

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
к.б.н., доц. Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ЕКСТРАМИТОХОНДРІАЛЬНА АТР ЯК РЕГУЛЯТОР  
КОНЦЕНТРАЦІЇ ЙОНІВ КАЛЬЦІЮ ТА ВМІСТУ КАРДІОЛІПІНУ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

**Загоруйко Анастасії Григорівни**

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

д.б.н. **Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Робота виконана у відділі біохімії м'язів  
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України  
під керівництвом д.б.н. **Л.Г. Бабіч**

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Загоруйко А.Г. Екстрамітохондріальна АТР як регулятор концентрації йонів Са та вмісту кардіоліпіну. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі представлені результати дослідження механізмів, що забезпечують залежне від наявності АТР збільшення концентрації іонізованого Са у матриксі мітохондрій за відсутності екзогенно доданого Са<sup>2+</sup>. Показано, що АТР-індуковане підвищення концентрації йонів Са<sup>2+</sup>, супроводжувався посиленням витоку Са<sup>2+</sup> з мітохондрій. Циклоспорин А (5 мкМ), рутенієвий червоний (10 мкМ) або олігоміцин (1 мкг/мл) не впливали ні на концентрацію Са<sup>2+</sup> в матриксі, ні на вихід катіонів з мітохондрій. За допомогою проточної цитометрії та потенціал чутливого флуоресцентного зонда ТМРМ було показано, що мембрани мітохондрій були поляризовані під час інкубації як в Mg<sup>2+</sup>-, так і в Mg<sup>2+</sup>,АТР-середовищі. Все вищесказане свідчить про те, що пара тразиєнтної проникності мітохондрій (mPTP) не залучена до досліджуваних ефектів АТР. На сьогодні білкові регулятори обміну йонів Са добре описані, в той же час, роль ліпідних регуляторів залишається вивченою недостатньо. У даних експериментах вміст кардіоліпіну (маркерного фосфоліпіду внутрішньої мембрани мітохондрій) було визначено двома методами: проточною цитометрією з кардіоліпінспецифічним флуоресцентним зондом (NAO) та тонкошаровою хроматографією. Показано, що вміст кардіоліпіну в мембранах мітохондрій знижувався при інкубації органел у Mg<sup>2+</sup>,АТР-середовищі порівняно з Mg<sup>2+</sup>-середовищем. Крім того, спостерігалось зниження вмісту фосфатидилхоліну та збільшення вмісту лізофосфатидилхоліну в мітохондріях під час інкубації в Mg<sup>2+</sup>,АТР-середовищі, що дозволяє зробити припущення про можливу участь ліпідної пори у впливі АТР на обмін Са<sup>2+</sup> в мітохондріях. Отримані результати підтверджують важливу роль екстрамітохондріальної АТР в регуляції концентрації йонів Са та вмісту кардіоліпіну, та можуть бути

використанні для подальшого дослідження мітохондріальних транспортерів  $\text{Ca}^{2+}$  з перспективами їх використання в якості терапевтичних мішеней.

**Ключові слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ , мітохондрія, АТР, кардіоліпін.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АТР	- Аденозинтрифосфат
VDAC	- (voltage-dependent anion channel) потенціалозалежний аніонний канал)
RaM	- система швидкого захоплення $Ca^{2+}$ в мітохондріях
mPTP	- мітохондріальна пора транз'єнтної проникності
CL	- Кардіоліпін
АФК	- активні форми кисню
MCU	- мітохондріальний $Ca^{2+}$ уніпортер
RyR1	- р'іанодинчутливі $Ca^{2+}$ рецептори в мітохондріях
EMRE	- (essential MCU regulator) основна регуляторна одиниця MCU
CsA	- циклоспорин А
CypD	- циклофілін D
ANT	- Аденіннуклеотидтрансфераза
PiC	- фосфатний канал
PA-mPT	- CsA-незалежна пальмітат/ $Ca^{2+}$ -індукована пора перехідної проникності
PA	- пальмітинова кислота
PLA2	- фосфоліпаза А2
RuR	- рутенієвий червоний

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	6
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Функціонування ролі йонів $\text{Ca}^{2+}$ та їх транспорт крізь мембранні структури клітини .....	8
1.2. Обмін йонів $\text{Ca}^{2+}$ у мітохондріях.....	10
1.3. Взаємодія йонів $\text{Ca}^{2+}$ з маркерним ліпідом мітохондрій – кардіоліпіном .....	12
1.3.1. Взаємодія мітохондріального $\text{Ca}^{2+}$ уніпортера з кардіоліпіном .....	16
1.3.2. Роль кардіоліпіну у відкритті мітохондріальної пори транзиторної проникності .....	18
1.4. Ліпідна пора перехідної проникності.....	21
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	25
2.1. Метод одержання фракції мітохондрій .....	25
2.2. Метод спектрофлуориметрії.....	26
2.3. Метод протокової цитофлуориметрії.....	27
2.4. Інші методи.....	27
РОЗДІЛ III .....	29
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	29
3.1 Індуковане АТР збільшення концентрації іонізованого Са у матриксі мітохондрій.....	29
3.2. АТР індукує збільшення виходу $\text{Ca}^{2+}$ з мітохондрій.....	31
3.3. АТР не викликає деполяризації мембран мітохондрій міометрія .....	33
3.4. АТР індукує зниження вмісту кардіоліпіну у мембранах мітохондрій	36
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41

## ВСТУП

$\text{Ca}^{2+}$  є універсальним регуляторним катіоном та виконує ряд важливих функцій в основних біохімічних та фізіологічних процесах у клітинах практично усіх тканин. Основним джерелом надходження до клітини іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є позаклітинний простір, а також внутрішньоклітинні депо: ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії. Динаміка  $\text{Ca}^{2+}$  сигналювання контролюється численними субклітинними системами, а саме:  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами, помпами та обмінниками. Ці системи забезпечують транспорт даного катіона крізь плазмалему та мембрани органел, що виконують функцію внутрішньоклітинного депо  $\text{Ca}^{2+}$ . Проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу не тільки цікава, а й вкрай важлива у практичному відношенні. Доведено, що виникнення різноманітних небезпечних патологій (наприклад, порушення скоротливої функції м'язів, діабет, гіпоксія/ішемія тощо) значною мірою пов'язане зі змінами у внутрішньоклітинному кальцієвому гомеостазі.

Мітохондрії відіграють провідну роль у процесах  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналінгу внаслідок їх здатності накопичувати та вивільняти значні кількості  $\text{Ca}^{2+}$ . Спроможність мітохондрій накопичувати даний катіон є визначальною для функціонування клітини в цілому, адже продукція ними АТФ залежить від концентрації даного катіона в матриксі. В той же час перенавантаження мітохондрій йонами  $\text{Ca}^{2+}$  є тригером відкриття пори транзієнтної проникності і розвитку апоптозу.

У внутрішній мітохондріальній мембрані є особливий компонент – кардіоліпін, що є маркерним ліпідом мітохондрій. Серед інших фосфоліпідів кардіоліпін має цікаві хімічні та структурні характеристики. Даний фосфоліпід відіграє ключову роль у регуляції біоенергетики мітохондрій, оптимізуючи діяльність ключових білків внутрішньої мембрани мітохондрій, що беруть участь в окисному фосфорилуванні. Зміни в структурі або вмісті

цього фосфоліпиду відповідають за дисфункцію мітохондрій у різних патологічних умовах.

З'ясування ролі мітохондрій та кардіоліпіну в регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу в клітині визначає **актуальність** дослідження та ідентифікації мітохондріальних транспортерів  $\text{Ca}^{2+}$  та розуміння їх функціональних механізмів, що відкривають нові перспективи їх використання в якості терапевтичних мішеней.

Раніше співробітниками відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України були представлені результати вивчення механізмів регуляції концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у мітохондріальному матриксі, за умови відсутності екзогенно-доданого катіона. Було показано залежне від концентрації АТФ зростання концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у матриксі мітохондрій за відсутності екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$ , що забезпечувало високий рівень загальної акумуляції  $\text{Ca}$  після внесення екзогенного катіона.

**Метою** цього дослідження було подальше вивчення можливих механізмів, що забезпечують залежне від наявності АТФ збільшення концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у матриксі мітохондрій за відсутності доданого  $\text{Ca}^{2+}$ .

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Виявити закономірності виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій в залежності від наявності АТФ.
2. Дослідити вплив інгібіторів основних мітохондріальних транспортних шляхів  $\text{Ca}^{2+}$  на концентрацію катіона у матриксі мітохондрій та вихід катіона з органели.
3. Визначити поляризацію мітохондріальних мембран в середовищах з наявністю АТФ, та при її відсутності.
4. Прослідкувати залежність вмісту кардіоліпіну в мітохондріальних мембранах, за наявності АТФ у середовищі інкубації.

## РОЗДІЛ I

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Функціонування ролі йонів $\text{Ca}^{2+}$ та їх транспорт крізь мембранні структури клітини

Йони  $\text{Ca}^{2+}$  відіграють важливу роль у забезпеченні функціональної активності клітини.  $\text{Ca}^{2+}$  бере участь у регуляції багатьох процесів, що відбуваються у живих організмах та їх клітинах, включаючи скорочення м'язів, нейромедіацію, регуляцію енергетичного обміну, контроль проникності біологічних мембран, клітинний поділ, секрецію, запліднення та багато інших [1]. Така регуляторна роль  $\text{Ca}^{2+}$  пов'язана зі здатністю до перерозподілу цих йонів на біологічних мембранах у відповідь на специфічні подразники через селективні канали, обмінники та насоси.

Концентрація та розподіл вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі мають вирішальне значення для ролі  $\text{Ca}^{2+}$  як універсального внутрішньоклітинного регулятора. У стані спокою концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі клітини становить близько 100 нМ, тоді як у позаклітинному середовищі – близько 1мМ [1]. При збудженні клітини концентрація цього йону збільшується, але не перевищує 1мкМ, хоча в примембранних ділянках, або, наприклад, в мітохондріях, локальна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  може бути й більшою.

Підвищення концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  під дією збуджувальних чинників відбувається внаслідок надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину крізь плазматичну мембрану через різноманітні кальцієві канали, а також як наслідок викиду  $\text{Ca}^{2+}$  із головного внутрішньоклітинного кальцієвого депо – ендоплазматичного ретикулула. Мітохондрії також здатні накопичувати йони  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже, у підвищенні концентрації вільного кальцію в цитоплазмі задіяні мембранозв'язані системи пасивного (енергонезалежного) транспорту цих йонів – кальцієві канали, а відновлення середнього рівня концентрації внутрішньоклітинного кальцію (100 нМ) – забезпечується функціонуванням так званих систем активного (енергозалежного) транспорту цих йонів. Такі

системи ідентифіковані у плазматичній мембрані (тапсигаргіннечутлива  $Mg^{2+}$ , АТР-залежна кальцієва помпа,  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник), ендоплазматичному ретикулумі (тапсигаргінчутлива  $Mg^{2+}$ , АТР-залежна кальцієва помпа) та у мітохондріях (електрофоретичний  $Ca^{2+}$ -уніпортер) [1].

Системи входу  $Ca^{2+}$  у цитоплазму пов'язані між собою. Наприклад, вивільнення  $Ca^{2+}$  із саркоплазматичного ретикулума може змінювати активність йонних каналів, що знаходяться на плазматичній мембрані і впливають на мембранний потенціал, а тим самим обумовлювати вхід йонів  $Ca^{2+}$  крізь потенціалозалежні  $Ca^{2+}$ -канали [2]. Водночас зменшення концентрації  $Ca^{2+}$  у саркоплазматичному ретикулумі активує так звані депокеровані  $Ca^{2+}$ -канали плазматичної мембрани [3].

