsev, A.S. Trudovishnikov, N.V. Belosludtseva, A.V. Agafonov, G.D. Mironova // *J. Membr. Biol.* – 2010. – Vol. 237. – P. 13-19.
38. **Belosludtsev, K.N.** Physiological aspects of the mitochondrial cyclosporin A-insensitive palmitate/ Ca^{2+} -induced pore: tissue specificity, age profile and dependence on the animal's adaptation to hypoxia [Text] / K.N. Belosludtsev, N.E. Saris, N.V. Belosludtseva, A.S. Trudovishnikov, L.D. Lukyanova, G.D. Mironova // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2009. – Vol. 41. – P. 395-401.
39. **Benveniste, I.** Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber [Text] / I. Benveniste, J.P. Salaun and F. Durst // *Phytochemistry.* – 1977. – Vol. 16. – P. 69-73.

40. **Benz, R.** Reversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayer Membranes—Charge-Pulse Relaxation Study [Text] / R. Benz, F. Beckers, U. Zimmermann // *J. Membr. Biol.* – 1979. – Vol. 48. – P. 181-204.
41. **Bertrand, J.C.** NADPH-cytochrome c reductase of *Candida tropicalis* grown on alkane [Text] / J.C. Bertrand, H. Bazin, M. Zacek, M. Gilewicz and E. Azoulay // *Eur. J. Biochem.* – 1979. – Vol. 93. – P. 237-243.
42. **Bodrova, M.** Role of the ADP/ATP antiporter in fatty acid-induced uncoupling of Ca²⁺-loaded rat liver mitochondria [Text] / M. Bodrova, V. Dedukhova, V. Samartsev and E. Mokhova // *IUBMB Life.* –2000. – Vol. 50. – P. 189-194.
43. **Bonora, M.** Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F₁F₀ ATP synthase dimers and C-ring conformation [Text] / M. Bonora, C. Morganti, G. Morciano, G. Pedriali, M. Lebedzinska-Arciszewska, G. Aquila, C. Giorgi, P. Rizzo, G. Campo, R. Ferrari, G. Kroemer, M.R. Wieckowski, L. Galluzzi, P. Pinton // *EMBO Rep.* – 2017. – Vol. 18. – P. 1077–1089.
44. **Bonora, M.** Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition [Text] / M. Bonora, M.R. Wieckowski, C. Chinopoulos, O. Kepp, G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Pinton // *Oncogene.* – 2015. – Vol. 34. – № 12: 1608.
45. **Bonora, M.** Physiopathology of the permeability transition pore: molecular mechanisms in human pathology [Text] / M. Bonora, S. Patergnani, D. Ramaccini, G. Morciano, G. Pedriali, A.E. Khasay, E. Bouhamida, C. Giorgi, M. R Wieckowski, P. Pinton // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10. – № 7: 998.
46. **Bonora, M.** Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition [Text] / M. Bonora, A. Bononi, E. De Marchi, C. Giorgi, M. Lebedzinska, S. Marchi, S. Patergnani, A. Rimessi, J.M. Suski, A. Wojtala, M.R. Wieckowski, G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Pinton // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12. – № 4. – P. 674-683.
47. **Bonora, M.** Shedding light on molecular mechanisms and identity of mPTP [Text] / M. Bonora, P. Pinton // *Mitochondrion.* – 2014. – Vol. 21. – P. 11.

48. **Borutaite, V.** Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia [Text] / V. Borutaite, A. Jekabsone, R. Morkuniene and G.C. Brown // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2003. – Vol. 35. – P. 357-366.
49. **Boyman, L.** Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: transient and permanent opening events [Text] / L. Boyman, A.K. Coleman, G. Zhao, A.P. Wescott, H.C. Joca, B.M. Greiser, M. Karbowski, C.W. Ward, W.J. Lederer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2019. – Vol. 666. – P. 31-39.
50. **Boyman, L.** Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: transient and permanent opening events [Text] / L. Boyman, A.K. Coleman, G. Zhao, A.P. Wescott, H.C. Joca, B.M. Greiser, M. Karbowski, C.W. Ward, W.J. Lederer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2019. – Vol. 666. – P. 31-39.
51. **Braganza, L.F.** Dye permeability at phase transitions in single and binary component phospholipids bilayers [Text] / L.F. Braganza, B.H. Blott, T.J. Coe and D. Melville // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 731. – № 2. – P. 137-144.
52. **Browning, J.A.** Pathophysiology of red cell volume [Text] / J.A. Browning, J.C. Ellory, J.S. Gibson // *Contrib Nephrol.* – 2006. – Vol. 152. – P. 241-268.
53. **Brustovetsky, N.N.** Carboxyatractylate-sensitive uncoupling in liver mitochondria from ground squirrels during hibernation and arousal [Text] / N.N. Brustovetsky, Z.G. Amerkanov, M.E. Yegorova, E.N. Mokhova, V.P. Skulachev // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 272. – P. 190-192.
54. **Busto, J.V.** Lamellar gel (l β) phases of ternary lipid composition containing ceramide and cholesterol [Text] / J.V. Busto, A.B. García-Arribas, J. Sot, A. Torrecillas, J.C. Gomez-Fernandez, F.M. Goni, A. Alonso // *Biophys. J.* – 2014. – Vol. 106. – № 3. – P. 621-630.
55. **Caffrey, M.** Kinetics and mechanism of transitions involving the lamellar, cubic, inverted hexagonal, and fluid isotropic phases of hydrated monoacylglycerides monitored by time-resolved X-ray diffraction [Text] / M. Caffrey // *Biochemistry.* – 1987. – Vol. 26. – № 20. – P. 6349-6363.

