

УДК 576.31

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ Ca^{2+} -НЕЗАВИСИМОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ iPLA2 В ИНДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫМИ АЦИЛКАРНИТИНАМИ

© 2023 г. Н. И. Федотчева^а, Е. В. Гришина^а, В. В. Дынник^{а, *}

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: dynnik@rambler.ru

Поступила в редакцию 12.04.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Известно, что наиболее токсичными считаются активированные производные длинноцепочечных жирных кислот ацилкарнитины (LCAC), которые наряду с кальцием могут участвовать в индукции митохондриальной поры, вовлекая различные типы фосфолипаз. В данной работе исследовано влияние ингибиторов Ca^{2+} -независимых и Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз, а также ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы на индукцию поры *D,L*-пальмитоилкарнитином (PC, C16:0). В экспериментах на изолированных митохондриях печени крыс исследовали влияние PC на скорость дыхания митохондрий, мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и набухание митохондрий при окислении глутамата и пирувата или сукцината. Показано, что ингибиторы карнитин-пальмитоилтрансферазы-1 этомоксир 2, Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы sPLA2 аристолоховая кислота или Ca^{2+} -независимой фосфолипазы iPLA2γ бромоенол лактон и PACOCF3 вызывали увеличение критических концентраций *D,L*-пальмитоилкарнитина (PC*), необходимых для снижения мембранного потенциала и индукции набухания митохондрий. В активированном ADP состоянии ($\text{ADP} + \text{Mg}^{2+}$ +гексокиназа) этомоксир 2 и аристолоховая кислота усиливали ингибирование дыхания и падение потенциала, вызванные избытком PC, в то время как ингибиторы фосфолипазы iPLA2γ PACOCF3 и бромоенол лактон, оказывали выраженный защитный эффект. Ингибирование iPLA2γ препятствовало снижению $\Delta\Psi_m$ и ингибированию дыхания митохондрий, вызванных PC. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вовлечении митохондриальной фосфолипазы iPLA2γ в индукцию митохондриальной поры длинноцепочечными ацилкарнитинами.

Ключевые слова: длинноцепочечные ацилкарнитины, митохондриальная пора, ингибиторы фосфолипаз, кальций независимая фосфолипаза iPLA2γ

DOI: 10.31857/S0233475523050043, EDN: OFGOIA

ВВЕДЕНИЕ

Индукция митохондриальной циклопорин А (CsA)-зависимой поры (mPTP) считается ключевым фактором гибели клеток различных органов и тканей при ишемии-реперфузии, нейродегенеративных заболеваниях, действии различных токсинов и др. [1–4]. Ионы кальция рассматриваются в качестве основного индуктора этой поры. Однако хорошо известно, что в условиях ишемии-реперфузии концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) в очаге поражения клеток могут превышать десятки мкМ [5, 6]. Наиболее токсичными считаются LCAC, активированные производные LCFA, концентрации которых в крови пациентов с ожирением, стеатогепатитом и диабетом 2 типа (T2D), а также при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях могут в 2–4 ра-

за превышать контрольные значения, что увеличивает риск инфаркта/инсульта в несколько раз [7, 8]. Исследования последних лет показывают, что LCAC и соответствующие ацил-КоА (Acyl-CoA) могут накапливаться в постишемических митохондриях в больших концентрациях [9]. Предполагается, что образующиеся в клетках из LCAC длинноцепочечные ацил-КоА являются основными токсинами, вызывающими подавление энергетики митохондрий вследствие ингибирования ключевых NAD-зависимых дегидрогеназ митохондрий и различных транспортеров [10–16] и активации открытия CsA-зависимой поры [3, 8, 14, 16].

Также известно, что LCFA могут вызывать образование кальций-зависимой липидной поры [17–19]. Насыщенные жирные кислоты: миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и эйкозановая (C20:0), имеющие в

сравнении с другими LCFA высокое сродство к Ca^{2+} , могут образовывать в мембранах липидную пору. Образование такой обратимой липидной поры не чувствительно к действию CsA и предотвращается в присутствии EGTA, что свидетельствует о формировании комплексов LCFA и Ca^{2+} [18, 19]. Поэтому можно допустить, что деацилирование пальмитоил-КоА или миристоил-КоА в митохондриях с образованием свободных жирных кислот и Коэнзима А (КоА), может приводить к локальному накоплению соответствующих жирных кислот и индукции Ca^{2+} -зависимой липидной поры.

