

К.Н. Белослудцев^{1,2}, Г.Д. Миронова^{1,2}

Митохондриальная липидная пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированная пора и её возможная роль в деградации нервных клеток

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественнонаучный институт», 142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

В обзоре обсуждается новый тип митохондриальной поры, имеющей липидную природу и индуцируемую пальмитиновой кислотой и Ca^{2+} . Рассмотрены молекулярные механизмы образования и регуляции этой поры, возможность ее образования в биологических мембранах и роль в физиологических и патофизиологических процессах. Обсуждается возможная роль липидной поры в глутамат-индуцированной деградации нервных клеток.

Ключевые слова: митохондрии, пальмитиновая кислота, липидная пора, деградация нервных клеток

K.N. Belosludtsev^{1,2}, G.D. Mironova^{1,2}

The mitochondrial lipid palmitate/ Ca^{2+} -induced pore and its possible role in a degradation of nervous cells

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy Science, 3, Institutsкая str., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

² Pushchino State Institute of Natural Sciences, 3, Prospekt Nauki, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

The subject of the review is a new type of mitochondrial pore — a pore which has lipid nature and is induced by palmitic acid and Ca^{2+} . The review considers molecular mechanisms of its formation and regulation, conditions of its opening in biological membranes and the role in physiological and pathophysiological processes. Also discussed is involvement of the lipid pore in glutamate-induced degradation of nervous cells.

Key words: Mitochondria, palmitic acid, lipid pore, neurodegradation

Известно, что гормоны и медиаторы, участвующие в клеточной сигнализации, запускают целый каскад реакций, заканчивающийся во многих случаях активацией того или иного ионного канала или поры и поступление ионов в цитоплазму клетки. Некоторые рецепторы, как, например, глутаматный (NMDA подтип), сами являются ионными каналами. Глутамат, связываясь со своим рецептором, изменяет его конформацию, в результате чего канал открывается и Ca^{2+} поступает в клетку. Так как концентрация Ca^{2+} в межклеточном пространстве значительно выше, чем в цитоплазме, ион устремляется в клетку. При этом, активируются соответствующие процессы внутриклеточной сигнализации. Медиаторы действуют обычно в течение непродолжительного времени, после чего ионный гомеостаз клетки восстанавливается до исходного уровня, в основном, за счёт поступления иона в кле-

точные депо (эндоплазматический ретикулум и митохондрии) [25, 37].

Однако при определённых патологиях, наблюдается чрезмерное поступление медиаторов в межклеточное пространство, что ведёт к длительной стимуляции клеток. Увеличение экстраклеточного глутамата, например, приводит к длительной стимуляции NMDA рецептора и как результат — длительное поступление Ca^{2+} в клетку, что является для неё токсичным [38], так как ведёт к накоплению иона в митохондриях, в основном, в виде Ca^{2+} -фосфатных солей. После исчерпания митохондриями способности связывать ион, в их матриксе накапливается свободный кальций, что ведёт к открытию Ca^{2+} -активируемых неспецифических пор. Открытие пор приводит к выбросу Ca^{2+} из митохондрий, падению мембранного потенциала и увеличению объёма их матрикса. При этом из митохондрий в цитоплазму выходят проапоптотические белки, что, в свою очередь, служит причиной запуска процессов апоптоза и некроза клеток [21, 24, 30, 37, 38]. Все перечисленные выше процессы

Для корреспонденции: Константин Николаевич Белослудцев, канд.биол.наук, старш. науч. сотр., лаб. митохондриального транспорта ФГУН ИТЭБ РАН, старш. науч. сотр. ФГБОУ ВПО ПушГЕНИ. E-mail: bekonik@gmail.com

лежат в основе деградации клеток при ишемии, окислительном стрессе, эпилепсии, нейродегенеративных заболеваниях и других патологиях [29, 37].

Механизм токсического действия ряда медиаторов до сих пор не ясен. Предполагалось, что инициируемое ими долгосрочное повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме с последующим выбросом ионов из митохондрий связан с формированием в них белкового мегаканала, так называемой циклоспорин А (ЦсА)-чувствительной митохондриальной поры (Mitochondrial Permeability Transition pore, МРТ). Однако участие этой поры в развитии токсического действия медиаторов дискуссионно, а в ряде исследований были обнаружены факты, поставившие под сомнения эту гипотезу [17, 18, 29, 40, 49, 50]. Сопоставление наших и литературных данных позволило предположить, что в основе ряда механизмов Ca^{2+} дисрегуляции (вторичного выхода иона из митохондрий), может лежать открытие в их внутренней мембране ЦсА-нечувствительной липидной поры, которая изучается в нашей лаборатории на протяжении последних 15 лет [3—5, 7, 8, 10, 12—15, 27, 29, 33—36].

Жирные кислоты как индукторы неспецифической проницаемости липидного бислоя

Исследования липидной поры начались в нашей лаборатории в середине 90-х годов прошлого века с обнаружения нового « Ca^{2+} сенсора» для МРТ поры в липидной фракции экстракта митохондрий, полученной при выделении ионных каналов [33]. Из этой фракции был выделен гидрофобный компонент, обладающий высоким сродством к Ca^{2+} . Добавление этого компонента к бислойным липидным мембранам (БЛМ) приводило к образованию в присутствии Ca^{2+} неселективных ионных каналов [27, 33]. Это соединение было локализовано преимущественно в контактных сайтах [34], т.е. там, где внутренняя и внешняя митохондриальная мембраны находятся в тесном контакте, и где расположено большинство мембранных транспортирующих систем.

Исследования показали, что гидрофобный Ca^{2+} -связывающий компонент — это смесь насыщенных длинноцепочечных свободных жирных кислот, в основном, пальмитиновой и стеариновой [34]. Для выяснения, какие липиды кроме пальмитиновой и стеариновой жирных кислот способны прочно связывать