56. **Calvo, S.E.** The mitochondrial proteome and human disease [Text] / S.E. Calvo, V.K. Mootha // *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 25-44.
57. **Capdevila, J.** Soluble cytochrome P-450 from housefly microsomes: Partial purification and characterization of two hemoprotein formsv [Text] / J. Capdevila, N. Ahmad and M. Agosin // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250. – P. 1048-1060.
58. **Carraro, M.** The unique cysteine of F-ATP synthase OSCP subunit participates in modulation of the permeability transition pore [Text] / M. Carraro, K. Jones, G. Sartori, M. Schiavone, S. Antonucci, R. Kucharczyk, J.-P. Di Rago, C. Franchin, G. Arrigoni, M. Forte, P. Bernardi // *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 32: 108095.
59. **Carreira, R. S.** Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells [Text] / R.S. Carreira, Y. Lee, M. Ghochani, A.B. Gustafsson and R.A. Gottlieb // *Autophagy.* – 2010. – Vol. 6. – P. 462-472.
60. **Carroll, J.** Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase [Text] / J.Carroll, J.He, S.Ding, I.M. Fearnley and J.E. Walker // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – Vol. 116. – P. 12816–12821.
61. **Cevc, G.** How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model [Text] / G. Cevc // *Biochemistry.* – 1991. – Vol. 30. – № 29. – P. 7186-7193.
62. **Chernomordik, L.V.** Mechanics of membrane fusion [Text] / L.V. Chernomordik, M.M. Kozlov // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 15. –P. 675-683.
63. **Clarke, A.L.** Site of action of fatty acids and other charged lipids on BKCa channels from arterial smooth muscle cells [Text] / A.L. Clarke, S. Petrou, J.V. Jr. Walsh, J.J. Singer // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2003. – Vol. 284. – № 3. – P. 607-619.
64. **Crouser, E.D.** Quantitation of cytochrome c release from rat liver mitochondria [Text] / E.D. Crouser, M.E. Gadd, M.W. Julian, J.E. Huff, K.M. Broekemeier, K.A. Robbins, D.R. Pfeiffer // *Anal. Biochem.* – 2003. – Vol. 317. – № 1. – P. 67-75.
65. **Cullis, P.R.** Structural properties of phospholipids in the rat liver inner mitochondrial membrane [Text] / P.R. Cullis, B. de Kruijff, M.J. Hope, R. Nayar, A.

- Rietveld, A.J. Verkleij // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol. 600. – № 3. – P. 625-635.
66. **Daum, G.** Lipids of mitochondria [Text] / G. Daum // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 822. – P. 1-42.
67. **Demine, S.** Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases [Text] / S. Demine, P. Renard, T. Arnould // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – № 8: 795.
68. **Di Lisa, F.** Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition [Text] / F. Di Lisa; P. Bernardi // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – Vol. 66:2. – P. 222-232.
69. **Di Lisa, F.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD^+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart [Text] / F. Di Lisa, R. Menabo, M. Canton, M. Barile and P. Bernardi // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 2571–2575.
70. **Dietrich, C.** Lipid rafts reconstituted in model membranes [Text] / C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton // *Biophys J.* – 2001. – Vol. 80. – № 3. – P. 1417-1428.
71. **Divakaruni, A.S.** Fatty Acids Change the Conformation of Uncoupling Protein 1 (UCP1) [Text] / A.S. Divakaruni, D.M. Humphrey, M.D. Brand // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 36845-36853.
72. **Dubinina, M.V.** A Permeability Transition in Liver Mitochondria and Liposomes Induced by α,ω -Dioic Acids and Ca^{2+} [Text] / M.V. Dubinina, V.N. Samartsev, M.E. Astashev, A.S. Kazakov, K.N. Belosludtsev // *Eur. Biophys. J.* – 2014. – Vol. 43. – №10-11. – P. 565-572.
73. **Dumas, J. F.** Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells [Text] / J.F. Dumas, L. Argaud, C. Cottet-Rousselle, G. Vial, C. Gonzalez, D. Demaille, X. Leverve, E. Fontaine // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 15117–15125.

