

## Ca<sup>2+</sup>-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ СЕМЯДОЛЕЙ ЛЮПИНА

© 2023 г. А. Г. Шугаев<sup>а</sup>, \*, П. А. Буцанец<sup>а</sup>, Н. А. Шугаева<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: ag-shugaev@ifr.moscow

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 12.01.2023 г.

Принята к публикации 12.01.2023 г.

Изучено влияние экзогенного Ca<sup>2+</sup> на дыхание, генерацию мембранного потенциала, изменение объема и проницаемость для протонов внутренней мембраны митохондрий, выделенных из семян этиолированных проростков люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.). Используемые в работе митохондрии характеризовались прочным сопряжением процессов окисления и фосфорилирования. Высокая функциональная активность митохондрий подтверждалась их способностью генерировать при окислении сукцината трансмембранный градиент протонов на внутренней мембране (мембранный потенциал или ΔΨ), а также устойчиво поддерживать его в течение длительного времени, как за счет работы электрон-транспортной цепи, так и за счет гидролиза АТФ в условиях анаэробноза. Показано, что присутствие 60–120 мкМ CaCl<sub>2</sub> в среде инкубации митохондрий не оказывало существенного влияния на скорость окисления сукцината и параметры окислительного фосфорилирования, однако индуцировало диссипацию ΔΨ в условиях исчерпания кислорода в среде инкубации. Максимально полное удаление Ca<sup>2+</sup> из среды в присутствии хелаторов (ЭГТА, ЭДТА) предотвращало сброс мембранного потенциала. Ca<sup>2+</sup>-зависимая деполяризация внутренней мембраны ингибировалась дитиотрейтолом, что предполагает участие в этом процессе активных форм кислорода. Сброс мембранного потенциала не сопровождался набуханием митохондрий и не был чувствителен к циклоспорину А. С использованием металлохромного Ca<sup>2+</sup>-индикатора арсеназо III, было показано, что митохондрии семян люпина способны активно поглощать экзогенный Ca<sup>2+</sup> и накапливать его в матриксе. Ca<sup>2+</sup>-индуцируемая диссипация ΔΨ в условиях анаэробноза сопровождалась выходом Ca<sup>2+</sup> из митохондрий, скорость которого резко возрастала в присутствии кальциевого ионофора A23 (A23187). Предполагается, что накопление Ca<sup>2+</sup> и повышение уровня активных форм кислорода в матриксе, индуцирует в условиях анаэробноза обратимую пермеабиллизацию внутренней мембраны митохондрий семян люпина, которая обусловлена открытием поры неспецифической проницаемости в состоянии низкой проводимости, проницаемой для протонов и, возможно, для других небольших катионов (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>).

**Ключевые слова:** *Lupinus angustifolius*, митохондрии, мембранный потенциал, окисление сукцината, проницаемость внутренней мембраны, семена люпина, транспорт кальция

**DOI:** 10.31857/S0015330322600814, **EDN:** PZENWD

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизма регулируемого изменения (увеличения) проницаемости внутренней мембраны митохондрий животных, растений и дрожжей

**Сокращения:** A23 (A23187) – кальциевый ионофор; МРК – митохондриальный разобщающий канал; ПГК – программируемая гибель клеток; СДГ – сукцинатдегидрогеназа; СК – салициловая кислота; ЕТН129 – кальциевый ионофор; МСU (mitochondrial calcium uniporter) – митохондриальный Ca<sup>2+</sup> – унипортер; РТР (Permeability Transition Pore) – пора неспецифической проницаемости во внутренней мембране митохондрий; ΔΨ (дельтапси) – мембранный потенциал.

для протонов и других небольших молекул, благодаря открытию в ней специального канала или поры, получившей название РТР (от Permeability Transition Pore) позволило выявить еще одну важнейшую функцию этих органелл. Было установлено, что наряду с процессом окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ, необходимого для обеспечения жизнедеятельности любой клетки, индукция РТР, под влиянием различных неблагоприятных и патологических факторов инициирует, по крайней мере, в митохондриях млекопитающих, процесс программируемой клеточной

гибели (ПГК) по пути апоптоза, благодаря выходу из органелл различных проапоптозных белков [1–3]. Хотя в отношении структуры РТР продолжаются дискуссии, установлено, что этот канал может функционировать в митохондриях в двух состояниях или подсостояниях. Гораздо лучше изучена работа РТР в состоянии высокой проводимости, когда через этот мегаканал через внутреннюю мембрану митохондрий могут проникать достаточно крупные молекулы с массой до 1.5 кДа, например, сахароза. Функционирование РТР в этом состоянии, кроме диссипации  $\Delta\Psi$  приводит к высокоамплитудному набуханию митохондрий, нарушению целостности их внешней мембраны и выходу из органелл цитохрома *c* и ряда других белков, запускающих процессы программируемой клеточной гибели (ПГК) по пути апоптоза (или некроза) [2]. Учитывая особую важность для клетки данного физиологического процесса, регуляция функционирования РТР чрезвычайно сложна, она включает десятки эффекторов и остается не до конца изученной, даже в митохондриях животных. Возможно, это связано с недостаточной изученностью молекулярной природы этого канала. Вместе с тем, среди исследователей существует консенсус относительно того, что основными индукторами РТР, наряду с активными формами кислорода (АФК), являются ионы Ca<sup>2+</sup>, и основная масса публикаций по данной проблеме посвящена изучению влияния именно этих эффекторов на функционирование РТР в митохондриях животных, дрожжей и растений [1, 3–8]. В состоянии низкой проводимости РТР проницаема для протонов и низкомолекулярных катионов (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, и, по-видимому, Ca<sup>2+</sup>). В этом состоянии функционирование РТР легко обратимо, не сопровождается набуханием органелл, но приводит к диссипации мембранного потенциала ( $\Delta\Psi$ ). Постулируется, что в данном состоянии РТР может вовлекаться в передачу Ca<sup>2+</sup>-сигнала и/или в регуляцию концентрации этого иона в матриксе за счет его быстрого выхода из органелл [2–4].