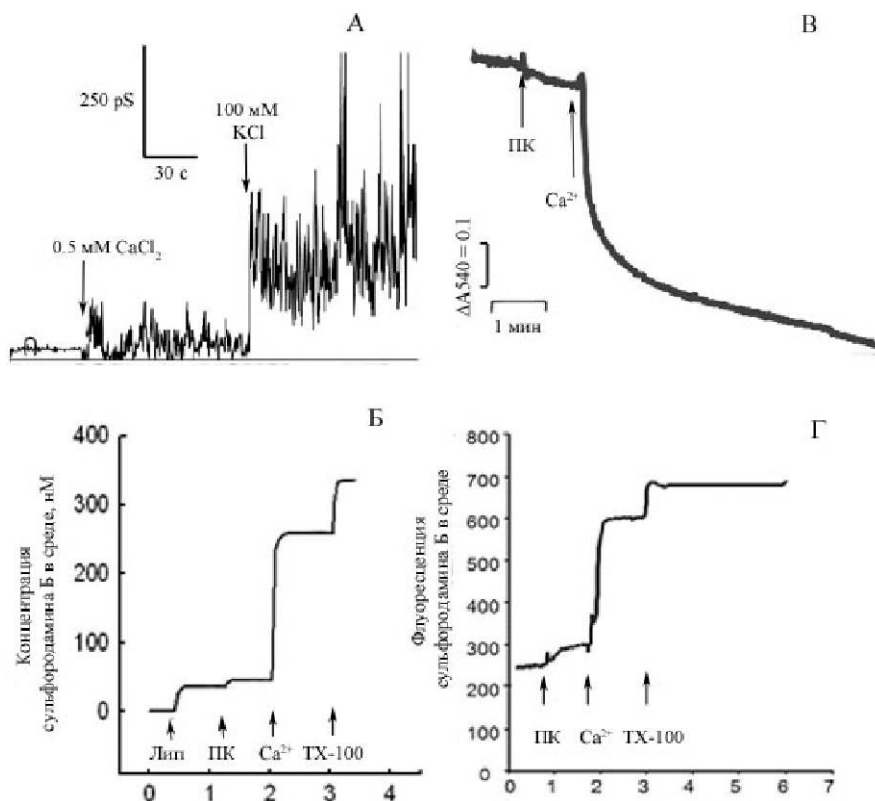


Рис. 1. Пальмитиновая кислота (ПК) индуцирует Ca^{2+} -зависимую проницаемость в искусственных (А — БЛМ; Б — липосомы) и биологических (В — митохондрии печени крыс; Г — плазматическая мембрана эритроцитов) мембранах: А — влияние ПК (0,5 массовых %) и Ca^{2+} на проводимость БЛМ (потенциал на мембране 100 мВ); Б — 50 мкМ ПК и 1 мМ CaCl_2 индуцируют выход флуоресцентного зонда сульфородамина Б из липосом; В — набухание митохондрий печени крыс, индуцированное 15 мкМ ПК и 30 мкМ CaCl_2 ; Г — 50 мкМ ПК и 0,5 мМ CaCl_2 индуцируют выход сульфородамина Б из эритроцитов

Ca²⁺, были протестированы 25 липидов различных классов. Как следует из таблицы, только насыщенные длинноцепочечные свободные жирные кислоты связывают Ca²⁺ со сродством, которое на 1—2 порядка выше, чем сродство к этому иону других жирных кислот и липидов (K_d для пальмитиновой кислоты = 5 мкМ при рН 8.5) [34]. Было установлено, что коммерческие пальмитиновая и стеариновая кислоты, в отличие от ненасыщенных жирных кислот, индуцировали неспецифическую Ca²⁺-зависимую ионную проницаемость БЛМ [34]. Эти же кислоты способны индуцировать неспецифическую Ca²⁺-индуцируемую проницаемость в липосомах [8, 12, 13]. Насыщенные жирные кислоты в присутствии Ca²⁺ способны индуцировать не только проницаемость БЛМ и липосомальной мембраны, но и неспецифическую нечувствительную к циклоспорино А проницаемость внутренней мембраны митохондрий, выделенных из разных тканей (печень, сердце, мозг), а также из мембраны эритроцитов [3, 5, 7, 8, 13, 15, 16, 34, 46, 47] (рис. 1).

Как видно из результатов исследований, пальмитат-индуцированная Ca²⁺-зависимая неспецифическая проницаемость наблюдалась во многих бислойных мембранах. Поэтому возникли закономерные вопросы:

1) об одной и той же проницаемости идет речь в случае искусственных и в случае нативных биологических мембран;

2) по какому механизму происходит индукция этой проницаемости.

Для того, чтобы ответить на первый вопрос были проведены исследования по влиянию одних и тех же агентов на индукцию неспецифической пальмитат/Ca²⁺-зависимой проницаемости (поры) в исследуемых липидных мембранах. Во-первых, было показано, что хелатирование Ca²⁺ (ЭГТА и АТФ) или связывание пальмитиновой кислоты (бычий сывороточный альбумин) подавляют индукцию неспецифической пальмитат/Ca²⁺-индуцированной поры во всех исследуемых мембранах [3, 5, 7, 36]. Во-вторых, загрузка митохондриальных и липосомальной

Таблица 1

Связывание Ca²⁺ различными липидами и свободными жирными кислотами [15]

Липиды и жирные кислоты	Связывание Ca ²⁺ *
Лауриновая кислота (12:0)	0,50±0,03
Миристиновая кислота (14:0)	7,30±0,25
Пальмитиновая кислота (16:0)	83,00±0,75
Стеариновая кислота (18:0)	100,00
Арахидоновая кислота (20:0)	73,00±2,5
Докозановая кислота (22:0)	44,00±1,2
Лигноцериновая кислота (24:0)	15,00±0,35
Пальмитолеиновая кислота (16:1)	1,90±0,08
Олеиновая кислота (18:1)	5,70±0,12
Линолевая кислота (18:2)	0,65±0,04
Линоленовая кислота (18:3)	0,87±0,05
Арахидоновая кислота (20:4)	1,10±0,05
1-Пальмитоил-лизифосфатидилхолин	0,43±0,02
1-Стеароил-лизифосфатидилхолин	0,47±0,02
1-Лауроил-лизифосфатидилхолин	0,43±0,01
Лизифосфатидилсерин	0,54±0,03
1,2-Дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфатидилхолин	0,40±0,2
1,2-Дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфатидилэтаноламин	0,22±0,01
1-Пальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-1-3-фосфатидилэтаноламин	0,76±0,03
Пальмитоил-КоА	0,43±0,02
Кардиолипин	0,60±0,03
L-α-фосфатидная кислота	19,50±0,8
Холестерин	0,33±0,01
Цереброзиды	0,20±0,01
Сфингомиелин	0,30±0,01

Примечание. * — % от связывания Ca²⁺ со стеариновой кислотой

мембран холестерином (основной модификатор бислоевых мембран) приводила к одинаковому увеличению скорости формирования пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры [6, 7]. В-третьих, загрузка липосом кардиолипином приводила к усилению пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной проницаемости, а связывание кардиолипина в митохондриях специфическим агентом нонил акридиновым оранжевым вызывало полное ингибирование образования поры в митохондриях [7, 14]. Все это говорит о том, что проницаемость, индуцированная пальмитиновой кислотой и кальцием в биологических мембранах по структуре аналогична той, которая индуцируется в искусственных мембранах, т.е. изучаемая нами в биологических мембранах пора имеет липидную природу.

Для того, чтобы ответить на вопрос о механизме, по которому происходит индукция пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой проницаемости, необходимо в первую очередь определиться, что лежит в основе этой индукции. Согласно развиваемым нами представлениям, в основе индукции пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой поры в искусственных и биологических мембранах лежит формирование комплексов жирной кислоты с Ca^{2+} . Только насыщенные жирные кислоты, которые связывают Ca^{2+} с высоким сродством (табл. 1), способны индуцировать неспецифическую Ca^{2+} -зависимую проницаемость искусственных (БЛМ и липосомы) и биологических мембран (внутренняя мембрана митохондрий и плазматическая мембрана эритроцитов). Ненасыщенные жирные кислоты и, в частности олеиновая и арахидоновая кислоты, которые практически не образуют прочные комплексы с Ca^{2+} , не способны индуцировать образование поры в искусственных мембранах, митохондриях и эритроцитах [3, 12, 16, 34, 47].

Помимо Ca^{2+} другие двухвалентные металлы также способны вызывать открытие пальмитат-зависимой поры. В экспериментах на липосомах и эритроцитах было показано, что Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} и др. металлы практически также эффективны в ин-

дукции пальмитат-зависимой поры, как и Ca^{2+} [12, 16]. В то же время, в митохондриях индуцировать открытие липидной поры помимо Ca^{2+} с той же эффективностью может только Sr^{2+} , который способен транспортироваться в митохондрии по Ca^{2+} унипортеру [5, 46]. Это означает, что для индукции поры важно именно комплексобразование анионов жирной кислоты с каким-либо двухвалентным катионом, а для митохондрий необходимо также ещё транспорт этих катионов в матрикс.

Эти исследования позволили предположить общий универсальный механизм образования пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной проницаемости (поры) во всех видах бислоевых мембран.

Механизм образования липидной поры, индуцированной жирными кислотами и Ca^{2+}

Согласно экспериментам, проведенным на липосомах с применением флуоресцентных зондов [12, 13], пальмитиновая кислота и Ca^{2+} индуцируют открытие липидной поры, а механизм образования этой поры связан с хемотропным фазовым переходом в липидном бислое (рис. 2).