74. **Elrod, J.W.** Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca^{2+} exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice [Text] / J.W. Elrod, R. Wong, S. Mishra, R.J. Vagnozzi, B. Sakthivel, S.A. Goonasekera, J. Karch, S. Gabel, J. Farber, T. Force, J.H. Brown, E. Murphy, J.D. Molkenin // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120. – P. 3680-3687.
75. **Ferdinandusse, S.** Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids [Text] / S. Ferdinandusse, S. Denis, C.W. Van Roermund, R.J. Wanders, G. Dacremont // *J. Lipid. Res.* – 2004. – Vol. 45. – P. 1104-1111.
76. **Galber, C.** The f subunit of human ATP synthase is essential for normal mitochondrial morphology and permeability transition [Text] / C. Galber, G. Minervini, G. Cannino, F. Boldrin, V. Petronilli, S. Tosatto, G. Lippe, V. Giorgio // *Cell Rep.* – 2021. – Vol. 35: 109111.
77. **Galluzzi, L.** No death without life: vital functions of apoptotic effectors [Text] / L. Galluzzi, N. Joza, E. Tasdemir, M.C. Maiuri, M. Hengartner, J.M. Abrams, N. Tavernarakis, J. Penninger, F. Madeo, G. Kroemer // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol. 15. – № 7. – P. 1113-1123.
78. **Gautier, C.A.** Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1 [Text] / C.A. Gautier, E. Giaime, E. Caballero, L. Núñez, Z. Song, David Chan, C. Villalobos, J. Shen // *Mol. Neurodegener.* – 2012. – Vol. 7: 22.
79. **Giorgio, V.** Ca^{2+} binding to F- ATP synthase beta subunit triggers the mitochondrial permeability transition [Text] / V. Giorgio, V. Burchell, M. Schiavone, C. Bassot, G. Minervini, V. Petronilli, F. Argenton, M. Forte, S. Tosatto, G. Lippe, P. Bernardi // *EMBO Rep.* – 2017. – Vol. 18. – P. 1065–1076.
80. **Giorgio, V.** Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition [Text] / V. Giorgio, L. Guo, C. Bassot, V. Petronilli and P. Bernardi // *Cell Calcium.* – 2018. – Vol. 70. – P. 56–63.
81. **Giorgio, V.** Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology [Text] / V. Giorgio, M.E. Soriano, E. Basso, E. Bisetto, G. Lippe, M. A Forte, P. Bernardi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1797. – P. 1113–1118.

82. **Gunter, T.** Mechanisms by which mitochondria transport calcium [Text] / T. Gunter and D. Pfeiffer // *Am. J. Physiol.* – 1990. – Vol. 258. – P. 755-786.
83. **Gurtovenko, A.A.** Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance [Text] / A.A. Gurtovenko and I. Vattulainen // *Biophys. J.* – 2007. – Vol. 92. – P. 1878-1890.
84. **Gurtovenko, A.A.** Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide [Text] / A.A. Gurtovenko and J. Anwar // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111. – P. 10453-10460.
85. **Haga, N.** Mitochondrial aggregation precedes cytochrome c release from mitochondria during apoptosis [Text] / N. Haga, N. Fujita, T. Tsuruo // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 5579-5585.
86. **Hagen, T.M.** Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase [Text] / T.M. Hagen, D.L. Yowe, J.C. Bartholomew, C.M. Wehr, K.L. Do, J.Y. Park, B.N. Ames // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 3064-3069.
87. **Halestrap, A.P.** Mitochondria and cell death [Text] / A.P. Halestrap, E. Doran, J.P. Gillespie, A. O'Toole // *Biochem. Soc. Trans.* – 2000. – Vol. 28. – № 2. – P. 170-177.
88. **Halestrap, A.P.** Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection [Text] / A.P. Halestrap, S.J. Clarke, S.A. Javadov // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol.61. – № 3. – P. 372-385.
89. **Halestrap, A.P.** The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death [Text] / A.P. Halestrap and C. Brenner // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 10. – № 16. – P. 1507-1525.
90. **Halestrap, A.P.** The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury [Text] / A.P. Halestrap, A.P. Richardson // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 129-141.

91. **Halestrap, A.P.** The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease [Text] / A.P. Halestrap, P. Pasdois // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787. – № 11. – P. 1402-1415.
92. **Halestrap, A.P.** What is the mitochondrial permeability transition pore? [Text] / A.P. Halestrap // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2009. – Vol. 46. – № 6. – P. 821-831.
93. **Hansen, K.G.** Transport of proteins into mitochondria [Text] / K.G. Hansen, and J.M. Herrmann // *Protein J.* – 2019. – Vol. 38. – P. 330-342.
94. **Harder, T.** Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components [Text] / T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 141. – №4. – P. 929-942.
95. **Hardy, S.** Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells [Text] / S. Hardy, W. El-Assaad, E. Przybytkowsky, E. Joly, M. Prentki, Y. Langelier // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 31861-31870.
96. **Haworth, R.** The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site [Text] / R. Haworth, D. Hunter // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1979. – Vol. 195. – P. 460-467.
97. **He, J.** Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase [Text] / J. He, H.C. Ford, J. Carroll, S. Ding, I.M. Fearnley, J.E. Walker // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2017. – Vol. 114. – P. 3409–3414.
98. **Helm, C.A.** Role of hydrophobic forces in bilayer adhesion and fusion [Text] / C.A. Helm, J.N. Israelachvili, P.M. McGuiggan // *Biochemistry.* – 1992. – Vol. 31. – № 6. – P. 1794-1805.
99. **Henique, C.** Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis [Text] / C. Henique, A. Mansouri, G. Fumey, V. Lenoir, J. Girard, F. Bouillaud, C. Prip-Buus, I. Cohen // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – № 47. – P. 36818-36827.
100. **Hermesh, O.** Mitochondria uncoupling by a long chain fatty acyl analogue [Text] / O. Hermesh, B. Kalderon, J. Bar-Tana // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 3937-3942.