Основними системами видалення  $Ca^{2+}$  із цитозолу є  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРаза саркоплазматичного ретикулума,  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник та  $Ca^{2+}$ -уніпортер мітохондрій [2].  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник є низькоафінним щодо  $Ca^{2+}$ , тоді як  $Ca^{2+}$ -помпи саркоплазматичного ретикулума та і плазматичної мембрани хоча й мають високий афінитет до  $Ca^{2+}$ , їм притаманна відносно невелика швидкість реакції [4]. Отже,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума можуть відповідати за контроль гомеостазу  $Ca^{2+}$  у спокої, тоді як  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник, скоріше за все, відіграє певну роль у регуляції високих, стимуляторних концентрацій  $Ca^{2+}$  в клітині [4]. Мітохондрії також можуть діяти як системи зниження концентрації  $Ca^{2+}$  [5]. В такому випадку енергія дихального ланцюга, яка зазвичай використовується для синтезу АТР, йде на транспорт  $Ca^{2+}$ . Афінність до  $Ca^{2+}$  у такому процесі незначна, тому раніше вважали, що такий шлях неприйнятний для регуляції гомеостазу  $Ca^{2+}$  у цитозолі в умовах низьких концентрацій, хоча експериментально було показано можливість накопичення значної кількості даних йонів ізольованими мітохондріями. Також доведено, що даний шлях може функціонувати за рахунок асоціації саркоплазматичного ретикулума і мітохондрій, що зближує домени з високою концентрацією  $Ca^{2+}$  [5]. Крім

того, накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями стимулює утворення АТР, оскільки  $\text{Ca}^{2+}$  є позитивним регулятором кількох ензимів циклу Кребса. Зростання рівня АТР опосередковано впливає на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі, бо АТР є джерелом енергії для функціонування pomp, які видаляють  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу [2].

### 1.2. Обмін йонів $\text{Ca}^{2+}$ у мітохондріях

Мітохондрії – це маленькі циліндричні двомембранні органели, що містять власний геном. Ці органели містяться практично у всіх клітинах еукаріотів. Клітини можуть мати різну кількість мітохондрій від 1 до 2000 (як у клітинах печінки). Типовий розмір цієї органели подібний до розміру кишкової палички, довжиною 1 мкм та шириною 0,5 мкм, хоча деякі можуть мати діаметр 10 мкм або утворювати у клітині довгі трубчасті структури. [6]

Мітохондрії називають енергетичними станціями клітини, адже вони виробляють майже всю енергію, необхідну для клітинного метаболізму, в процесі окисного фосфорилування [7]. Ці органели також беруть участь у багатьох інших фізіологічних процесах клітини, таких як запрограмована клітинна смерть, аутофагія, підтримка гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  [8].

Мітохондрії містять дві мембрани: зовнішню і внутрішню. Простір, обмежений цими двома мембранами, називають міжмембранним простором. Трубочасті інвагінації внутрішньої мітохондріальної мембрани, що проектуються в матрикс, називаються кристами. Кристи містять ферментативні комплекси, що беруть участь у процесах окисного фосфорилування. Також мітохондрії – це мобільні внутрішньоклітинні високоенергетичні інтегратори метаболічних та йонних сигналів, які здатні акумулювати йони  $\text{Ca}^{2+}$  у значних кількостях [1]. У стані спокою концентрація йонів  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій становить 0,1-1 мкМ. При зростанні концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріальний може збільшуватися до 10-50 мкМ. Тобто мітохондріальний  $\text{Ca}^{2+}$  у живій клітині швидко реагує на фізіологічні зміни цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [9].

Мітохондрії поглинають і вивільняють  $\text{Ca}^{2+}$  з однієї з трьох причин [6]:

1. Для регулювання концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , що генерується первинним подразником.
2. Для регулювання ферментів, чутливих до  $\text{Ca}^{2+}$  усередині мітохондріального матриксу.
3. Спровокувати запрограмовану загибель клітин - апоптоз (наприклад, стимулюючи вивільнення цитохрому c для активації шляху каспази або регулюючи білок Bcl-2).

Щоб потрапити до матриксу, йони  $\text{Ca}^{2+}$  мають пройти крізь зовнішню та внутрішню мітохондріальні мембрани. Традиційно вважали, що вони вільно проходять крізь зовнішню мембрану [10]. Проте з часом було доведено, що потенціалзалежний аніонний канал (VDAC), вбудований у ліпідні бішари, проводить йони  $\text{Ca}^{2+}$  та одновалентні йони до міжмембранного простору [11]. Тобто VDAC може функціонувати як  $\text{Ca}^{2+}$ -активованій  $\text{Ca}^{2+}$ -канал.

Структури, що забезпечують обмін  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, розміщені головним чином у внутрішній мембрані [12]. Для зручності можна умовно поділити всі системи за напрямком переміщення катіонів[1]:

- 1) системи, що забезпечують накопичення йонів  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій:
  - $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер;
  - Система швидкого захоплення катіона (RaM);
  - Ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали;
  - Пору транзйентної проникності (РТР) – при дисипації потенціалу на внутрішній мембрані;
  - $\text{Na}^+$  - $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - антипортери – за умови деполяризації внутрішньої мембрани та наявності градієнта кальцію спрямованого всередину органели.

2) системи, що забезпечують вихід йонів  $\text{Ca}^{2+}$  до цитоплазми:

- $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -антипортер;
- $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - антипортери;

- Оборотний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер – за умови деполяризації мембрани (колапс мембранного потенціалу);

- Пору транзієнтної проникності (РТР).

Кожна система транспорту кальцію регулюється фізико-хімічними (мембранний потенціал) чинниками та великою кількістю білкових та небілкових ефекторів (рутенієвий червоний, йони  $\text{Mg}^{2+}$ , поліаміни, азид натрію, олігоміцин, ліпідне оточення) [1].

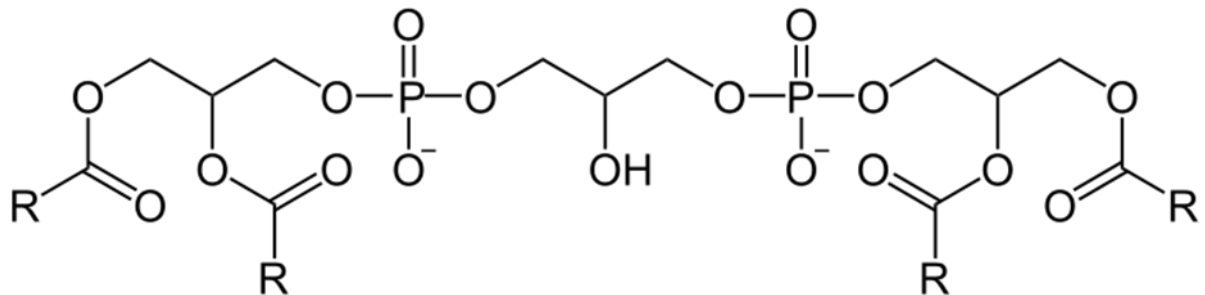
### 1.3. Взаємодія йонів $\text{Ca}^{2+}$ з маркерним ліпідом мітохондрій – кардіоліпіном

Фосфоліпіди - це основні будівельні блоки мембран мітохондрій. Зовнішня та внутрішня мітохондріальні мембрани мають різний склад та асиметричний розподіл фосфоліпідів. Ці сполуки в основному синтезуються в ендоплазматичному ретикулумі, а потім переносяться в мітохондрії. Фосфоліпіди відіграють важливу роль в архітектурі, функціонуванні та динаміці мембрани мітохондрій, а також у транспорті білків у мітохондрії. Зміни у складі фосфоліпідів можуть впливати на цілісність мембрани мітохондрій, проникність та плинність, а отже, на стабільність та активність багатьох асоційованих з мембраною білків [13].

Основними складовими внутрішньої мембрани мітохондрій є дихальний ланцюг, АДФ/АТФ транспортер, фосфатидилетаноламін, фосфатидилхолін та кардіоліпін [14]. Димерний фосфоліпід – кардіоліпін (CL) є маркерним ліпідом мітохондрій. CL пов'язаний переважно з внутрішньою мембраною мітохондрій, де він становить близько 15-20% від загальної кількості фосфоліпідів [8], проте виявлено невелику кількість CL (4–5%), пов'язану із зовнішньою мембраною мітохондрій [15]. Даний фосфоліпід переважає в місцях контакту, що з'єднують зовнішню та внутрішню мембрани [16].

CL має унікальну структуру – це димерний фосфоліпід з чотирма ацильними ланцюгами та двома фосфатидильними фрагментами, пов'язаними з гліцерином (рис. 1.1).

Склад жирних ацильних ланцюгів CL є надзвичайно специфічним. У більшості тканин ссавців (серця, скелетних м'язів, печінки та нирок) CL містить переважно лінолеву кислоту (18:2) [17]. У мітохондріях серця лінолева кислота становить 80–90% ацильного ланцюга CL, а тетралінолеоїл CL є найбільш поширеним видом. Кардіоліпін мозку багатий на молекулярні види з довголанцюговими поліненасиченими залишками жирних кислот, такими як арахідонова (20:4), докозатетраєнова (22:4) та докозагексаєнова (22:6) [16]. CL у товстій кишці має короткі та переважно насичені жирні кислоти, тоді як у мозку в основному являє собою довгі та ненасичені види CL [18]. Зміни кількості CL або зміни складу кардіоліпіну призводять до дисфункції мітохондрій та різних паталогічних станів [8,16, 19].



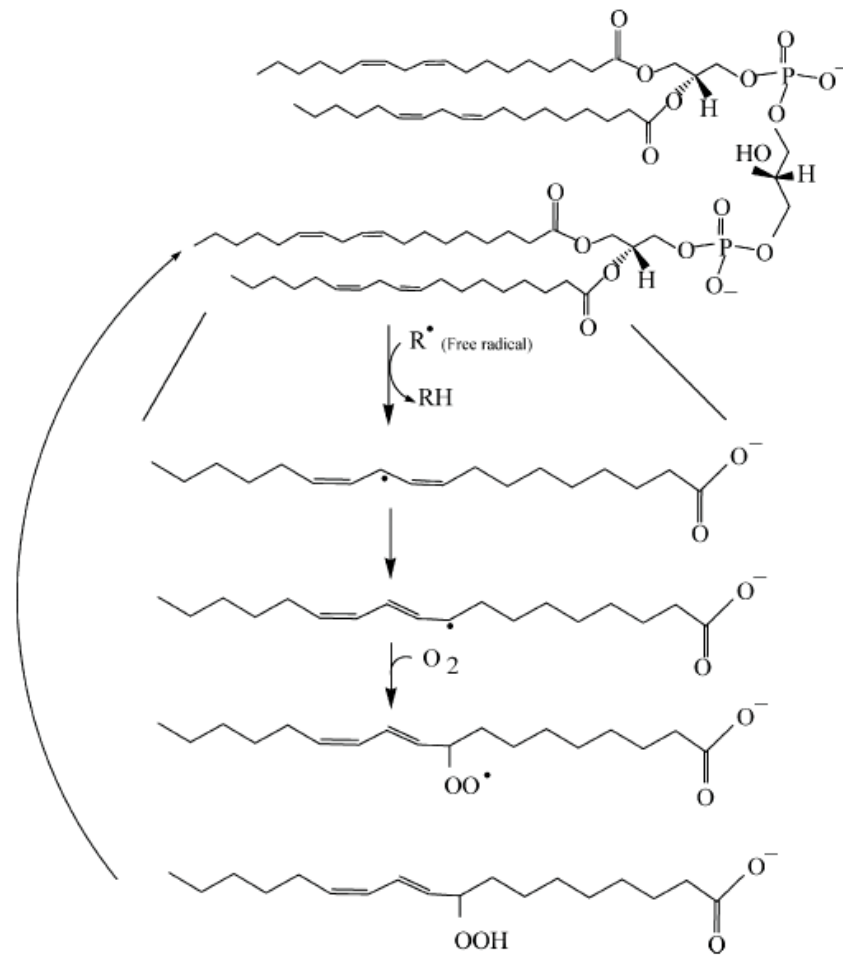
**Рисунок 1.1** Структура кардіоліпіну

Зміни в профілі CL мітохондрій можуть відбуватися головним чином як наслідок [16]:

- втрати вмісту CL внаслідок змін активності CL-синтази;
- зміни у складі ацильного ланцюга та перебудови CL.
- перекисного окиснення CL через атаку активними формами кисню (АФК).