Как показано на рис. 2, связывание Ca^{2+} с анионами пальмитиновой кислоты, находящейся в мембране, будет приводить к фазовой сегрегации комплексов ПК/ Ca^{2+} в отдельные твердокристаллические мембранные домены (*стадия 1 n 2*) (рис. 2). Отвердевание жирнокислотных доменов в мембране будет сопровождаться сокращением их площади — за счет того, что упаковка углеводородных цепей в твердо-кристаллической фазе более компактна, чем в жидко-кристаллической фазе [28, 44]. Монослой, в котором произошла сегрегация комплексов пальмитиновой кислоты с Ca^{2+} , окажется растянутым (то есть, в нем возрастет сила латерального натяжения), а противоположный монослой — сжатым (в нем увеличится сила латерального давления). Таким образом, в мембране возникнет межслойный дисбаланс сил латерального давления/натяжения, что приведет

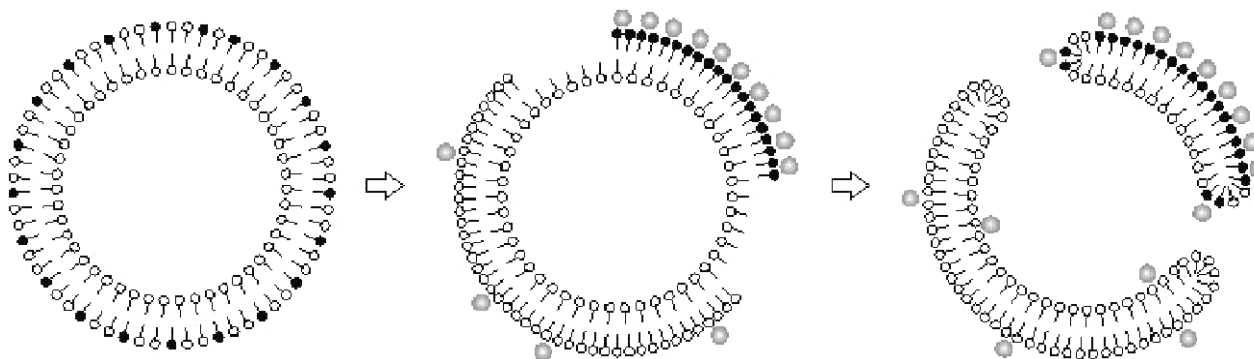


Рис. 2. Механизм образования гидрофильной липидной поры в мембране липосом при хемотропном фазовом переходе (Agafonov et al., 2007)

к разрыву растянутого монослоя (стадия 2). Углеводородные цепи липидов в месте разрыва окажутся экспонированными в водную среду, что термодинамически крайне невыгодно. Поэтому сжатый монослой также разорвется, и края монослоев по периметру разрыва сомкнутся — возникнет гидрофильная липидная пора (стадия 3) [8, 13].

Следует подчеркнуть, что речь здесь идет именно о поре в мембране, а не о разрушении (мицеллизации) липосом, вследствие «детергеноподобного» эффекта пальмитиновой кислоты или ее комплексов с Ca^{2+} . При использовании метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии было продемонстрировано, что после того, как произошло открытие пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры, радиус везикул практически не изменяется, мицеллы не образуются, и целостность мембраны восстанавливается [12].

Следует отметить также, что образование крупных гидрофильных пор в липидном бислое мембран не является редким явлением. Липидные поры могут образовываться в результате осмотического шока (как, например, при гемолизе эритроцитов [41]) электрического пробоя мембран [9, 11], а также при фазовом переходе в липидном бислое [1, 2]. Это предполагает, что липидные поры, такие как митохондриальная пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированная пора, могут принимать участие в ряде клеточных процессах.

*Митохондриальная
пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированная липидная пора:
её свойства и регуляция*

До недавнего времени в биоэнергетике господствовала точка зрения о том, что в митохондриях в присутствии Ca^{2+} и ряда других агентов может быть индуцировано открытие неспецифической поры, известной как Mitochondrial Permeability Transition pore, представляющей собой белковый мегаканал. В состав этого канала входят аденилаттранслокатор, порин, циклофилин D и ряд других мембранных митохондриальных белков [52, 53]. Открытие этой поры ингибировалось циклоспорином А. Способность жирных кислот индуцировать открытие ЦсА-чувствительной МРТ поры известна давно. Их действие объяснялось и протонотормным эффектом, и взаимодействием с основной структурной единицей МРТ — аденилаттранслокатором [19, 51]. Однако влияние жирных кислот всегда наблюдалось на фоне какого-либо из индукторов митохондриальной поры (неорганического фосфата, окислителей и др.), поэтому оценить их собственный вклад в этот процесс было достаточно сложно.

Между тем, как было показано выше, длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты в присутствии Ca^{2+} способны индуцировать образование друго-

го типа пор, имеющих липидную природу, и в их функционировании белковые молекулы не принимали участия [3, 5, 46, 47]. Исходя из механизма образования липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и Ca^{2+} , молекулярные механизмы регуляции этой поры в митохондриальной мембране, а также ее свойства должны значительно различаться с механизмами регуляции и свойствами белковой МРТ поры.

Согласно полученным данным, на открытие митохондриальной липидной поры не влияют модуляторы ЦсА-чувствительной белковой МРТ поры. Как показано на рис. 3, ингибиторы (ЦсА, АДФ, дитиотреитол) и активаторы (атрактилозид, неорганический фосфат, тимеросал) МРТ поры не влияют на набухание митохондрий, индуцированное пальмитатом и Ca^{2+} [5, 7, 46].

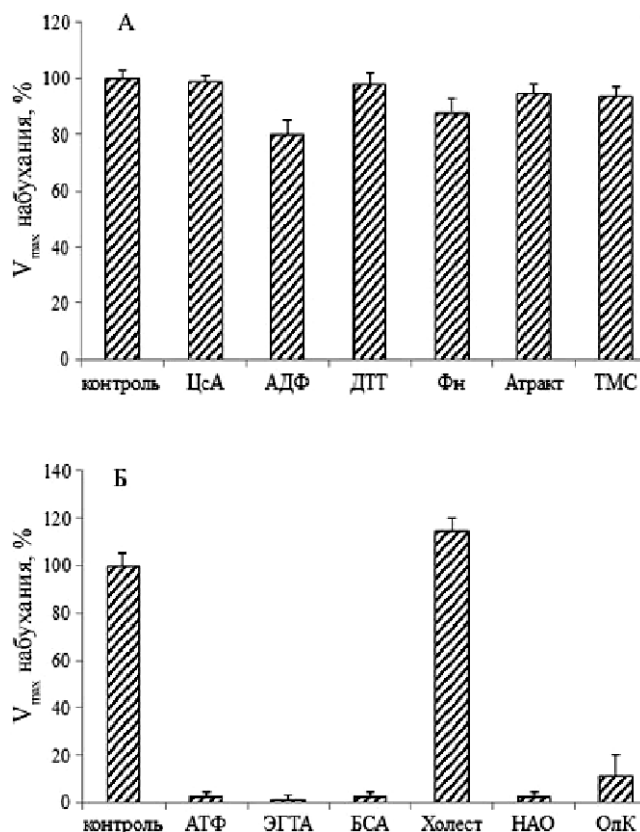


Рис. 3. Влияние различных модуляторов МРТ поры (а) и модуляторов пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры (б) на пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированное набухание митохондрий печени крыс. Набухание индуцировалось 15 мкМ ПК и 30 мкМ Ca^{2+} .

