

УДК 576.31

## ИНДУКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦИКЛОСПОРИН-ЗАВИСИМОЙ ПОРЫ АЦИЛКАРНИТИНАМИ. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И ДЛИНЫ УГЛЕРОДНОЙ ЦЕПИ

© 2022 г. Н. И. Федотчева<sup>а</sup>, Е. В. Гришина<sup>а</sup>, В. В. Дынник<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: Dynn timer@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.04.2021 г.

После доработки 31.05.2021 г.

Принята к публикации 02.06.2021 г.

Известно, что концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) при ожирении и диабете сильно увеличиваются, а в условиях ишемии-реперфузии могут превышать десятки мкМ в очаге поражения клеток. Наиболее токсичными считаются LCAC, активированные производные LCFA. В данной работе исследовано влияние *D,L*-ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи на индукцию митохондриальной циклоспорин А (CsA)-зависимой поры (mPTP). В экспериментах на изолированных митохондриях печени крыс тестировали гексаилоилкарнитин (НС, С6:0), лауроилкарнитин (LC, С12:0), миристоилкарнитин (МС, С14:0) и пальмитоилкарнитин (РС, С16:0); регистрировали скорость дыхания митохондрий, митохондриальный потенциал ( $\Delta\Psi$ ) и набухание митохондрий при окислении глутамата и пирувата в присутствии ацилкарнитинов в различных концентрациях. Показано, что все исследованные ацилкарнитины вызывают ингибирование дыхания митохондрий, активированного ADP-гексокиназной системой, а также индуцируют набухание митохондрий. Величины наблюдаемых эффектов обратно пропорциональны длине углеродной цепи ацилкарнитинов. Критические концентрации РС, МС, LC и НС, при которых происходит снижение  $\Delta\Psi$ , составляют 100, 110, 500 мкМ и 3 мМ соответственно. Индукция набухания митохондрий происходит при пороговых концентрациях РС, МС и LC 10, 25 и 200 мкМ соответственно. CsA, EGTA и ADP увеличивают пороговые концентрации РС и МС, необходимые для индукции mPTP, и не эффективны при более высоких концентрациях ацилкарнитинов. Таким образом, в ряду карнитиновых производных насыщенных жирных кислот с длиной углеродной цепи от 6 до 16 РС и МС являются наиболее токсичными агентами, способными вызывать индукцию mPTP.

**Ключевые слова:** ацилкарнитины, митохондриальная пора

**DOI:** 10.31857/S0233475522010066

### ВВЕДЕНИЕ

Концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) в плазме крови используются как маркеры ряда врожденных метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также диабета 2 типа (T2D) и стеатогепатита и др. [1, 2]. При ожирении и T2D, распространение которых в мире носит характер пандемии, риск возникновения инсульта/инфаркта увеличивается в несколько раз. Увеличение такого риска может быть обусловлено токсическим действием LCFA и LCAC, вызывающим нарушение  $Ca^{2+}$ -гомеостаза и гибель клеток по типу некроза или апоптоза.

Концентрации LCFA и LCAC в крови пациентов с ожирением и T2D в 2–4 раза превышают контрольные величины [1], а в условиях ишемии-

реперфузии в очаге поражения клеток могут превышать десятки мкМ [3–5]. LCAC – основная активированная форма LCFA, которая переносится кровью, транспортируется в митохондрии и окисляется в виде Ацил-КоА. Длинноцепочечные Ацил-КоА являются ингибиторами NAD-зависимых дегидрогеназ, включая ферменты цикла Кребса и глутаматдегидрогеназу [6], а также транслокатора адениннуклеотидов (ANT) и других митохондриальных транспортеров [7–11].

Хорошо известно, что LCFA вызывают разобщение окислительного фосфорилирования митохондрий [12], стимулируют индукцию избытком  $Ca^{2+}$  циклоспорин А (CsA)-чувствительной митохондриальной поры (mPTP) [13–15]. Принято считать, что индукция mPTP играет важную роль в гибели клеток по типу некроза, апоптоза или

некроптоза [13–16]. Кальций является основным индуктором этой поры. Избыточное накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях приводит к обратимому или необратимому открытию поры, деполяризации и деэнергизации митохондрий и индукции mPTP.