Наши предыдущие исследования, проведенные на изолированных митохондриях печени крыс, показали, что *D,L*-ацилкарнитины с различной длиной углеродной цепи (от C6:0 до C16:0) могут вызывать ингибирование дыхания митохондрий и индукцию митохондриальной поры. Влияние этих *D,L*-ацилкарнитинов на скорость дыхания митохондрий, набухание и снижение митохондриального потенциала было обратным-пропорционально длине углеродной цепи [20]. Наиболее токсичными оказались *D,L*-миристоилкарнитин (МС) и *D,L*-пальмитоилкарнитин (РС), критические концентрации которых (50–70 мкМ), вызывающие индукцию поры в митохондриях печени и сердца крыс, уменьшались в присутствии кальция в среде, свидетельствуя о синергичном действии LCAC и Ca^{2+} на индукцию поры [20–22]. Однако индукция поры с участием МС и РС в наших экспериментах наблюдалась также в присутствии EGTA, CsA, ADP и Mg^{2+} , наличие которых в среде в 2–3 раза увеличивало критические концентрации LCAC, что свидетельствует об участии LCAC в активации CsA-зависимой поры [20], но не исключает возможное вовлечение других дополнительных механизмов.

В экспериментах, проведенных на изолированных кардиомиоцитах, также было показано [22], что добавки в среду инкубации клеток 15–20 мкМ МС или РС вызвали, после лаг-периода в 8–15 мин, сокращение (контрактуру) и гибель клеток вследствие перераспределения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула в митохондрии, коллапса энергетики и выхода Ca^{2+} из митохондрий. Длительность лаг-периода увеличивалась, а количество погибших клеток уменьшалось в присутствии неорганического фосфата (P_i), CsA, ингибиторов Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII), Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A2 (сPLA2) и фосфолипазы C (PLC) [22].

В настоящее время установлено, что в период после ишемии-реперфузии и при сердечной недостаточности, кроме активации CaMKII δ , сPLA2 α и PLC β , γ , усиливается также ферментативная активность Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A2

(iPLA2 γ), что затрудняет восстановление миокарда и способствует индукции mPTP ионами кальция [23–27]. Однако участие фосфолипазы iPLA2 γ в индукции митохондриальной поры посредством LCAC в настоящее время изучено недостаточно. Поэтому задачей нашей работы было исследование возможного вклада iPLA2 γ в индукцию поры РС в митохондриях печени крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия выделения митохондрий и проведения экспериментов описаны ранее [20]. Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов крыс линии Вистар 6–8 недель содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помещениях при температуре 20–22°C (свет/темнота = 12/12 ч). Митохондрии печени выделяли с использованием стандартных методик дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA и 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). Митохондриальные препараты дважды промывали средой выделения, не содержащей EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду. Инкубационная среда для митохондрий содержала 125 мМ KCl, 3 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 1 мМ MgCl_2 . Содержание митохондриального белка определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

Скорость потребления кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с помощью закрытого кислородного электрода (Кларка) в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при 27°C и постоянном перемешивании. Разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi_m$) на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония (TPP^+), концентрацию которого во внешней среде $[\text{TPP}^+]_{\text{out}}$ регистрировали с помощью TPP^+ -селективного электрода. Среда инкубации содержала 125 мМ KCl, 3 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ MgSO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 2 мкМ TPP^+ . Стационарную скорость дыхания в состоянии V_3 при добавлении 1 мМ ADP обеспечивали внесением в среду инкубации 5 мМ глюкозы и 0.5 ед. гексокиназы. В работе использовали реактивы Sigma (США), Tocris (Великобритания).

Набухание митохондрий определяли спектральным методом при длине волны 540 нм с использованием спектрофотометра Ocean Optic USB-4000 (США). Митохондрии (0.3–0.4 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 125 мМ KCl, 1.5 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), в каче-

стве субстрата окисления использовали сукцинат (5 мМ).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с использованием *t*-критерия для сравнения пар величин с помощью программы Сигма-Плот 11. Данные представлены как среднее значение *S.E.M.* *n* = 6 независимых экспериментов. За уровень значимости принято *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние D,L-пальмитоилкарнитина (PC) на митохондриальный потенциал и набухание митохондрий в присутствии ингибиторов фосфолипаз. Рисунок 1а, 1б характеризует влияние PC на митохондриальный потенциал в Состоянии 2 (без ADP, Mg²⁺ и гексокиназы в среде). Репрезентативные кривые представлены на рис. 1а. В контроле три последовательные добавки 20 мкМ PC вызывали рассеивание мембранного потенциала, обеспечивая критическую величину PC* = 60 мкМ (сплошная кривая). Введение в среду инкубации 25 мкМ аристолоховой кислоты (Aristolochic acid, Arist), ингибитора Ca²⁺-зависимой фосфолипазы cPLA2, увеличивало величину PC* до 80 мкМ. Лучший защитный эффект наблюдался при инкубации митохондрий с бромоенол лактоном ((R/S)-bromo-enol lactone, BEL, 25 мкМ) и PACOCF3 (PAC, 25 мкМ), ингибиторами Ca²⁺-независимой фосфолипазы iPLA2γ. В присутствии этих ингибиторов критическая концентрация PC* превышала 100 мкМ. Средние величины PC* для Arist, BEL и PAC составляли 95, 110 и 125 мкМ соответственно (рис. 1б). Ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы-1 (CPT1) этомоксиром (Etomoxir 2, Eto, 25 мкМ) увеличивало PC* до 85 мкМ. Наилучший защитный эффект обеспечивало ингибирование iPLA2γ посредством PAC, приводящее к увеличению PC* на 60–75% в сравнении с контролем.