Велике значення при дисфункції мітохондрій відіграє перекисне окиснення CL. Активні форми кисню – це загальна назва різних пероксидів та вільних радикалів, фізіологічно утворених при метаболізмі молекулярного кисню, що є потужними окиснювачами. Більшість внутрішньоклітинних АФК утворюються в мітохондріях [20]. Виробництву АФК значною мірою протидіє складна система антиоксидантного захисту, що включає

супероксиддисмутазу, каталазу та глутатіонпероксидазу. Баланс між виробництвом АФК та антиоксидантним захистом визначає ступінь окисного стресу. Наслідки цього стресу включають модифікацію клітинних білків, ДНК та ліпідів, особливо фосфоліпідів з високим ступенем ненасиченості. Молекули кардіоліпіну особливо схильні до окислення завдяки високому вмісту ненасичених жирних кислот, особливо лінолевої кислоти. Насправді наявність метиленової групи між двома подвійними зв'язками робить ці жирні кислоти чутливими до індукованих АФК пошкоджень, їх чутливість до окислення експоненційно зростає в залежності від кількості подвійних зв'язків на молекулу жирної кислоти [21]. Вважається, що перекисне окиснення кардіоліпіну проходить через кілька послідовних етапів [16]: абстракція атома водню з лінолевої кислоти, утворюючи алкільний радикал (CL •); додавання кисню для утворення пероксидного радикала (CLOO •), та утворення гідропероксиду (CLOOH) шляхом абстракції водню з іншого ацильного ланцюга. Реакція повторюється, і весь процес продовжується у вільнорадикальній ланцюговій формі (рис. 1.2).



**Рисунок 1.2** Схематичне зображення перекисного окиснення кардіоліпіну [16].

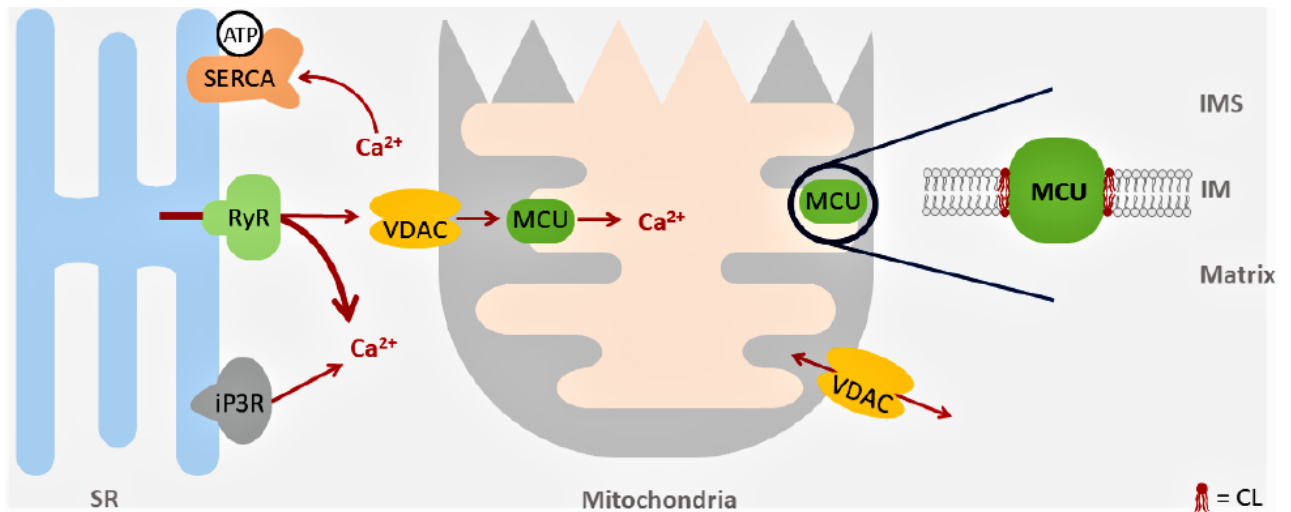
CL відіграє важливу роль у деяких реакціях та процесах, що відбуваються в мітохондріях, включаючи клітинне дихання та синтез АТФ. Крім того, цей фосfolіпід бере участь у стабілізації мітохондріальних крист, процесах ділення та злиття мітохондрій, імпорті білків, процесах мітофагії та апоптозу [8]. Зміни, що відбуваються в профілі CL, можуть негативно впливати на активність різноманітних білків та ферментів мітохондрій тим самим погіршуючи функції та динаміку мітохондрій. Це може зіграти важливу роль у етіології та прогресуванні ряду патофізіологічних ситуацій та захворювань, таких як: синдром Барта, ішемія/реперфузія міокарда, серцева недостатність, діабет та нейродегенеративні розлади [8, 22-23].

### 1.3.1. Взаємодія мітохондріального $\text{Ca}^{2+}$ уніпортера з кардіоліпіном

Поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріальним уніпортером координує цитозольні сигнальні події та мітохондріальну біоенергетику. Процес поглинання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  цим уніпортером залежить від концентрації іона всередині й відбувається за градієнтом електрохімічного потенціалу. Цей електрохімічний градієнт створюється протонною помпою, котра спряжена або через електрон-транспортуючу систему з субстратним окисненням, або медіюється  $\text{F}_0\text{F}_1$ -АТРазою, яка використовує енергію гідролізу АТР. Окрім цього  $\text{Ca}^{2+}$ - уніпортер здатен транспортувати й інші двовалентні катіони –  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , лантаноїди, але не  $\text{Mg}^{2+}$ . Однак концентрація в клітині цих іонів настільки мала, що уніпортер у нормі навряд чи транспортує інші катіони, окрім  $\text{Ca}^{2+}$  [24]. Протягом останнього десятиліття були виявлені всі білкові компоненти мітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  уніпортера, включаючи MCU – пороутворюючу субодиницю. При цьому конкретні потреби в ліпідах для функції та формування цього комплексу наразі невідомі. Проте нещодавно було доведено потребу в кардіоліпіні для стабільності та для нормального функціонування MCU [25].

Під час збудження (скорочення)  $\text{Ca}^{2+}$  виділяється з ендоплазматичного ретикулума та прямує до мітохондрії через мітохондріальний кальцієвий уніпортер (MCU). Щоб забезпечити ефективну передачу кальцію, ріанодінові рецептори (RyR) в ендоплазматичного ретикулума розташовані в безпосередній близькості від мітохондрій, особливо поруч з мітохондріальним уніпортером кальцію (MCU), що розміщений у внутрішній мембрані [26].  $\text{Ca}^{2+}$  стимулює ключові дегідрогенази циклу Кребса, включаючи піруватдегідрогеназу, ізоцитратдегідрогеназу та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназу, прискорюючи регенерацію NADH і FADH<sub>2</sub>. Однак примусова регенерація відновних еквівалентів активує дихальний ланцюг. Тому  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє помітну роль у адаптації мітохондріального метаболізму до підвищених потреб у енергії [27]. Як уже вказувалося, пороутворюючою одиницею мітохондріального уніпортера кальцію є білок

MCU, який пов'язує EMRE та регуляторні субодиниці MICU1, MICU2 та MCUb у комплекс, інтегрований у внутрішню мембрану (рис. 1.3) [22].



**Рисунок 1.3** Мітохондріальний уніпортер кальцію: транспорт кальцію із саркоплазматичного ретикулума (SR) опосередкований різними білками - рецептори ріанодіну (RyRs) та інозитолтрифосфатні рецептори (iP3R) вивільняють  $\text{Ca}^{2+}$  в систолічних умовах, тоді як потенціал залежний аніонний канал (VDAC) і мітохондріальний уніпортер кальцію (MCU) дозволяють поглинати  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. MCU вбудований у внутрішню мітохондріальну мембрану і вимагає CL для оптимальної активності.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase саркоплазматичного ретикулума (SERCA) контролює поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  SR. IMS, міжмембранний простір; IM, внутрішня мітохондріальна мембрана [22].

Відсутність CL погіршує поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, зменшуючи як кількість, так і активність MCU [25].

Білки периферичної мембрани MICU1 та MICU2, які є двома регуляторними субодиницями уніпортера, пов'язують CL *in vitro* [28]. Нещодавнє крио-ЕМ-дослідження каналу MCU грибків виявило наявність чотирьох ацильних ланцюгів у трансмембранних спіралях MCU, які утворюють бічні мембранні отвори, з основними залишками, готовими взаємодіяти з головними групами фосфоліпідів [29]. Крім того, було

виявлено структуру, що містить 8 молекул CL і 16 PC в гетерооктамерному комплексі уніпортерів, так що одна молекула CL і дві PC з'єднуються з кожною субодиницею MCU [30].

Також недавні дослідження показали, що Arg<sup>297</sup>-залишок MCU утворює водневі зв'язки з фосфатним фрагментом CL та з N-кінцевим доменом EMRE, а його мутація до Asp призводить до відсутності поглинання Ca<sup>2+</sup> [30].

CL сильно взаємодіє з багатьма інтегральними мембранними білками і підвищує їх стабільність [31]. Завдяки реконструкції складу ацильного ланцюга, CL знімає пружний стрес, що виникає на мітохондріальній мембрані через скупчення білків. Роблячи це, CL дозволяє утворювати стабільні ліпідно-білкові комплекси, що призводить до нормального функціонування білків мембрани мітохондрій. Висновок про те, що втрата CL збільшує обмін MCU, вказує на основний біохімічний механізм впливу CL на стабільність білкових комплексів мітохондріальних мембран і потенційно може бути екстрапольований на інші ключові мембранні білки мітохондрій, що взаємодіють з CL [25].

### 1.3.2. Роль кардіоліпіну у відкритті мітохондріальної пори транзйентної проникності

Мітохондріальна пора транзйентної проникності (mPTP) – це канал з високою провідністю, що стимулює раптове збільшення проникності внутрішньої мембрани для йонів та молекул розміром до 1,5кДа, що призводить до набрякання мітохондрій, випускаючи цитохром c, тим самим ініціюючи апоптоз [6].

Ключовими індукторами mPTP є Ca<sup>2+</sup> і АФК, але на нього також можуть впливати і модулювати багато інших агентів. Специфічною особливістю mPTP є його чутливість до циклоспорину А (CsA). У більшості випадків відкриття mPTP викликає деполаризацію мітохондрій та загибель клітин. З іншого боку, mPTP також може відігравати важливу фізіологічну роль - у випадках, коли активується в певному режимі: або з низькою провідністю,

або у перехідному режимі (мерехтіння) [8,22]. Молекулярна архітектура mPTP до кінця не зрозуміла, але загальноприйнято, що mPTP має білкову природу.

У формуванні та модуляції mPTP беруть участь: циклофілін D (CypD) у матриці мітохондрії; ANT (АДФ/АТФ-транслокатор) та PiC на внутрішній мембрані; VDAC (залежний від напруги аніонний канал) на зовнішній мембрані. Недавні дослідження продемонстрували, що АТФ-синтаза є ще одним передбачуваним компонентом mPTP на внутрішній мембрані мітохондрій [32].

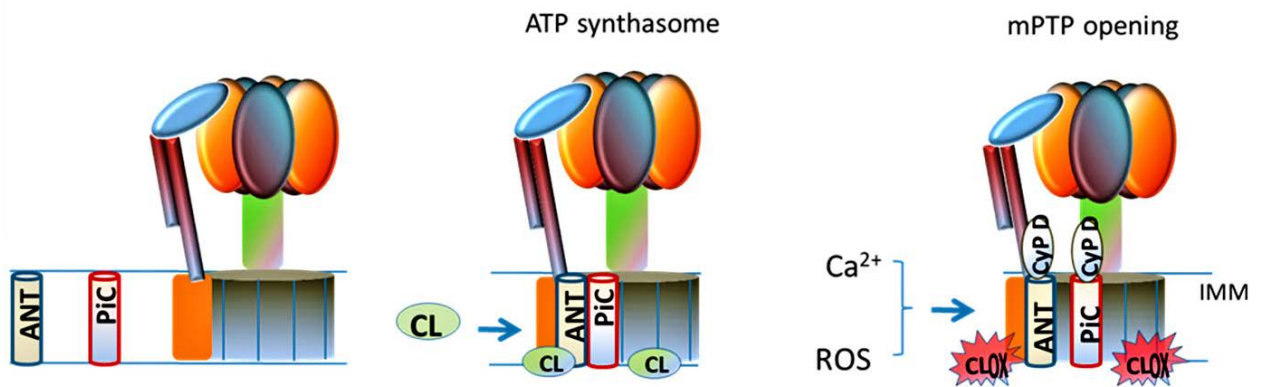
Існує дві гіпотези щодо участі АТФ-синтази у формуванні mPTP. Перша вказує на утворення пори транз'єнтної проникності на межі мономерів димеру АТФ-синтази [33], інша припускає участь с-субодиниці  $F^0$ , у формуванні mPTP. АТФ-синтаза, PiC та ANT утворюють у мітохондріях великий суперкомплекс, який називається АТФ-синтасома [34]. Основна роль цього суперкомплексу полягає у підвищенні ефективності процесу окисного фосфорилування, проте очевидною є також участь АТФ-синтасоми у формуванні та регуляції mPTP.