Доказательства присутствия РТР в митохондриях растений были получены 20 лет назад [8–10], однако, публикации, посвященные изучению этого канала остаются немногочисленными, а полученные результаты достаточно противоречивыми. Трудности в изучении РТР возникают, в частности, вследствие того, что органеллы, выделенные из митохондрий ряда растительных объектов (клубней картофеля, листьев кабачка), оказались не способны активно поглощать из среды инкубации и накапливать в матриксе ионы Ca<sup>2+</sup>, по-видимому, вследствие отсутствия или низкой активности Ca<sup>2+</sup>-унипортера (MCU) [8, 11, 12]. Поэтому, для создания условий накопления Ca<sup>2+</sup> в матриксе и индукции РТР в таких митохондриях исследователи вынуждены использовать или

очень высокие, нефизиологические концентрации этого катиона в среде инкубации [8–10] или Ca<sup>2+</sup>-ионофы [12]. Кроме того, было обнаружено, что некоторые механизмы, регулирующие функционирование РТР в митохондриях животных, не работают у растений. Так, например, открытие РТР в митохондриях растений, может быть нечувствительно к ингибированию циклоспорином А (ЦсА), что является диагностическим тестом для выявления функционирования данного канала в митохондриях животных [8, 10]. Наконец, было обнаружено, что многие последствия индукции РТР в митохондриях растений (набухание органелл, выход цитохрома *c*, ингибирование в присутствии аденилатов), могут быть имитированы открытием во внутренней мембране другого канала – АТФ-чувствительного K<sup>+</sup>-канала (РмитоK<sub>АТФ</sub>) [13]. Эти результаты свидетельствуют, что функционирование РТР в митохондриях растений имеет ряд особенностей, в частности, открытие этого канала может быть не чувствительно к ЦсА, и не всегда приводит к набуханию органелл [7, 8, 12].

Ранее нами было показано, что присутствие в среде инкубации митохондрий семян люпина стрессового фитогормона, салициловой кислоты (СК), которое активировало образование АФК, вызывало, резкое увеличение протонной проницаемости внутренней мембраны органелл и диссипацию  $\Delta\Psi$ , которые предотвращались присутствием антиоксидантов и полностью обращались внесением в среду инкубации митохондрий восстановителей, например, дитиотрейтолом (ДТТ) [14, 15]. Полученные результаты позволили предположить, что СК способна индуцировать пермеабиллизацию внутренней мембраны митохондрий растений в результате открытия АФК-зависимого, проницаемого для протонов разобщающего канала (МРК), который, по-видимому, является особым состоянием (подсостоянием) РТР функционирующей в состоянии низкой проводимости [14]. В данной работе для выяснения механизмов регуляции МРК в митохондриях семян люпина нами было изучено влияние на его индукцию ионов Ca<sup>2+</sup>, который, как уже отмечалось, наряду с АФК, является ключевым регулятором работы РТР в митохондриях животных, растений и дрожжей.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение влияния экзогенного кальция на дыхание и проницаемость внутренней мембраны митохондрий семян люпина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объектом исследования** служили митохондрии, выделенные из семян этиолированных проростков люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L., сорт “Ладный”). Проростки люпина выра-

щивали в течение 5 дней на дистиллированной воде в термостате при 24–25°C в темноте.

**Выделение митохондрий** из семядолей проростков люпина осуществляли, используя единую методику дифференциального центрифугирования, описанную ранее [16] в небольшой модификации. Семядоли массой 12 г промывали дистиллированной водой, высушивали, охлаждали в холодной комнате, измельчали в ступке со средой гомогенизации (в соотношении 1 : 4), содержащей: 0.5 М сахарозу, 50 мМ HEPES-буфер (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Гомогенат отфильтровывали через 4 слоя мираклоса и центрифугировали при 4000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали и отмывали в среде, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 5 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 0.1% БСА, затем центрифугировали при 4000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант, содержащий митохондрии центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали в малом объеме среды, содержащей: 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Пробирку с суспензией митохондрий (10–15 мг/мл) хранили на льду. Все операции проводили в холодной комнате при 2–4°C.

**Поглощение кислорода** митохондриями измеряли полярографическим (или амперометрическим) методом с использованием кислородного электрода типа Кларка. Стандартная инкубационная среда (1 мл) содержала: 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4) и 0.1% БСА, свободный от ЖК и 0.6–0.8 мг белка митохондрий. В качестве субстрата окисления использовали 5 мМ сукцинат в присутствии 100 мкМ АТФ необходимого для предотвращения ингибирования СДГ оксалоацетатом и поддержания мембранного потенциала в условиях анаэробноза за счет работы АТФазы. Остальные добавки и условия экспериментов приведены в подписях к рисункам. Скорость поглощения кислорода при окислении дыхательного субстрата митохондриями в различных метаболических состояниях, величину коэффициента дыхательного контроля (ДК) и отношения АДФ/О рассчитывали по методу Chance и Williams [17]. Количество митохондриального белка определяли по методу Бредфорд [18], используя БСА в качестве стандарта.

**За генерацией мембранного потенциала ( $\Delta\Psi$ )** на внутренней мембране митохондрий следили по изменению разности поглощений при 511 и 533 нм сафранина О [19] на спектрофотометре Hitachi-557 в двухволновом режиме работы. Стандартная среда инкубации (2 мл) при комнатной температуре дополнительно содержала 5 мкМ сафранин и

около 0.5 мг/мл митохондриального белка. Остальные добавки приведены в подписях к рисункам.

**Изменение уровня ионов Ca<sup>2+</sup> в среде** инкубации митохондрий регистрировали по разности поглощений металлохромного индикатора арсеназо III при двух длинах волн (665 и 685 нм) на спектрофотометре Hitachi-557 [20]. Среда инкубации содержала 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 2 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 25 мкМ арсеназо III, 5 мМ сукцинат, 200 мкМ АДФ, 0.1% БСА свободный от ЖК, а также 20 или 100 мкМ CaCl<sub>2</sub>. Остальные добавки приведены в подписях к рисункам.

**Изменение объема митохондрий.** Набухание и сжатие митохондрий (0.25–0.35 мг белка/мл) регистрировали по изменению поглощения (мутности) суспензии при 540 нм в двухлучевом режиме с помощью спектрофотометра Hitachi-557. Среды опытной кюветы и кюветы сравнения (2 мл) содержали: 0.3 М сахарозу и 10 мМ HEPES-буфер (pH 7.4). Дополнительный состав сред опытной кюветы приведен в подписях к рисунку. Добавки, там, где это указано на рисунке, вносили в минимальных объемах, при необходимости проводилась соответствующая коррекция оптической плотности сред вследствие разведения.