Модуляторы: А — 1 мкМ ЦсА, 3 мМ АДФ, 2 мМ дитиотреитол, 1 мМ неорганический фосфат, 50 мкМ атрактилозид, 50 мкМ тимеросал; Б — 3 мМ АТФ, 1 мМ ЭГТА, 2 мг/мл бычий сывороточный альбумин, холестерин (15 мольных %, концентрация ПК 20 мкМ и 30 мкМ Ca^{2+}), 6 мкМ нонил акридиноый оранжевый, 15 мкМ олеиновая кислота

В то же время, как показано выше, связывание молекул Ca^{2+} и жирной кислоты, а также модификация мембран липидами приводили к изменению вероятности образования пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры в митохондриях [5, 7, 36, 46]. Ненасыщенные жирные кислоты, в отличие от насыщенных, не способны индуцировать образование липидной митохондриальной поры [3, 5, 47]. Это является также отличием липидной поры от МРТ. Было показано, что ЦсА-чувствительную МРТ пору способны индуцировать любые жирные кислоты. В то же время, присутствие в мембране ненасыщенных жирных кислот снижает вероятность открытия в митохондриях липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры [7, 14, 47].

Для открытия пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры во внутренней митохондриальной мембране необходимо присутствие ионов Ca^{2+} в митохондриальном матриксе. Было показано, что ингибиторы митохондриального Ca^{2+} унипортера — рутений красный и лантан, а также деполяризация внутренней митохондриальной мембраны (что препятствует Ca^{2+} транспорту по электрофоретическому Ca^{2+} унипортеру) предотвращают образование липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры [36, 46]. Таким образом, важным фактором для образования поры является энергизация митохондриальной мембраны, которая, обеспечивает создание с матриксной стороны внутренней митохондриальной мембраны благоприятных условий для образования поры (локально-высокие концентрации Ca^{2+} и жирной кислоты). В отличие от этого при индукции МРТ поры благоприятным процессом является деполяризация внутренней митохондриальной мембраны [46].

Стоит еще раз подчеркнуть, что помимо Ca^{2+} , индуцировать образование липидной пальмитат-зависимой митохондриальной поры с той же эффективностью могут Sr^{2+} и гораздо слабее Ba^{2+} — ионы, способные транспортироваться в митохондрии по Ca^{2+} унипортеру. Это свойство липидной поры является еще одним отличием от МРТ поры, открытие которой способен индуцировать только Ca^{2+} [46].

Одно из самых важных свойств липидных пор является их способность самопроизвольно закрываться, «затекать», если их радиус не превышает некоторой критической величины (для жидкокристаллического бислоя — 9 нм); при этом достаточно быстро (доли секунды) целостность мембраны восстанавливается [2]. Этим свойством обладает и пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированная пора, т.е. она является короткоживущей. Было показано, что размер пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры немного больше размера МРТ поры, радиус которой — 2—3 нм. В экспериментах на липосомах и митохондриях было показано, что после открытия липидной поры со временем происходит ее закрытие и целостность мембраны восстанавливается, чего не наблюдается при открытии

МРТ [8, 12, 46]. Существенно, что при открытии липидной поры, в случае дальнейшего добавления ингибитора входа Ca^{2+} в митохондрии (рутеиниевого красного) наблюдается восстановление мембранного потенциала, чего также не наблюдается при открытии МРТ [35, 36]. Способность митохондрий нормально функционировать после открытия-закрытия поры является важной для многих физиологических и патофизиологических процессов, например для индукции апоптоза [31].

Возможность индукции митохондриальной липидной пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой поры в физиологических условиях и при патологиях

Возможность индукции липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры в митохондриях различных тканей целиком зависит от наличия индукторов. Концентрация Ca^{2+} , при которой на выделенных митохондриях печени наблюдается индукция пальмитат-зависимого набухания значительно меньше того количества Ca^{2+} , которое требуется для открытия ЦсА-чувствительной МРТ поры [3, 46, 47]. В то же время, эта концентрация все же выше той, которая устанавливается в клетке даже при патологиях. Однако локально высокие концентрации Ca^{2+} в клетке могут наблюдаться в микродоменах между митохондриями и эндоплазматическим ретикулулом [42], что будет способствовать индукции липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры.

Согласно полученным в нашей лаборатории данным [8], основными свободными жирными кислотами в мембране митохондрий печени крыс являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты, и их процентное молярное содержание среди общих липидов составляет соответственно 6,61, 6,45 и 5,06% (табл. 2). В экспериментах по индукции пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой поры набухание митохондрий печени наблюдалось при добавлении в среду 30 нмоль пальмитиновой кислоты/мг белка [3], что соответствует повышению содержания ПК в мембране примерно на 5% (от общего содержания липидов) [8]. Следовательно, суммарное содержание основных длинноцепочечных насыщенных свободных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой кислот), при котором индуцируется Ca^{2+} -зависимое набухание митохондрий составляет примерно 17—18% (молярных). Следовательно, увеличение концентрации ПК в митохондриальной мембране менее чем в 2 раза приведет к возникновению липидных пор [8].

Таким образом, в норме суммарное содержание длинноцепочечных насыщенных свободных жирных кислот в мембране митохондрий близко к некоему пороговому уровню, выше которого в присутствии Ca^{2+} индуцируется образование липидных пор. Известно, что содержание Ca^{2+} в клетке существенно возрастает при

Состав свободных жирных кислот (СЖК) в мембранах митохондрий [17]

СЖК	Содержание СЖК	
	мкг/мг белка	% (моль/моль) от суммарного количества липидов
14:0	0,89	0,65
16:0	10,14	6,61
16:1 n-9	0,17	0,10
16:1 n-7	0,11	0,06
18:0	10,98	6,45
18:1 n-9	8,47	5,06
18:1 n-7	0,00	0,00
18:2 n-6	3,79	2,25
18:3 n-3	0,21	0,11
20:0	0,40	0,20
20:3 n-6	0,10	0,05
22:0	3,02	1,46
20:4 n-6	0,10	0,05
20:5 n-3	0,28	0,15
24:0	0,14	0,05
22:4 n-6	2,21	1,10
22:5 n-6	0,14	0,06
22:5 n-3	0,12	0,05
22:6 n-3	0,21	0,10

Таблица 3

Содержание свободной и связанной пальмитиновой кислоты (ПК) в клетках линий WENI-164 и С6 [17]

Липиды	ПК в составе липидов (мкг/мкг Р _i)		Свободная ПК в митохондриях (мкг/мг белка)	
	С6	WENI-164	С6	WENI-164
	—	—	7,1	17,5
Фосфатидилхолин	6,1	5,8		
Фосфатидилэтаноламин	1,1	1,7		
Сфингомиелин	4,3	5,4		
Кардиолипин	0,51	4,08		

самых различных патологических и стрессовых ситуациях, что способствует дополнительному повышению содержания свободных жирных кислот в клеточных мембранах — за счет активации фосфолипаз. Следует отметить, что Ca^{2+} , а также и Sr^{2+} , могут активировать митохондриальную фосфолипазу A_2 [26, 43]. Поэтому содержание свободных жирных кислот в клеточных мембранах может существенно возрасти при развитии различных патологических процессов. Безусловно, основным продуктом фосфолипазы A_2 является арахидоновая кислота, которая локализуется в фосфолипиде преимущественно по положению 2. Однако помимо арахидоновой кислоты при перегрузке митохондрий Ca^{2+} или при окислительном стрессе активация фосфолипазы A_2 приводит к накоплению и других жирных кислот, в том числе и насыщенных — пальмитиновой, стеариновой и миристиновой [23, 32, 34, 39, 48]. Это

может происходить вследствие того, что эти жирные кислоты также могут локализоваться во 2 положении фосфолипида [8]. Общеизвестно, что насыщенные жирные кислоты локализуются преимущественно в 1 положении фосфолипидов, но они могут появляться вследствие лизофосфолипидной активности фосфолипазы A_2 [23, 39].