Репрезентативные кривые, характеризующие влияние представленных выше ингибиторов на набухание митохондрий, показаны на рис. 1в–1ж. Критическая концентрация PC*, при которой происходило полное набухание митохондрий, была 20 мкМ в контроле и возрастала до 50 мкМ в присутствии ингибитора iPLA2γ PAC (40 мкМ). Менее выраженным был защитный эффект ингибитора cPLA2 Arist (PC* = 40 мкМ), тогда как эффективность BEL и Eto (PC* = 30 мкМ) не превышала 60% от величины защитного эффекта PAC. Как показано на рис. 1ж, эффект CsA был значительно слабее по сравнению с действием ингибиторов фосфолипаз. Средние критические концентрации PC* для PAC, Arist, BEL, Eto и CsA представлены на панели 1з. Сравнение этих величин также свидетельствует о высокой эффектив-

ности PAC в предотвращении набухания митохондрий. В сравнении с контролем (PC* = 20 ± 4 мкМ) ингибирование iPLA2γ посредством PAC увеличивало PC* более чем в 2.5 раза, до 50–60 мкМ.

Таким образом, можно заключить, что в Состоянии 2 (без ADP) снижение митохондриального потенциала и активация набухания в присутствии PC происходят с вовлечением митохондриальной фосфолипазы iPLA2γ.

Влияние PC на митохондриальный потенциал и дыхание митохондрий в Состоянии 3 в присутствии ингибиторов фосфолипаз или CPT1. Рисунок 2 показывает влияние PC на мембранный потенциал (ΔΨ_m) и дыхание митохондрий в Состоянии 3 (наличие ADP, Mg²⁺ и гексокиназы в среде) при введении в среду инкубации ингибиторов фосфолипаз или CPT1. Средняя критическая концентрация D,L-пальмитоилкарнитина (PC*), при которой происходит рассеивание ΔΨ_m в митохондриях печени крыс, при окислении пирувата и L-глутамата составляет 60–70 мкМ. В этих условиях аристолоховая кислота оказывает противоположный эффект, вызывая падение ΔΨ_m и ингибирование дыхания даже в присутствии допороговых концентраций PC равных 50 мкМ (рис. 2а, 50 мкМ Arist, штриховые кривые). В то же время, при более низких концентрациях PC (20–30 мкМ), даже 100 мкМ Arist не оказывает какого-либо влияния на ΔΨ_m и дыхание митохондрий (рис. 2б), что указывает на отсутствие прямого мембранотропного эффекта этого ингибитора. Сходный негативный эффект наблюдается при ингибировании CPT1. На рис. 2в показано, что наличие 20 мкМ EGTA в среде не препятствует открытию поры, индуцируемой 80 мкМ PC (рис. 2в, штриховые кривые), а ингибитор CPT1 этомоксир (Eto, 20 мкМ) усиливает действие PC, ускоряя снижение ΔΨ_m и ингибируя дыхание митохондрий (точечные кривые).

В отличие от аристолоховой кислоты и этомоксира ингибиторы iPLA2γ BEL и PAC в Состоянии 3 также обеспечивают защитный эффект, препятствуя индукции поры избытком PC. Рисунок 2г показывает, что введение в среду инкубации 30 мкМ BEL предотвращает рассеивание ΔΨ_m в присутствии 80 мкМ PC. Ингибирование iPLA2γ, вызываемое 40 мкМ PAC, также приводит к реактивации дыхания и предотвращает падение ΔΨ_m при действии PC в высоких концентрациях, 100–120 мкМ (рис. 2з). Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что индукция поры избытком PC в Состоянии 3 также происходит с вовлечением митохондриальной iPLA2γ.