Исследования последних лет показывают, что LCAC и соответствующие Ацил-КоА накапливаются в постишемических митохондриях в больших концентрациях [9]. Очевидно, что длинноцепочечные Ацил-КоА могут быть основными токсинами, вызывающими подавление энергетики митохондрий и индукцию mPTP, вследствие ингибирования ими ключевых дегидрогеназ митохондрий и различных транспортеров [6–11]. Однако к настоящему времени механизмы токсического действия LCFA, LCAC, и Ацил-КоА на регуляцию  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза, энергетику митохондрий и индукцию mPTP в клетках разных типов изучены недостаточно. Мало исследован также вопрос о сравнительном действии ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи на индукцию CsA-зависимой поры, который и составляет предмет данной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия выделения митохондрий и проведения экспериментов описаны ранее [17]. Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов крыс линии Вистар (возраст 6–8 недель) содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помещениях при температуре 20–22°C (свет/темнота – 12 ч/12 ч). Митохондрии печени выделяли с использованием стандартных методик дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA и 10 мМ трис-НСl (рН 7.4). Митохондриальные препараты дважды промывали средой выделения, не содержащей EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду. Инкубационная среда для митохондрий содержала: 125 мМ КCl, 3 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Содержание митохондриального белка определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Скорость потребления кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в термостатируемой ячейке объемом 1 мл, при 27°C и постоянном перемешивании. Разность электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония ( $\text{TPP}^+$ ), концентрацию которого во внешней среде  $[\text{TPP}^+]_{\text{out}}$  регистрировали с

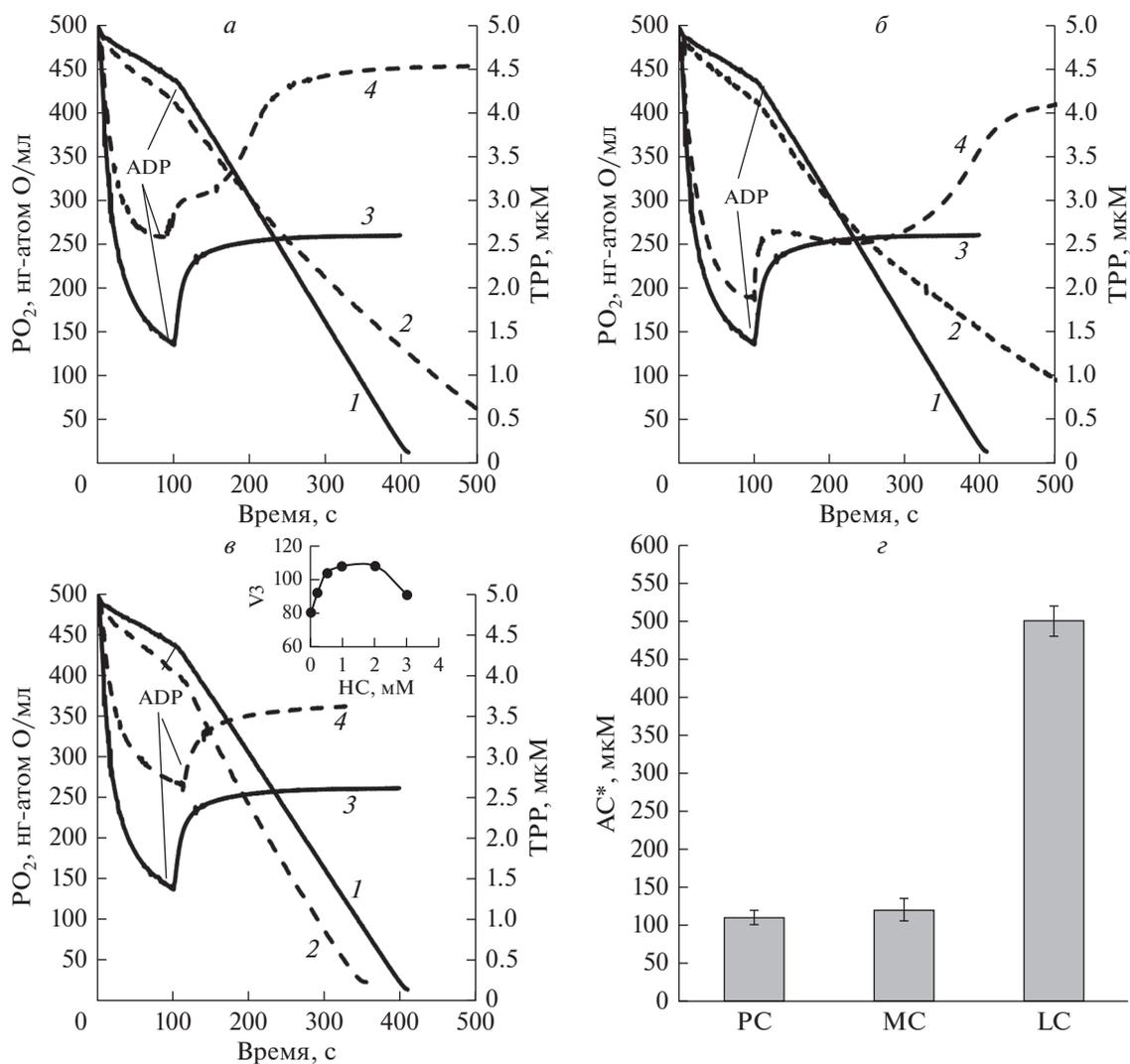
помощью  $\text{TPP}^+$ -селективного электрода. Среда инкубации содержала 125 мМ КCl, 3 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 2 мкМ  $\text{TPP}^+$ . Стационарную скорость дыхания в состоянии V3 при добавлении 750 мкМ ADP обеспечивали внесением в среду инкубации 5 мМ глюкозы и 0.5 ед. гексокиназы. В работе использовали реактивы фирм Sigma-Aldrich (США), Tocris (Великобритания).

