

УДК 577.352.4

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ПАЛЬМИТИНОВОЙ И $\omega$ -ГИДРОКСИПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТ КАК ИНДУКТОРОВ $\text{Ca}^{2+}$ -ЗАВИСИМОЙ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ

© 2019 г. М.В. Дубинин\*, В.Н. Самарцев\*, А.Е. Степанова\*, А.А. Семенова\*,  
Е.И. Хорошавина\*, К.Н. Белослудцев\*, \*\*

\*Марийский государственный университет, 424000, Йошкар-Ола, площадь Ленина, 1

\*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Институтская ул., 3

E-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 09.07.2019 г.

Принята к публикации 003.09.2019 г.

На энергизованных путем окисления сукцината изолированных митохондриях печени крыс и лецитиновых липосомах исследовано действие  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислоты как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации мембран. Такие  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые эффекты  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислоты на митохондрии и липосомы сравнены с аналогичными хорошо изученными эффектами пальмитиновой кислоты. Установлено, что в присутствии циклоспорина А  $\omega$ -гидроксипальмитиновая кислота вызывает существенно более интенсивное набухание митохондрий, чем пальмитиновая кислота и, таким образом, является более эффективным индуктором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой циклоспорин А-нечувствительной пермеабилзации внутренней мембраны органелл. Вместе с тем  $\omega$ -гидроксипальмитиновая кислота как индуктор  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого выхода сульфородамина В из липосом значительно уступает в эффективности пальмитиновой кислоте. Показано, что в отличие от пальмитиновой кислоты, действие  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислоты как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях печени полностью блокируется неорганическим фосфатом в присутствии циклоспорина А. Выяснено, что в этом случае неорганический фосфат не может быть заменен близким по свойству проникающим анионом – ванадатом. Полученные данные рассматриваются как свидетельство того, что  $\omega$ -гидроксипальмитиновая и пальмитиновая кислоты как индукторы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации митохондрий печени существенно отличаются по механизму действия. Если  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый эффект пальмитиновой кислоты можно рассматривать как формирование липидной поры, то  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый эффект  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислоты в присутствии неорганического фосфата – формирование циклоспорин А-чувствительной митохондриальной поры. Обсуждается действие неорганического фосфата как блокатора индуцируемой  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислотой  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой циклоспорин А-чувствительной поры в митохондриях печени.

*Ключевые слова:* митохондриальная пора,  $\omega$ -гидроксипальмитиновая кислота, пальмитиновая кислота, циклоспорин А, ионы кальция, неорганический фосфат.

DOI: 10.1134/S0006302919060103

Одним из связанных с митохондриями звеньев в сложном механизме гибели клеток является индукция кальций-зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны – формирование митохондриальных пор. Это в свою очередь приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также к выходу из межмембранного пространства в цитоплазму так называемых апопто-

генных белков: цитохрома с, индуцирующего апоптоз фактора, эндонуклеазы G и др. [1, 2].

Известны различные гипотезы о механизме формирования митохондриальной поры. В настоящее время широкое распространение получила гипотеза о том, что основной структурной единицей митохондриальной поры является  $\text{F}_0\text{F}_1$ -АТФ-синтаза, другие белки митохондрий: АДФ/АТФ-антипортер, переносчик фосфата, циклофилин D выступают в качестве белковых модуляторов поры [2–6]. Циклоспорин А (ЦсА),

Сокращения: ЦсА – циклоспорин А, ГПК –  $\omega$ -гидроксипальмитиновая.

специфический блокатор такой «классической» поры, связываясь на внутренней поверхности внутренней мембраны с циклофилином D, снижает чувствительность митохондрий к  $\text{Ca}^{2+}$  как к индуктору поры [1–8]. Эффективным физиологическим модулятором поры является неорганический фосфат ( $\text{P}_i$ ). Хорошо установлено, что  $\text{P}_i$ , так же как и его химические аналоги арсенат и ванадат, повышает чувствительность митохондрий к  $\text{Ca}^{2+}$  как к индуктору поры [9]. Наряду с этим  $\text{P}_i$  усиливает эффект ЦсА как блокатора поры [9]. В последнем случае  $\text{P}_i$  не может быть заменен близкими по свойствам проникающими анионами арсенатом и ванадатом [9]. Было предположено существование на внутренней поверхности внутренней мембраны регуляторного сайта, связывание с которым  $\text{P}_i$  сопровождается ингибированием поры и который в отсутствие ЦсА замаскирован циклофилином D [9].

Одними из эффективных индукторов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях животных являются свободные монокарбоновые жирные кислоты [10–13]. Известно, что индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий пальмитиновой и другими насыщенными жирными кислотами не подавляется ЦсА [11–13]. Установлено, что такие жирные кислоты в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  способны эффективно индуцировать неспецифическую проницаемость как искусственных мембран, так и плазматической мембраны эритроцитов [12–15]. В основе механизма индукции такой проницаемости может лежать образование липидных пор при формировании комплексов жирных кислот и  $\text{Ca}^{2+}$  по механизму хемотропного фазового перехода [12–16].

Одним из путей метаболизма монокарбоновых жирных кислот у млекопитающих и человека является их  $\omega$ -окисление, происходящее, главным образом, в клетках печени и почек и приводящее к образованию соответствующих  $\omega$ -гидроксикарбоновых кислот [17,18]. Так, в процессе  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты в качестве первичного продукта образуется  $\omega$ -гидроксипальмитиновая кислота (ГПК). Накопление этой кислоты в крови и клетках пациентов наблюдается при различных патологических состояниях, связанных с нарушением липидного обмена [18].