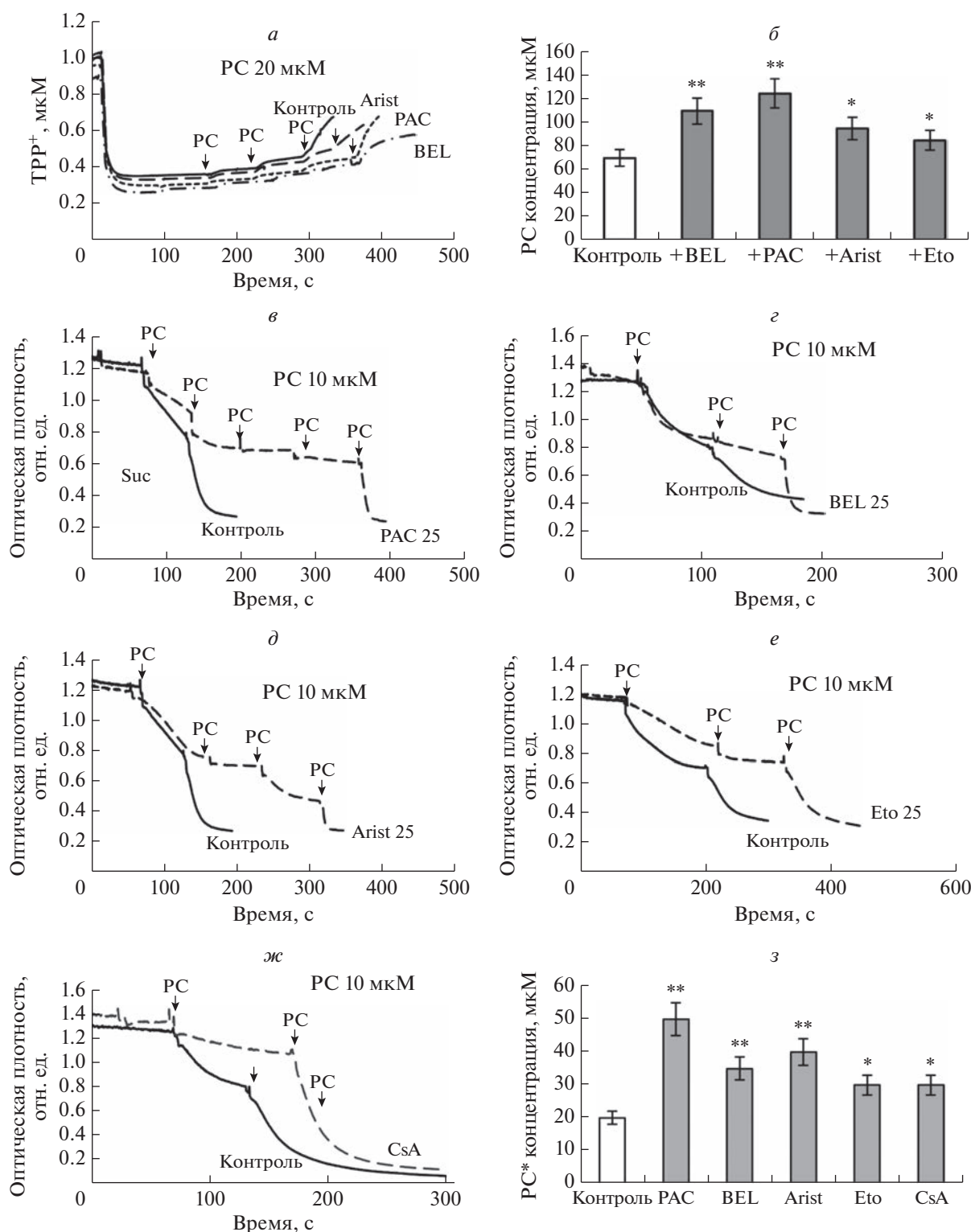


Рис. 1. Влияние пальмитоилкарнитина и ингибиторов фосфолипаз и карнитин-пальмитоилтрансферазы на мембранный потенциал и набухание митохондрий. Влияние последовательных добавок *D,L*-пальмитоилкарнитина (PC, 20 мкМ) и ингибиторов фосфолипаз (Arist, BEL, PAC) и карнитин-пальмитоилтрансферазы (Eto) в концентрации 25 мкМ на мембранный потенциал (*а*, *б*) и набухание митохондрий, индуцированное PC (10 мкМ каждая добавка) в контроле и в присутствии 25 мкМ PAC (*в*), BEL (*г*), Arist (*д*), Eto (*е*) и 1 мкМ CsA (*ж*). Средние критические концентрации PC*, индуцирующие набухание в присутствии этих ингибиторов, представлены на панели *з*. В среде инкубации 5 мМ сукцината и 0.4 и 1.2 мг/мл митохондриального белка при измерении набухания и мембранного потенциала соответственно. Концентрации ингибиторов и PC приведены в мкМ. $n = 6$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