Интересно, что в некоторых клеточных линиях содержание пальмитиновой и стеариновой кислот, находящихся как в свободном, так и связанном состоянии увеличено. Так, в клеточной линии WENI-164, чувствительной к фактору некроза опухолей (то есть, клетки, склонные к апоптозу) наблюдается [35] увеличенное содержание как свободной, так и находящейся в составе фосфолипидов пальмитиновой кислоты по сравнению с клетками линии С6, нечувствительной к фактору некроза опухолей (табл. 3).

Таким образом, возможный механизм образования и функционирования митохондриальной липидной поры при различных патофизиологических условиях может выглядеть следующим образом (рис. 4). При различных стрессовых стимулах избыточное количество Ca^{2+} будет поступать в митохондрии по Ca^{2+} унипортеру. Накопление в митохондриях свободного Ca^{2+} приведет к активации фосфолипазы A_2 и появлению в мембране жирных кислот (в том числе и пальмитиновой). Таким образом, на матричной стороне внутренней митохондриальной мембраны создаются благоприятные условия для образования комплексов Ca^{2+} с жирной кислотой. Как только концентрация комплексов Ca^{2+} с кислотой превысит некоторую критическую величину, начнется процесс фазовой сегрегации этих комплексов, что приведет к образованию липидных пор — по механизму, который уже рассматривался выше.

Кратковременное открытие поры приведет к падению мембранного потенциала и рассеянию всех трансмембранных концентрационных градиентов: через поры будет происходить неспецифическое перераспределение ионов по градиентам (в частности, выход ионов Ca^{2+} и K^+ и вход H^+). Однако, так как целостность мембраны быстро восстанавливается вследствие самопроизвольного закрытия образовавшихся липидных пор (что является принципиальной особенностью этих пор), то мембранный потенциал будет восстанавливаться за счет работы дыхательной цепи. Реполяризация внутренней мембраны митохондрий, в свою очередь, повлечет за собой повторное поглощение органеллами вышедшего из митохондрий Ca^{2+} . Таким образом, закрытие поры приведет цикл к начальному состоянию: митохондрии начнут аккумулировать Ca^{2+} и цикл повторится [7].

Существование подобного Ca^{2+} цикла в митохондриях, когда вход иона осуществляется через Ca^{2+} уни-

портер, а выброс через липидную пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированную пору было продемонстрировано с добавленной пальмитиновой кислотой. Пальмитиновая кислота в присутствии Ca^{2+} вызывала падение мембранного потенциала и выброс Ca^{2+} из митохондрий. При этом предотвращение входа Ca^{2+} (рутием красным или лантаном) в митохондрии вызывало реполяризацию митохондриальной мембраны и остановку выброса из митохондрий Ca^{2+} вследствие невозможности образования новых пальмитат/ Ca^{2+} комплексов и, соответственно, липидной поры [7, 36].

Вполне возможно, что активация подобной рециклизации Ca^{2+} через митохондриальную мембрану, когда вход Ca^{2+} опосредуется Ca^{2+} унипортером, а выброс иона происходит через открытые липидные поры, может являться для клетки как защитным, так и повреждающим механизмом. Так, было показано, что с возрастом происходит увеличение чувствительности митохондрий печени крыс к индукторам липидной поры — пальмитиновой кислоте и Ca^{2+} [7, 15]. Это увеличение чувствительности наряду с известным свойством пальмитиновой кислоты индуцировать апоптоз [45] может свидетельствовать о причастности липидной пальмитат-зависимой поры к механизмам внутриклеточного старения.

С другой стороны, было показано, что у животных, отличающихся по чувствительности к гипоксии, которая закрепленной генетически, индукция митохондриальной липидной поры происходит по-разному. Показано, что митохондрии печени высокоустойчивых к гипоксии животных более чувствительны к индукторам поры — пальмитиновой кислоте и Ca^{2+} , по сравнению с митохондриями, выделенными из печени низкоустойчивых животных. Можно предположить, что индукция поры, и активация циклизации Ca^{2+} через внутреннюю мембрану в случае с митохондриями высокоустойчивых животных будет приводить к слабому или

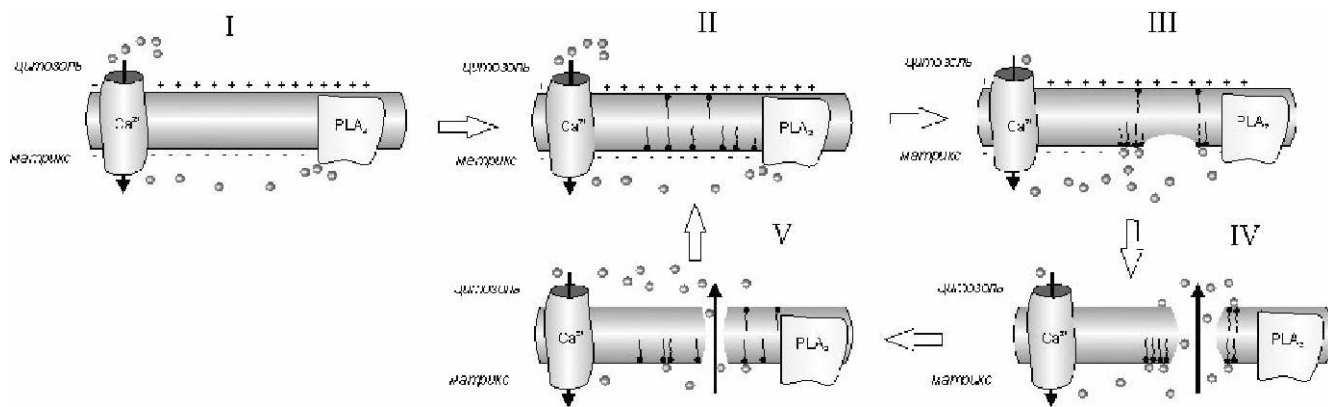


Рис. 4. Возможный механизм образования липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры в митохондриях при активации фосфолипазы A_2 , объяснения в тексте

умеренному разобщению и таким образом предупреждению образования активных форм кислорода (АФК) при гипоксии. В то же время индукция поры в митохондриях низкоустойчивых к гипоксии животных будет способствовать повреждению митохондрий и запуску клеточной гибели. Это подтверждается экспериментами по образованию в этих состояниях АФК митохондриями. Показано, что индукция липидной поры в митохондриях высокоустойчивых животных снижала скорость образования активных форм кислорода, а в митохондриях низкоустойчивых к гипоксии животных скорость образования АФК при индукции поры увеличивалась [7, 15].

Возможное участие митохондриальной липидной пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой поры в глутамат-индуцированной деградации нервных клеток

С открытием в митохондриальной мембране липидной поры мы связываем также нарушения Ca^{2+} гомеостаза и функции митохондрий при продолжительной стимуляции нейронов центральной нервной системы глутаматом [29]. Механизм отсроченной Ca^{2+} дисрегуляции (ОКД) и мембранной деполяризации (МД) при перегрузке клеток глутаматом до сих пор не ясен. Не определены и факторы, предупреждающие ОКД и МД. Первоначально исследователи полагали, что ОКД и МД являются необратимыми процессами [20]. Однако было показано, что эти процессы могут быть обратимыми и их развитие, по крайней мере, на первых этапах, может подавляться блокаторами NMDA-каналов или хелатированием Ca^{2+} в инкубационной среде [29]. Увеличение ионной проводимости внутренней митохондриальной мембраны при развитии ОКД и МД трудно связать с открыванием МРТ поры, поскольку замена в инкубационной среде Ca^{2+} на Sr^{2+} , который, в отличие от Ca^{2+} , не способен открывать МРТ пору [17], а также присутствие ЦсА не препятствуют возникновению глутамат-индуцированного процесса деградации нервных клеток [18, 50]. Все эти факты побудили нас совместно с группой Б.И. Ходорова к поиску альтернативных механизмов Ca^{2+} -зависимой МД [10].