Недавно нами было установлено, что в присутствии ионов кальция ГПК способна индуцировать слияние и/или агрегацию мембран лецитиновых липосом. Предположено, что этот механизм лежит в основе  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой агрегации эритроцитов, индуцируемой ГПК [15]. ГПК в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  также индуцирует агрегацию митохондрий печени, которая сопровождается выходом цитохрома *c* из органелл и ЦсА-нечув-

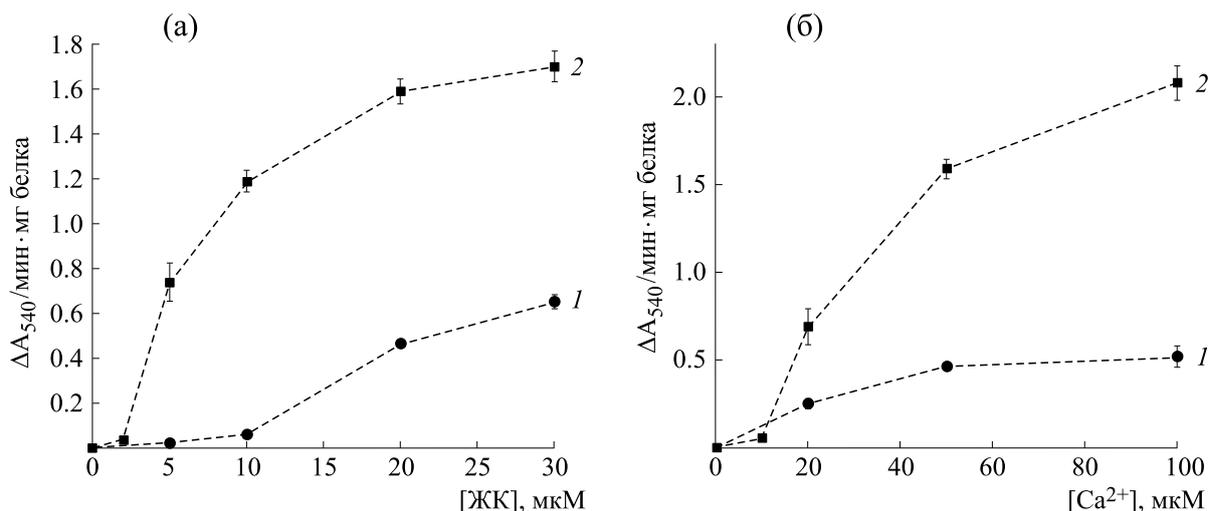
ствительной пермеабиллизацией внутренней мембраны [19].

Остается неизвестным механизм действия ГПК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий. Необходимы дальнейшие исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых эффектов ГПК как на изолированных митохондриях печени, так и на липосомах. При проведении исследований такие  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые эффекты ГПК на митохондрии и липосомы целесообразно сравнить с аналогичными хорошо изученными эффектами пальмитиновой кислоты от которой ГПК отличается только наличием гидроксильной группы в  $\omega$ -положении. Полученные данные рассматриваются как свидетельство того, что ГПК и пальмитиновая кислота, как индукторы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации митохондрий печени, существенно отличаются по механизму действия. Если  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый эффект пальмитиновой кислоты можно рассматривать как формирование липидной поры, то  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый эффект ГПК в присутствии  $\text{P}_i$  – как формирование «классической» ЦсА-чувствительной поры.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии из печени белых половозрелых крыс-самцов массой 210–250 г выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина в соответствии с методикой, описанной в работе [20]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-трис, pH 7,4. Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (60–70 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду в узкой пластиковой пробирке.

Изменение оптической плотности суспензии митохондрий регистрировали при длине волны 540 нм на спектрометре «FLAME-T-UV-VIS» (Ocean Optics, США). Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для  $\text{Ca}^{2+}$  определяли с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -селективного электрода. Разность электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью тетрафенилфосфоний-чувствительного электрода. Изменения концентраций тетрафенилфосфония и  $\text{Ca}^{2+}$  в среде регистрировали одновременно с помощью оригинальной многоканальной электрометрической системы Record 4usb в кювете объемом



**Рис. 1.** Зависимости скорости изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени от концентрации добавляемой жирной кислоты (а) и хлорида кальция (б). Добавки на рис. (а): пальмитиновая кислота (1) и ГПК (2) в указанных концентрациях. Добавки на рис. (б): 30  $\mu\text{M}$  пальмитиновой кислоты (1), 30  $\mu\text{M}$  ГПК (2), хлорид кальция — в указанных концентрациях. Концентрация митохондриального белка в ячейке — 0,4 мг/мл. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ), в некоторых случаях значения стандартной ошибки среднего не превышают размера указанных на рисунке символов.

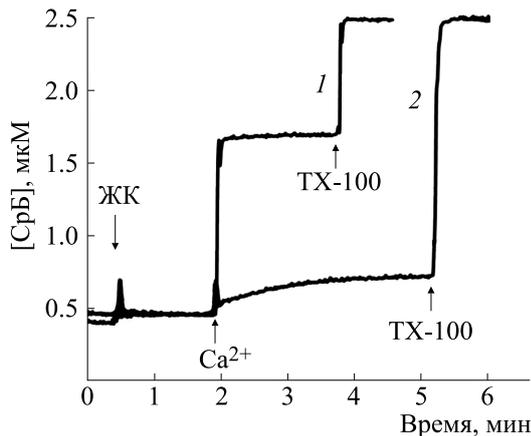
1,2 мл при 25°C при постоянной аэрации и перемешивании. Среда инкубации митохондрий содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ КСl, 20  $\mu\text{M}$  EGTA, 5 мМ янтарной кислоты и 10 мМ MOPS-трис (рН 7,4). Большие однослойные липосомы, нагруженные сульфородаминем Б, формировали из лецитина методом экструзии в соответствии с описанной ранее методикой [19]. Выход сульфородамина Б из липосом определяли по увеличению интенсивности флуоресценции вследствие диссоциации димеров сульфородамина Б после разбавления красителя во внешней среде [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**ГПК индуцирует Ca<sup>2+</sup>-зависимую ЦсА-нечувствительную неспецифическую пермеабиллизацию митохондрий печени более эффективно, чем пальмитиновая кислота.** Хорошо установлено, что формирование как ЦсА-чувствительной, так и нечувствительной пор во внутренней мембране митохондрий сопровождается высокоамплитудным набуханием этих органелл, инкубируемых в сахарозной среде [10–12,19,21]. Набухание митохондрий приводит к уменьшению рассеивания проходящего через суспензию митохондрий света, и это может быть зарегистрировано как снижение оптической плотности этой суспензии [10–12,19,21]. Как показано нами ранее [19] и подтверждено в настоящей работе (данные не приведены), ГПК, так же как и пальмитиновая кислота, вызывает значительное снижению оптической плотности суспензии в отсутствие и в при-