Набухание митохондрий определяли спектральным методом при длине волны 540 нм с использованием спектрофотометра Ocean Optic USB-4000 (США). Митохондрии (0.3–0.4 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 125 мМ КCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7.4), в качестве субстратов окисления использовали глутамат (10 мМ) с пируватом (1 мМ) или сукцинат (5 мМ).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с t-критерия Стьюдента для сравнения пар величин с помощью программы SigmaPlot 11. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  S.E.M. Количество повторенных независимых экспериментов  $n = 4–6$ . За уровень значимости принято  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние ацилкарнитинов на дыхание митохондрий и митохондриальный потенциал.** Рис. 1 характеризует влияние ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи (C6, C12–C16) на дыхание митохондрий и митохондриальный потенциал  $\Delta\psi$  при активации энергетики митохондрий ADP-гексокиназной системой. Преинкубация митохондрий с 100 мкМ *D,L*-пальмитоилкарнитина (PC, C16:0) вызывает ингибирование дыхания и быструю диссипацию  $\Delta\psi$ , которые наблюдаются после добавки ADP и активации дыхания митохондрий (скорость дыхания V3) (рис. 1а). Диссипация  $\Delta\psi$  и деэнергизация митохондрий, так же как и набухание митохондрий (см. ниже), свидетельствуют об открытии mPTP при избытке PC. Средняя пороговая концентрация PC (для *D,L*-формы) составляет 110 мкМ (рис. 1б). При меньших концентрациях PC ( $[\text{PC}] < 60–70$  мкМ) сброс потенциала и открытие поры развиваются медленно. Сходный эффект вызывает миристилкарнитин (MC, C14:0), для которого пороговая концентрация составляет 120 мкМ (рис. 1б). В сравнении с PC и MC, лауроилкарнитин (LC, C12:0) вызывает ингибирование дыхания и сброс  $\Delta\psi$  только при концентрациях, превышающих 500 мкМ (рис. 1б). Короткоцепочечный гексаоилкарнитин (HC, C6:0) активирует дыхание и не вызывает сброс  $\Delta\psi$  даже при концентрации в 2 мМ (рис. 1в). Слабое ингибирование дыхания митохондрий наблюдается только при больших концентрациях HC, превышающих 3 мМ (рис. 1в, вставка). Это ингибирование



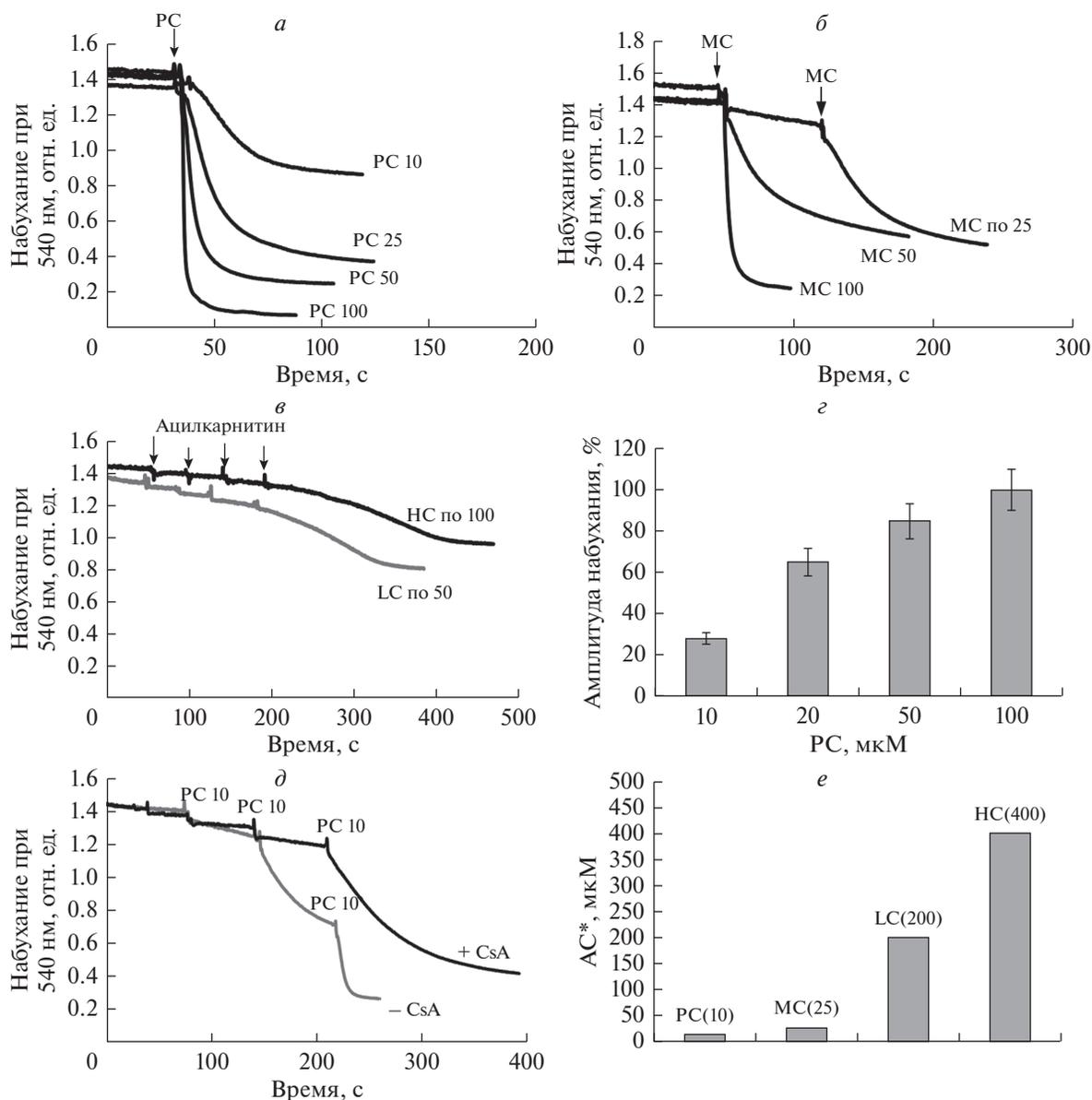
**Рис. 1.** Влияние ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи на дыхание и мембранный потенциал митохондрий.