Олігомеризація АТФ-синтасоми може модулюватися молекулами CL [35], що взаємодіють з усіма компонентами цього суперкомплексу (АТФ-синтазою, ANT та PiC), ймовірно склеюючи ці білки. При цьому кардіоліпін також необхідний для незалежної діяльності усіх компонентів суперкомплексу. Так наприклад, CL взаємодіє і є необхідним для стабілізації та функціонування АТФ-синтази, сприяючи її обертанню, підтримуваному трансмембранним градієнтом протонів [36]. Також існує припущення, що CL працює як протонна пастка всередині внутрішньої мембрани мітохондрій, таким чином мінімізуючи зміни рН у міжмембранному просторі та постачаючи протони для активності АТФ-синтази [37]. CL також виявляється критично важливим для олігомеризації та підтримки АТФ-синтазних збірок, що має вплив на морфологію крист, а отже, і на виробництво енергії [38]. Активність ANT є оптимальною лише у

присутності тетралінолеоїл-CL, тоді як інші види CL, а також інші фосфоліпіди виявилися неефективними в підтримці активності ANT [39]. Кристалічна структура ANT показує, що мономер цього білка має 2-3 сайти, в яких він щільно зв'язаний з 2-3 молекулами CL [40]. Можливо, ці тісно зв'язані молекули CL беруть участь у зв'язуванні мономерів всередині димеру та стабілізації димерної структури ANT, яка є активною формою цього білка [40].

Йони  $\text{Ca}^{2+}$  являються основними індукторами розкриття mPTP. Проте в ізольованих мітохондріях серця розкриття mPTP, зазвичай, отримують додаванням відносно високих концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ . Такі високі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  навряд чи досягаються у життєздатних клітинах, що свідчить про те, що сам  $\text{Ca}^{2+}$  не викликає безпосереднього відкриття mPTP. Також можна припустити, що mPTP сенсibiliзується до  $\text{Ca}^{2+}$  додатковими факторами, такими як АФК або продукти їх окиснювальної дії на складові мітохондрій, особливо CL. Було також виявлено, що рівень окисненого CL збільшується при реперфузії серця, як наслідок спалаху АФК [41].

В умовах, що сприяють відкриттю mPTP, зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з CL на межі розділу між РіС, ANT та АТФ-синтазою може спричинити конформаційні зміни в АТФ-синтасомі (рис. 1.4) [42]. Дослідження *in vitro*, проведені на ізольованих мітохондріях серця щурів показали, що мікромольні концентрації екзогенно доданого окисненого CL знижують потребу в йонах  $\text{Ca}^{2+}$  для індукції відкриття mPTP [43]. Логічною тоді є гіпотеза, що взаємодію між білковими компонентами АТФ-синтасоми можуть порушити відхилення кількості та складу CL (наприклад, його окиснення), за наявності  $\text{Ca}^{2+}$ . Такі зміни маркерного фосфоліпіду можуть викликати дестабілізацію суперкомплексу, сприяючи тим самим відкриттю mPTP. Індукція розкриття mPTP окисленими CL і  $\text{Ca}^{2+}$  сприяє вивільненню цитохрому c з мітохондрій, що призводить до загибелі клітини.



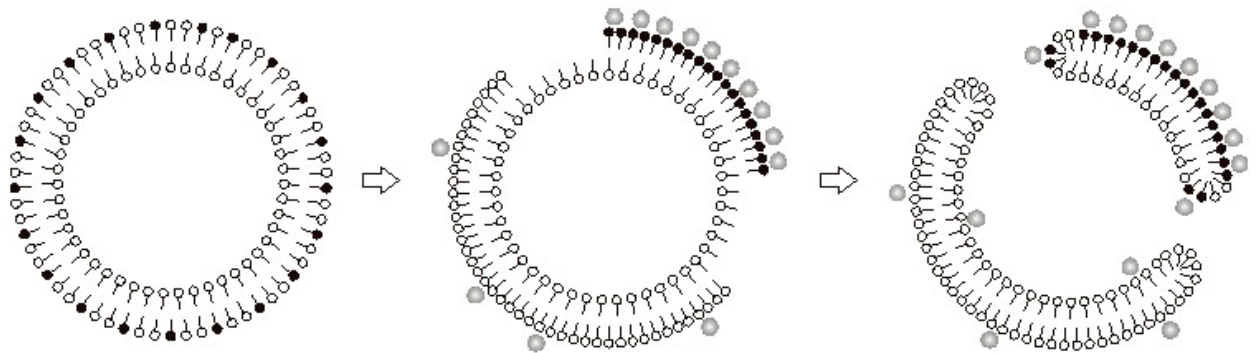
**Рисунок 1.4** Роль кардіоліпіну у функціонуванні АТФ-синтасоми та відкритті mPTP. ANT - АДФ/АТФ-транслокатор, CL – кардіоліпін, CLox – окиснений кардіоліпін, Сур D – циклофілін D, IMM – внутрішня мітохондріальна мембрана, mPTP – мітохондріальна пора транзисентної проникності, PiC – фосфатний канал [8].

#### 1.4. Ліпідна пора перехідної проникності

Відкриття чутливої до CsA mPTP - не єдиний механізм, за допомогою якого мітохондріальна мембрана може зберігати проникність по відношенню до йонів Ca<sup>2+</sup> в умовах стресу. Існує ще один принципово інший механізм, який, на відміну від класичного, не є чутливим до CsA і пов'язаний з ліпідною, а не білковою порою [44]. Механізм базується на утворенні комплексів між аніонами довголанцюгових насичених жирних кислот (насамперед пальмітинової та стеаринової кислот) та Ca<sup>2+</sup>, що відбувається на внутрішній мітохондріальній мембрані зі сторони матриксу та супроводжується появою транзиторних ліпідних пор - PA-mPT. Здатність зв'язувати Ca<sup>2+</sup> з високою спорідненістю є унікальною особливістю довголанцюгових насичених жирних кислот, інші ліпіди та вищі жирні кислоти мають набагато нижчу спорідненість до Ca<sup>2+</sup> і не можуть викликати Ca<sup>2+</sup>-залежне проникнення біологічних мембран [45].

Зв'язування Ca<sup>2+</sup> з аніонами PA на одній стороні мембрани призведе до сегрегації комплексів PA/Ca<sup>2+</sup> у твердофазні домени (рис. 1.5). Синусоїдні твердофазні домени щільніше упаковані, що зумовлює зменшення загальної

площі моношару. Таким чином, моношар, що містить твердофазні домени, стане розширеним, а протилежний моношар залишиться ущільненим. Після цього розширений моношар може розірватися, і гідрофобні частини бішару піддаються дії водного середовища, утворюючи вкрай нестійку структуру. Отже, ущільнений моношар також розривається, а потім зливається з розширеним моношаром, закриваючи гідрофобні краї розриву. Отримана структура і буде гідрофільною ліпідною порою [44].



**Рисунок 1.5** Схематичне представлення формування гідрофільної ліпідної пори на ліпосомній мембрані при хемотропному фазовому переході [46].

Однією з найважливіших властивостей ліпідних пор є їх здатність мимовільно закриватися через короткий проміжок часу, якщо їх діаметр не перевищує певного критичного значення ( $\sim 9$  нм). Закриття ліпідних пор відбувається швидко (частки секунди), після чого відновлюється цілісність ліпідного бішару [47]. Розмір пор PA-mPT становить близько 4 нм, що трохи більше, ніж розмір mPTR ( $\sim 2\text{--}3$  нм). [48]

Загалом якщо порівнювати PA-mPT та класичну CsA-залежну mPTR, то можна зробити висновок, що це два абсолютно різні шляхи виникнення проникності мітохондріальної мембрани. Перш за все, утворення пор PA-mPT вимагає значно менших концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  порівняно з mPTR [48]. Хоча вони і вищі за базальний рівень внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , ці значення знаходяться в межах діапазону патологічних концентрацій внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , що спостерігаються під час стресу [49]. Також

для відкриття PA-mPT необхідна наявність насичених жирних кислот, тоді як відкриття mPTP стимулюється наявністю ненасичених жирних кислот. Крім того, PA-mPTP може індукуватися не тільки  $\text{Ca}^{2+}$ , але також  $\text{Sr}^{2+}$  і, меншою мірою,  $\text{Ba}^{2+}$ . Іншою умовою реалізації шляху PA-mPT є наявність мембранного потенціалу, тоді як розкриття mPTP може бути спричинене лише деполяризацією мембрани мітохондрій [44].

Механізм  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного відкриття PA-mPT реалізується наступним чином. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до його посиленого поглинання мітохондріями. Накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці мітохондрій призводить до активації фосфоліпази A2 (PLA2), яка підвищує вміст вільних жирних кислот у внутрішній мембрані мітохондрій. Аніони довголанцюгових насичених жирних кислот утворюють комплекси з  $\text{Ca}^{2+}$  на стороні матриксу внутрішньої мітохондріальної мембрани і коли їх вміст досягає певного порогу, вони розділяються на тверді домени, що супроводжується утворенням ліпідних пор. Це призводить до деполяризації мітохондрій та перерозподілу іонів по мембрані мітохондрій (зокрема, виділення  $\text{Ca}^{2+}$  та зворотного захоплення  $\text{H}^+$  органелами). Після швидкого закриття пор мембранний потенціал швидко відновлюється, завдяки посиленій роботі дихального ланцюга. Реполіризація мембран веде до реактивації поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  та індукції нового циклу поглинання/вивільнення [44].

Відкриття mPTP часто веде до апоптозу, отже утворення PA-mPT – це своєрідний захист від відкриття mPTP та подальшого апоптозу. Важливо, що утворення пор PA-mPT не роз'єднує дихальний ланцюг в мітохондріях, дозволяючи органелам підтримувати енергопостачання при стресових умовах.

Отже, загально відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$  є чи не основними регуляторними йонами живих клітин, а мітохондрії – органели, що забезпечують проходження багатьох життєво необхідних процесів. Саме тому вивчення транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  крізь мітохондріальну мембрану є критичним для розуміння

життєдіяльності клітин. При тому, що білкові регулятори обміну  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, на сьогодні, є добре описаними, роль ліпідних регуляторів залишається вивченою недостатньо. Також роль кардіоліпіну, як одного з ключових фосфоліпідів внутрішньої мембрани мітохондрій, у транспорті  $\text{Ca}^{2+}$  потребує детального дослідження.

## РОЗДІЛ II

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Метод одержання фракції мітохондрій

Для дослідження використовувалися невагітні самки щурів, що утримувалися у віварії при стаціонарних умовах та постійній температурі. Робота з лабораторними тваринами проводилася згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовується в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Тварин присипляли хлороформом (діетиловим етером) з подальшою цервікальною дислокацією. Мітохондрії з міометрія невагітних щурів виділяли методом диференціального центрифугування [50].

Очищену від жирової тканини матку переносили у 0,9% розчин NaCl. Потім отриману тканину зважували та ножицями подрібнювали на меленькі шматочки, середнім розміром 2×2 мм. Даний препарат поміщали в буферний розчин (pH = 7,4, 4°C) такого складу: 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA, 20 мМ Hepes. Наступним кроком було гомогенізування 3 рази по 20 сек за допомогою гомогенізатора Heidolph Silent Crusher M при охолодженні льодом. Мітохондрії суспендували у середовищі наступного складу: 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA, 20 мМ Hepes pH 7.4 за 4 °C. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при навантаженні 1 000 g і температурі 5-8 °C. Супернатант ще раз центрифугували протягом 15 хв при навантаженні 12 000 g і температурі 5-8 °C. Осад суспендували у буферному розчині того ж складу і втретє центрифугували протягом 15 хв при 12 000 g і 5-8 °C. Отриманий осад мітохондрій суспендували – 1 мг тканини : 1 мкл буфера. Протягом експерименту фракцію мітохондрій зберігали на льоду.

Концентрацію білка у мітохондріальній фракції визначали за Bradford методикою [51], в якості стандарту використовували бичачий сироватковий альбумін. Концентрація білка у пробі становила 25 мкг/мл.