сутствии ЦсА, что также свидетельствует о высокоамплитудном набухании этих органелл. Было также установлено [19] и подтверждено в настоящей работе (данные не приведены), что ГПК так же эффективно, как и пальмитиновая кислота, индуцирует быстрый выход Ca<sup>2+</sup> из матрикса митохондрий и полное падение  $\Delta\psi$  в отсутствие и в присутствии ЦсА. Эти данные рассматриваются как свидетельство того, что ГПК, так же как и пальмитиновая кислота, способна индуцировать Ca<sup>2+</sup>-зависимую ЦсА-нечувствительную пору в митохондриях печени [19].

Для сравнения эффектов пальмитиновой кислоты и ГПК была исследована зависимость скорости набухания митохондрий от концентраций этих жирных кислот и хлорида кальция. Установлено, что в митохондриях, нагруженных хлоридом кальция (50  $\mu\text{M}$ ), эффект ГПК как индуктора ЦсА-нечувствительной пермеабиллизации проявляется уже при концентрации 5  $\mu\text{M}$  и достигает максимального значения при концентрации 30  $\mu\text{M}$ , в то время как пальмитиновая кислота значительно менее эффективна (рис. 1а). Концентрация добавляемого хлорида кальция, при которой наблюдаются максимальные эффекты 20  $\mu\text{M}$  жирных кислот, составляет 50  $\mu\text{M}$  (рис. 1б). В присутствии ЦсА ГПК более интенсивно индуцирует набухание митохондрий печени, чем пальмитиновая кислота при различных концентрациях хлорида кальция (рис. 1б). Следовательно, ГПК как индуктор Ca<sup>2+</sup>-зависимой ЦсА-нечувствительной поры в митохондриях пе-

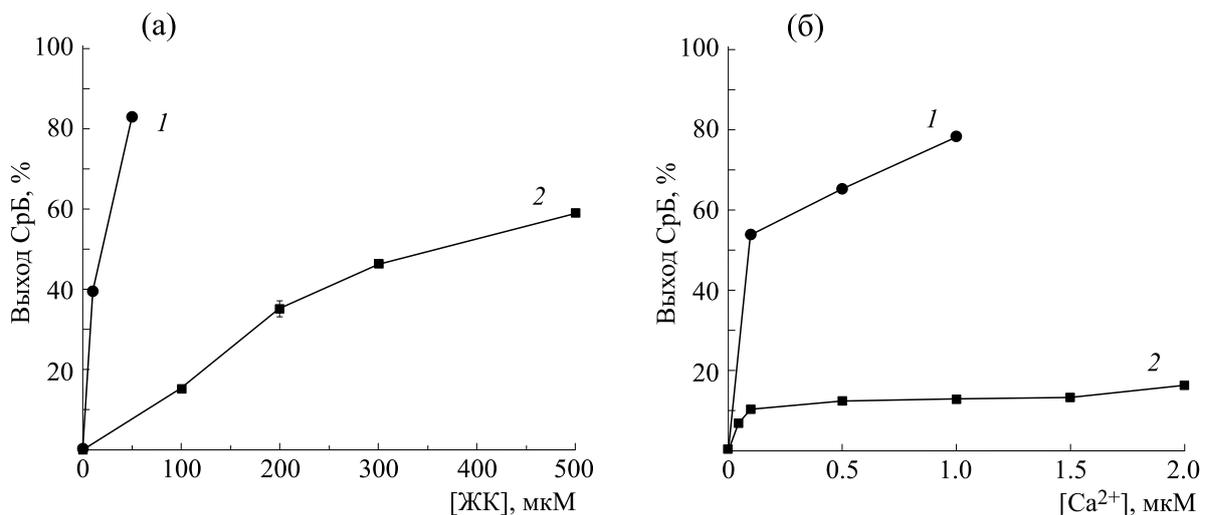


**Рис. 2.** Выход сульфородамина Б из однослойных липосом, индуцированный пальмитиновой кислотой в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  (1) и ГПК в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  (2). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Добавки: 50 мкМ пальмитиновой кислоты, 50 мкМ ГПК, 1 мМ хлорида кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), 0,1% тритона X-100 (ТХ-100). Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате липосом. Аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах.

чени более эффективна, чем пальмитиновая кислота.

**ГПК в отличие от пальмитиновой кислоты слабо индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выход сульфородамина Б из липосом.** Во введении уже отмечалось, что пальмитиновая кислота в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  способна индуцировать проницаемость искусствен-

ных мембранных систем — липосом для флуоресцентного зонда сульфородамина Б [12,13,16]. Эти данные легли в основу концепции липидной поры, сформированной в липидном бислое по механизму хемотропного фазового перехода [12,13,16]. Как установлено в настоящей работе (рис. 2, кривая 1), в присутствии 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  пальмитиновая кислота уже в концентрации 50 мкМ вызывает интенсивный выход сульфородамина Б из липосом. Последующее добавление неионного детергента тритона X-100 (0,1%) приводит к дальнейшему выходу сульфородамина Б, что свидетельствует о разрушении оставшейся части липосом. ГПК в концентрации 50 мкМ не эффективен в присутствии 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 2, кривая 2). На рис. 3а приведены данные зависимости относительного количества вышедшего сульфородамина Б из липосом от концентрации пальмитиновой кислоты (кривая 1) и ГПК (кривая 2). Как видно из рисунка, пальмитиновая кислота в концентрации 50 мкМ в присутствии 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  индуцирует выход из липосом сульфородамина Б на 80%. Для достижения подобного эффекта ГПК необходимо концентрацию этой жирной кислоты увеличить до 500 мкМ (рис. 3а, кривая 2). Пальмитиновая кислота в концентрации 50 мкМ индуцирует существенный выход сульфородамина Б из липосом уже при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мМ (рис. 3б, кривая 1). ГПК в концентрации 50 мкМ не эффективен даже при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  2 мМ (рис. 3б, кривая 2). Следовательно, ГПК значительно слабее пальмитиновой кислоты индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выход сульфородамина Б из липосом.