*а* – Дыхание (1, 2) и мембранный потенциал (3, 4) митохондрий регистрировали в присутствии 1мМ ADP, глюкозы и гексокиназы в контроле (1, 3) и при преинкубации митохондрий с 110 мкМ пальмитоилкарнитина (PC, 2, 4). *б* – Дыхание (1, 2) и мембранный потенциал (3, 4) митохондрий регистрировали в присутствии 1мМ ADP, глюкозы и гексокиназы в контроле (1, 3) и при преинкубации митохондрий с 450 мкМ лауроилкарнитина (LC, 2, 4). *в* – Дыхание (1, 2) и мембранный потенциал (3, 4) митохондрий регистрировали в присутствии 1мМ ADP, глюкозы и гексокиназы в контроле (1, 3) и при преинкубации митохондрий с 2.0 мМ гексаноилкарнитина (НС, 2, 4). *з* – Пороговые концентрации ацилкарнитинов (AC\*), при которых происходит сброс мембранного потенциала (выход ТТР из митохондрий). MC – миристоилкарнитин. Все ацилкарнитины в *D,L*-форме. V3 – скорость дыхания митохондрий (нг-атом О/мл/мин).

ние снимается при добавках малата или сукцината в среду инкубации (не показано), что указывает на возможное ингибирование дегидрогеназ цикла Кребса короткоцепочечными Ацил-КоА. Ранее нами было показано, что подобный эффект обратимого ингибирования энергетики митохондрий может наблюдаться даже при избытке пирувата [14].

**Влияние ацилкарнитинов на набухание митохондрий.** На рис. 2 представлены данные о влиянии концентраций ацилкарнитинов (C6, C12–C16) на набухание митохондрий. Видно, что PC (рис. 2а)

и MC (рис. 2б) обладают сходным токсическим действием. При разовых добавках в 25 и 50 мкМ соответственно, PC и MC индуцируют 50–60% набухание митохондрий, а при концентрациях 100 мкМ оба ацилкарнитина индуцируют быстрое 100% набухание митохондрий. Зависимость амплитуды набухания от концентрации PC показана на рис. 2г. В сравнении с действием длинноцепочечных ацилкарнитинов, эффекты карнитинов с более короткой длиной углеродной цепи LC (C12:0) и НС (C6:0) выражены слабо. Видно, что 25–30% набухание митохондрий развивается