Было предположено, что увеличение в цитоплазме нервных клеток, а вслед за этим и в митохондриях свободного Ca^{2+} при глутаматной перегрузке, должно привести к активации фосфолипазы A_2 (PLA_2) и появлению жирных кислот, в том числе Ca^{2+} -связывающих, которые способствуют открытию липидной поры. Для проверки этого предположения на суспензии митохондрий мозга и печени крысы были выполнены исследования, имитирующие нагрузку митохондрий Ca^{2+} , в условиях предотвращающих возникновение циклоспорин А-чувствительной неспеци-

ческой мегапоры (МРТ). Эти исследования показали, что перегрузка митохондрий суррогатом кальция — стронцием приводит к выбросу из них Sr^{2+} , защелачиванию среды, снижению трансмембранного потенциала (рис. 5) и набуханию митохондрий [10]. Всё это свидетельствует о появлении неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий, обусловленной, вероятно, активацией фосфолипазы A_2 ионами Sr^{2+} (Ca^{2+}).

Подтверждение этого предположения получено в экспериментах с ингибиторами $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -зависимой PLA_2 , которые подавляли перечисленные эффекты Sr^{2+} [10]. Установлено, что преинкубация митохондрий мозга с ингибитором $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -зависимой PLA_2 арахидоилтрифторметил кетон (AACOCF₃, 14 мкМ) приводит к снижению выброса ионов Sr^{2+} из митохондрий, ослаблению развития деполяризации мембраны и гораздо меньшему защелачиванию среды, наблюдаемых после последней добавки Sr^{2+} (рис. 5). Следовательно, AACOCF₃ предупреждал развитие

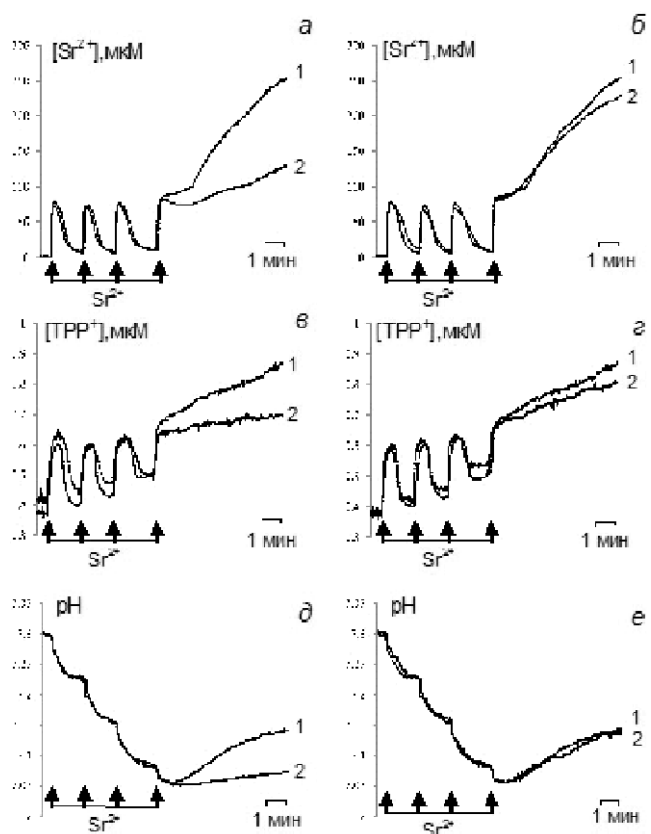


Рис. 5. Влияние ингибиторов Ca^{2+} -зависимой PLA_2 — AAC(O)CF₃, 14 мкМ (а, в, д) и Ca^{2+} -независимой PLA_2 — PalC(O)CF₃, 10 мкМ (б, г, е) на Sr^{2+} -индуцируемое циклоспорин А-нечувствительное открытие поры в митохондриях печени крысы: 1 — контроль; 2 — в присутствии ингибитора. Добавки: Sr^{2+} — 200 нмоль/мг белка (Миронова и др., 2011)

неспецифической проницаемости митохондрий. Подобные результаты были получены и с другими ингибиторами Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 , 4-(4-октадецилфенил) оксобутеновой кислотой (ОВАА), аристороховой кислотой, трифторперазином как на митохондриях мозга, так и на митохондриях печени [10].

Следует отметить, что ингибиторы Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 — броменол лактон (BEL) и пальмитилтрифторметил кетон (РАСОСФ₃), в отличие от ингибиторов Ca^{2+} -зависимой PLA_2 , не предупреждали появления неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны (рис. 5). В то же время, бычий сывороточный альбумин, который часто используют для связывания свободных жирных кислот, также предупреждал появление неспецифической проводимости мембраны.

Из полученных данных следует, что ионы Sr^{2+} вызывают активацию Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 , что приводит к появлению в митохондриальной мембране Ca^{2+} -связывающих жирных кислот, и как следствие, появлению неспецифической циклопорин А-нечувствительной проницаемости митохондриальной мембраны.

Ингибиторы Ca^{2+} -зависимой PLA_2 подавляли также глутамат-индуцированные изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в нервных клетках [10]. При добавлении глутамата (Glu) к культуре гранулярных нейронов мозжечка происходило небольшое скачкообразное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, переходящее в умеренное плато (рис. 6). Продолжительное действие высоких концентраций Glu вызывало вторичное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Предварительная инкубация культуры нейронов с ингибитором PLA_2 арахидоилтрифторметил кетоном (AACOCF₃, 10 мкМ) и последующее его присутствие во время действия Glu, отодвигали наступление ОКД. Аналогичным эффектом обладал и другой ингибитор PLA_2 — ОВАА. Из графиков усредненных $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ответов на Glu видно, что увеличение латентного периода ОКД проявляется в уменьшении наклона графика изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в присутствии AACOCF₃ по сравнению с действием одного только Glu (рис. 6). Ингибиторы PLA_2 подавляли также и глутамат-индуцированные изменения $\Delta\Psi_m$ в культивированных нейронах мозжечка [10].