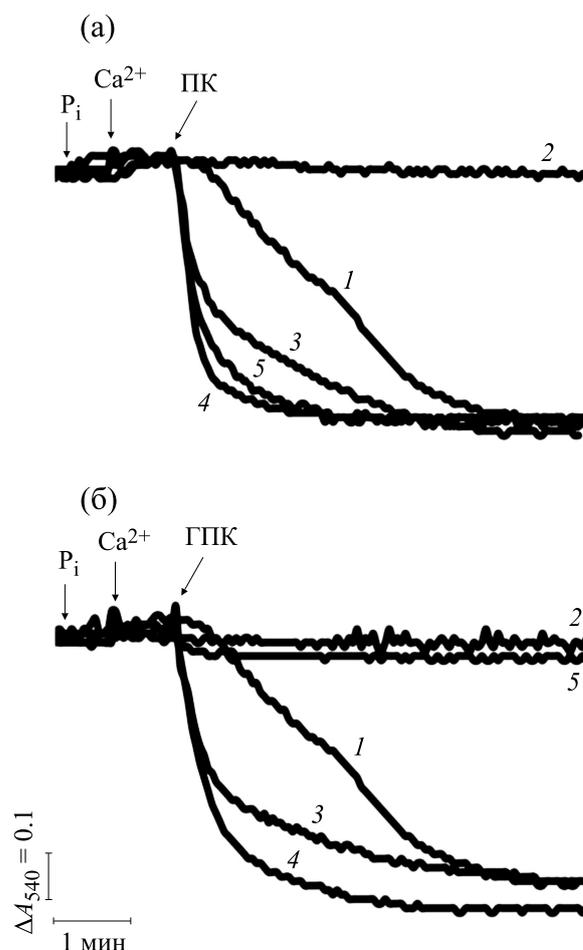
**Рис. 3.** Зависимости выхода сульфородамина Б из липосом от концентрации жирных кислот (а) и хлорида кальция (б). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Добавки на рис. (а): пальмитиновая кислота (1) и ГПК (2) в указанных концентрациях. Добавки на рис. (б): 50 мкМ пальмитиновой кислоты (1), 50 мкМ ГПК (2), хлорид кальция — в указанных концентрациях. Приведены средние значения ( $n = 3$ ), значения стандартной ошибки среднего не превышают размера указанных на рисунке символов.

**Неорганический фосфат ( $P_i$ ) в присутствии ЦсА не влияет на эффект пальмитиновой кислоты как индуктора  $Ca^{2+}$ -зависимой пермеабилзации митохондрий, но блокирует аналогичное действие ГПК.** Во введении уже отмечалось, что одним из эффективных модуляторов ЦсА-чувствительной поры является  $P_i$ , способный повышать чувствительность митохондрий к  $Ca^{2+}$  как к индуктору поры и наряду с этим усиливать действие ЦсА как блокатора поры. Эти эффекты  $P_i$  достигают максимальных значений уже при его концентрации в 1 мМ [9]. Представляет интерес выяснить, как влияет  $P_i$  на эффекты пальмитиновой кислоты и ГПК как индукторов поры. В присутствии в среде инкубации 1 мМ  $P_i$  внесение 40 мкМ хлорида кальция приводит к набуханию митохондрий печени (рис. 4а и 4б, кривые 1). При этих условиях 1 мкМ ЦсА полностью блокирует набухание (рис. 4а и 4б, кривые 2). Пальмитиновая кислота индуцирует быстрое набухание митохондрий приблизительно в равной степени как в отсутствие (рис. 4а, кривая 3), так и в присутствии  $P_i$  (рис. 4а, кривая 4). ЦсА в присутствии  $P_i$  не эффективен (рис. 4а, кривая 5). При аналогичных условиях ГПК, так же как и пальмитиновая кислота, индуцирует быстрое набухание митохондрий приблизительно в равной степени как в отсутствие (рис. 4б, кривая 3), так и в присутствии  $P_i$  (рис. 4б, кривая 4). Однако при условии инкубации митохондрий с ЦсА и  $P_i$  ГПК, в отличие от пальмитиновой кислоты, не индуцирует набухания органелл (рис. 4б, кривая 5).

На рис. 5а приведены данные сравнительного исследования зависимости начальной скорости индуцируемого ГПК и пальмитиновой кислотой  $Ca^{2+}$ -зависимого набухания митохондрий, инкубируемых с 1 мкМ ЦсА, от концентрации  $P_i$ . Как видно из рисунка (кривая 1),  $P_i$  в концентрации 1 мМ эффективно блокирует индуцируемое ГПК набухание органелл. При тех же условиях, но при замене ГПК пальмитиновой кислотой,  $P_i$  в концентрации 1 мМ наоборот увеличивает скорость набухания митохондрий (рис. 5а, кривая 2).