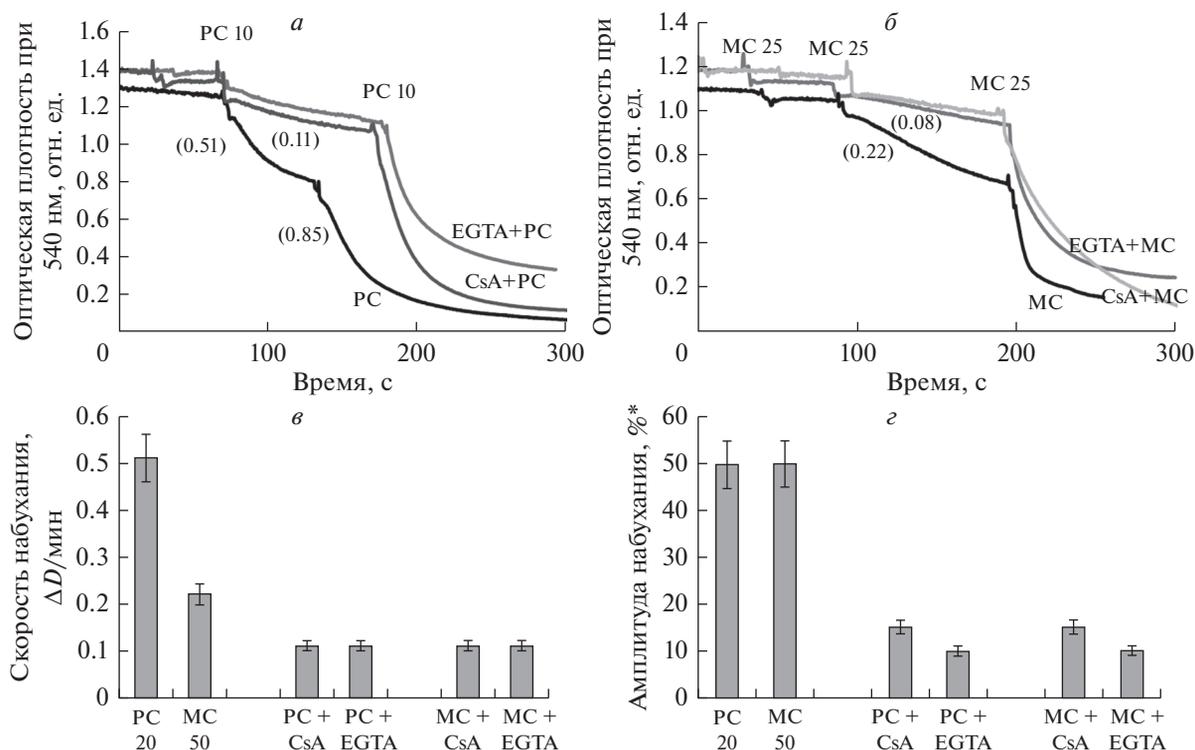


**Рис. 2.** Набухание митохондрий, индуцированное ацилкарнитинами с различной длиной углеродной цепи. *а* – Набухание митохондрий, индуцированное пальмитоилкарнитином в разных концентрациях (PC). *б* – Набухание митохондрий, индуцированное миристоилкарнитином (MC) в разных концентрациях. *в* – Набухание митохондрий при последовательных добавках лауроилкарнитина (LC) и гексаилоилкарнитина (HC). *г* – зависимость амплитуды набухания митохондрий от концентрации PC при окислении глутамата с пируватом; *д* – индуцированное PC набухание митохондрий при окислении сукцината и влияние циклоспорина А; *е* – пороговые концентрации (значения указаны в скобках) ацилкарнитинов (AC\*), индуцирующие набухание митохондрий. В качестве субстратов окисления были использованы глутамат 10 мМ + пируват 1 мМ и сукцинат (5 мМ), концентрация митохондриального белка 0.3–0.4 мг/мл, среда инкубации 120 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1.5 мМ фосфата, pH 7.4.

только при достижении концентраций LC и HC, превышающих 200 и 400 мкМ соответственно (рис. 2в).

Влияние последовательных малых добавок PC и MC на набухание митохондрий показано на рис. 3. Однократные добавки 10 мкМ PC и 25 мкМ MC не вызывают заметный эффект, тогда как последующие добавки индуцируют быстрое набуха-

ние митохондрий (контроль, рис. 3а, 3б, нижние кривые). Набухание митохондрий при однократных добавках 10 мкМ PC (рис. 3а) и 25 мкМ MC (рис. 3б) эффективно предотвращается CsA и EGTA (рис. 3а, 3б, верхние кривые), тогда как вторая добавка PC и третья добавка MC вызывают 100% набухание митохондрий, что указывает на ограниченный защитный эффект CsA и EGTA,



**Рис. 3.** Влияние циклоспорина А и EGTA на индуцированное ацилкарнитинами набухание митохондрий. Набухание митохондрий, индуцированное последовательными добавками пальмитоилкарнитина (PC), 10 мкМ каждая (а), и мристоилкарнитинном (MC), 25 мкМ каждая добавка (б), в присутствии циклоспорина А (2 мкМ) и EGTA (1 мМ); в скобках указаны скорости набухания ( $\Delta D/\text{мин}$ ). Ингибирование скорости (в) и амплитуды (г) индуцированного 20 мкМ PC и 50 мкМ MC набухания митохондрий циклоспоринном А и EGTA. \* – за 100% принята максимальная амплитуда набухания, наблюдаемая в присутствии 100 мкМ PC. Субстраты окисления глутамат (10 мМ) и пируват (1 мМ).

наблюдающийся при пороговых концентрациях LCAC.