Исходя из имеющихся данных, мы полагаем, что начальная обратимая стадия ОКД и МД в нервных

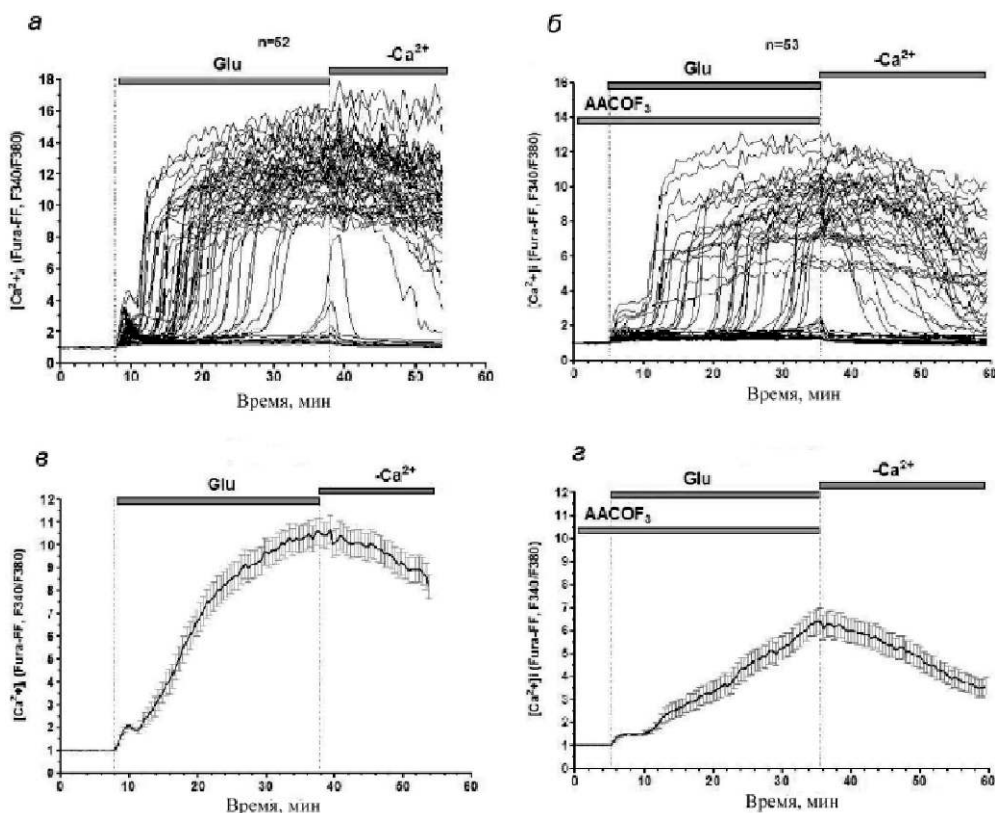


Рис. 6. Ингибирование фосфолипазы A_2 увеличивает латентный период отсроченной кальциевой дисрегуляции в гранулярных нейронах мозжечка крысы. Графики изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в индивидуальных нейронах (а, б) и усредненные изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ этих же нейронов (в, г), индуцированные одним глутаматом (Glu, 100 мкМ) (а, в) и Glu в присутствии ингибитора фосфолипазы A_2 арахидоилтрифторметил кетона (10 мкМ AACOCF₃) (б, г). (Миронова и др., 2011)

клетках при их перегрузке глутаматом, может быть обусловлена открытием в митохондриях липидной пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой поры.

Как известно, при продолжительной стимуляции NMDA рецепторов глутаматом наблюдается поступление в клетку избыточного количества Ca^{2+} . Это, в свою очередь, приведет к появлению в матриксе митохондрий свободного Ca^{2+} , что сопровождается активацией Ca^{2+} -зависимой PLA_2 и накоплением в матриксе митохондрий жирных кислот. Как уже отмечалось выше, несмотря на то, что ненасыщенная арахидоновая кислота является основным продуктом действия фосфолипазы A_2 , при активации фосфолипазы A_2 наблюдается также увеличение свободных насыщенных жирных кислот. Насыщенные жирные кислоты, и в первую очередь пальмитиновая, будут формировать во внутренней мембране митохондрий $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -зависимые короткоживущие поры, способствующие выбросу иона из митохондрий, падению $\Delta\Psi$ и рН-градиента между матриксом и внешним окружением митохондрий, а также набуханию митохондрий [35, 46].

Следует заметить, что арахидоновая кислота не способна вызывать открытие короткоживущей липидной поры [47]. Тем не менее, нельзя исключить дополнительного эффекта арахидоновой кислоты в развитии ОКД, особенно на её необратимой стадии.

Как было сказано выше, развитие глутамат-индуцированной ОКД и МД в конечном счете приведет к гибели клетки. Причиной этого может быть выброс проапоптотических белков (цитохром с, апоптоз-индуцирующий фактор (АИФ), Smac/Diablo) из митохондрий, которые запускают каскад апоптотических ферментов [21, 22, 29].

Известно, что пальмитиновая кислота является природным индуктором апоптоза. Её добавление к культуре клеток приводит к выбросу в цитоплазму митохондриальных проапоптотических белков [20], который может быть осуществлен при открытии в митохондриях липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры. Было показано, что при открытии этой поры происходит выход из органелл цитохрома с и АИФ [4, 5, 7, 15, 15]. Вполне вероятно, что открытие липидной поры в митохондриях нейронов при глутамат-индуцированной Ca^{2+} дисрегуляции будет приводить к включению апоптотических сигналов и развитию пальмитат-индуцированного апоптоза. Участие митохондриальной липидной пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры в пальмитат-индуцированном апоптозе выглядит привлекательным еще и потому, что, как уже обсуждалось выше, липидная пора является короткоживущей [35, 46], т.е. способна закрываться, и таким образом практически не нарушается основная митохондриальная функция — синтез АТФ, что необходимо для развития апоптоза.

На основании данных, полученных на выделенных митохондриях и первичной культуре гранулярных клеток мозжечка крысы, мы полагаем, что ОКД и МД, развивающиеся в нейронах при длительном действии глутамата, могут быть обусловлены открытием в митохондриальной мембране пальмитат/ Ca^{2+} активируемой поры, по крайней мере в начальной фазе развития ОКД. На следующих стадиях это может вызвать развитие апоптоза и некроза в нервных клетках.

Работа поддержана грантами РФФИ (09-04-01024-а, 10-04-00920-а, 12-04-00430-а), ДПННУТ (4.3010.2011) и грантом президента Российской Федерации для молодых кандидатов наук (МК-145.2012.4).

Список литературы

1. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. — М.: Наука, 1992.
2. Антонов В.Ф., Шевченко Е.В. Липидные поры и стабильность клеточных мембран // Вестн. РАМН. — 1995. — 10. — С. 48—55.
3. Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Возможный механизм образования и регуляции пальмитат-индуцированной циклоспорин А-нечувствительной митохондриальной поры // Биохимия. — 2005. — 70. — С. 987—994.
4. Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Роль митохондриальной пальмитат/ Ca^{2+} -активируемой поры в пальмитат-индуцируемом апоптозе // Биофизика. — 2008. — 6. — С. 6—11.
5. Белослудцев К.Н., Миронова Г.Д. Митохондриальная пальмитат/кальций-индуцированная пора: свойства и возможная роль в активации апоптоза. — LAP Lambert academic publishing, Saarbrücken, 2011.
6. Белослудцева Н.В., Белослудцев К.Н., Агафонов А.В., Миронова Г.Д. Влияние холестерина на образование в митохондриях и липосомах пальмитат/ Ca^{2+} -активируемой поры // Биофизика. — 2009. — 54(3). — С. 464—470.
7. Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Митохондриальная липидная пора, индуцированная пальмитатом и кальцием: свойства и физиологические аспекты функционирования. — LAP Lambert academic publishing, Saarbrücken, 2011.
8. Гриценко Е.Н., Миронова Г.Д. Пермеабиллизация мембран при связывании кальция с жирными кислотами: физико-химический механизм и возможность его реализации в митохондриальной мембране. — LAP Lambert academic publishing, Saarbrücken, 2011.
9. Лейкин С.Л., Глазер Р.В., Черномордик Л.В. Механизм образования пор при электрическом пробое мембран // Биологические мембраны. — 1986. — С. 944—951.
10. Миронова Г.Д., Белослудцев К.Н., Сурин А.М. и др. Митохондриальная липидная пора в механизме глутамат-индуцируемой кальциевой дисрегуляции нейронов мозга // Биологические мембраны. — 2011. — 28(6). — С. 483—494.