## 2.2. Метод спектрофлуориметрії

*Концентрацію іонізованого Ca в мітохондріях ( $[Ca^{2+}]_m$ )* міометрія щурів визначали за допомогою спектрофлуориметра QuantaMaster™ 40 (Photon Technology International) та флуоресцентного зонда Fluo-4, AM ( $\lambda_{exc} = 490$  nm,  $\lambda_{em} = 520$  nm). Мітохондрії міометрія навантажували 2 мкМ Fluo-4, AM протягом 30 хв за 37 °С у середовищі наступного складу (мМ): цукроза – 250, EGTA – 1, Hepes – 20; pH 7.4. Після цього суспензію мітохондрій розбавляли (1:10) у тому ж середовищі, що не містить флуоресцентного зонда, з подальшим центрифугуванням. Осад ресуспендували в тому ж середовищі, що не містить флуоресцентного зонда.  $[Ca^{2+}]_m$  визначали у середовищі наступного складу (мМ): цукроза – 250,  $K^+$ -фосфатний буфер – 2, сукцинат натрію – 5,  $MgCl_2$  – 3,  $\pm ATP$  – 3,  $\pm CaCl_2$  – 0.1, Hepes – 20; pH 7.4. Калібрування Fluo-4 флуоресценції проводили наприкінці кожної проби шляхом додавання 0.1% Triton X-100 (за присутності 100 мкМ  $CaCl_2$ ) та, через хвилину, 5 мМ EGTA ( $F_{max}$  та  $F_{min}$ , відповідно). Концентрацію іонізованого Ca у матриксі мітохондрій розраховували з використанням рівняння Грінкевича [52].

*Концентрацію іонізованого Ca в інкубаційному середовищі ( $[Ca^{2+}]_o$ )* визначали за допомогою QuantaMaster™ 40 спектрофлуориметра (Photon Technology International) та флуоресцентного зонда 1 мкМ Fluo-4, Pentapotassium Salt, cell impermeant ( $\lambda_{exc} = 490$  nm,  $\lambda_{em} = 520$  nm). Флуоресцентний зонд вносили до середовища інкубації до внесення мітохондрій. Калібрування флуоресценції Fluo-4, Pentapotassium Salt проводили наприкінці кожної проби додаючи 5 мМ EGTA та, за хвилину, 5 мМ  $CaCl_2$  ( $F_{min}$  та  $F_{max}$ , відповідно). Концентрацію іонізованого Ca в інкубаційному середовищі розраховували з використанням рівняння Грінкевича [52].

### 2.3. Метод протокової цитофлуориметрії

Для визначення поляризації мембран мітохондрій та вмісту кардіоліпіну використовували проточний цитометр з аргонним лазером ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm) COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, United States). Експериментальні дані аналізували використовуючи SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter).

*Відносні значення мембранного потенціалу мітохондрій ( $\Delta\psi$ )* визначали з використанням проточного цитометра, суспензії мітохондрій та потенціал чутливого флуоресцентного зонда 100 nM TMRM ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  590 nm) у середовищі інкубації склад якого наведено вище (визначення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ ). Суспензію мітохондрій (25 мкг/мл) навантажували 100 нМ TMRM в 1 мл інкубаційного середовища протягом 5 хв. одразу аналізували на проточному цитометрі за довжини 590 нм (channel FL2). Кожне вимірювання було представлено як середнє значення інтенсивності флуоресценції 10 000 подій і виражене у відносних одиницях: середнє значення інтенсивності флуоресценції зразка мінус середнє значення інтенсивності флуоресценції зразка після введення протонифору CCCP (10 мкМ).

*Відносні значення вмісту кардіоліпіну* мітохондрій аналізували на проточному цитометрі за допомогою суспензій мітохондрій та флуоресцентного зонда 100 нМ NAO (Acridine Orange 10-nonyl bromide) ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm) у середовищі того ж складу, що і для визначення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Суспензію мітохондрій (25 мкг/мл) навантажували 100 нМ NAO в 1 мл інкубаційного середовища протягом 5 хв, а потім негайно аналізували на проточному цитометрі на довжині хвилі 520 нм (канал FL1). Кожне вимірювання представляється як середнє значення інтенсивності флуоресценції 10 000 подій.

### 2.4. Інші методи

Ліпідний склад мембран мітохондрій визначали за допомогою хроматографії у тонкому шарі. Суспензію мітохондрій інкубували в середовищах, що містять  $\text{Mg}^{2+}$  - і  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ, протягом 5 хвилин з подальшим

центрифугуванням. Отримані преципітати використовували для визначення загальних ліпідів. Загальні ліпіди із суспензії мітохондрій отримували за методом Bligh & Dyer [53]. Ліпідні екстракти зберігали в невеликому обсязі хлороформу при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Після цього ліпідні екстракти розділяли тонкошаровою хроматографією на стандартних пластинках (Сорбфіл, Росія), використовуючи системи розчинників для першого розміру хлороформ(65):метанол(30):аміак(6):бензол(10), другий розмір хлороформ(5):метанол(1):оцтова кислота(1):вода(0,5):ацетон(2) [54]. Для ідентифікації індивідуальних фосфоліпідів використовувалися специфічні реагенти та стандарти [55]. Вміст індивідуальних фосфоліпідів визначали за методом Васьковського і Костецького [56].

Статистичний аналіз. Усі дані представлені як середнє значення  $\pm$  SE 3-6 незалежних експериментів. Статистичний аналіз проводили за допомогою парного t-критерію Стьюдента. Значення  $P < 0,05$  вважалося значущим.

## РОЗДІЛ III

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Регуляція концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях має вирішальне значення для біоенергетики та клітинної сигналізації [57]. Кінетичні властивості накопичення, зберігання та вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ізольованих мітохондрій точно передбачають поведінку органел всередині неушкодженої клітини [58].

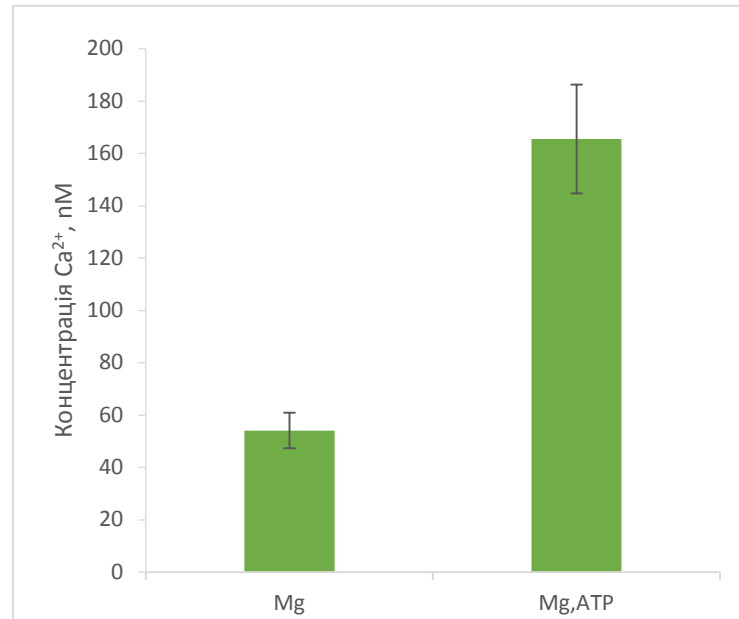
У попередній роботі співробітників відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України представлені результати вивчення механізмів регуляції концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у матриксі мітохондрій за відсутності екзогенного катіона. Концентрацію іонізованого  $\text{Ca}$  у мітохондріях міометрія визначали у  $\text{Mg}^{2+}$ - та  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР- середовищах. Показано залежне від концентрації АТР зростання концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у матриксі мітохондрій за відсутності екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$ , що забезпечувало високий рівень загальної акумуляції  $\text{Ca}$  після внесення екзогенного катіона. Коефіцієнт Хілла дорівнює  $3,18 \pm 0,27$  та константа активації для АТР дорівнює  $0,97 \pm 0,07$  мМ. Також було показано, що за низької концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у матриксі ( $\text{Mg}^{2+}$ -середовище) мітохондрії мають відносно більший розмір, тоді як за більш високої концентрації катіона у матриксі ( $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-середовище) мітохондрії мають менший розмір [59].

Метою цього дослідження було подальше вивчення можливих механізмів, що забезпечують залежне від наявності АТР збільшення концентрації іонізованого  $\text{Ca}$  у матриксі мітохондрій за відсутності доданого  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 3.1 Індуковане АТР збільшення концентрації іонізованого $\text{Ca}$ у матриксі мітохондрій.

Мітохондрії міометрія, навантажені флуоресцентним зондом Fluo 4АМ, інкубували в середовищах, що містять  $\text{Mg}^{2+}$ - та  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР. Як видно з

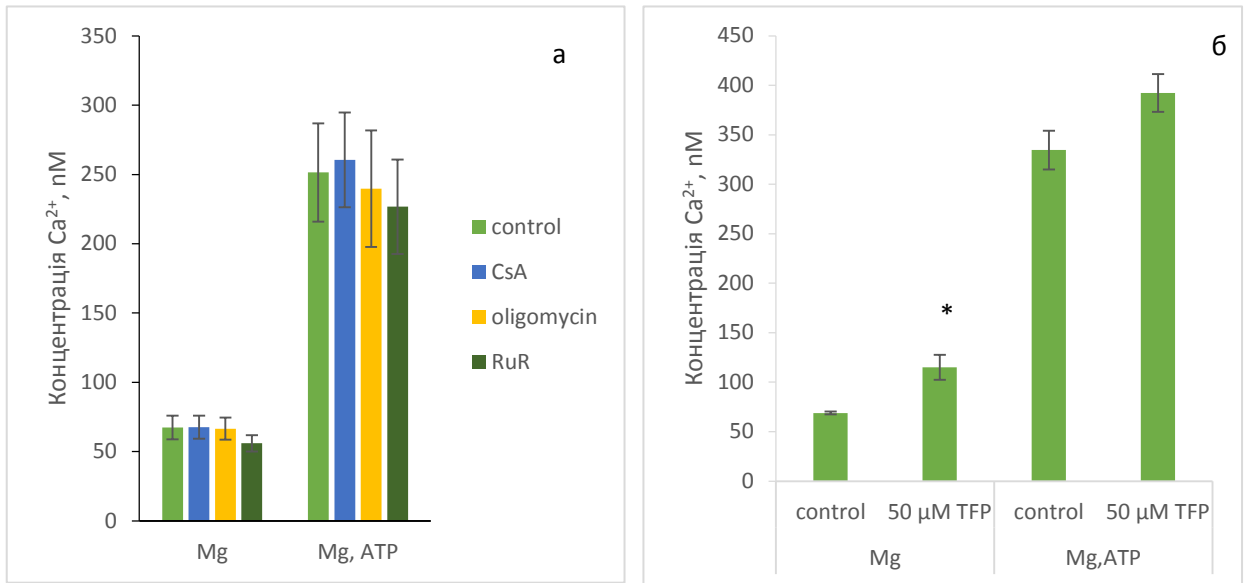
результатів рис. 1, АТФ індукувала підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці мітохондрій приблизно в 3 рази (рис. 3.1).



**Рисунок 3.1** Індуковане АТФ збільшення концентрації іонізованого Са в матриці мітохондрій.  $M \pm m$ ,  $n=6$

Отже, для з'ясування можливих механізмів, що можуть бути задіяні у забезпеченні збільшення концентрації іонізованого Са у матриці мітохондрій за наявності у середовищі АТФ та відсутності доданого  $\text{Ca}^{2+}$ , використовували різні ефектори мітохондрій: циклоспорин А – метаболіт грибів, інгібітор пори транзйентної проникності мітохондрій; рутенієвий червоний – інгібітор мітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера; олігоміцин – інгібітор комплексу F1F0-АТРази; трифлуоперазин – антагоніст кальмодуліну. Відомо, що високий рівень концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці мітохондрій є потужним активатором пори транзйентної проникності. Циклоспорин А (CsA), найбільш часто використовуваний інгібітор пори, блокує вихід іонів Са з мітохондрій що супроводжується накопиченням значної кількості цього катіону у матриці [60]. Проте, у експериментах даного дослідження було показано, що на  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  не впливає додавання 5 мкМ циклоспорину, 10 мкМ RuR або 1 мкг/мл олігоміцину (рис. 3.2, а). Під час інкубації мітохондрій з 50 мкМ трифлуоперазином в  $\text{Mg}^{2+}$ -середовищі

було зафіксовано приблизно 2-кратне підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці мітохондрій без статистично значущих змін у  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-середовищі (рис. 3.2, б).