Влияние CsA и EGTA на скорости и амплитуды набухания митохондрий при действии 20 мкМ PC и 50 мкМ MC представлена на рис. 3в, 3г соответственно. Из данных, представленных на этих рисунках следует, что только при концентрациях PC и MC близких к пороговым величинам 20 мкМ и 50 мкМ, CsA и EGTA оказывают характерный для CsA-зависимой поры (mPTP) защитный эффект. Защитный эффект отсутствует при более высоких концентрациях PC и MC (рис. 3а, 3б).

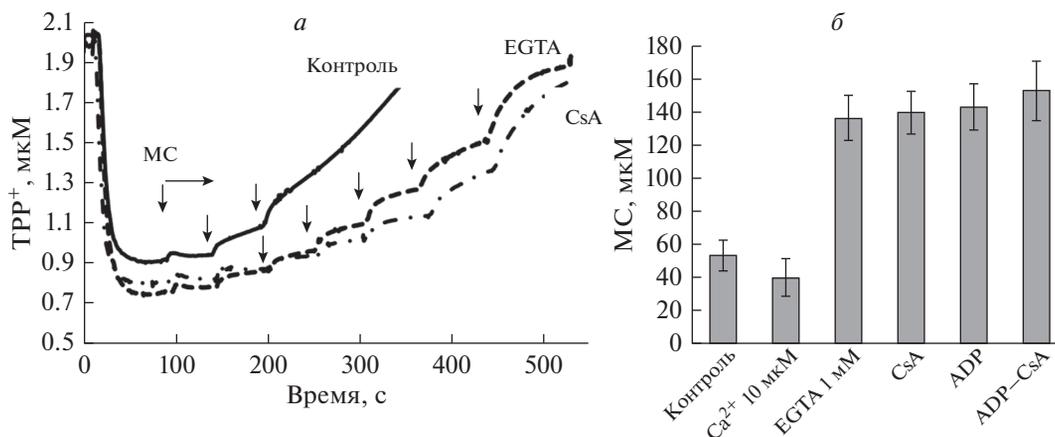
**Влияние мристоилкарнитина на диссипацию митохондриального потенциала. Ограниченный защитный эффект CsA и EGTA.** Из данных приведенных на рис. 4а видно, что в контроле (верхняя кривая) третья добавка 20 мкМ MC вызывает снижение митохондриального потенциала  $\Delta\Psi$ . Преинкубация митохондрий с CsA или EGTA препятствует индукции поры при таких условиях, тогда как последующие добавки MC вызывают концентрационно-зависимую диссипацию  $\Delta\Psi$ , указывая на ограниченный защитный эффект этих ингибиторов. Известно, что ADP,  $\text{Mg}^{2+}$ , ингибиторы ANT (карбоксиаттрактолизид, бонгкреко-

вая кислота) и др. также ингибируют индукцию mPTP, вызванную ионами кальция [16]. При индукции поры PC или MC также наблюдается защитный эффект этих соединений. Из рис. 3б следует, что пороговая концентрация MC (MC\*), вызывающая диссипацию  $\Delta\Psi$  увеличивается более чем в 2 раза в присутствии CsA, EGTA, ADP ( $\text{ADP} + \text{Mg}^{2+} + \text{гексокиназа}$ ) или при сочетанном действии CsA и EGTA, тогда как наличие  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации усиливает действие MC, снижая пороговую величину MC\*. Взаимное синергичное действие PC и  $\text{Ca}^{2+}$  при индукции mPTP нами было показано ранее на митохондриях печени и сердца [18, 19].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что длинноцепочечные LCAC (MC и PC) можно рассматривать, как наиболее токсичные агенты в ряду производных насыщенных жирных кислот, вызывающих индукцию CsA-зависимой поры.

Хорошо известно, что CsA, адениновые нуклеотиды (ATP, ADP), ингибиторы ANT и  $\text{Mg}^{2+}$



**Рис. 4.** Влияние циклоспорина А и EGTA на индуцированное ацилкарнитинами снижение мембранного потенциала митохондрий. Изменения мембранного потенциала, индуцированные последовательными добавками миристоилкарнитина (МС), 20 мкМ каждая добавка в присутствии 2 мкМ CsA и 1 мМ EGTA (а); влияние Ca<sup>2+</sup> и ингибиторов митохондриальной поры (EGTA 1 мМ, CsA 2 мкМ и ADP 0.7 мМ) на пороговые концентрации миристоилкарнитина (б).

препятствуют индукции mPTP кальцием [16], а эффект неорганического фосфата (P<sub>i</sub>) дозозависим [20, 21]. Механизмы регуляции и структурные элементы этого белкового мегакомплекса остаются предметом споров в течение нескольких десятков лет [13–16]. В настоящее время считается, что этот мегаканал формируется с участием АТФ-синтазы (F1F0), ANT, переносчика фосфата P<sub>i</sub> (PiC) и ключевого регулятора поры циклофилина D (CypD) [16]. CypD и F1F0 являются мишенями CsA [16, 22].