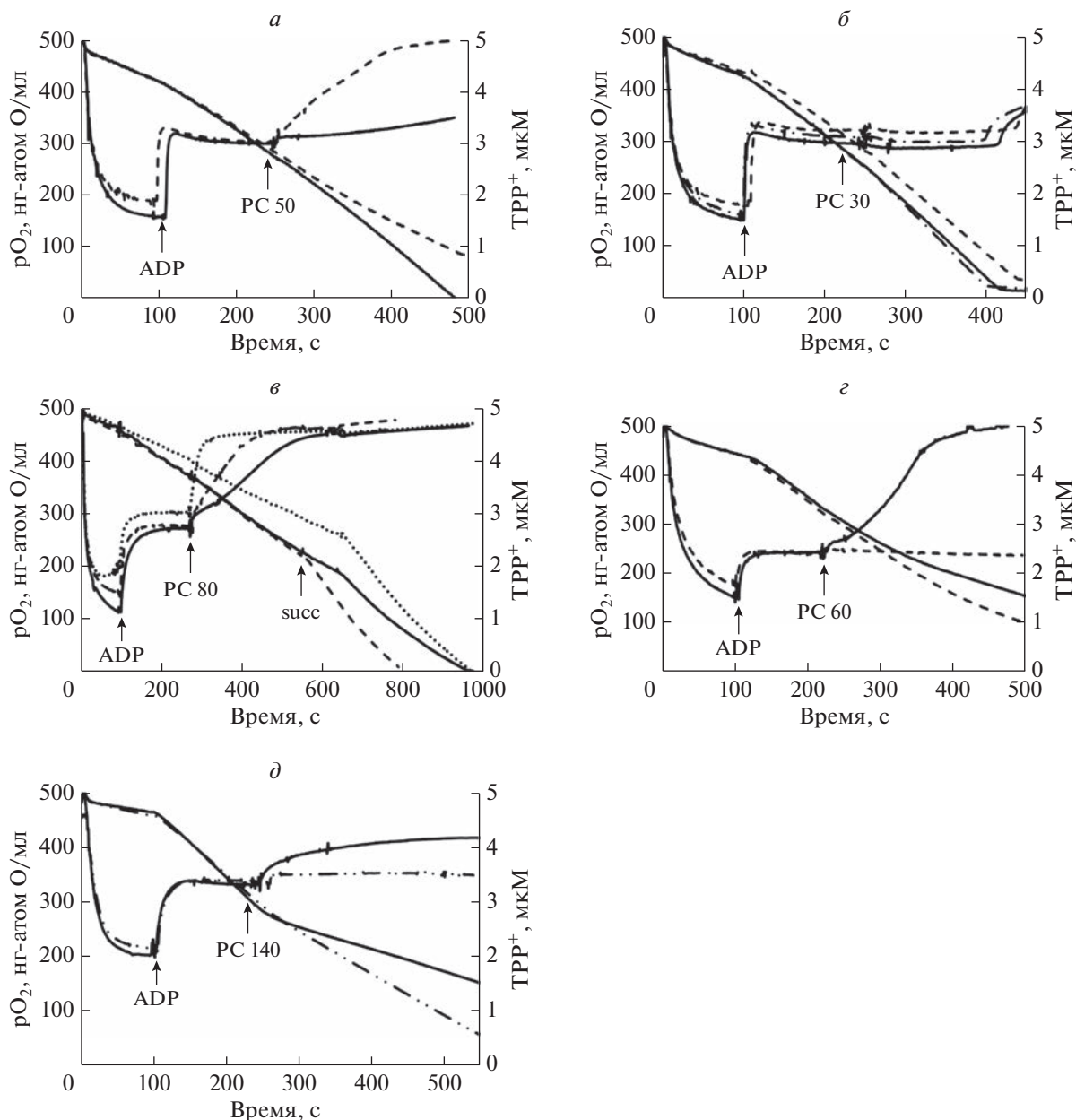


Рис. 2. Влияние PC на митохондриальный потенциал и дыхание митохондрий в Состоянии 3 в присутствии ингибиторов фосфолипаз или CPT1. *а, б* – влияние *D,L*-пальмитоилкарнитина в допороговых концентрациях (PC, *а* – 50, *б* – 30 мкМ) на мембранный потенциал (TPP^+) и дыхание митохондрий в контроле (сплошные кривые) и в присутствии ингибитора фосфолипазы cPLA₂ аристолоховой кислоты (*а* – 100 мкМ Arist, штриховые кривые; *б* – 50 и 100 мкМ Arist, штрих-пунктирные и штриховые кривые соответственно). *в* – влияние PC (80 мкМ) на мембранный потенциал и дыхание митохондрий в контроле (сплошные кривые) и в присутствии ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы (Ето, 20 мкМ, точечные кривые) или 20 мкМ EGTA (штриховые кривые) в среде. *г, д* – защитные эффекты ингибиторов фосфолипазы iPLA2γ бромоенол лактона (*г* – 30 мкМ BEL, штриховая кривая) и PACOCF3 (*д* – 40 мкМ PAC, штрих-пунктирная кривая) при ингибировании дыхания и падении мембранного потенциала, вызываемых PC (*г* – 60, *д* – 140 мкМ). В среде инкубации присутствовали: 1 мМ пируват, 10 мМ глутамат и 1 мг/мл митохондриального белка. Добавки ADP – 1 мМ. Концентрации ингибиторов и PC приведены в мкМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ca²⁺-независимая фосфолипаза iPLA2γ локализована в митохондриях и пероксисомах [27] и активируется в присутствии только высоких (миллимолярных) концентраций двухвалентных метал-

лов, включая Mg²⁺ и Ca²⁺ [28]. Активация iPLA2γ приводит к увеличению продукции арахидоновой кислоты (AA, C20:4) и продуктов ее превращения – сигнальных молекул-лейкотриенов и простагландинов. Ряд данных свидетельствует об участии

iPLA2 γ в поддержании базального перекисного окисления липидов и ее цитопротекторной роли при окислительном стрессе [29]. Однако как увеличение, так и подавление экспрессии iPLA2 γ *in vivo* вызывает митохондриальные аномалии и дисфункцию, а также развитие ряда заболеваний, включая онкологические [25–27].