101. **Hunter, D. R.** The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release [Text] / Hunter, D. R. and Haworth, R. A. // Arch. Biochem. Biophys. – 1979. – Vol. 195. – P. 468-477.
102. **Hunter, D. R.** The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms [Text] / D. R. Hunter and R. A. Haworth // Arch. Biochem. Biophys. – 1979. – Vol. 195. – P. 453–459.
103. **Hunter, D.** Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria [Text] / D. Hunter, R. Haworth, J. Southard // Biol. Chem. – 1976. – Vol. 251. – P. 5069-5077.
104. **Hunter, F.E.** Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions [Text] / F.E. Hunter, L. Ford // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol. 216. – P.357-369.
105. **Ibarguren, M.** The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health [Text] / M. Ibarguren, D.J. López, P.V. Escribá // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Vol.1838. – № 6. – P. 1518-1528.
106. **Ichas, F.** From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state [Text] / F. Ichas and J.P. Mazat // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1366. – P. 33-50.
107. **Ichihara, K.** Some properties and distribution of the B- hydroxylation system of medium-chain fatty acids [Text] / K. Ichihara, E. Kusunose and M. Kusunose // Biochim. Biophys. Acta. – 1969. – Vol. 176. – P. 704-712.
108. **Ipsen, J.H.** Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system [Text] / J.H. Ipsen, G. Karlström, O.G. Mouritsen, H. Wennerström, M.J. Zuckermann // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 905. – № 1. – P. 162-172.
109. **Israelachvili, J.N.** Physical principles of membrane organization [Text] / J.N. Israelachvili, S. Marcelja, R.G. Horn // Q. Rev. Biophys. – 1980. – Vol. 13. – № 2. – P. 121-200.

110. **Jacobson, K.** Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations [Text] / K. Jacobson and D. Papahadjopoulos // *Biochemistry*. – 1975. – Vol. 14. – P. 152-161.
111. **Kamo, N.** Membrane potential measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state [Text] / N. Kamo, M. Muratsugo, H. Ruyi, J. Kobatake // *J. Membr. Biol.* – 1979. – Vol. 48. – P. 105-121.
112. **Karch, J.** Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice [Text] / J. Karch, J.Q. Kwong, A.R. Burr, M.A. Sargent, J.W. Elrod, P.M. Peixoto, S. Martinez-Caballero, H. Osinska, E.H-Y. Cheng, J. Robbins, K.W. Kinnally, J.D. Molkentin // *eLife*. – 2013. – Vol. 2: e00772.
113. **Karch, J.** Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD [Text] / J. Karch, M.J. Broun, H. Khalil, M.A. Sargent, N. Latchman, N. Terada, P.M. Peixoto, J. D. Molkentin // *Sci. Adv.* – 2019. – Vol. 5: eaaw4597.
114. **Kim, J.S.** Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis [Text] / J.S. Kim, L. He and J.J. Lemasters // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 304. – P. 463-470.
115. **Kist, M.** Cell death pathways: intricate connections and disease implications [Text] / M. Kist, D. Vucic // *EMBO J.* – 2021. – Vol. 40. – № 5. – e106700.
116. **Klug, G.A.** Alterations in liver mitochondrial function as a result of fasting and exhaustive exercise [Text] / G.A. Klug, J. Krause, A.K. Ostlund, G. Knoll, D. Brdiczka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 764. – № 3. – P. 272-282.
117. **Knecht, V.** Molecular dynamics simulations of lipid vesicle fusion in atomic detail [Text] / V. Knecht, S.J. Marrink // *Biophys J.* – 2007. – Vol. 92. – № 12. – P. 4254-4261.

118. **Kroemer, G.** Mitochondrial cell death control in familial Parkinson disease [Text] / G. Kroemer and K. Blomgren // PLoS Biology. – 2007. – Vol. 5. – № 7. – P. 206.
119. **Kroemer, G.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [Text] / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87. – P. 99-163.
120. **Kroesen, B.-J.** Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via de novo generated C16-ceramide and involves mitochondria [Text] / B.-J. Kroesen, B. Pettus, C. Luberto, M. Busman, H. Sietsma, L. De Leij and Y.A. Hannun // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 13606-13614.
121. **Lafont, F.** Bacterial invasion via lipid rafts [Text] / F.Lafont, F.G. van der Goot // Cell Microbiol. – 2005. – Vol. 7. – № 5. – P. 613-620.
122. **Laker, R.C.** The mitochondrial permeability transition pore regulator cyclophilin D exhibits tissue specific control of metabolic homeostasis [Text] / R.C. Laker, E.P. Taddeo, Y.N. Akhtar, M. Zhang, K.L. Hoehn, Z. Yan // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11: e0167910.
123. **Laposata, E.A.** Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse [Text] / E.A. Laposata, L.G. Lange // Science. – 1986. – Vol. 231. – P. 497-499.
124. **Lee, A.G.** Analysis of the defect structure of gel-phase lipid [Text] / A.G. Lee // Biochemistry. – 1977. – Vol. 16. – № 5. – P. 835-841.
125. **Lemasters, J.J.** Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death [Text] / J.J. Lemasters, T.P. Theruvath, Z. Zhong, A.L. Nieminen // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787. – P. 1395-1401.
126. **Lemeshko, V.V.** Dextran causes aggregation of mitochondria and influences their oxidoreductase activities and light scattering [Text] / V.V. Lemeshko, S. Solano, L.F. López, D.A. Rendón, P. Ghafourifar, L.A. Gómez // Arch. Biochem. Biophys. – 2003b. – Vol. 412. – P. 176-185.
127. **Lemeshko, V.V.** Redox state-dependent aggregation of mitochondria induced by cytochrome c [Text] / V.V. Lemeshko // Mol. Cell Biochem. – 2012. – Vol. 360. – P. 111-119.