В наших экспериментах CsA и ADP вызывают увеличение пороговой концентрации МС (МС\*), необходимой для диссипации ΔΨ (рис. 4б). Однако, в отличие от классической модели индукции открытия поры избытком Ca<sup>2+</sup>, при индукции поры LCAC защитный эффект CsA ограничен концентрациями PC или MC, близкими к пороговым. Из рис. 3 видно, что CsA эффективен только при малых концентрациях PC и MC. Уже вторая добавка 10 мкМ PC или 25 мкМ MC вызывает быстрое набухание митохондрий. Эти данные могут свидетельствовать о наличии разных мишеней в мегакомплексе поры, на которые может быть направлено действие Ca<sup>2+</sup> и LCAC и соответствующих ацил-КоА.

CypD рассматривается в качестве ключевой мишени CsA при индукции mPTP кальцием [16, 22]. Одной из наиболее вероятных мишеней действия LCAC, а также соответствующих ацил-КоА, при индукции mPTP может быть ANT. Известно, что цитоплазматические и митохондриальные длинноцепочечные ацил-КоА, связываясь с ANT, вызывают ингибирование этого переносчика аденилатов [9–11]. Поэтому, известная гипотеза об участии LCFA и их производных в стабилизации ANT в цитоплазматической или митохон-

дриальной конформациях и роли таких конформационных переходов в регуляции mPTP [23] требует дальнейшего изучения.

Известно, что LCFA могут вызывать образование липидной поры [24–26]. Длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты: пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и эйкозановая (C20:0) кислоты, имеющие, в сравнении с другими LCFA, высокое сродство к Ca<sup>2+</sup>, могут образовывать в мембранах разного типа липидную пору. Образование такой обратимой липидной поры (комплекса жирной кислоты и Ca<sup>2+</sup>) предотвращается в присутствии EGTA [25, 26]. Теоретически можно было бы допустить, что деацетилирование пальмитоил-КоА и миристоил-КоА в митохондриях в условиях наших экспериментов может приводить к локальному накоплению соответствующих жирных кислот и индукции липидной поры. Однако индукция поры с участием MC в наших условиях наблюдается в присутствии EGTA и CsA (рис. 4б), что свидетельствует об участии LCAC в регуляции классической CsA-зависимой mPTP.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Источники финансирования.** Работа выполнена в рамках Государственного контракта 075-00381-21-00 Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН).

**Соответствие принципам этики.** Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами, сформулированными в Хельсинкской декларации по использованию лабораторных животных. Все процедуры на животных были одобрены комитетом по этике ИТЭБ РАН (N28 / 2021, 9 февраля 2021 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O., Bain J., Stevens R., Dyck J.R., Newgard C.B., Lopaschuk G.D., Muoio D.M. 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **7** (1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
- Fromenty B., Robin M.A., Igoudjil A., Mansouri A., Pessayre D. 2004. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* **30** (2), 121–138. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70098-8](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70098-8)
- Ford D.A., Han X., Horner C.C., Gross W. 1996. Gross accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: Metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. *Biochemistry.* **35** (24), 7903–7909. <https://doi.org/10.1021/bi960552n>
- Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B., Kerner J., Hoppel C.L. 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia–reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33** (6), 1065–1089. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1378>
- Liepinsh E., Makrecka-Kuka M., Volska K., Kuka J., Makarova E., Antone U., Sevostjanovs E., Vilskersts R., Strods A., Tars K., Dambrova M. 2016. Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem. J.* **473** (9), 1191–1202. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160164>
- Erfle J.D., Sauer F. 1969. The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and alpha-oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **178** (3), 441–452. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90213-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90213-7)
- Lai J.C., Cooper A.J. 1991. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* **16** (7), 795–803.
- Farrell H.M.Jr., Wickham E.D., Reeves H.C. 1995. Effects of long-chain acyl-coenzyme A's on the activity of the soluble form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase from lactating bovine mammary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* **321** (1), 199–208. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1386>
- Paulson D.J., Shug A.L. 1984. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **766** (1), 70–76. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90218-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90218-4)
- Schoenfeld P., Bohnensack R. 1997. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett.* **420**, 167–170.
- Ciapaite J., Van Eikenhorst D., Bakker S., Diamant M., Heine R.J., Wagner M.J., Westerhoff H.V., Krab K. 2005. Modular kinetic analysis of the adenine nucleotide translocator-mediated effects of palmitoyl-CoA on the oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Diabetes.* **54** (4), 944–951. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.944>
- Wojtczak L., Wieckowski M.R. 1999. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 447–455.
- Hunter D.R., Haworth R.A. 1979. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Arch. Biochem. Biophys.* **195** (2), 468–477.
- Crompton M., Ellinger H., Costi A. 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357–360.
- Bernardi P., Broekemeir K.M., Pfeiffer D.R. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5), 509–517. <https://doi.org/10.1007/BF00762735>
- Kwong J.Q., Molkentin J.D. 2015. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* **21** (2), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>
- Гришина Е.В., Галимова М.Х., Джафаров Р.Х., Сергеев А.С., Федотчева Н.И., Дынник В.В. 2015. Индукция циклоспорин-чувствительной митохондриальной поры субстратами, образующими ацетил-CoA, в норме и при диабете 2 типа. *Биол. мембраны.* **32** (5–6), 319–327. <https://doi.org/10.7868/S0233475515050047>
- Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Nenov M.N., Kasyrov V.A., Pimenov O.Y., Dynnik V.V. 2020. Dissecting cellular mechanisms of long-chain acylcarnitines-driven cardiotoxicity: Disturbance of calcium homeostasis, activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipases, and mitochondrial energetics collapse. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (20), 7461. <https://doi.org/10.3390/ijms21207461>
- Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. 2020. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* **287** (8), 1525–1536. <https://doi.org/10.1111/febs.15090>
- Chalmers S., Nicholls D.G. 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278** (2), 19062–19070.
- Mishra J., Ariea J., Davani L., Gayathri K., Natarajan K., Kwok W.M., David F., Stowe J., Camara A.K.S. 2019. Cyclosporin A increases mitochondrial buffering of calcium: An additional mechanism in delaying mitochondrial permeability transition pore opening. *Cells.* **8**, 1052. <https://doi.org/10.3390/cells8091052>
- Fayaz S.M., Raj Y.V., Krishnamurthy R.G. 2015. Cy-pD: The key to the death door. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **14**, 654–663.
- Zoratti M., Szabo I. 1995. Mitochondrial permeability pore. *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**, 139–176.