Окислительный стресс и деэнергизация митохондрий также могут приводить к активации iPLA2 γ , накоплению АА, токсичных продуктов ее окисления и стимуляции Ca^{2+} CsA-зависимой поры [30, 31]. Ингибирование или нокаут iPLA2 γ в клетках сердца [32] и печени [33] уменьшает вероятность открытия такой поры. Показано, что активация этой фосфолипазы при сердечной недостаточности или жировой диете приводит к активации липоксигеназного пути окисления АА в клетках сердца и печени и генерации токсичных 12-гидрокси-эйкозатетраеновых кислот (12-НЕТЕ), участвующих в индукции поры. Эти данные позволяют считать сигнальный путь с участием липоксигеназы-12 (LOX-12) одним из важных сигнальных путей, участвующих в активации Ca^{2+} -зависимой поры [34, 35].

Представленные результаты показывают, что ингибирование iPLA2 γ бромоенол лактоном или PACOCF3 препятствует индукции митохондриальной поры РС. Противоречивые эффекты ингибиторов Ca^{2+} -зависимой PLA2 и CPT1 на мембранный потенциал в Состояниях 2 и 3 (рис. 1б и 2) отчасти могут быть связаны с их неспецифическим действием. Учитывая известное мембранотропное действие ингибиторов фосфолипаз, таких как PACOCF3 и AACOCF3 [36], в данной работе мы использовали минимальные концентрации бромоенол лактона (30 мкМ) и PACOCF3 (40 мкМ), обеспечивающие защитный эффект.

Локализованная на внешней мембране митохондрий CPT1 участвует в превращении цитоплазматического пальмитоил-КоА в пальмитоилкарнитин (РС). Ее ингибирование этомоксиром не препятствует транспорту РС в митохондрии. Более того, этомоксир усиливает токсическое действие РС на митохондриальный потенциал и вызывает ингибирование дыхания (рис. 2а). Поэтому предполагаемое использование этомоксира как протектора токсического действия свободных жирных кислот при реперфузии может быть неэффективным.

Таким образом, представленные данные указывают на то, что Ca^{2+} -независимая iPLA2 γ может быть вовлечена в индукцию митохондриальной поры D,L-пальмитоилкарнитином. Механизмы прямой или опосредованной активации iPLA2 γ и липоксигеназы-12 с участием карнитиновых и КоА производных жирных кислот пока неизвестны и могут представлять задачу для дальнейших исследований.