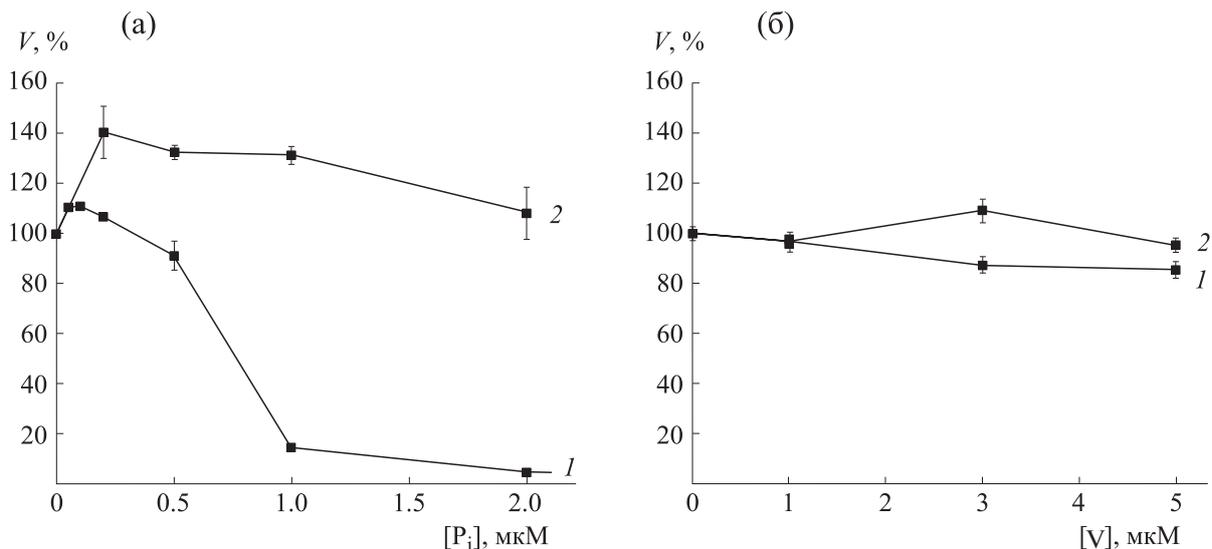
При изучении эффектов  $P_i$  как модулятора  $Ca^{2+}$ -зависимой поры действие этого аниона сравнивают с эффектами близкого по свойствам проникающего аниона ванадата [9]. Установлено, что ванадат даже в концентрации 5 мМ не оказывает влияния на  $Ca^{2+}$ -зависимое набухание митохондрий, индуцируемое как ГПК (рис. 5б, кривая 1), так и пальмитиновой кислотой (рис. 5б, кривая 2).

В присутствии  $P_i$  пальмитиновая кислота в равной степени и в отсутствие, и в присутствии ЦсА индуцирует быстрый выход  $Ca^{2+}$  из матрикса



**Рис. 4.** Влияние неорганического фосфата и ЦсА на кинетику изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени, индуцированную пальмитиновой кислотой (а) или ГПК (б). Цифрами обозначены кривые, полученные при добавках различных агентов: 1 –  $P_i + Ca^{2+}$ ; 2 –  $P_i + ЦсА + Ca^{2+}$ ; 3 –  $Ca^{2+} +$  пальмитиновая кислота или ГПК; 4 –  $P_i + Ca^{2+} +$  пальмитиновая кислота или ГПК; 5 –  $P_i + ЦсА + Ca^{2+} +$  пальмитиновая кислота или ГПК. 1 мМ  $P_i$  был добавлен в среду инкубации до внесения митохондрий. Другие условия эксперимента и добавки приведены в подписи к рис. 1. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах.

митохондрий (рис. 6а) и полное падение  $\Delta\psi$  (рис. 6б). В отличие от пальмитиновой кислоты ГПК при условии инкубации митохондрий с ЦсА и  $P_i$  не индуцирует выход  $Ca^{2+}$  из матрикса (рис. 6в) и не влияет на  $\Delta\psi$  (рис. 6г). В этом случае добавление к митохондриям печени известного каналообразующего агента аламетицина (5 мкг/мл) [22] индуцирует интенсивный выход  $Ca^{2+}$  из матрикса (рис. 6в, кривая 2) и падение  $\Delta\psi$  (рис. 6г, кривая 2).



**Рис. 5.** Зависимости относительной скорости изменения оптической плотности ( $V$ , %) суспензии митохондрий печени инкубируемых с  $\text{Ca}^{2+}$  и ЦсА, от концентрации неорганический фосфата (а) и ванадата (б) в присутствии ГПК (кривая 1) и пальмитиновой кислоты (кривая 2). Условия опыта и добавки – как на рис. 4. Неорганический фосфат ( $P_i$ ) и ванадат в указанных на рисунке концентрациях были добавлены в среду инкубации до внесения митохондрий. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ), в некоторых случаях значения стандартной ошибки среднего не превышают размера указанных на рисунке символов.

Ванадат даже в концентрации 2 мМ, т. е. в более высокой, чем концентрация  $P_i$ , в присутствии ЦсА не влияет на способность ГПК индуцировать выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса и падение  $\Delta\psi$  (данные не приведены). Эти и представленные на рис. 5 данные свидетельствуют о том, что в наших условиях  $P_i$  как блокатор ГПК-индуцируемой поры не может быть заменен близким по свойствам проникающим анионом – ванадатом.