В работе использованы следующие реактивы: CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и другие соли были отечественного производства марки о.с.ч. или х.ч. Дыхательные субстраты, нуклеотиды, БСА свободный от ЖК, MOPS, HEPES, ЭГТА, FCCP, NADH, сафранин О, А23, аламецитин и др. — фирмы “Sigma” (США), арсеназо III — фирмы “Serva” (Германия).

Все опыты и серии опытов были выполнены в трех биологических и трех аналитических повторностях. На рисунках представлены данные характерных опытов, в таблицах и графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Влияние Ca<sup>2+</sup> на окисление сукцината митохондриями семядолей люпина*

В таблице 1 приведены результаты полярографических опытов по изучению влияния различных концентраций экзогенного Ca<sup>2+</sup> на окисление сукцината митохондриями семядолей проростков люпина. Судя по представленным данным, используемые в работе митохондрии имели высокую функциональную интактность. В частности, окисление митохондриями дыхательных субстратов, например, сукцината, осуществлялось с высокой скоростью, оно существенно стимулировалось добавками АДФ (состояние 3), а затем тормозилось после его исчерпания в процессе синтеза АТФ (состояние 4). При этом величина дыхатель-

**Таблица 1.** Влияние CaCl<sub>2</sub> на дыхание и параметры окислительного фосфорилирования при окислении сукцината митохондриями семян люпина

| Вариант                   | Состояние 3 | Состояние 4 | ДК        | АДФ/О     |
|---------------------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| Контроль                  | 186 ± 20    | 69 ± 14     | 2.7 ± 0.5 | 1.6 ± 0.1 |
| 50 мкМ CaCl <sub>2</sub>  | 190 ± 25    | 67 ± 15     | 2.8 ± 0.5 | 1.6 ± 0.2 |
| 100 мкМ CaCl <sub>2</sub> | 196 ± 21    | 73 ± 20     | 2.7 ± 0.3 | 1.5 ± 0.2 |
| 300 мкМ CaCl <sub>2</sub> | 209 ± 27    | 82 ± 26     | 2.5 ± 0.3 | 1.4 ± 0.3 |

Примечание. Состав стандартной среды инкубации см. в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Дополнительно вносили 5 мМ сукцинат, 100 мкМ АТФ, а также 100 мкМ АДФ при окислении сукцината в состоянии 3. Скорости окисления субстрата выражены в нг-атом O<sub>2</sub>/(мин/мг белка митохондрий).

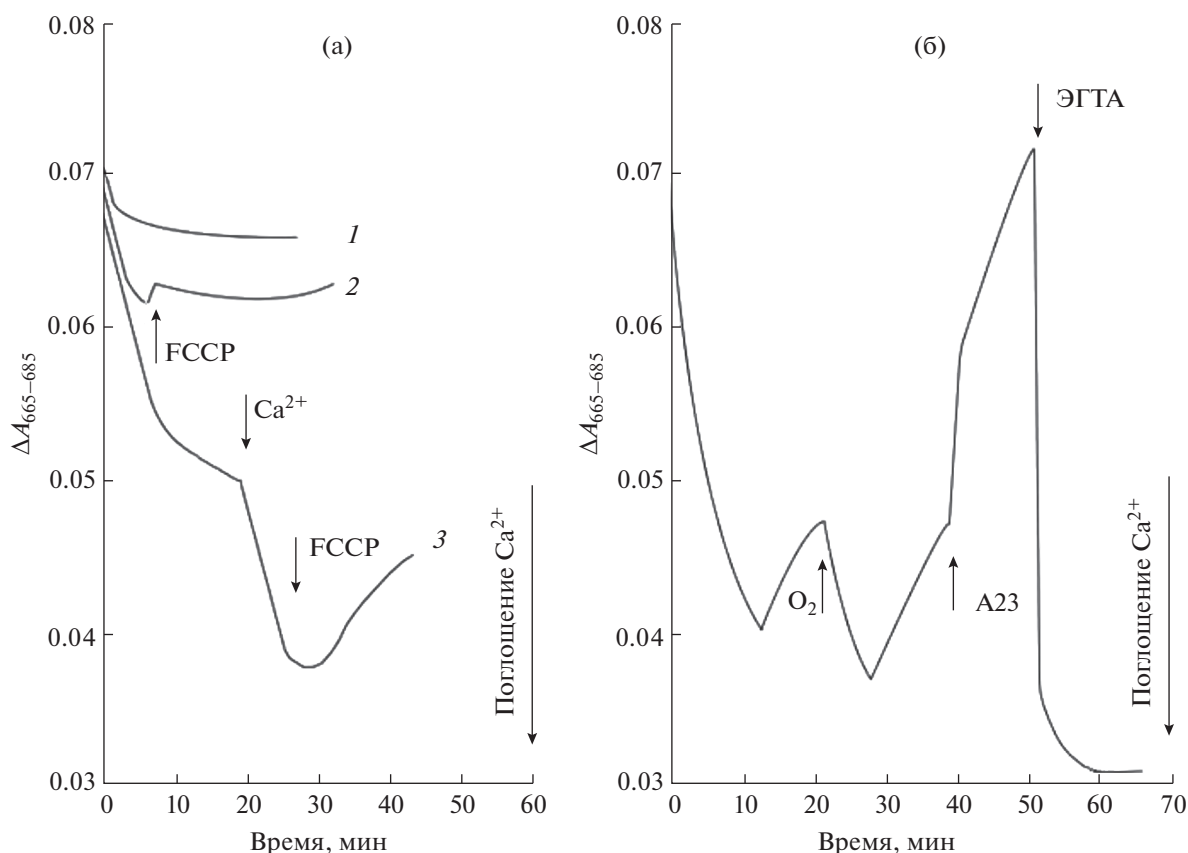
ного контроля (ДК) по Чансу (состояние 3/состояние 4) составляла около 3, что свидетельствовало о прочном сопряжении процесса окислительного фосфорилирования, а близкая к теоретической величина отношения АДФ/О (равная 1.6–1.5) указывала на его высокую эффективность. Ранее нами было показано, что выделенные аналогичным способом митохондрии люпина столь же эффективно окисляли малат и другие НАД-зависимые дыхательные субстраты [16]. Далее было установлено, что присутствие в среде инкубации митохондрий ионов Ca<sup>2+</sup> даже в сравнительно высокой концентрации (50–100 мкМ) не оказывало существенного влияния, ни на скорости окисления сукцината в различных метаболических состояниях, ни на величину коэффициента ДК и отношения АДФ/О (табл. 1). Незначительное разобщение дыхания, которое выражалось в увеличении скорости окисления сукцината в состоянии 4, а также в снижении величины ДК и АДФ/О, проявлялось только при использовании достаточно высоких (300 мкМ и выше) концентраций Ca<sup>2+</sup> (табл. 1).