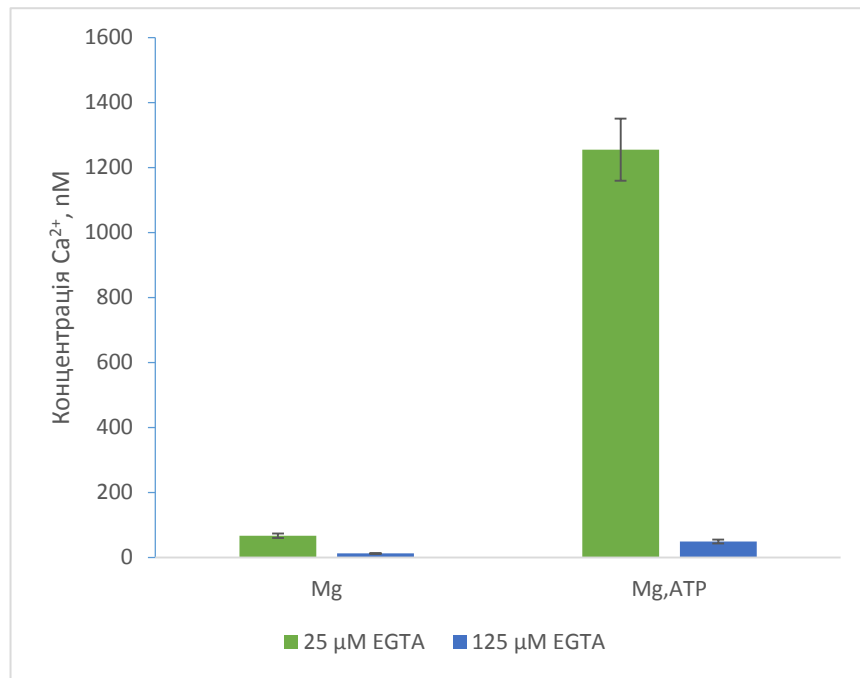


**Рисунок 3.2** Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці мітохондрій: а) 5 мкМ циклоспорину А, 10 мкМ RuR або 1 мкг/мл олігоміцину не виявили впливу на  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  ( $M \pm m$ ,  $n=4-5$ ); б) 50 мкМ трифлуоперазину в  $\text{Mg}^{2+}$ -середовищі викликало збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  без статистично значущих змін у  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-середовищі ( $M \pm m$ ,  $n=4-6$ , \* -  $P < 0,05$  (порівняно з контролем))

### 3.2. АТР індукує збільшення виходу $\text{Ca}^{2+}$ з мітохондрій

Для оцінки витоку  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій був використаний флуоресцентний зонд Fluo-4, пентакалієва сіль. Показано, що концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у разі інкубації мітохондрій у  $\text{Mg}^{2+}$ -середовищі становила  $67.5 \pm 6.9$ , а у  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-середовищі –  $1254.7 \pm 95.5$  nM. Ці результати одержані за присутності 25 μM EGTA., збільшення концентрації якого до 125 μM супроводжується різким зменшенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі (Рис. 3.3).

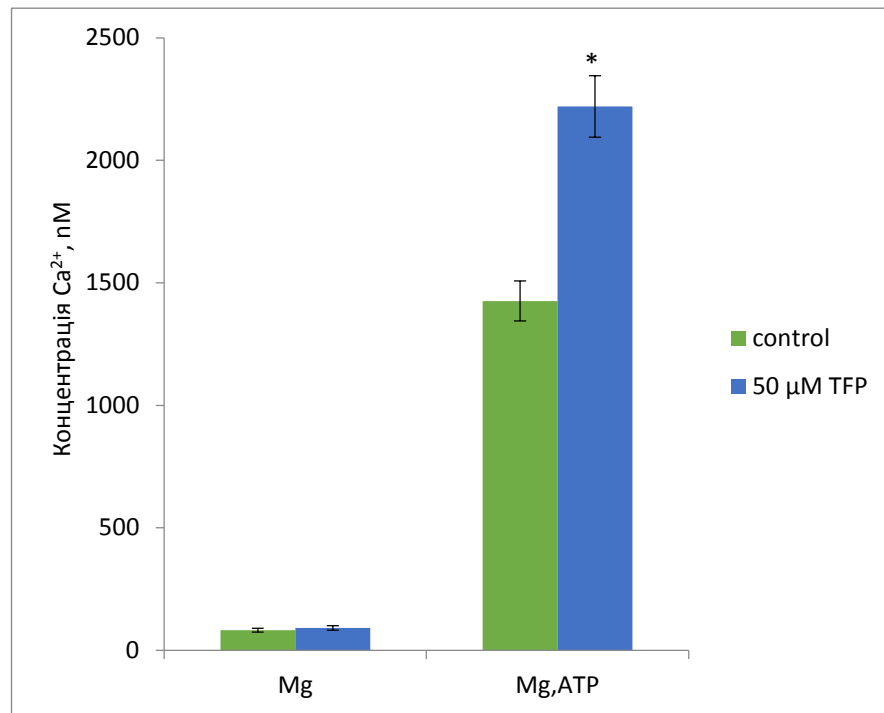
Інкубація мітохондрій з 5 μM CsA, 10 μM RuR або 1 μ/ml oligomycin не впливала на вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій до  $\text{Mg}^{2+}$ - та  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР- середовища (данні не наведено).



**Рисунок 3.3** Концентрація Ca<sup>2+</sup> у Mg<sup>2+</sup>- та Mg<sup>2+</sup>,АТР- середовищі. M±m, n=3

Було зафіксовано підвищення концентрації Ca<sup>2+</sup> у Mg<sup>2+</sup>,АТР-середовищі приблизно в 1,5 рази, під час інкубації мітохондрій з 50 мкМ трифлуоперазином (рис. 3.4).

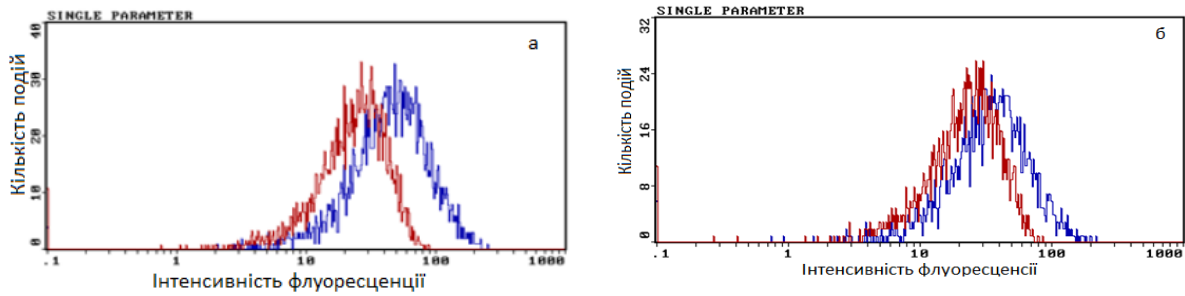
Добре відомо, що висока Ca<sup>2+</sup> місткість мітохондрій досягається головним чином шляхом хелатування іонів Ca<sup>2+</sup> фосфатами в матриксі мітохондрій, утворюючи аморфні Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> преципітати [61]. Утворення цих комплексів залежить від рН, і вони піддаються зворотному перетворенню в Ca<sup>2+</sup> і фосфат при руйнуванні мітохондріального потенціалу протонофорами, які вивільняють Ca<sup>2+</sup>, що призводить до його виходу з мітохондрій у цитозоль [62, 63]. Виходячи з цього, можна припустити, що додавання АТР до середовища інкубації може супроводжуватися деполяризацією мембран мітохондрій. Наступним завданням було дослідити рівень поляризації мітохондріальних мембран міометрія під час інкубації органел як у Mg<sup>2+</sup>- так і Mg<sup>2+</sup>,АТР-середовищі.



**Рисунок 3.4** Концентрація Ca<sup>2+</sup> у Mg<sup>2+</sup>- та Mg<sup>2+</sup>,АТФ- середовищах за інкубації мітохондрій з 50 μМ трифлуоперазином. M±m, n=5-6, \* - P<0.05 (у порівнянні з контролем)

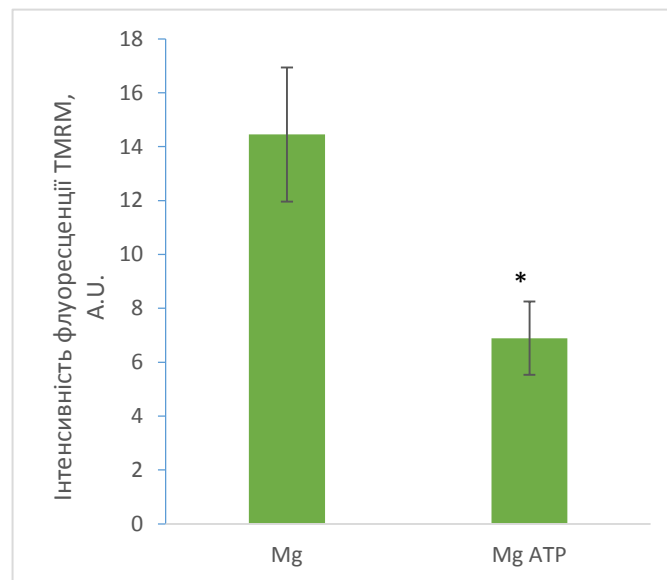
### 3.3. АТФ не викликає деполяризації мембран мітохондрій міометрія

Мембранний потенціал мітохондрій аналізували на проточному цитометрі з використанням суспензії мітохондрій та чутливого до потенціалу флуоресцентного зонда 100 нМ ТМРМ. Даний зонд накопичується в поляризованих мітохондріях, а деполяризація мембран мітохондрій призводить до виходу зонда, що можна оцінити за зменшенням інтенсивності його флуоресценції (рис. 3.5).



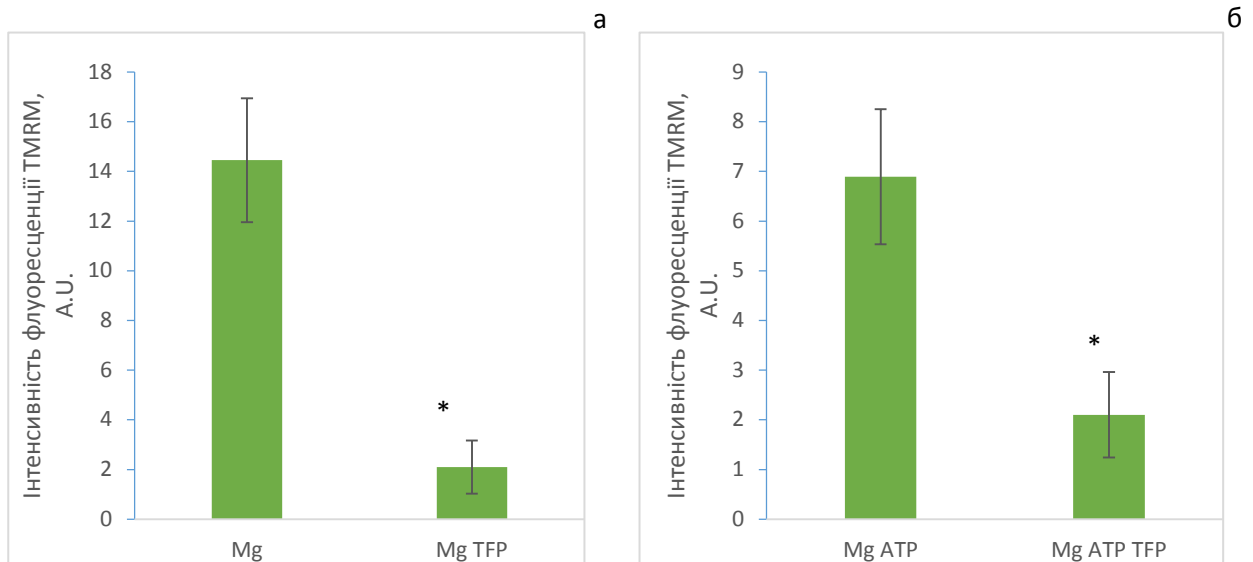
**Рисунок 3.5** Аналіз мембранного потенціалу мітохондрій при інкубації в  $Mg^{2+}$ - (а) та  $Mg^{2+}$ , АТФ-середовищі (б). Синій графік – навантажені TMRM мітохондрії; червоний графік - навантажені TMRM мітохондрії + 10  $\mu M$  СССР. Наведено типові результати,  $n=4$ .