24. Sultan A., Sokolove P.M. 2001. Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **386** (1), 37–51.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2194>
25. Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C., Gritsenko E., Pavlov E., Lazareva A.V., Limarenko E., Rey C., Louisot P., Saris N.E. 2001. Palmitic and stearic acids bind  $\text{Ca}^{2+}$  with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to  $\text{Ca}^{2+}$ -activated mitochondrial pores. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33** (4), 319–331.  
<https://doi.org/10.1023/a:1010659323937>
26. Mironova G.D., Pavlov E.V. 2021. Mitochondrial cyclosporine A-independent palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced permeability transition pore (PA-mPT Pore) and its role in mitochondrial function and protection against calcium overload and glutamate toxicity. *Cells.* **10**, 125.  
<https://doi.org/10.3390/cells10010125>

## Induction of Mitochondrial Cyclosporin-dependent Permeability Transition Pore by Acylcarnitines. Effects of Concentrations and Carbon Chain Length

N. I. Fedotcheva<sup>1</sup>, E. V. Grishina<sup>1</sup>, V. V. Dynnik<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

\*e-mail: [Dynnik@rambler.ru](mailto:Dynnik@rambler.ru)

It is known that the concentrations of long-chain fatty acids (LCFA) and their carnitine derivatives (LCAC) in the blood at obesity and type 2 diabetes are greatly increased and under conditions of ischemia/reperfusion can exceed tens of  $\mu\text{M}$  in the area of cell damage (for example, in stroke/heart attack). The most toxic are LCAC, activated derivatives of LCFA. In this work we investigated effects of *D,L*-acylcarnitines with different carbon chain lengths (hexanoylcarnitine (HC, C6: 0); lauroylcarnitine (LC, C12: 0); myristoylcarnitine (MC, C14: 0), and palmitoylcarnitine (PC, C16: 0)) on the induction of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). In experiments on isolated rat liver mitochondria, the mitochondrial respiration rate ( $V_3$  and  $V_4$ ), mitochondrial potential ( $\Delta\Psi$ ), and mitochondrial swelling during the oxidation of glutamate and pyruvate were recorded in the presence of various concentrations of acylcarnitines. It was shown that all 4 acylcarnitines inhibited mitochondrial respiration activated by the ADP-hexokinase system ( $V_3$ ) and also induced mitochondrial swelling (in state 4). The magnitudes of the observed effects were inversely proportional to the carbon chain length of the acylcarnitines. In the case of HC, respiration inhibition and swelling were weak and were observed only at high concentrations of HC, exceeding 3 and 0.4 mM, respectively. Dissipation of  $\Delta\Psi$ , which characterizes the pore opening, was not observed during incubation of mitochondria with an excess of HC. The critical concentrations of PC, MC, and LC, at which a rapid fall of  $\Delta\Psi$  occurred, were 100, 110, and 500  $\mu\text{M}$ , respectively. PC, MC, and LC at concentrations of the order of 10, 25, and 200  $\mu\text{M}$ , respectively, induced significant swelling of mitochondria (>40%). Cyclosporin A and EGTA raised threshold concentrations of LCAC required for pore opening but were ineffective at higher concentrations of PC and MC. Thus, among the derivatives of saturated fatty acids with a carbon chain length from 6 to 16, PC and MC are the most toxic agents causing the induction of mPTP.

**Keywords:** acylcarnitines, mitochondrial permeability transition pore