128. **Lemeshko, V.V.** The natural antioxidant otopaphenol delays the permeability transition of mitochondria and induces their aggregation [Text] / V.V. Lemeshko, L.F. Lopez, S. Solano, R. Torres // *Antioxid Redox Signal.* – 2003a. – Vol. 5. – P. 281-290.
129. **Leontiadou, H.** Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers [Text] / H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 86. – № 4. – P. 2156-2164.
130. **Liu, X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c [Text] / X. Liu, C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang // *Cell.* – 1996. – Vol. 86. – P. 147-157.
131. **Lu, A.Y.H.** Role of hemoprotein P-450 in fatty acid β -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes [Text] / A.Y.H. Lu and M.J. Coon // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243. – P. 1331-1332.
132. **Madec, S.** CYP4F3B expression is associated with differentiation of HepaRG human hepatocytes and unaffected by fatty acid overload [Text] / S. Madec, V. Cerec, E. Plée-Gautier, J. Antoun, D. Glaise, J.P. Salaun, C. Guguen-Guillouzo, A. Corlu // *Drug. Metab. Dispos.* – 2011. – Vol. 39. – P.1987-1996.
133. **Marrink, S.J.** Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves [Text] / S.J. Marrink, A.H. De Vries, D.P. Tieleman // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1788. – P. 149-168.
134. **McArthur, K.** BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis [Text] / K. McArthur, L.W. Whitehead, J.M. Heddleston, L. Li, B.S. Padman, V. Oorschot, N.D. Geoghegan, S. Chappaz, S. Davidson, H.S. Chin, R.M. Lane, M. Dramicanin, T.L. Saunders, C. Sugiana, R. Lessene, L.D. Osellame, T-L. Chew, G. Dewson, M. Lazarou, G. Ramm, G. Lessene, M.T. Ryan, K.L. Rogers, M.F. van Delft, B.T. Kile // *Science.* – 2018. – Vol. 359: eaao6047.
135. **Medina, D.L.** Lysosomal calcium regulates autophagy [Text] / D.L. Medina and A. Ballabio // *Autophagy.* – 2015. – Vol. 11. – P. 970-971.

136. **Mironova, G.D.** Formation of palmitic acid/ Ca^{2+} complexes in the mitochondrial membrane: a possible role in the cyclosporin-insensitive permeability transition [Text] / G.D. Mironova, E. Gritsenko, O. Gateau-Roesch, C. Levrat, A. Agafonov, K. Belosludtsev, A. Prigent, D. Muntean, M. Dubois, M. Ovize // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2004. – Vol. 36. – P. 171-178.
137. **Mironova, G.D.** Mitochondrial Ca^{2+} cycle mediated by the palmitate-activated cyclosporin A-insensitive pore [Text] / G.D. Mironova, K.N. Belosludtsev, N.V. Belosludtseva, E.N. Gritsenko, B.I. Khodorov, N.-E.L. Saris // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – Vol. 39. – № 2. – P. 167-174.
138. **Mironova, G.D.** Mitochondrial Cyclosporine A-Independent Palmitate/ Ca^{2+} -Induced Permeability Transition Pore (PA-mPT Pore) and Its Role in Mitochondrial Function and Protection against Calcium Overload and Glutamate Toxicity [Text] / G.D. Mironova, E.V. Pavlov // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 125.
139. **Mironova, G.D.** Oscillating Ca^{2+} -induced channel activity obtained in BLM with a mitochondrial membrane component [Text] / G.D. Mironova, A. Lazareva, O. Gateau-Roesch, J. Tyynela, Y. Pavlov, M. Vanier, N.E. Saris // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1997. – Vol. 29. – P. 561-569.
140. **Mironova, G.D.** Palmitic and stearic acids bind Ca^{2+} with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to Ca^{2+} -activated mitochondrial pores [Text] / G.D. Mironova, O. Gateau-Roesch, C. Levrat, E. Gritsenko, E. Pavlov, A.V. Lazareva, E. Limarenko, P. Rey, P. Louisot, N.-E.L. Saris // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2001. – Vol. 33. – P. 319-331.
141. **Mitchell, P.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism [Text] / P. Mitchell // *Nature.* – 1961. – Vol. 191. – P. 144-148.
142. **Miura, Y.** (B-1), (B-2) and (B-3) hydroxylation of long chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium* [Text] / Y. Miura and A.J. Fulco // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – Vol. 388. – P. 305-317.