#### Транспорт Ca<sup>2+</sup> в митохондриях семян люпина

С учетом, отмеченных во введении, противоречивых литературных данных относительно особенностей функционирования Ca<sup>2+</sup>-транспортирующих механизмов в митохондриях растений, а также отмеченного выше слабого действия Ca<sup>2+</sup> на дыхание митохондрий люпина, представляло интерес выяснение возможности этих органелл к поглощению и накоплению в матриксе экзогенного Ca<sup>2+</sup>. С этой целью для регистрации изменения уровня Ca<sup>2+</sup> в среде инкубации митохондрий нами был использован металлохромный индикатор арсеназо III. Было обнаружено, что митохондрии семян люпина в присутствии дыхательного субстрата (сукцината) и кислорода способны поглощать экзогенный Ca<sup>2+</sup> в диапазоне концентраций 20–200 мкМ с достаточно высокой для растительных митохондрий скоростью, примерно, 15 нмоль Ca<sup>2+</sup>/(мин/мг белка) (рис. 1а). Необходимо отметить, что процесс поглощения Ca<sup>2+</sup> в митохон-

дрих зависел от присутствия в среде инкубации неорганического фосфата (P<sub>i</sub>) и был активным, поскольку тормозился, как в отсутствие P<sub>i</sub>, так и в присутствии разобщителей дыхания, например, FCCP (рис. 1а, кривые 1, 2). Кроме того, переносчик, катализирующий транспорт Ca<sup>2+</sup> в матрикс, характеризовался достаточно низким сродством к кальцию, поскольку при внесении в среду инкубации 20 мкМ Ca<sup>2+</sup> скорость его поглощения митохондриями быстро снижалась, но восстанавливалась после следующей добавки 20 мкМ Ca<sup>2+</sup> (рис. 1а, кривая 3). Если добавка FCCP в среду инкубации происходила после нескольких минут поглощения Ca<sup>2+</sup>, тогда торможение транспорта кальция в матрикс выявляло существование противоположного процесса, а именно, выхода поглощенного Ca<sup>2+</sup> из митохондрий (рис. 1а, кривая 3).

На рис. 1б показана динамика транспорта 100 мкМ Ca<sup>2+</sup> через внутреннюю мембрану митохондрий люпина. Видно, что в течение 10–12 мин наблюдалась практически линейная скорость поглощения Ca<sup>2+</sup> митохондриями, после чего направленность процесса резко менялась и регистрировался выход накопленного кальция из матрикса. Как было показано в полярографических исследованиях с использованием кислородного электрода, за указанный временной период (10–12 мин) поглощения митохондриями Ca<sup>2+</sup> происходило исчерпание кислорода в среде инкубации при окислении сукцината. Обращение транспорта Ca<sup>2+</sup> при наступлении условий анаэробноза подтверждалось и тем фактом, что внесение в среду инкубации небольшого количества кислорода, например, в результате ее барбатирования воздухом, и последующее его исчерпание при окислении субстрата, было способно неоднократно изменять направленность транспорта Ca<sup>2+</sup> в митохондриях люпина. Наконец, быстрое удаление всего накопленного митохондриями Ca<sup>2+</sup> происходило после добавки ионофора A23 (рис. 1б). Добавка хелатора кальция – ЭГТА (500 мкМ) снижала содержание Ca<sup>2+</sup> в среде инкубации митохондрий до исходного уровня. Таким образом, интактные митохондрии семян люпина способны катализировать



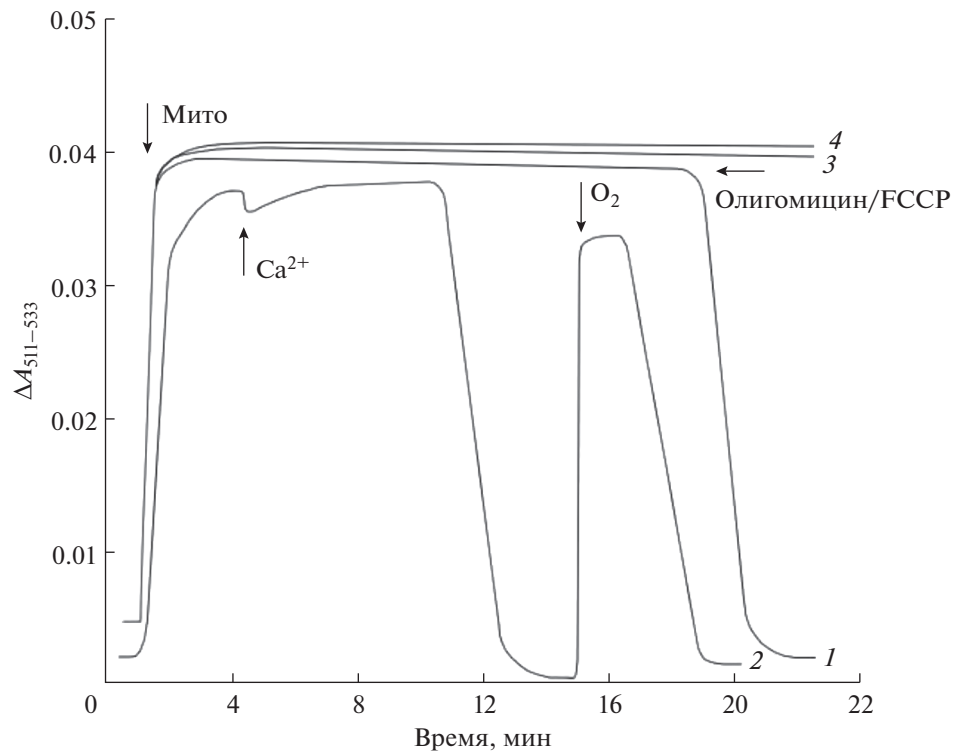
**Рис. 1.** Транспорт экзогенного  $Ca^{2+}$  в митохондриях семян люпина. Условия измерения – в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Стандартная реакционная среда в присутствии 0.3–0.4 мг/мл митохондриального белка, а также 20 мкМ  $Ca^{2+}$  (рис. 1а) или 100 мкМ  $Ca^{2+}$  (рис. 1б), дополнительно вносили, где указано: 20 мкМ  $Ca^{2+}$ , 5 мкМ А23, 0.5 мкМ FCCP, 1 мМ ЭГТА.  $\uparrow O_2$  – барбатиrowание инкубационной среды воздухом. 1, 2 – транспорт  $Ca^{2+}$  в митохондриях в отсутствие неорганического фосфата или в присутствии FCCP соответственно; 3 – кинетика поглощения 20 мкМ  $Ca^{2+}$  митохондриями люпина.