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

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

Соответствие принципам этики. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами, сформулированными в Хельсинкской декларации по использованию лабораторных животных. Все процедуры на животных были одобрены комитетом по этике ИТЭБ РАН (Протокол 19/2022, 05 марта 2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hunter D.R., Haworth R.A. 1979. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. *Arch. Biochem. Biophys.* **195** (2), 468–477.
2. Crompton M., Ellinger H., Costi A. 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357–360.
3. Bernardi P., Broekemeir K.M., Pfeiffer D.R. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporine-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5), 509–517. <https://doi.org/10.1007/BF00762735>
4. Kwong J.Q., Molkentin J.D. 2015. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* **21** (2), 206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>
5. Ford D.A., Han X., Horner C.C., Gross W. 1996. Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: Metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. *Biochemistry.* **35** (24), 7903. <https://doi.org/10.1021/bi960552n>
6. Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B., Kerner J., Hoppel C.L. 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia–reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33** (6), 1065–1089. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1378>
7. Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O., Bain J., Stevens R., Dyck J.R., Newgard C.B., Lopaschuk G.D., Muoio D.M. 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **7** (1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
8. Fromenty B., Robin M.A., Igoudjil A., Mansouri A., Pessayre D. 2004. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* **30** (2), 121–138. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70098-8](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70098-8)
9. Liepinsh E., Makrecka-Kuka M., Volska K., Kuka J., Makarova E., Antone U., Sevostjanovs E., Vilskersts R., Strods A., Tars K., Dambrova M. 2016. Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem. J.* **473** (9),

- 1191–1202.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160164>
10. Erfle J.D., Sauer F. 1969. The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and alpha-oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **178** (3), 441–452.
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90213-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90213-7)
11. Lai J.C., Cooper A.J. 1991. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* **16** (7), 795–803.
12. Farrell H.M. Jr, Wickham E.D., Reeves H.C. 1995. Effects of long-chain acyl-coenzyme A's on the activity of the soluble form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase from lactating bovine mammary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* **321** (1), 199–208.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1386>
13. Paulson D.J., Shug A.L. 1984. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **766** (1), 70–76.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90218-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90218-4)
14. Schoenfeld P., Bohnensack R. 1997. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Letters.* **420**, 167–170.
15. Ciapaitė J., Van Eikenhorst D., Bakker S., Diamant M., Heine R.J., Wagner M.J., Westerhoff H.V., Krab K. 2005. Modular kinetic analysis of the adenine nucleotide translocator-mediated effects of palmitoyl-CoA on the oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Diabetes.* **54** (4), 944–951.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.944>
16. Wojtczak L., Wieckowski M.R. 1999. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 447–455.
17. Sultan A., Sokolove P.M. 2001. Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **386** (1), 37–51.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2194>
18. Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C., Gritsenko E., Pavlov E., Lazareva A.V., Limarenko E., Rey C., Louisot P., Saris N.E. 2001. Palmitic and stearic acids bind Ca^{2+} with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to Ca^{2+} -activated mitochondrial pores. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33** (4), 319–331.
<https://doi.org/10.1023/a:1010659323937>
19. Mironova G.D., Pavlov E.V. 2021. Mitochondrial cyclosporine A-independent palmitate/ Ca^{2+} -induced permeability transition pore (PA-mPT Pore) and its role in mitochondrial function and protection against calcium overload and glutamate toxicity. *Cells.* **10**, 125.
<https://doi.org/10.3390/cells10010125>
20. Федотчева Н.И., Гришина Е.В., Дынник В.В. 2022. Индукция митохондриальной циклоспорин-зависимой поры ацилкарнитинами. Влияние концентрации и длины углеводной цепи. *Биол. мембраны.* **39** (1), 75–82.
<https://doi.org/10.31857/S0233475522010066>
21. Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. 2020. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* **287** (8), 1525–1536.
<https://doi.org/10.1111/febs.15090>
22. Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Nenov M.N., Kasyrov V.A., Pimenov O.Y., Dynnik V.V. 2020. Dissecting cellular mechanisms of long-chain acylcarnitines-driven cardiotoxicity: Disturbance of calcium homeostasis, activation of Ca^{2+} -dependent phospholipases, and mitochondrial energetics collapse. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (20), 7461.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207461>
23. Hollander J.M., Thapa D., Shepherd D.L. 2014. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: Influence of cardiac pathologies. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **307**, H1–H14.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2013>
24. Caro A.A., Cederbaum A.I. 2007. Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **457** (2), 252–263.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.10.018>
25. Saito Y., Watanabe K., Fujioka D., Nakamura T., Obata J., Kawabata K., Watanabe Y., Mishina H., Tamaru S., Kita Y., Shimizu T., Kugiyama K. 2012. Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A2 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of TNF- α -mediated pathway. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **302**, H2018–H2030.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00955.2011>
26. Asemu G., Dhalla N.S., Tappia P.S. 2004. Inhibition of PLC improves postischemic recovery in isolated rat heart. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **287** (6), H2598–H2605.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00506.2004>
27. Hara S., Yoda E., Sasaki Y., Nakatani Y., Kuwata H. 2019. Calcium-independent phospholipase A2 γ (iPLA2 γ) and its roles in cellular functions and diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* **1864** (6), 861–868.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.009>
28. Moon S.H., Jenkins C.M., Liu X., Guan S., Mancuso D.J., Gross R.W. 2012. Activation of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 γ (iPLA2 γ) by divalent cations mediating arachidonate release and production of downstream eicosanoids. *J. Biol. Chem.* **287** (18), 14880–14895.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336776>
29. Kinsey G.R., Blum J.L., Covington M.D., Cummings B.S., McHowat J., Schnellmann R. 2008. Decreased iPLA2 γ expression induces lipid peroxidation and cell death and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J. Lipid Res.* **49** (7), 1477–1487.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M800030-JLR200>
30. Kinsey G.R., McHowat J., Patrick K.S., Schnellmann R.G. 2007. Role of Ca^{2+} -independent phospholipase A2 γ in Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321** (2), 707–715.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.119545>