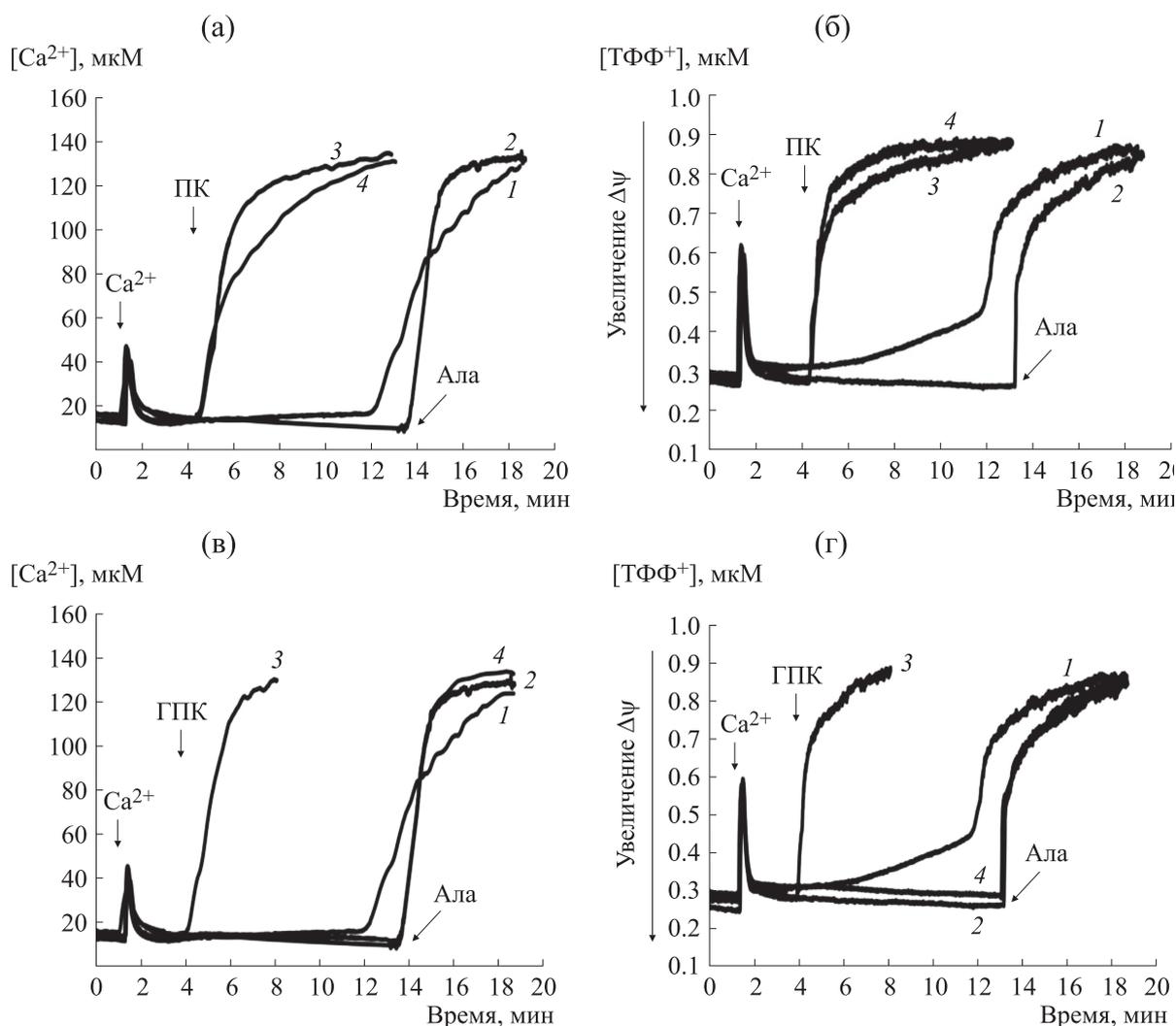
Можно предположить, что действие  $P_i$  как блокатора индуцируемой ГПК ЦсА-нечувствительной пермеабиллизации митохондрий возможно только при его транспорте в матрикс при участии специального фосфатного переносчика и, следовательно, может быть устранено путем ингибирования этого переносчика. Эффективными ингибиторами переносчика фосфата являются SH-реагенты мерсалил и *n*-этилмалеимид, вызывающие полное ингибирование активности этого переносчика в митохондриях печени в количестве 10 и 170 нмоль/мг белка соответственно [23]. Известно, что мерсалил не проходит через внутреннюю мембрану митохондрий печени и взаимодействует с SH-группой Cys41 переносчика фосфата на его наружной поверхности. С этой же SH-группой взаимодействует и *n*-этилмалеимид [24].

Как показано на рис. 7а, мерсалил (12,5 нмоль/мг белка), будучи добавленный к митохондриям печени крыс, инкубируемых в присутствии ЦсА и отсутствии  $P_i$ , снижает эффектив-

ность ГПК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого набухания органелл, а также снимает ингибирующее влияние  $P_i$  при его предварительном добавлении в среду инкубации. Аналогичным действием обладает и *n*-этилмалеимид (250 нмоль/мг белка) (рис. 7б). Эти данные свидетельствуют о том, что действие  $P_i$  как блокатора индуцируемой ГПК  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации митохондрий устраняется при условии их инкубации с указанными SH-реагентами, эффективно действующими как ингибиторы переносчика  $P_i$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

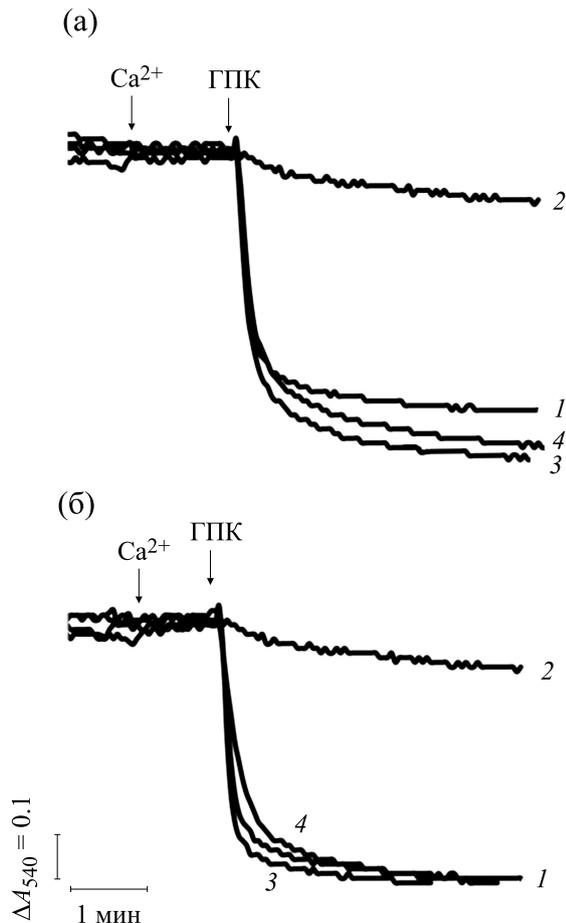
Особенностью действия насыщенных жирных кислот и, в частности, пальмитиновой является то, что их эффект может проявляться и в присутствии специфического блокатора «классической» поры – ЦсА [11–13]. На основании данных, полученных на модельных мембранных системах – липосомах, была сформулирована гипотеза о том, что в основе механизма индукции такой проницаемости лежит формирование в липидной фазе внутренней мембраны митохондрий поры вследствие образования комплексов жирных кислот и  $\text{Ca}^{2+}$  по механизму хемотропного фазового перехода [12,13,16]. В рамках подтверждения этой гипотезы можно рассматривать также представленные на рис. 2 и 3 наши данные о том, что пальмитиновая кислота эффективно индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выход сульфородамина Б из липосом.