143. **Miura, Y.** (B-2) Hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium* [Text] / Y. Miura and A.J. Fulco // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249. – P. 1880-1888.
144. **Miura, Y.** B- and (B-1)-hydroxylation of 1-dodecanol by frog liver microsomes [Text] / Y. Miura // *Lipids.* – 1981. – Vol. 16. – P. 721-725.
145. **Miura, Y.** B- and (B-1)-hydroxylation of fatty acids by frog liver microsomes [Text] / Y. Miura, H. Hisaki and N. Ueta // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – Vol. 531. – P. 149-157.
146. **Miura, Y.** B- and (B-1)-hydroxylation of lauric acid by frog liver microsomes. In *Microsomes, Drug Oxidations and Drug Toxicity* (eds. Sato, R. and Kato, R.) [Text] / Y. Miura // Japan Scientific Societies Press. – Tokyo, 1982b. – P. 301-302.
147. **Miura, Y.** Effect of detergents on the microsomal cytochrome P-450- dependent monooxygenases from frog and rat liver [Text] / Y. Miura, H. Hisaki and N. Ueta // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1980. – Vol. 67B. – P. 541-547.
148. **Miura, Y.** Effect of inhibitors on B- and (B-1)-hydroxylation of lauric acid by frog liver microsomes [Text] / Y. Miura // *Lipids.* – 1982a. – Vol. 17. – P. 864-869.
149. **Miura, Y.** Seasonal changes and sex difference in laurate hydroxylase activity in frog liver microsomes [Text] / Y. Miura // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1985. – Vol. 82C. – P. 63-67.
150. **Mnatsakanyan, N.** A mitochondrial megachannel resides in monomeric F_1F_0 ATP synthase [Text] / N. Mnatsakanyan, M.C. Llaguno, Y. Yang, Y. Yan, J. Weber, F.J. Sigworth, E.A. Jonas // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10: 5823.
151. **Mortensen, P.B.** Formation and degradation of dicarboxylic acids in relation to alterations in fatty acid oxidation in rats [Text] / P.B. Mortensen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1124. – P. 71-79.
152. **Nakagawa, T.** Cyclophilin D- dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death [Text] / T. Nakagawa, S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo, Y. Tsujimoto // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – Vol. 652-658.

153. **Neginskaya, M.A.** ATP synthase c-subunitdeficient mitochondria have a small cyclosporine a-sensitive channel, but lack the permeability transition pore [Text] / M.A. Neginskaya, M.E. Solesio, E.V. Berezhnaya, G.F. Amodeo, N. Mnatsakanyan, E.A. Jonas, E.V. Pavlov // Cell Rep. – 2019. – Vol. 26. – P. 11-17.
154. **Nunnari, J.** Mitochondria: in sickness and in health [Text] / J. Nunnari, A. Suomalainen // Cell. – 2012. – Vol. 148. – № 6. – P. 1145-1159.
155. **Orellana, M.** Peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation in liver of rats after chronic ethanol consumption [Text] / M. Orellana, R. Rodrigo, E. Valdes // Gen. Pharmacol. – 1998. – Vol. 31 – P. 817-820.
156. **Palikaras, K.** Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology [Text] / K. Palikaras, E. Lionaki and N. Tavernarakis // Nat. Cell Biol. – 2018. – Vol. 20. – P. 1013-1022.
157. **Papahadjopoulos, D.** Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion [Text] / D. Papahadjopoulos, S. Nir, N. Düzgünes // J. Bioenerg. Biomembr. – 1990. – Vol. 22. –P. 157-179.
158. **Pinke, G.** Cryo- EM structure of the entire mammalian F- type ATP synthase [Text] / G. Pinke, L. Zhou and L.A. Sazanov // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2020. – Vol. 27. – P. 1077-1085.
159. **Rajagopal, M.C.** Transient heat release during induced mitochondrial proton uncoupling [Text] / M.C. Rajagopal, J.W. Brown, D. Gelda, K.V. Valavala, H. Wang, D.A. Llano, R. Gillette, S. Sinha //Commun. Biol. – 2019. – Vol. 26. – № 2. – P. 279.
160. **Rand, R.P.** Mechanical Properties of the Red Cell Membrane. Ii. Viscoelastic Breakdown of the Membrane [Text] / R.P. Rand // Biophys. J. – 1964. – Vol. 4. – P. 303-316.
161. **Rath, S.** MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations [Text] / S. Rath, R. Sharma, R. Gupta, T. Ast, C. Chan, T.J. Durham, R.P. Goodman, Z. Grabarek, M.E. Haas, W.H.W. Hung, P.R. Joshi, A.A. Jourdain, S.H. Kim, A.V. Kotrys, S.S. Lam, J.G. McCoy, J.D. Meisel, M. Miranda, A. Panda, A. Patgiri, R. Rogers, S. Sadre, H. Shah, O.S. Skinner, T.L. To, M.A. Walker, H. Wang, P.S. Ward, J. Wengrod, C.C. Yuan, S.E.

- Calvo, V.K. Mootha // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – № D1: D1541-D1547.
162. **Reddy, J.K.** Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation [Text] / J.K. Reddy, M.S. Rao // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – P.852-858.
163. **Reddy, J.K.** Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis [Text] / J.K. Reddy // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P.1333-1339.
164. **Reuttinger, R.T.** Identification of the B-hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans* as a nonheme iron protein requiring phospholipid for catalytic activity [Text] / R.T. Reuttinger, S.T. Olson, R.F. Boyer and M.J. Coon // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1974. – Vol. 57. – P. 1011-1017.
165. **Ribel-Madsen, A.** Plasma acylcarnitine profiling indicates increased fatty acid oxidation relative to tricarboxylic acid cycle capacity in young, healthy low birth weight men [Text] / A. Ribel-Madsen, R. Ribel-Madsen, C. Brøns, C.B. Newgard, A.A. Vaag, L.I. Hellgren // *Physiol. Rep.* – 2016. – Vol. 4. – P. 12977.
166. **Robbins, K.C.** In vitro B-oxidation of medium chain fatty acids on mammalian tissue [Text] / K.C. Robbins // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1968. – Vol. 123. – P. 531-538.
167. **Rodriguez-Enriquez, S.** Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes [Text] / S. Rodriguez-Enriquez, I. Kim, R.T. Currin and J.J. Lemasters // *Autophagy.* – 2006. – Vol. 2. – P. 39-46.
168. **Rosencrans, W.M.** VDAC regulation of mitochondrial calcium flux: from channel biophysics to disease [Text] / W.M. Rosencrans, M. Rajendran, S.M. Bezrukov and T.K. Rostovtseva // *Cell Calcium.* – 2021. – Vol. 94: 102356.
169. **Rottenberg, H.** Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics [Text] / H. Rottenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1983. – Vol. 80. – № 11. – P. 3313-3317.
170. **Roy, S.M.** Membrane fusion induced by small molecules and ions [Text] / S.M. Roy, and M. Sarkar // *J. Lipids.* – 2011. – Vol. 2011. – Artical ID 528784. – P. 1-14.