31. Rauckhorst A.J., Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R. 2014. Regulation of the Ca^{2+} -independent phospholipase A2 in liver mitochondria by changes in the energetic state. *J. Lipid Res.* **55** (5), 826–836. <https://doi.org/10.1194/jlr.M043307>
32. Williams S.D., Gottlieb R.A. 2002. Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem. J.* **362** (Pt 1), 23–32. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620023>
33. Moon S.H., Jenkins C.M., Kiebish M.A., Sims H.F., Mancuso D.J., Gross R.W. 2012. Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A(2) γ (iPLA(2) γ) attenuates calcium-induced opening of the mitochondrial permeability transition pore and resultant cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **287** (35), 29837–29850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373654>
34. Moon S.H., Liu H., Cedars A.M., Yang C., Kiebish M.A., Joseph S.M., Kelley J., Jenkins C.M., Gross R.W. 2018. Heart failure-induced activation of phospholipase iPLA 2 γ generates hydroxyeicosatetraenoic acids opening the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **293** (1), 115–129. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000405>
35. Moon S.H., Diltthey B.G., Liu X., Guan S., Sims H.F., Gross R.W. 2021. High-fat diet activates liver iPLA2 γ generating eicosanoids that mediate metabolic stress. *J. Lipid Res.* **62**, 100052. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100052>
36. Dubinin M.V., Astashev M.E., Penkov N.V., Gudkov S.V., Dyachenko I.A., Samartsev V.N., Belosludtsev K.N. 2016. Effects of phospholipase A2 inhibitors on bilayer lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **249** (3), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9872-7>

Involvement of the Mitochondrial Ca^{2+} -Independent Phospholipase iPLA2 in the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Long-Chain Acylcarnitines

N. I. Fedotcheva¹, E. V. Grishina¹, V. V. Dynnik¹, *

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*
*e-mail: dynnik@rambler.ru

It is known that activated derivatives of long-chain fatty acids acylcarnitines (LCAC) are considered the most toxic, which, along with calcium, can participate in the induction of mitochondrial permeability transition pore, involving various types of phospholipases in the complex mechanisms of pore activation. In this work, we investigated the influence of different inhibitors of phospholipases and carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) on the induction of mitochondrial permeability transition pore by *D,L*-palmitoylcarnitine (PC, C16:0). In the experiments on isolated rat liver mitochondria, the effects of PC on mitochondrial respiration rate, mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$), and mitochondrial swelling were examined. It was shown that the application of the inhibitors of carnitine palmitoyltransferase-1 (Etomoxir 2), Ca^{2+} -dependent phospholipase cPLA2 (Aristolochic acid), or Ca^{2+} -independent phospholipase iPLA2 γ ((*R/S*)-bromo-enol lactone (BEL) and PACOCF3) caused an increase in the critical concentrations of *D,L*-palmitoylcarnitine (PC*) required for $\Delta\Psi_m$ dissipation and mitochondrial swelling. The most pronounced protective effect was caused by PACOCF3 and BEL. In state 3 of respiration ($\text{ADP} + \text{Mg}^{2+} + \text{hexokinase}$), Etomoxir 2 and Aristolochic acid enhanced respiration inhibition induced by excess *D,L*-palmitoylcarnitine and promoted dissipation of $\Delta\Psi_m$, while the inhibitors of iPLA2 γ prevented the dissipation of $\Delta\Psi_m$ evoked by *D,L*-palmitoylcarnitine and caused an increase in the rate of mitochondrial respiration. Thus, the results obtained indicate the involvement of mitochondrial iPLA2 γ in the induction of mitochondrial permeability transition pore by long-chain acylcarnitines.

Keywords: long chain acylcarnitines, mitochondrial permeability transition pore, calcium-independent iPLA2 γ