**Рис. 6.** Сравнение эффектов пальмитиновой кислоты (а, б) и ГПК (в, г) на кинетику выхода из митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$  (а, в) и тетрафенилфосфония (б, г) инкубируемых в присутствии  $\text{P}_i$ : 1 –  $\text{P}_i + \text{Ca}^{2+}$ ; 2 –  $\text{P}_i + \text{ЦсА} + \text{Ca}^{2+}$ ; 3 –  $\text{P}_i + \text{Ca}^{2+}$  + пальмитиновая кислота или ГПК; 4 –  $\text{P}_i + \text{ЦсА} + \text{Ca}^{2+}$  + пальмитиновая кислота или ГПК. Концентрация митохондриального белка в ячейке – 1,0 мг/мл.  $\text{P}_i$  (1 мМ) был добавлен в среду инкубации до внесения митохондрий. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Добавки: 50 мкМ хлорида кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), 30 мкМ пальмитиновой кислоты (ПК), 30 мкМ ГПК, 5 мкг/мл аламетицина (Ала). Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Молекула ГПК отличается от молекулы пальмитиновой кислоты только наличием гидроксильной группы на конце ацильной цепи – в ω-положении. Так же как и пальмитиновая кислота, ГПК в нагруженных  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриях печени вызывает высокоамплитудное набухание этих органелл, выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса и падение  $\Delta\psi$  одинаково эффективно в отсутствие и в присутствии ЦсА [19] (рис. 1). При сравнении эффектов этих жирных кислот при их равных концентрациях и при одинаковых концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  было уста-

новлено, что ГПК вызывает существенно более интенсивное набухание митохондрий, чем пальмитиновая кислота. Следовательно, ГПК является более эффективным индуктором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны органелл. Можно было бы предположить, что механизм действия ГПК, так же как и пальмитиновой кислоты, заключается в формировании во внутренней мембране митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой липидной поры. Однако ГПК, как индуктор  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого выхода сульфородамина Б из



**Рис. 7.** Влияние мерсалила (а) и *n*-этилмалеимида (б) на кинетику ЦсА-нечувствительного изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени, индуцированную ГПК в присутствии и в отсутствие неорганического фосфата ( $P_i$ ). Цифрами обозначены кривые, полученные при добавках различных агентов: 1 – ЦсА +  $Ca^{2+}$  + ГПК; 2 –  $P_i$  + ЦсА +  $Ca^{2+}$  + ГПК; 3 – ЦсА + *n*-этилмалеимид или мерсалил +  $Ca^{2+}$  + ГПК; 4 – ЦсА +  $P_i$  + *n*-этилмалеимид или мерсалил +  $Ca^{2+}$  + ГПК.  $P_i$  (1 мМ), *n*-этилмалеимид (250 нмоль/мг белка) или мерсалил (12,5 нмоль/мг белка) были добавлены в среду инкубации до внесения митохондрий. Другие условия эксперимента и добавки приведены в подписи к рис. 1.

липосом, значительно уступает в эффективности пальмитиновой кислоте (рис. 2 и 3). Ранее уже было установлено, что ГПК существенно уступает в эффективности пальмитиновой кислоте и как индуктор  $Ca^{2+}$ -зависимой пермеабилзации плазматической мембраны эритроцитов [15]. Как уже отмечалось во введении, эффект ЦсА как блокатора поры усиливается  $P_i$  [2,9]. В настоящей работе установлено, что, в отличие от пальмитиновой кислоты, действие ГПК как индуктора  $Ca^{2+}$ -зависимой поры в присутствии ЦсА полно-

стью блокируется  $P_i$  (рис. 4–6). Таким образом, пальмитиновая кислота и ГПК как индукторы  $Ca^{2+}$ -зависимой поры существенно отличаются по механизму действия: если  $Ca^{2+}$ -зависимый эффект пальмитиновой кислоты можно рассматривать как формирование липидной поры, то  $Ca^{2+}$ -зависимый эффект ГПК в присутствии  $P_i$  – как формирование «классической» ЦсА-чувствительной поры.