11. **Чизмаджев Ю.А., Черномордик Л.В., Пастушенко В.Ф., Абидор И.Г.** Электрический пробой бислоиных липидных мембран // ВИНТИ. — 1982. — С. 161–266.
12. **Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K.** et al. A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca^{2+} /palmitic acid complexes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — 1609, 2. — P. 153–160.
13. **Agafonov A.V., Gritsenko E.N., Shlyapnikova E.N.** et al. Ca^{2+} -induced phase separation in the membrane of palmitate-containing liposomes and its possible relation to membrane permeabilization // *J. Membr. Biol.* — 2007. — 215 (1). — P. 57–68.
14. **Belosludtsev K.N., Saris N.-E.L., Andersson L.C.** et al. On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and Ca^{2+} in mitochondria // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2006. — 38. — P. 113–120.
15. **Belosludtsev K.N., Saris N.E., Belosludtseva N.V.** et al. 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 // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2009. — 41. — P. 395–401.
16. **Belosludtsev K.N., Trudovishnikov A.S., Belosludtseva N.V.** et al. 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 // *J. Membr. Biol.* — 2010. — 237(1). — P. 9–13.
17. **Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev.* — 1999. — 79. — P. 1127–1155.
18. **Bolshakov A.P., Mikhaylova M.M., Szabadkai G.** et al. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca^{2+} deregulation // *Cell Calcium.* — 2008. — 43. — P. 602–614.
19. **Bodrova M., Dedukhova V., Samartsev V., Mokhova E.** Role of the ADP/ATP antiporter in fatty acid-induced uncoupling of Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria // *IUBMB Life.* — 2000. — 50. — P. 189–194.
20. **Budd S.L., Nicholls D.G.** Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells // *J. Neurochem.* — 1996. — 67. — P. 2282–2291.
21. **Choi D.W., Rothman S.M.** The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death // *Annu. Rev. Neurosci.* — 1990. — 13. — P. 171–182.
22. **Crompton M.** Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // *J. Physiol.* — 2000. — 529. — P. 11–21.
23. **De Carvalho M.G.S., Garritano J., Leslie C.C.** Regulation of lysophospholipase activity of the 85-kDa phospholipase A_2 and activation in mouse peritoneal macrophages // *J. Biol. Chem.* — 1995. — 270. — P. 20439–20446.
24. **Duchen M.R.** Mitochondria and Ca^{2+} in cell physiology and pathophysiology // *Cell Calcium.* — 2000. — 28. — P. 339–348.
25. **Fleck M.W., Henze D.A., Barrionuevo G., Palmer A.M.** Aspartate and glutamate mediate synaptic transmission in area C1A of the hippocampus // *J. Neurosci.* — 1993. — 13(9). — P. 3944–3955.
26. **Gadd M.E., Broekemeier K.M., Crouser E.D.** et al. Mitochondrial iPLA $_2$ activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition // *J. Biol. Chem.* — 2006. — 281(11). — P. 6931–6939.
27. **Gateau-Roesch O., Pavlov E., Lazareva A.V.** et al. Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2000. — 32. — P. 105–110.
28. **Jacobson K., Papahadjopoulos D.** Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations // *Biochemistry.* — 1975. — 14. — P. 152–161.
29. **Khodorov B.** Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2004. — 86 (2). — P. 279–351.
30. **Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T.** et al. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury // *Mol. Cell. Biochem.* — 1997. — 174. — P. 159–165.
31. **Liu X., Kim C., Yang J.** et al. Induction of apoptosis program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c // *Cell.* — 1996. — 86. — P. 147–157.
32. **Loo R.W., Conde-Frieboes K., Reynolds L.J., Dennis E.A.** Activation, inhibition and regiospecificity of the lysophospholipase activity of the 85-kDa group IV cytosolic phospholipase A_2 // *J. Biol. Chem.* — 1997. — 272. — P. 19214–19219.
33. **Mironova G.D., Lazareva A., Gateau-Roesch O.** et al. Oscillating Ca^{2+} -induced channel activity obtained in BLM with a mitochondrial membrane component // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 1997. — 29, 6. — P. 561–569.
34. **Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C.** et al. 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 // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2001. — 33. — P. 319–331.
35. **Mironova G.D., Gritsenko E., Gateau-Roesch O.** et al. Formation of Palmitic Acid/ Ca^{2+} Complexes in the Mitochondrial Membrane: A Possible Role in the Cyclosporin-Insensitive Permeability Transition // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2004. — 36. — P. 171–178.
36. **Mironova G.D., Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V.** et al. Mitochondrial Ca^{2+} cycle mediated by the palmitate-activated cyclosporin A-insensitive pore // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2007. — 39. — P. 167–174.
37. **Nicholls D.G., Budd S.L.** Mitochondria and neuronal survival // *Physiol. Rev.* — 2000. — 80 (1). — P. 315–360.
38. **Olney J.W.** Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate // *Science.* — 1969. — 1646. — P. 719–721.
39. **Pilitis J.G., Diaz F.G., O'Regan M.H., Phillis J.W.** Differential effects of phospholipase inhibitors on free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury // *Brain Res.* — 2002. — 951. — P. 96–106.
40. **Pinelis V.G., Tuhbatova G., Surin A.** et al. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. — Chicago, IL, October 17–21, 2009. — P. 212.
41. **Rand R.P.** Mechanical Properties of the Red Cell Membrane. II. Viscoelastic Breakdown of the Membrane // *Biophys. J.* — 1964. — 17. — P. 303–316.
42. **Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T.** Microdomains with high Ca^{2+} concentration that are sensed by neighboring mitochondria // *Science.* — 1993. — 262. — P. 744–747.
43. **Saris N.-E.L.** Stimulation of phospholipase A_2 activity in mitochondria by magnesium and polyamines // *Magnesium Res.* — 1994. — 7. — P. 5–10.
44. **Schmidt G., Knoll W.** Densitometric characterization of aqueous lipid dispersions // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* — 1985. — 89. — P. 36–43.
45. **Sparagna G., Hickson-Bick D., Buja L., McMillin J.** A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2000. — 279. — P. 2124–2132.

46. **Sultan A., Sokolove P.** Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane // Arch. Biochem. Biophys. — 2001a. — 386. — P. 31–51.

47. **Sultan A., Sokolove P.** Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview // Arch. Biochem. Biophys. — 2001b. — 386. — P. 52–61.

48. **Thorne T.E., Voelkel-Johnson C., Casey W.M.** et al. The activity of cytosolic phospholipase A₂ is required for the lysis of adenovirus-infected cells by tumor necrosis factor // J. Virology. — 1996. — 70. — P. 8502–8507.

49. **Vergun O., Reynolds I.J.** Fluctuations in mitochondrial membrane potential in single isolated brain mitochondria: modulation by adenine nucleotides and Ca²⁺ // Biophys. J. — 2004. — 87 (5). — P. 3585–3593.

50. **Wabnitz A.V., Storozhevyykh T.P., Selinova Y.E.** et al. The permeability pore is not a prerequisite for Glutamate-induced calcium deregulation and mitochondrial depolarization in brain neurons // Biol. Membr. (Russian). — 2005. — 22 (4). — P. 347–350.

51. **Wieckowski M., Wojtczak L.** Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore // FEBS Lett. — 1998. — 423. — P. 339–342.

52. **Zoratti M., Szabo I.** Mitochondrial permeability transition // Biochim. Biophys. Acta. — 1995. — 1241. — P. 139–176.

53. **Zoratti M., Szabo I., De Marchi U.** Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — 1706. — P. 40–52.

Поступила 21.03.12

Сведения об авторах:

Миронова Галина Дмитриевна, д-р биол. наук, проф., засл. деят. науки РФ, зав. лаб. митохондриального транспорта ФГУН ИТЭБ РАН, проф. ФГБОУ ВПО «ПущГЕНИ»