171. **Salaun, J.-P.** A microsomal (cytochrome P-450)-linked lauric acid monooxygenase from aged Jerusalem Artichoke-tuber tissues [Text] / J.-P. Salaun, I. Benveniste, D. Reichhart and F. Durst // *Eur. J. Biochem.* – 1978. – Vol. 90. – P. 155-159.
172. **Samartsev, V.N.** A comparative study of the action of protonophore uncouplers and decoupling agents as inducers of free respiration in mitochondria in states 3 and 4: theoretical and experimental approaches [Text] / V.N. Samartsev, A.A. Semenova, M.V. Dubinin // *Cell Biochem. Biophys.* – 2020. – Vol. 78. – P. 203-216.
173. **Samovski, D.** Gating of the mitochondrial permeability transition pore by long chain fatty acyl analogs in vivo [Text] / D. Samovski, B. Kalderon, E. Yehuda-Shnaidman, J. Bar-Tana // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P.6879-6890.
174. **Sanders, R.J.** Evidence for two enzymatic pathways for ω -oxidation of docosanoic acid in rat liver microsomes [Text] / R.J. Sanders, R. Ofman, F. Valianpour, S. Kemp, R.J. Wanders // *J. Lipid. Res.* –2005. – Vol. 46. – P. 1001-1008.
175. **Schekman, R.** Coat proteins and vesicle budding [Text] / R. Schekman and L. Orci // *Science.* – 1996. – Vol. 271. – № 5255. – P. 1526-1533.
176. **Schmidt, G.** Densitometric characterization of aqueous lipid dispersions [Text] / G. Schmidt, W. Knoll // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* – 1985. – Vol. 89. – P. 36-43.
177. **Schonfeld, P.** Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier [Text] / P. Schonfeld, R. Bohnensack // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 420. – P. 167-170.
178. **Sengupta, D.** Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder [Text] / D. Sengupta, H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778. – P. 2308-2317.
179. **Shimabukuro, M.** Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes [Text] / M. Shimabukuro, Y. Zhou, M. Levi, R. Unger // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 2498-2502.

180. **Shoun, H.** Subterminal hydroxylation of fatty acids by a cytochrome P-450-dependent enzyme system from a fungus, *Fusarium oxysporum* [Text] / H. Shoun, Y. Sudo and T. Beppu // *J. Biochem.* – 1985. – Vol. 97. – P. 755-763.
181. **Silvius, J.R.** Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems [Text] / J.R. Silvius // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. 1610. – № 2. – P. 174-183.
182. **Simons, K.** Functional rafts in cell membranes [Text] / K. Simons, E. Ikonen // *Nature.* – 1997. – Vol. 387. – P. 569-572.
183. **Singer, S.J.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes [Text] / S.J. Singer, G.L. Nicolson // *Science.* – 1972. – Vol. 175. – № 4023. – P. 720-731.
184. **Song, M.** II Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts [Text] / M. Song, K. Mihara, Y. Chen, L. Scorrano and G.W. Dorn // *Cell Metab.* – 2015. – Vol. 21. – P. 273-286.
185. **Spikes, T.E.** Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria [Text] / T.E. Spikes, M.G. Montgomery, and J.E. Walker // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2020. – Vol. 117. – № 38. – P. 23519-23526.
186. **Sultan, A.** Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview [Text] / A. Sultan and P.M. Sokolove // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001a. – Vol. 386. – P. 52-61.
187. **Sultan, A.** Palmitic acid opens a novel cyclosporin A- insensitive pore in the inner mitochondrial membrane [Text] / A. Sultan and P.M. Sokolove // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001b. – Vol. 386. – P. 37-51.
188. **Sun, T.** Parkin regulates programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury by targeting cyclophilin- D [Text] / T. Sun, W. Ding, T. Xu, X. Ao, T. Yu, M. Li, Y. Liu, X. Zhang, L. Hou, J. Wang // *Antioxid. Redox Signal.* – 2019. – Vol. 31. – P. 1177-1193.
189. **Szabo, I.** The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore [Text] / I. Szabo and M. Zoratti // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1992. – Vol. 24. – P. 111-117.