Эффект  $P_i$  как блокатора индуцируемой ГПК  $Ca^{2+}$ -зависимой ЦсА-чувствительной поры устраняется путем инкубации митохондрий с SH-реагентами мерсалилом и *n*-этилмалеимидом, эффективно действующими как ингибиторы переносчика  $P_i$ . Это предполагает, что для эффективного действия  $P_i$  необходим его транспорт в матрикс митохондрий. Как уже отмечалось во введении, на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий предполагается существование регуляторного сайта, связывание с которым  $P_i$  сопровождается ингибированием поры и который в отсутствие ЦсА замаскирован циклофилином D [9]. Такое действие  $P_i$  является уникальным, так как близкие по свойствам проникающие анионы арсенат и ванадат не обладают подобным эффектом [9]. ЦсА, препятствуя связыванию циклофилина D, вызывает демаскировку такого регуляторного сайта и таким образом способствует взаимодействию с ним  $P_i$  [9]. По-видимому, связывание  $P_i$  с таким сайтом приводит также к ингибированию действия ГПК как индуктора «классической»  $Ca^{2+}$ -зависимой поры митохондрий печени. И в этом случае ванадат также не эффективен. Тот факт, что в отсутствие  $P_i$  ЦсА не влияет на эффект ГПК как индуктора  $Ca^{2+}$ -зависимой митохондриальной поры, позволяет предположить, что связывание циклофилина D с мембранными сайтами не является необходимым условием формирования этой поры.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президента Российской Федерации (№ МК-61.2019.4) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 17.4999.2017/8.9).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и ис-

пользования животных при выполнении работы были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, *Physiol. Rev.* **94**, 909 (2014).
2. К. Н. Белослудцев, М. В. Дубинин, Н. В. Белослудцева и др., *Биохимия* **84**, 759 (2019).
3. M. Bonora, A. Bononi, E. De Marchi, et al., *Cell. Cycle* **12**, 674 (2013).
4. V. Giorgio, S. von Stockum, M. Antoniel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 5887 (2013).
5. C. Gerle, *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 1191 (2016).
6. A. W. Leung, P. Varanyuwatana, and A. P. Halestrap, *J. Biol. Chem.* **283**, 26312 (2008).
7. A. P. Halestrap and A. M. Davidson, *Biochem. J.* **268**, 153 (1990).
8. A. P. Richardson and A. P. Halestrap, *Biochem. J.* **473**, 1129 (2016).
9. E. Basso, V. Petronilli, M. A. Forte, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 26307 (2008).
10. M. E. Bodrova, V. I. Dedukhova, V. N. Samartsev, et al., *IUBMB Life* **50**, 189 (2000).
11. A. Sultan and P. Sokolove, *Arch. Biochem. Biophys.* **386**, 52 (2001).
12. K. N. Belosludtsev, N. V. Belosludtseva, A. V. Agafonov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 2600 (2014).
13. K. N. Belosludtsev, N. V. Belosludtseva, A. V. Agafonov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2200 (2015).
14. K. N. Belosludtsev, A. S. Trudovishnikov, N. V. Belosludtseva, et al., *J. Membr. Biol.* **237**, 13 (2010).
15. М. В. Дубинин, А. Е. Степанова, К. А. Шербаков и др. *Биофизика* **61**, 916 (2016).
16. A. Agafonov, E. Gritsenko, K. Belosludtsev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, 153 (2003).
17. R. J. Sanders, R. Ofman, F. Valianpou, et al., *J. Lipid. Res.* **46**, 1001 (2005).
18. R. J. Wanders, J. Komen, and S. Kemp, *FEBS J.* **278**, 182 (2011).
19. M. V. Dubinin, V. N. Samartsev, A. E. Stepanova, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **50**, 391 (2018).
20. V. N. Samartsev, A. V. Smirnov, I. P. Zeldi, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1339**, 251 (1997).
21. V. Petronilli, C. Cola, S. Massari, et al., *J. Biol. Chem.* **268**, 21939 (1993).
22. I. S. Gostimskaya, V. G. Grivennikova, T. V. Zharova, et al., *Anal. Biochem.* **313**, 46 (2003).
23. E. Ligeti, G. Brandolin, Y. Dupont, et al., *Biochemistry* **24**, 4423 (1985).
24. G. C. Ferreira, R. D. Pratt, and P. L. Pedersen, *J. Biol. Chem.* **265**, 21202 (1990).

## A Comparative Study of the Effects of Palmitic Acid and $\omega$ -Hydroxypalmitic Acid as Inducers of $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Permeabilization of Liver Mitochondria and Lecithin Liposomes

M.V. Dubinin\*, V.N. Samartsev\*, A.E. Stepanova\*, A.A. Semenova\*, E.I. Khoroshavina\*, and K.N. Belosludtsev\*, \*\*

\*Mari State University, pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

\*\* Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The effects of  $\omega$ -hydroxypalmitic acid as an inducer of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane permeabilization were studied on succinate-fueled isolated rat liver mitochondria and lecithin liposomes.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent effects of  $\omega$ -hydroxypalmitic acid on mitochondria and liposomes are compared with similar well-studied effects of palmitic acid. It was found that in the presence of cyclosporin A,  $\omega$ -hydroxypalmitic acid induced significantly more intensive mitochondrial swelling than palmitic acid and, thus, was a more effective inducer of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cyclosporin A-insensitive permeabilization of the inner membrane of organelles. At the same time,  $\omega$ -hydroxypalmitic acid, as an inducer of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of sulforhodamine B from liposomes, was much inferior to palmitic acid. It was shown that, as opposed to palmitic acid, the action of  $\omega$ -hydroxypalmitic acid as an inducer of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in the liver mitochondria was completely blocked by inorganic phosphate in the presence of cyclosporin A. It has been found that in this case, inorganic phosphate cannot be replaced by a similar permeable anion vanadate. The results obtained provide evidence that mechanisms of action of  $\omega$ -hydroxypalmitic acid and palmitic acid as inducers of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent permeabilization of liver mitochondria differ significantly. When the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent effect of palmitic acid is considered as the formation of a lipid pore, the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent effect of  $\omega$ -hydroxypalmitic acid in the presence of inorganic phosphate is the formation of a cyclosporin A-sensitive MPT pore. The action of inorganic phosphate as an inhibitor of  $\omega$ -hydroxypalmitic acid-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cyclosporin A-sensitive pore in liver mitochondria is discussed.

*Keywords:* mitochondrial pore,  $\omega$ -hydroxypalmitic acid, palmitic acid, cyclosporin A, calcium ions, inorganic phosphate