Розрахунок чутливого до СССР компонента інтенсивності флуоресценції TMRM показав, що мітохондрії поляризовані при інкубації в обох  $Mg^{2+}$ - та  $Mg^{2+}$ , АТФ-середовищах (рис. 3.6). Однак рівень поляризації мембран мітохондрій дещо вищий у  $Mg^{2+}$ -середовищі.



**Рисунок 3.6** СССР-чутливий компонент інтенсивності флуоресценції TMRM.  $M \pm m$ ,  $n=4$ , \* -  $P < 0.05$  (у порівнянні з  $Mg^{2+}$ -середовищем)

Подальше додавання 50 мкМ трифлуоперазину супроводжувалося зменшенням інтенсивності флуоресценції TMRM під час інкубації мітохондрій в обох  $Mg^{2+}$ - та  $Mg^{2+}$ ,ATP- середовищі (рис. 3.7).



**Рисунок 3.7** Вплив 50  $\mu$ М трифлуоперазину на СССР-чутливий компонент інтенсивності флуоресценції TMRM за інкубації мітохондрій у  $Mg^{2+}$ - (а) та  $Mg^{2+}$ ,ATP-середовищі (б).  $M \pm m$ ,  $n=4$ , \* -  $P < 0.05$ . (у порівнянні з контролем без трифлуоперазину)

Раніше вже досліджувався вплив антагоністів кальмодуліну на потенціал мітохондрій за допомогою конфокальної мікроскопії та флуоресцентних потенціал-чутливих зондів TMRM та MTG. Інкубація клітин міометрія в присутності 10 мкМ кальмідозоліума або 100 мкМ трифлуоперазину супроводжувалася майже повним зменшенням «червоної» флуоресценції (TMRM), тоді як «зелена» флуоресценція (MTG) залишалася незмінною [64]. Також раніше вже досліджувалася поляризація мітохондріальних мембран міометрія, використовуючи режим гасіння та 1 мкМ TMRM. Було показано, що інкубація ізольованих мітохондрій із 100 мкМ трифлуоперазином супроводжується деполаризацією мембран мітохондрій [65].

Все вищесказане свідчить про те, що мітохондрії міомерія були поляризовані під час інкубації як у  $Mg^{2+}$ - та  $Mg^{2+}$ , АТР-середовищі, а пора транзйентної проникності мітохондрій не бере участі у досліджуваних ефектах АТР. Цей висновок опосередковано підтверджується деполяризуючим ефектом трифлуоперазину.

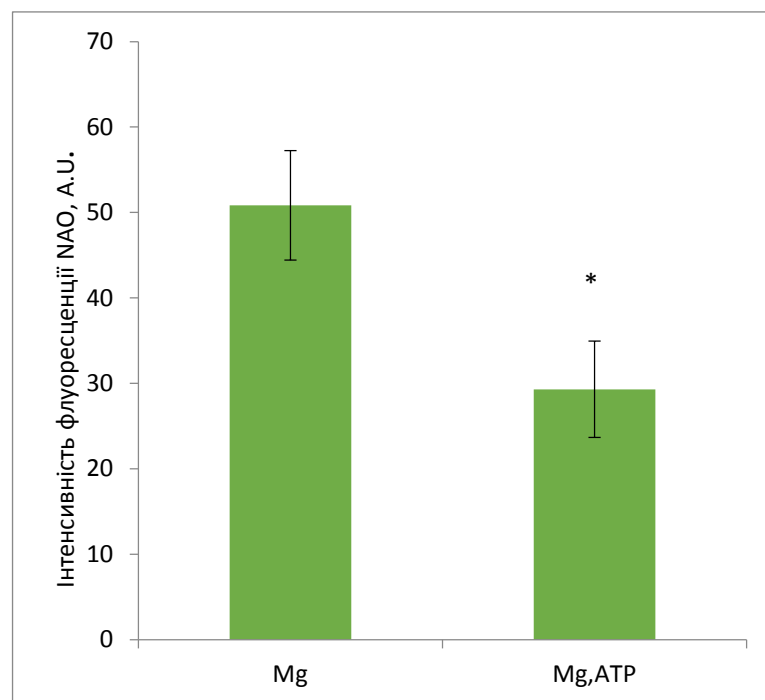
Дані літератури вказують на те, що перехідна проникність у мітохондріях може бути спровокована утворенням CsA-незалежної пальмітат/ $Ca^{2+}$ -індукованих пор перехідної проникності (РА-mPT), які принципово відрізняються від класичної  $Ca^{2+}$ -індукованої CsA-чутливої mPTP [44]. Накопичення  $Ca^{2+}$  в матриці мітохондрій призводить до активації фосфоліпази А2 (PLA2), що підвищує вміст вільних жирних кислот у внутрішній мембрані мітохондрій. Потім аніони довголанцюгових насичених жирних кислот утворюють комплекси з  $Ca^{2+}$  на матричній стороні внутрішньої мембрани мітохондрій. Коли ж їх вміст досягає певного порогу, вони відокремлюються у тверді домени, що супроводжується утворенням ліпідних пор [44]. Автори припустили, що здатність “ліпідних” пор (РА-mPT) спонтанно і швидко відкриватися та закриватися лежить в основі так званого “мерехтливого” режиму переходу проникності мітохондрій, який є оборотним [44]. Пори РА-mPT відіграють захисну роль, вивільняючи надлишок  $Ca^{2+}$  з мітохондрій, саме тому їх можна назвати «порами життя» [44].

#### 3.4. АТР індукує зниження вмісту кардіоліпіну у мембранах мітохондрій

На даний час ідентифіковано та охарактеризовано білкові регулятори мітохондріального кальцієвого уніпортера, проте роль ліпідних регуляторів донедавна залишалася ілюзорною [66]. Загально відомо, що мембранні ліпіди впливають на конформацію, олігомеризацію, топологію, стабільність та активність мембранних білків [66]. До складу мембран мітохондрій входить велика кількість фосфоліпідів: фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидна кислота та кардіоліпін.

Кардіоліпіни - це специфічні маркерні фосфоліпіди мітохондрій, що складають близько 20% маси фосфоліпідів внутрішньої мембрани мітохондрій [67, 68]. Кардіоліпін (CL) відіграє ключову роль у багатьох біоенергетичних процесах мітохондрій таких як: дихання та перетворення енергії, підтримка морфології та динаміки мітохондрій, а також участь у деяких етапах апоптотичного процесу [69-72]. Окиснення його жирнокислотного ланцюга може забезпечити сигнали про загибель клітин і контролювати апоптоз мітохондрій [67]. Перевантаження іонами  $\text{Ca}^{2+}$  сприяє окисненню ліпідів мембрани мітохондрій та пов'язаним з цим подіям, таким як відкриття пори перехідної проникності [73]. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  мають високу спорідненість до кардіоліпіну,  $K_d$  у мкМ діапазоні [74].

У експериментах даної роботи вміст мітохондріального кардіоліпіну було визначено за допомогою проточної цитометрії та кардіоліпіноспецифічного флуоресцентного зонда (NAO). Було показано, що вміст кардіоліпіну в мембранах мітохондрій зменшився при інкубації органел у  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-середовищі порівняно з  $\text{Mg}^{2+}$ -середовищем (Рис. 3.8).



**Рисунок 3.8** Вміст кардіоліпіну в мембранах мітохондрій при інкубації органел у  $\text{Mg}^{2+}$ - та  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-середовищі.  $M \pm m$ ,  $n=5$ ,  
\* -  $P < 0.05$  (у порівнянні з  $\text{Mg}^{2+}$ -середовищем)

Для перевірки вмісту кардіоліпіну в мітохондріях також була використана тонкошарова хроматографія. Дані, продемонстровані у таблиці вказують на те, що інкубація мітохондрій у  $Mg^{2+}$ , АТФ-середовищі призвела до глибоких змін у фосфоліпідному складі мітохондрій в порівнянні з складом мембран в звичайному стані: зниження вмісту фосфатидилхоліну, кардіоліпіну, сфінгомієліну, вмісту фосфатидилінозиту та підвищення рівня лізофосфатидилхоліну (табл.).

Таблиця

Вміст фосфоліпідів у мітохондріях після 5 хв. інкубації органел в  $Mg^{2+}$ - та  $Mg^{2+}$ , АТФ-середовищі

	$Mg^{2+}$ -середовище	$Mg^{2+}$ , АТФ-середовище
	мкг Рі/мг ліпідів	
Фосфатидилхолін (PC)	5,62±0,29	4,37±0,10*↓
Фосфатидил-етаноламін (PE)	4,08±0,36	4,27±0,05
Дифосфатидил-гліцерол (DPG)	1,54±0,06	0,72±0,29*↓
Сфінгомієлін (SM)	1,59±0,36	0,55±0,07*↓
Фосфатидил-інозитол (PI)	1,54±0,12	1,13±0,03*↓
Фосфатидилсерин (PS)	1,44±0,31	0,77±0,102
Лізофосфатидил-холін (LPC)	0,27±0,14	0,67±0,64*↑
Зона старту (Start)	0,17±0,09	0,07±0,04

Зменшення вмісту PC та збільшення вмісту LPC в мітохондріях під час інкубації в  $Mg^{2+}$ , АТФ-середовищі вказує на активацію фосфоліпаз А, викликану  $Ca^{2+}$ . Таким чином, зниження вмісту CL також може бути обумовлено  $Ca^{2+}$ -індукованою активацією PLA. Відомо, що фосфоліпази типу А (PLA1 і PLA2) гідролізують ацильні залишки фосфоліпідів у положенні sn-1 і sn-2, що призводить до збільшення вмісту вільних жирних

кислот. При високій концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій вільні довголанцюгові насичені жирні кислоти утворюють комплекси з  $\text{Ca}^{2+}$  на матрикській стороні внутрішньої мітохондріальної мембрани, які сприяють утворенню ліпідних пор [44]. Таким чином, можна припустити участь ліпідної пори у впливі АТР на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях.

## ВИСНОВКИ

1. Індуковане АТР збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці супроводжується збільшенням виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-середовищі приблизно в 19 разів вища, ніж у  $\text{Mg}^{2+}$ -середовищі. Підвищення концентрації EGTA супроводжувалося різким зниженням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційному середовищі.

2. Циклоспорин А, рутенієвий червоний та олігоміцин не впливали ні на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці, ні на вихід катіонів з мітохондрій.

3. Поляризація мітохондріальних мембран зберігається як в  $\text{Mg}^{2+}$ , так і в  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-середовищі. Цей висновок побічно підтверджується деполаризуючим ефектом трифлуоперазину.

4. За допомогою проточної цитометрії та тонкошарової хроматографії реєстрували зниження вмісту кардіоліпіну в мітохондріальних мембранах за наявності АТР у середовищі інкубації.