процессы активного поглощения (импорта) экзогенного  $Ca^{2+}$ , а также его выхода (экспорта) во внешнюю среду, который проявлялся в условиях ингибирования транспорта этого катиона в матрикс.

#### *Влияние $Ca^{2+}$ на генерацию мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий люпина*

Генерацию мембранного потенциала ( $\Delta\Psi$ ), который является наиболее чувствительным индикатором процессов разобщения и сопряжения в ЭТЦ, изучали в тех же экспериментальных условиях, что и дыхание митохондрий. Как и следовало ожидать, высокая функциональная активность, используемая в данной работе митохондрий, подтверждалась их способностью к быстрой генерации  $\Delta\Psi$  при окислении сукцината в присутствии АТФ и его поддержанию в течение продолжительного времени даже после исчерпания кислорода в среде инкубации (рис. 2, кривая 1). Поскольку ско-

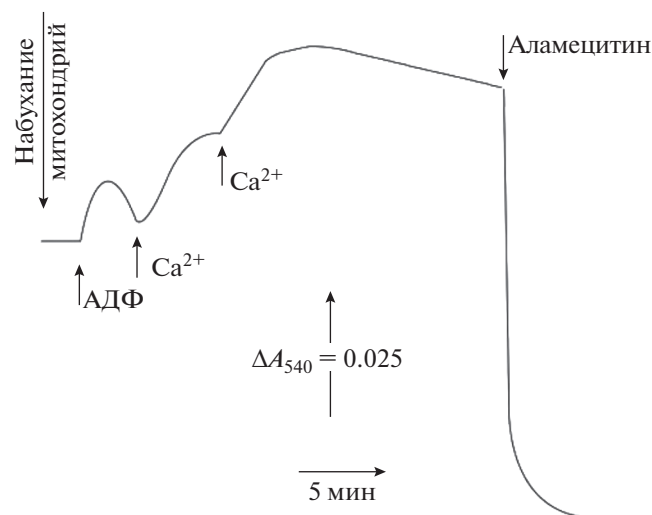
рость дыхания митохондрий люпина при окислении сукцината была достаточно высокой, условия анаэробноза в среде инкубации органелл возникали по истечении короткого интервала времени (10–12 мин), длительность которого определялась в полярографических опытах с использованием кислородного электрода (данные не приведены). Этот интервал времени также соответствовал результатам опытов по изучению динамики транспорта  $Ca^{2+}$  (рис. 1б). В отсутствие кислорода потенциал на внутренней мембране митохондрий люпина поддерживался благодаря гидролизу АТФ, что подтверждалось его диссипацией под влиянием олигомицина (рис. 2, кривая 1). Таким образом, полученные результаты показали, что митохондрии люпина способны генерировать и в течение длительного времени поддерживать  $\Delta\Psi$ , как в условиях аэробноза при окислении сукцината, так и в условиях анаэробноза, за счет гидролиза АТФ. Эти данные также подтверждают целостность внутренней мембраны органелл и ее низкую проницаемость для протонов.



**Рис. 2.** Влияние ионов Ca<sup>2+</sup> на генерацию мембранного потенциала ( $\Delta\Psi$ ) в митохондриях семян люпина. Условия измерения — в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Стандартная среда инкубации содержала 5 мкМ сафранин и около 0.5 мг/мл митохондриального белка. Дополнительно вносили 100 мкМ Ca<sup>2+</sup>, 20 мкМ олигомицин, 0.5 мкМ ФССР, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ.  $\uparrow O_2$  — барбатирование инкубационной среды воздухом. 1 — контроль, генерация и длительное поддержание  $\Delta\Psi$  на внутренней мембране при окислении сукцината и гидролизе АТФ; 2 — диссипация  $\Delta\Psi$  под влиянием 100 мкМ Ca<sup>2+</sup> в условиях анаэробноза (через 10–12 мин окисления субстрата), 3, 4 — ингибирование Ca<sup>2+</sup>-индуцируемой (в присутствии 100 мкМ Ca<sup>2+</sup>) деполяризации внутренней мембраны митохондрий под влиянием ЭГТА или ДТТ соответственно.

Далее нами было изучено влияние Ca<sup>2+</sup> на генерацию  $\Delta\Psi$  и возможность индукции МРК (или РТР) в митохондриях люпина. Следует отметить, что в выборе действующих концентраций Ca<sup>2+</sup> мы опирались на литературные данные, согласно которым для индукции РТР в митохондриях растений и дрожжей требуются достаточно высокие (вплоть до миллимолярных) концентрации этого катиона [8, 9, 12, 21–24]. Причиной этого, возможно, является низкая активность и/или низкое сродство основного переносчика (по-видимому, унипортера), катализирующего транспорт Ca<sup>2+</sup> в матрикс митохондрий ряда растений и дрожжей [8, 23, 24]. На рис. 2, кривая 2 показано действие ионов Ca<sup>2+</sup> на величину  $\Delta\Psi$  в митохондриях люпина. Видно, что добавка 200 мкМ CaCl<sub>2</sub> в среду инкубации органелл или совсем не влияла, или незначительно снижала величину потенциала. Судя по этим данным, ионы Ca<sup>2+</sup> не оказывают существенного разобщающего действия на окисление сукцината, что согласуется с результатами полярографических опытов (табл. 1). Тем не ме-