190. **Taddeo, E.P.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle [Text] / E.P. Taddeo, R.C. Laker, D.S. Breen, Y.N. Akhtar, B.M. Kenwood, J.A. Liao, M. Zhang, D.J. Fazakerley, J.L. Tomsig, T.E. Harris, S.R. Keller, J.D. Chow, K.R. Lynch, M. Chokki, J.D. Molkenin, N. Turner, D.E. James, Z. Yan, K.L. Hoehn // *Mol. Metab.* – 2014. – Vol. 3. – P. 124-134.
191. **Tavecchio, M.** Deletion of cyclophilin D impairs betaoxidation and promotes glucose metabolism [Text] / M. Tavecchio, S. Lisanti, M.J. Bennett, L.R. Languino, and D.C. Altieri // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5: 15981.
192. **Terada, H.** Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H⁺ in cooperation with hydrophobic anions [Text] / H. Terada, O. Shima, K. Yoshida, Y. Shinohara // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – № 14. – P. 7837-7842.
193. **Tonin, A.M.** Mitochondrial bioenergetics deregulation caused by long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain: a possible role of mPTP opening as a pathomechanism in these disorders? [Text] / A.M. Tonin, A.U. Amaral, E.N. Busanello, J. Gasparotto, D.P. Gelain, N. Gregersen, M. Wajner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1842. – № 9. – P. 1658-1667.
194. **Tonsgard, J.H.** Characterization of the binding sites for dicarboxylic acids on bovine serum albumin [Text] / J.H. Tonsgard, S.C. Meredith // *Biochem. J.* – 1991. – Vol. 276. – P. 569-575.
195. **Tonsgard, J.H.** Serum dicarboxylic acids in patients with Reye syndrome [Text] / J.H. Tonsgard // *J. Pediatr.* – 1986. – Vol. 109. – P. 440-445.
196. **Urbani, A.** Purified F-ATP synthase forms a Ca²⁺-dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore [Text] / A. Urbani, V. Giorgio, A. Carrer, C. Franchin, G. Arrigoni, C. Jiko, K. Abe, S. Maeda, K. Shinzawa-Itoh, J.F.M. Bogers, D.G.G. McMillan, C. Gerle, I. Szabò, P. Bernardi // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10: 4341.

197. **Vakifahmetoglu-Norberg, H.** The role of mitochondria in metabolism and cell death [Text]/ H. Vakifahmetoglu-Norberg, A.T. Ouchida, E. Norberg // *Biochem Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 482. – № 3. – P. 426-431.
198. **Verkade, P.E.** The role of the dicarboxylic acid in metabolism [Text] / P.E. Verkade // *Chem. & Ind.: London.* – 1938. – Vol. 57. – P. 704-711.
199. **Verkade, P.E.** Untersuchungenuber der Fett Stoffwechsel [Text] / P.E. Verkade, M. Elzas, J. van der Lee, H.H. DeWolff, A. Verkade-Sandbergen and D. van der Sande // *Z. Phys. Chem.* – 1933. – Vol. 215. – P. 225-257.
200. **Verkleij, A.J.** The lipidic particle as an intermediate structure in membrane fusion processes and bilayer to hexagonal HII transitions [Text] / A.J. Verkleij, C.J. van Echteld, W.J. Gerritsen, P.R. Cullis, B. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol. 600. – № 3. – P. 620-624.
201. **Wada, F.** Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in B-oxidation of fatty acids [Text] / F. Wada, H. Shibata, M. Goto and Y. Sakamoto // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1968. – Vol. 162. – P. 518-524.
202. **Wakabayashi, K.** Studies in vitro on the mechanism of B-oxidation of fatty acids [Text] / K. Wakabayashi and N. Shimazono // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1961. – Vol. 48. – P. 615-617.
203. **Wanders, R.J.** Fatty acid ω -oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans [Text] / R.J. Wanders, J. Komen, S. Kemp // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 182-194.
204. **Wieckowski, M.** Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore [Text] / M. Wieckowski, L. Wojtczak // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 423. – P. 339-342.
205. **Wieckowski, M.** Long-chain fatty acids opening of the reconstituted mitochondrial permeability transition pore [Text] / M. Wieckowski, D. Brdiczka, L. Wojtczak // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 484. – P. 61-64.
206. **Wojtczak, L.** Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria [Text] / L. Wojtczak, P. Schönfeld // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – Vol. 1183. – P. 41-57.

207. **Woodbury, D.J.** Vesicle-membrane fusion. Observation of simultaneous membrane incorporation and content release [Text] / D.J. Woodbury, J.E. Hall // *Biophys J.* – 1988. – Vol. 54. – № 2. – P. 345-349.
208. **Xu, F.** CYP4 isoform specificity in the ω -hydroxylation of phytanic acid, a potential route to elimination of the causative agent of Refsum's disease [Text] / F. Xu, V.Y. Ng, D.L. Kroetz, P.R. de Montellano // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* –2006. – Vol. 318. – P.835-839.
209. **Yamamoto, S.** Isolation of cytochrome P-450 highly active in prostaglandin B-hydroxylation from lung microsomes of rabbits treated with progesterone [Text] / S. Yamamoto, E. Kusunose, K. Ogita, M. Kaku, K. Ichihara and M. Kusunose // *J. Biochem.* – 1984. – Vol. 96. – P. 593-603.
210. **Zoratti, M.** Electrophysiology clarifies the megariddles of the mitochondrial permeability transition pore [Text] / M. Zoratti, U. De Marchi, L. Biasutto, I. Szabo // *FEBS Lett.* – 2010. – 584(10). – P. 1997-2004.
211. **Zoratti, M.** Mitochondrial permeability transition [Text] / M. Zoratti and I. Szabo // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1241. – P. 139-176.
212. **Zorov, D.B.** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS- induced ROS release [Text] / D.B. Zorov, M. Juhaszova and S.J. Sollott // *Physiol. Rev.* – 2014. – Vol. 94. – P. 909-950.