5. Вище наведені результати вказують на те, що білкова пара не бере участі в реалізації ефектів АТР, припускається, що у впливі АТР на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях бере участь ліпідна пара.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Костерін, С.О., Бабіч, Л.Г., Шликов, С.Г., Данилович, Ю.В., Векліч, Т.О., Мазур, Ю.Ю. (2016). *Біохімічна роль та регуляція  $Ca^{2+}$ -транспортувальних систем гладеньком'язових клітин*. Київ: «Наукова думка».
2. Chalmers, S., Olson, M.L., MacMillan, D., Rainbow, R.D. McCarron, J.G. (2007). Ion channel in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*, 42(4–5), pp. 447–466. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.010
3. Ng, L.C., Gurney, A.M. (2001). Store-operated channels mediate  $Ca^{2+}$  influx and contraction in rat pulmonary artery. *Circulation Research*, pp. 923–929.
4. Matthew, A., Shmygol, A., Wray, S. (2004).  $Ca^{2+}$  entry, efflux and release in smooth muscle. *Biological Research*, 37(4).
5. Lennarz, W.J., Lane, M.D. (2013). *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press.
6. Campbell, Anthony K. (2015). *Intracellular Calcium*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
7. Osellame, L.D., Blacker T.S., Duchen, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab*, 26, pp. 711–723.
8. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2019). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*, 8(7), 728. <https://doi.org/10.3390/cells8070728>
9. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 13(9), 566-78. doi: 10.1038/nrm3412

10. Cali, T., Ottolini, D., Brini, M. (2012). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  as a key regulator of mitochondrial activities. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 942, pp. 53–73. doi: 10.1007/978-94-007-2869-1\_3
11. Gincel, D., Zaid, H., Shoshan-Barmatz V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal*, 358, pp. 147–155.
12. Carafoli, E. (2010). The fateful encounter of mitochondria with calcium: How did it happen? *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), pp. 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.024>
13. Lu, Y.W., Claypool, S.M. (2015). Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Frontiers in Genetic*, 6, 3. <http://www.frontiersin.org/Genetics/editorialboard>
- Schlame, M. (2020). Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1862(1), 148305. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148305>
15. De Kroon, A.I., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., de Kruijff, B. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? (1997). *Biochim. Biophys. Acta*, 1325(1), pp. 108–116. doi: 10.1016/s0005-2736(96)00240-4
16. Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., & Ruggiero, F. M. (2009). Role of cardiolipin peroxidation and  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondrial dysfunction and disease. In *Cell Calcium*, 45(6), pp. 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.03.012G>
17. Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M.L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.*, 39(3), pp. 257–288. doi: 10.1016/s0163-7827(00)00005-9
18. Oemer, G., Koch, J., Wohlfarter, Y., Alam, M. T., Lackner, K., Sailer, S., Neumann, L., Lindner, H.H., Watschinger, K., Haltmeier, M., Werner, E.R., Zschocke, J., Keller, M.A. (2020). Phospholipid Acyl Chain Diversity Controls the

- Tissue-Specific Assembly of Mitochondrial Cardiolipins. *Cell Reports*, 30(12), pp. 4281–4291. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.115>
19. Lesnefsky, E.J., Hoppel, C.L. (2008). Cardiolipin as an oxidative target in cardiac mitochondria in the aged rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777(7-8), pp. 1020–1102. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.05.444.
  20. Brand, M.D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, pp. 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
  21. Bielski, B.H., Arudi, R.L., Sutherland, M.W. (1983) A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> – with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 258(8), pp. 4759–4761. DOI:10.1016/S0021-9258(18)32488-8
  22. Wasmus, C., Dudek, J. (2020). Metabolic Alterations Caused by Defective Cardiolipin Remodeling in Inherited Cardiomyopathies. *Life*, 10(11), 277. doi: 10.3390/life10110277
  23. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G. (2014). Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease. *Antioxid. Redox Signal*, 20(12), pp. 1925–1953. doi: 10.1089/ars.2013.5280
  24. Бабіч, Л.Г., Шликов, С.Г., Костерін, С.О. (2014). Транспортування іонів Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях гладеньких м'язів. *Український біохімічний журнал*, 86(6), сс. 18-30.
  25. Ghosh, S., Basu, B.W., Madaris, T.R., Srikantan, S., Madesh, M., Mootha, V.K., Gohil, V.M. (2020). An essential role for cardiolipin in the stability and function of the mitochondrial calcium uniporter. *PNAS*, 117(28), pp. 16383-16390. doi: 10.1073/pnas.2000640117.
  26. Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J., Rizzuto, R. (2004). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca<sup>2+</sup> Waves and Protects against Ca<sup>2+</sup>-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell*, 16(1), pp. 59–68. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.026
  27. Kohlhaas, M., Maack, C. (2013) Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc. Res*, 98(2), pp. 259–268. doi: 10.1093/cvr/cvt032

28. Kamer, K.J., Grabarek, Z., Mootha, V.K. (2017). High-affinity cooperative  $\text{Ca}^{2+}$  binding by MICU1-MICU2 serves as an on-off switch for the uniporter. *EMBO*, 18(8), pp. 1397–1411. doi: 10.15252/embr.201643748
29. Baradaran, R., Wang, C., Siliciano, A. F., Long, S. B. (2018). Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters. *Nature*, 559(7715), pp. 580–584. doi: 10.1038/s41586-018-0331-8.
30. Zhuo, W., Zhou, H., Guo, R., Yi, J., Zhang, L., Yu, L., Sui, Y., Zeng, W., Wang, P., Yang, M. (2021). Structure of intact human MCU supercomplex with the auxiliary MICU subunits. *Protein & Cell*, 12(3), pp. 220-229. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00776-w>
31. Musatov, A., Sedlák, E. (2017). Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. *Biochimie*, 142, pp. 102–111. doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.013.
32. Bernardi, P., Di Lisa, F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 78, pp. 100–106. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.023.
33. Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., D Glick, G., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., Lippe, G., Bernardi P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(15), pp. 5887–5892. doi: 10.1073/pnas.1217823110.
34. Claypool, S.M. (2009). Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(10), pp. 2059–2068. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.020>
35. Claypool, S.M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J.A., Koehler, C.M. (2008). Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.*, 182(5), pp. 937–950. doi: 10.1083/jcb.200801152.
36. Duncan, A.L., Robinson, A.J., Walker, J.E. (2016). Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP

- synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 113(31), pp. 8687–8692. doi: 10.1073/pnas.1608396113.
37. Haines, T.H., Dencher, N.A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.*, 528(1-3), pp. 35–39. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03292-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03292-1)
38. Acehan, D., Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M., Stokes, D.L., Schlame, M. (2011). Cardiolipin Affects the Supramolecular Organization of ATP Synthase in Mitochondria. *Biophys. J.*, 100(9), pp. 2184–2192. doi: 10.1016/j.bpj.2011.03.031
39. Klingenberg, M. (2009). Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1788(10), pp. 2048–2058. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.06.007
40. Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V.M., Lauquin, G.J., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E. (2006). Relations Between Structure and Function of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, pp. 713–741. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142747
41. Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., Ruggiero, F.M. (2004). Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ. Res.*, 94(1), pp. 53–59. doi: 10.1161/01.RES.0000109416.56608.64
42. Halestrap, A.P. (2014). The C Ring of the F1Fo ATP Synthase Forms the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Critical Appraisal. *Front. Oncol.*, 4, pp. 234. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00234>
43. Petrosillo, G., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F.M., Paradies, G. (2006). Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett.*, 580(27), pp. 6311–6316. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.036
44. Mironova, G. D., & Pavlov, E. V. (2021). Mitochondrial cyclosporine a-independent palmitate/ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore (Pa-mpt pore) and its role in mitochondrial function and protection against calcium overload and glutamate toxicity. In *Cells*, 10(1), pp. 1–17. <https://doi.org/10.3390/cells10010125>

45. Agafonov, A., Gritsenko, E., Belosludtsev, K., Kovalev, A., Gateau-Roesch, O., Saris, N.E., Mironova, G.D. (2003). A permeability transition in liposomes induced by the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /palmitic acid complexes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1609(2), pp. 153–160. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00666-1
46. Agafonov, A.V., Gritsenko, E.N., Shlyapnikova, E.A., Kharakoz, D.P., Belosludtseva, N.V., Lezhnev, E.I., Saris, N.E., Mironova, G.D. (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phase separation in the membrane of palmitate-containing liposomes and its possible relation to membrane permeabilization. *J. Membr. Biol.* 2007, 215(1), pp. 57–68. doi: 10.1007/s00232-007-9005-4
47. Antonov, V.F., Shevchenko, E.V., Smirnova, E., Yakovenko, E.V., Frolov, A.V. (1992). Stable cupola-shaped bilayer lipid membranes with mobile Plateau-Gibbs border: Expansion-shrinkage of membrane due to thermal transitions. *Chem. Phys. Lipids*, 61(3), pp. 219–224. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(92\)90101-T](https://doi.org/10.1016/0009-3084(92)90101-T)
48. 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), pp. 37–51. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2194>
49. Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T. (1993). Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262(5134), pp. 744–747. doi: 10.1126/science.8235595.
50. Kosterin, S. A., Bratkova, N. F., & Kurskiĭ, M. D. (1985). [The role of sarcolemma and mitochondria in calcium-dependent control of myometrium relaxation.] *Biokhimiia*, 50(8), pp. 1350–1361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2416360>
51. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
52. Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of*

- Biological Chemistry*, 260(6), pp. 3440–3450.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3838314>
53. Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), pp. 911–917. doi: 10.1139/o59-099
54. Svetashev, V. I., & Vaskovsky, V. E. (1972). A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids. *Journal of Chromatography A*, 67(2), pp. 376–378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91245-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91245-2)
55. Kates, M. (1972). Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 3(C), p. 267. [https://doi.org/10.1016/S0075-7535\(08\)70544-8](https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)70544-8)
56. Vaskovsky, V. E., Kostetsky, E. Y., & Vasendin, I. M. (1975). A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography A*, 114(1), pp. 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85249-8)
57. Pathak, T., & Trebak, M. (2018). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signaling. *Pharmacology and Therapeutics*, 192, pp. 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.001>
58. Nicholls, D. G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*, 38(3–4), pp. 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.011>
59. Sylenko, A. V., Shlykov, S. G., Babich, L. G., Chunikhin, Y., & Kosterin, S. O. (2021). Regulation of ionized calcium concentration in mitochondria matrix in the absence of exogenous Ca<sup>2+</sup>. *Ukrainian Biochemical Journal*, 93(3), pp. 5–12. <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.005>
60. Bauer, T. M., & Murphy, E. (2020). Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circulation Research*, 126, pp. 280–293. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316306>
61. Lehninger, A.L., Carafoli, E., Rossi, C.S. (1967). Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 29, pp. 259–320. doi: 10.1002/9780470122747.ch6

62. 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(21), pp. 19062-19070. doi: 10.1074/jbc.M212661200
63. Zoccarato, F., Nicholls, D. (1982). The role of phosphate in the regulation of the independent calcium-efflux pathway of liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 127(2), pp. 333-338. doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06875.x
64. Shlykov, S.G., Babich, L.G., Yevtushenko, M.E., Karakhim, S.O., & Kosterin, S.O. (2014). Modulation of myometrium mitochondrial membrane potential by calmodulin antagonists. *Ukrainian Biochemical Journal*, 86(1), pp. 29–41. <https://doi.org/10.15407/ubj86.01.029>
65. Babich, L.G., Shlykov, S.G., Kushnarova, A.M., & Kosterin, S.O. (2016). Ca(2+)-dependent regulation of the Ca(2+) concentration in the myometrium mitochondria. I. Trifluoperazine effects on mitochondria membranes polarization and [Ca(2+)](m). *The Ukrainian Biochemical Journal*, 88(4), pp. 5–11.
66. Alevriadou, B.R., Patel, A., Noble, M., Ghosh, S., Gohil, V.M., Stathopoulos, P.B., & Madesh, M. (2021). Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 320(4), pp. 465–482. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00502.2020>
67. Ahmadpour, S.T., Mahéo, K., Servais, S., Brisson, L., & Dumas, J.F. (2020). Cardiolipin, the mitochondrial signature lipid: Implication in cancer. In *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), pp. 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21218031>
68. Tan, J.X., & Finkel, T. (2020). Mitochondria as intracellular signaling platforms in health and disease. *The Journal of Cell Biology*, 219(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.202002179>
69. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M., & Petrosillo, G. (2018). Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia-reperfusion injury: Implications for pharmacological cardioprotection. In *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 315(5), pp. H1341–H1352. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00028.2018>

70. Kasahara, T., Kubota-Sakashita, M., Nagatsuka, Y., Hirabayashi, Y., Hanasaka, T., Tohyama, K., & Kato, T. (2020). Cardiolipin is essential for early embryonic viability and mitochondrial integrity of neurons in mammals. *FASEB Journal*, 34(1), pp. 1465–1480. <https://doi.org/10.1096/fj.201901598R>
71. Wasmus, C., & Dudek, J. (2020). Metabolic alterations caused by defective cardiolipin remodeling in inherited cardiomyopathies. In *Life*, 10(11), pp. 1–23. <https://doi.org/10.3390/life10110277>
72. Ross, E., Funai, K., Brown, D.A., & Raza, S. (2019). The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(7), pp. 1039–1052. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.03.012>
73. Miranda, É. G. A., Araujo-Chaves, J. C., Kawai, C., Brito, A. M. M., Dias, I. W. R., Arantes, J. T., & Nantes-Cardoso, I. L. (2020). Cardiolipin Structure and Oxidation Are Affected by  $\text{Ca}^{2+}$  at the Interface of Lipid Bilayers. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00930>
74. Brenza, J.M., Neagle, C.E., & Sokolove, P.M. (1985). Interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  with cardiolipin-containing liposomes and its inhibition by adriamycin. *Biochemical Pharmacology*, 34(24), pp. 4291–4298. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90287-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90287-4)