нее, присутствие ионов Ca<sup>2+</sup> индуцировало, после лаг-периода (10–12 мин), быструю диссипацию  $\Delta\Psi$  (рис. 2, кривая 2). Деполяризация мембраны была полностью обратима после аэрации среды, однако, после исчерпания кислорода в ходе дыхания митохондрий, вновь наблюдался сброс потенциала (рис. 2, кривая 2). Деполяризацию мембраны под влиянием Ca<sup>2+</sup> можно было предотвратить внесением в среду инкубации ЭГТА, а, кроме того, удалением из нее P<sub>i</sub>, необходимого, как было показано выше, для транспорта этого катиона в матрикс (рис. 2, кривые 3 и 4). Интересно, что ЭГТА ингибировала диссипацию  $\Delta\Psi$ , если была добавлена в реакционную среду предварительно или через 1–2 мин после добавки Ca<sup>2+</sup>, более позднее внесение хелатора не предотвращало и не обращало диссипацию  $\Delta\Psi$ . Следует отметить, что Ca<sup>2+</sup>-зависимая деполяризация внутренней мембраны митохондрий люпина не ингибировалась ЦсА (данные не приведены), но полностью предотвращалась в присутствии мощного восстановителя — ДТТ, что предполагает участие в этом процессе АФК (рис. 2, кривая 5).



**Рис. 3.** Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на изменение объема митохондрий семян люпина. Условия опытов и составы сред — в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Там, где указано на рисунке в опытную кювету дополнительно вносили: 100 мкМ АДФ, 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 15 мкг/мл аламецитин.

#### *Влияние транспорта $\text{Ca}^{2+}$ на изменение объема митохондрий семян люпина*

Судя по литературным данным, индукция РТР в митохондриях животных, как правило, сопровождалась не только диссипацией  $\Delta\Psi$ , но и высокоамплитудным набуханием органелл, ведущего к нарушению целостности внешней мембраны и выходу из межмембранного пространства цитохрома *c* и других проапоптотических белков [1–3]. Что касается митохондрий растений, то здесь ситуация неоднозначная. В ряде работ была обнаружена взаимосвязь между индукцией РТР и набуханием митохондрий [8–10], однако, в других исследованиях этого не наблюдалось [12, 22]. В используемых нами условиях, внесение  $\text{Ca}^{2+}$  в среду инкубации дышащих митохондрий люпина, даже при использовании довольно высоких его концентраций (до 200 мкМ), сопровождалось не набуханием, а сжатием органелл (рис. 3). В этих условиях набухание митохондрий регистрировалось только после добавки аламецитина, способного образовывать во внутренней мембране митохондрий пору, диаметр которой примерно равен диаметру РТР в состоянии высокой проводимости, проницаемой для молекул с мол. массой до 1.5 кДа, в том числе, для молекул сахарозы (рис. 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что митохондрии семян люпина обладали способностью к поглощению  $\text{Ca}^{2+}$  из внешней среды и накоплению его в матриксе. Также было установлено, что этот

процесс является энергозависимым и характеризуется абсолютной необходимостью присутствия  $P_i$  в среде инкубации. Кроме того, было показано, что поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями семян люпина осуществлялось с относительно низкой скоростью, около 15 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /(мин/мг белка), которая на порядок ниже аналогичной скорости импорта этого катиона в митохондрии животных, катализируемого  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортером [24]. При этом, она соответствовала низкой интенсивности поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями, выделенными из ряда других растительных объектов [10, 11, 25]. В этой связи высказывается сомнение в том, что митохондрии могут участвовать в регуляции уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле клеток растений [25]. Полученные результаты также подтвердили, имеющиеся в литературе, данные о низкой затрате энергии, требуемой для активного транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях растений, что выражалось в слабом разобщении дыхания, т.е. в незначительном увеличении скорости окисления субстрата в состоянии 4 и снижении величины  $\Delta\Psi$  [24]. Очевидно, это обусловлено особенностями механизмов транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях растений, функционирование которых остается малоизученным несмотря на почти полувековую историю проведения подобных исследований.

Результаты, полученные в данной работе, позволили получить новую важную информацию о роли ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в индукции проницаемости внутренней мембраны в митохондриях люпина, вследствие открытия в ней разобщающего канала, проницаемого для протонов (МРК). Судя по ряду показателей, индукция МРК под влиянием  $\text{Ca}^{2+}$  в этих органеллах, оказалась достаточно близка к  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой индукции РТР в митохондриях, выделенных из некоторых других растительных объектов, например, из корней пшеницы [10]. В частности, интактные митохондрии корней пшеницы, как и митохондрии люпина, в ходе дыхания активно поглощали экзогенный  $\text{Ca}^{2+}$  и транспорт этого катиона зависел от присутствия в среде инкубации  $P_i$ . Далее, наступление анаэробнозиса в среде инкубации митохондрий сопровождалось быстрой диссипацией  $\Delta\Psi$  и выделением из матрикса поглощенных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [10]. При этом, в отсутствие экзогенного кальция одна только аноксия была не способна индуцировать РТР в митохондриях пшеницы. Кроме того, при низких микромолярных концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  его накопление в матриксе и индукция РТР не сопровождалась набуханием митохондрий пшеницы и выходом из них цитохрома *c*. Сопоставление этих данных с результатами, представленными в этой работе, позволяет заключить, что закономерности индукции и регуляции активности РТР в митохондриях корней пшеницы во многом схожи с аналогичными

предпосылками открытия разобщающего канала в митохондриях семян люпина, т.е. накоплением в матриксе ионов Ca<sup>2+</sup> и возникновением условий анаэробноз. В этой связи высказывается предположение, что в условиях анаэробноз увеличивается чувствительность РТР к основным ее регуляторам [10, 26, 27]. Однако, конкретный механизм подобной сенсibilизации РТР низким уровнем кислорода, например, к ионам Ca<sup>2+</sup> остается невыясненным.

Как уже отмечалось во введении, особенностью интактных митохондрий, выделенных из ряда растительных объектов, например, стеблей гороха и клубней картофеля, а также митохондрий некоторых дрожжей является отсутствие или низкая активность унипортера (MCU), обеспечивающего транспорт экзогенного Ca<sup>2+</sup> в матрикс [9, 12, 22, 23]. Вследствие этого, для увеличения уровня Ca<sup>2+</sup> в таких митохондриях используются Ca<sup>2+</sup>-ионофоры, например, ETН129 или А23. Интересно, что катализируемое ETН129 накопление Ca<sup>2+</sup> в митохондриях стеблей гороха приводило к индукции РТР и сопровождалось диссипацией ΔΨ, но не вело к изменению объема матрикса, а в митохондриях клубней картофеля использование очень высоких (миллимолярных) концентраций экзогенного Ca<sup>2+</sup> индуцировало РТР и высокоамплитудное набухание органелл [9, 12]. В митохондриях дрожжей *Endomyces magnusii* открытие РТР и диссипация ΔΨ при накоплении Ca<sup>2+</sup> в присутствии ETН129 также не сопровождалась набуханием матрикса, она совпадала по времени с наступлением аноксии и могла быть легко обращена дополнительной аэрацией суспензии органелл [23]. Подобные особенности в “поведении” и механизмах регуляции РТР, отражающие функционирование поры в различных состояниях свидетельствуют, по-видимому, о многообразии функций РТР в митохондриях дрожжей, растений и животных.

Хотя в отношении молекулярной структуры РТР продолжаются дебаты, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* давно установлено, что этот канал в митохондриях животных может функционировать в двух основных состояниях или подсостояниях (высокой и низкой проводимости) [4, 28]. Основные характеристики, механизмы регуляции и функциональное значение РТР в состоянии высокой проводимости или “классической РТР” хорошо известны и многократно описаны, в том числе для митохондрий растений [1–3, 7, 27]. Поэтому, более подробно рассмотрим особенности работы РТР в состоянии низкой проводимости, которое, как нам представляется, характерно для митохондрий растений и, возможно, некоторых дрожжей. Основными характеристиками этого состояния РТР являются: легкая, иногда спонтанная, обратимость индукции, отсутствие высокоамплитудного набухания матрикса и нарушения целостности

мембран, проницаемость канала только для протонов и небольших катионов (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>), включая, по-видимому, ионы Ca<sup>2+</sup> [4, 28]. Судя по имеющейся литературе, часть из которой была приведена выше, РТР в митохондриях растений и некоторых дрожжей, если ее активность удастся обнаружить, по-видимому, также может функционировать в двух состояниях – высокой и низкой проводимости. При этом, следует отметить, что открытие РТР в состоянии высокой проводимости, например, в митохондриях клубней картофеля, сопровождающееся высокоамплитудным набуханием, нарушением целостности внешней мембраны органелл и выходом из них цитохрома *c* достигалось только при использовании высоких или очень высоких (миллимолярных) концентраций экзогенного Ca<sup>2+</sup> [8, 9]. Трудно сказать, насколько реально достижение подобных, пусть даже локальных, концентраций ионов Ca<sup>2+</sup> в цитозоле клетки. Вместе с тем, нельзя полностью исключать возможность того, что в физиологических условиях свойства MCU могут существенно изменяться под влиянием целого семейства различных белков-регуляторов, образующих единый комплекс с этим переносчиком [24]. В недавней работе итальянских ученых были приведены характеристики функционирования РТР в митохондриях стеблей проростков гороха [12]. Как уже отмечалось, в этих митохондриях отсутствовали, или были неактивны, переносчики, катализирующие импорт экзогенного Ca<sup>2+</sup>, поэтому, был использован ETН129, обеспечивающий возможность электрофоретического транспорта и накопления этого катиона в матриксе, а также индукцию РТР. Подобно митохондриям животных РТР в этих органеллах индуцировалась Ca<sup>2+</sup>, прооксидантами (диамидом), окислителями SH групп белков (фениларсен-оксидом) и ингибировалась Mg-АДФ, указывая на существование общих компонентов в механизме регуляции канала. Вместе с тем были обнаружены и существенные особенности функционирования РТР в митохондриях гороха, которые, с другой стороны, сближают их с митохондриями люпина. Основными из них являются отсутствие набухания органелл, а также ее низкая чувствительность к ЦсА и высокая – к антиоксидантам и ДТТ [12]. Анализируя полученные результаты авторы высказывают предположение, что в митохондриях гороха РТР представляет собой АТФазу, точнее Ca<sup>2+</sup>-АТФазу, которая в ходе длительной эволюции приобрела дополнительную функцию, благодаря чему она может использоваться в качестве канала, обеспечивающего быстрый выход из матрикса ионов Ca<sup>2+</sup> [12].

Для выяснения физиологической роли РТР действительно важным является вопрос о способности транспортировать из матрикса ионы Ca<sup>2+</sup>,



при функционировании этого канала в состоянии низкой проводимости. К сожалению, этот вопрос пока не решен окончательно даже для митохондрий животных, хотя многие исследователи считают, что именно благодаря этому свойству РТР митохондрии способны играть ключевую роль в гомеостатировании уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле клеток, принимать активное участие в  $\text{Ca}^{2+}$  сигналинге, а также защищать органеллы от критического повышения уровня АФК и  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе [4, 29–31]. Полученные в данной работе результаты также оставляют этот вопрос открытым, хотя было показано, что пермеабиллизация внутренней мембраны митохондрий семян люпина, вследствие открытия РТР, сопровождалось довольно быстрым выходом из матрикса накопленного  $\text{Ca}^{2+}$ . Тем не менее, эта скорость была существенно ниже, чем в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора, а, кроме того, выход  $\text{Ca}^{2+}$  мог быть связан с активацией или демаскированием (в результате торможения энергозависимого импорта  $\text{Ca}^{2+}$ ) других транспортных механизмов, например,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  или  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  антипортеров, катализирующих экспорт этого катиона из митохондрий животных и растений. В этой связи следует отметить, что в митохондриях животных (печень, сердце) выход накопленного  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий с участием указанных переносчиков происходит с низкой скоростью (5–10 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /(мин/мг белка)), которая в 100–500 раз ниже, чем скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  катализируемая MCU. Вследствие этого необходимость существования механизма, обеспечивающего возможность быстрого выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса митохондрий достаточно очевидна и это может быть одной из функций РТР (т.е. в качестве  $\text{Ca}^{2+}$ -канала) [3, 29].

В заключение следует отметить, что сопоставление полученных результатов с данными о функционировании  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой РТР в митохондриях растений и некоторых дрожжей, позволяет утверждать, что аналогичный механизм, регулирующий проницаемость внутренней мембраны, существует в митохондриях семян люпина. Открытие РТР в состоянии низкой проводимости в этих органеллах легко обратимо, не чувствительно к ЦсА, сопровождается деполяризацией мембраны и индуцируется при повышении в матриксе уровня ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , а также при возникновении условий анаэробноза. Безусловно, необходимы дополнительные исследования для выяснения конкретных механизмов транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , а также его роли в регуляции функциональной активности митохондрий растений, включая индукцию РТР. В этой связи, митохондрии семян люпина представляются, на наш взгляд, перспективным объектом, поскольку выяснение указанных вопросов может проводиться на интактных органеллах.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (номер темы 121040800153-1 “Механизмы адаптации растений к факторам аридизации глобального климата и антропогенному загрязнению окружающей среды”).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Azzolin L., von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P.* The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 2504. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.023>
2. *Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G.* The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology // *Physiol. Rev.* 2015. V. 95. P. 111. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>
3. *Vercesi A., Castilho R.F., Kowaltowski A., de Oliveira H.C.F., de Souza-Pinto N.C., Figuella T.R., Busanello E.N.B.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition // *Free Radical Biol. Med.* 2018. V. 129. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.034>
4. *Ichas F., Mazat J.-P.* From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1366. P. 33.
5. *Sileikyte J., Forte M.* The mitochondrial permeability transition in mitochondrial disorders // *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2019. art. ID 3403075. <https://doi.org/10.1155/2019/3403075>
6. *Tajeddine N.* How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation? // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1860. P. 1079. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.013>
7. *Zancani M., Casolo V., Petrusa E., Peresson C., Patui S., Bertolini A., De Col V., Braiddot E., Boscuttiand F., Vianello A.* The permeability transition in plant mitochondria: the missing link // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. Art. 1120. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01120>
8. *Fortes F., Castilho R.F., Catisti R., Carnieri E., Vercesi A.E.*  $\text{Ca}^{2+}$  induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2001. V. 33. P. 43. <https://doi.org/10.1023/A:1005672623709>
9. *Arpagaus S., Rawyler A., Braendle R.* Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 1780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109416200>
10. *Violainen E., Blokhina O., Fagersted K.*  $\text{Ca}^{2+}$ -induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anox-

- ic stress // *Ann. Bot.* 2002. V. 90. P. 509.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf221>
11. *Martins I.S., Vercesi A.E.* Some characteristics of Ca<sup>2+</sup> transport in plant mitochondria // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985. V. 129. P. 943.  
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)91982-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)91982-5)
  12. *De Col V., Petrusa E., Casolo V., Braidot E., Lippe G., Filippo A., Peresson C., Bertolini A., Giorgio V., Checchitto V., Vianello A., Bernardi P., Zancani M.* Properties of the permeability transition of pea stem mitochondria // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. P. 1626.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01626>
  13. *Petrusa E., Casolo V., Peresson C., Braidot E., Vianello A., Macri F.* The K<sup>+</sup> ATP channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria // *Mitochondrion.* 2004. V. 3. P. 297.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.01.002>
  14. *Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Шугаева Н.А.* Салициловая кислота индуцирует протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий семян люпина // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. С. 765.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330316060099>
  15. *Буцанец П.А., Шугаева Н.А., Шугаев А.Г.* Влияние мелатонина и салициловой кислоты на генерацию АФК митохондриями семян люпина // *Физиология растений.* 2021. Т. 68. С. 421.  
<https://doi.org/10.31857/S0015330321040035>
  16. *Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Андреев И.М., Шугаева Н.А.* Влияние салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий растений // *Физиология растений.* 2014. Т. 61. С. 555.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330314040186>
  17. *Chance B., Williams G.R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation // *Adv. Enzymol.* 1956. V. 17. P. 65.
  18. *Bredford M.M.* A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  19. *Moore A.L., Bonner W.D.* Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranin method // *Plant Physiol.* 1982. V. 70. P. 415.  
<https://doi.org/10.1104/pp.70.5.1271>
  20. *Scarpa A.* Measurements of cation transport with metalochromic indicators // *Met. Enzymol.* 1979. V. 56. P. 301.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)56030-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)56030-3)
  21. *Silva M.A.P., Carnieri E.G.S., Vercesi A.* Calcium transport by corn mitochondria // *Plant Physiol.* 1992. V. 98. P. 452.  
<https://doi.org/10.1104/pp.98.2.452>
  22. *Curtis M.J., Wolpert T.J.* The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death // *Plant J.* 2002. V. 23. P. 295.  
<http://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01213.x>
  23. *Deryabina Y.I., Bazhenova E.N., Saris N.-E.L., Zvyagil'skaya R.A.* Ca<sup>2+</sup> efflux in mitochondria from the yeast *Endomyces magnusii* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 47801.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103685200>
  24. *Wagner S., De Bortoli S., Schwarzlander M., Szabo I.* Regulation of mitochondrial calcium in plants versus animals // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 3809.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw100>
  25. *Akerman K.E.G., Moore A.L.* Phosphate dependent, ruthenium red insensitive Ca<sup>2+</sup> uptake in mung bean mitochondria // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 114. P. 1176.  
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(83\)90686-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(83)90686-1)
  26. *Blokhina O.B., Chirkova T.V., Fagerstedt K.V.* Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells // *J. Exp. Bot.* 2001. V. 52. P. 1179.  
<https://doi.org/10.1093/jexbot/52.359.1179>
  27. *Chavez E., Melendes E., Zazueta C., Reyes-Vivas H., Perales S.G.* Membrane permeability transition as induced by dysfunction of the electron transport chain // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 41. P. 961.  
<https://doi.org/10.1080/15216549700202021>
  28. *Bernardi P.* The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? // *Front. Physiol.* 2013. V. 4. Art. 95.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00095>
  29. *Bernardi P., Petronilli V.* The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1996. V. 28. P. 131.  
<https://doi.org/10.1007/BF02110643>
  30. *Huser J., Blatter L.* Fluctuation in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore // *Biochem J.* 1999. V. 343. P. 311.  
<https://doi.org/10.1042/bj3430311>
  31. *De Marchi E., Bonora M., Giorgi C., Pinton P.* The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux // *Cell Calcium.* 2014. V. 56. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.03.004>