

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ИЗ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ КОЛЛАПСА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

О. В. АКОПОВА, В. Ф. САГАЧ

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;
e-mail: circul@biph.kiev.ua

Досліджено механізм вивільнення кальцію з мітохондрій печінки щурів у разі індукованого протоннофором (карбонілціанід м-хлорфенілгідрозоном, КЦХФ) колапсу мембранного потенціалу. Одержані результати показують, що вивільнення кальцію з мітохондрій під дією КЦХФ супроводжується підвищенням проникності мітохондріальної мембрани внаслідок відкриття Ca^{2+} -залежної мітохондріальної пори. Вивільнення кальцію за цих умов відбувається шляхом реверсії Ca^{2+} -уніпортера, а також через пору, що свідчить про наявність нечутливої до специфічного інгібітора уніпортера — рутенієвого червоного — компоненти в механізмі вивільнення катіона. На відміну від кальцію, вивільнення стронцію з мітохондрій за тих самих умов повністю блокується рутенієвим червоним, що свідчить про відсутність відмінних від уніпортера шляхів швидкого вивільнення Sr^{2+} в умовах деполяризації мембрани. Одержано також дані, які вказують на часову обмеженість існування пори у відкритому стані і відновлення бар'єрних функцій мітохондріальної мембрани після закриття пори.

К л ю ч о в і с л о в а: кальцій, Ca^{2+} -уніпортер, протоннофор, транспортування Ca^{2+} , мітохондріальна пора.

З аметное в последние годы возрождение интереса к изучению транспорта кальция в митохондриях [1,2] связано с накоплением большого массива данных, свидетельствующих, что митохондрии играют важную роль в регуляции Ca^{2+} -гомеостаза клеток [2–4]. Сложная динамика изменений внутриклеточной концентрации ионов Ca и поддержание ее в цитозоле на физиологически необходимом и достаточно низком уровне достигается как вследствие активного накопления этого катиона эндоплазматическим ретикуломом, так и путем его захвата митохондриями через потенциалзависимый уніпортер [2–5]. В результате многочисленных исследований становится все более очевидной роль митохондрий как органелл, способных принимать и передавать поступающие в клетку кальциевые сигналы ближайшему внутриклеточному окружению [4,6]. Эта функция митохондрий — своего рода кальциевых депо — обеспечивается соответствующей Ca^{2+} -транспортной системой, способной гибко реагировать на быстрые изменения цитозольной концентрации этого катиона при действии физиологических стимулов [2–4].

Митохондриальная система транспорта кальция, осуществляющая его обмен между этими органеллами и внутриклеточной средой, как известно, включает Ca^{2+} -уніпортер и электронейтральные обменные механизмы — $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмен [2,3]. Накопление кальция митохондриями происходит путем энергозависимой транс-

локации катиона по уніпортеру (возможной только при наличии мембранного потенциала [2,3,5]), тогда как высвобождение — путем $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена, а также — вследствие реверсии уніпортера в условиях мембранной деполяризации [5] под действием разобщителей и ингибиторов митохондриального дыхания.

Известно, что сброс мембранного потенциала приводит к быстрому выходу из органелл предельно накопленного кальция [2,3,5]. Однако вопрос о механизмах высвобождения катиона в этих условиях дискутируется в современной литературе. Господствовавшие длительное время представления о реверсии уніпортера при коллапсе мембранного потенциала [5] в последние годы подвергаются критике со стороны авторов, считающих, что высвобождение Ca^{2+} из митохондрий может происходить лишь путем $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - или $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена либо через митохондриальную пору [2,3,7] — неселективный канал, открытие которого, индуцируемое ионами Ca, сопровождается пермеабиллизацией митохондриальной мембраны (mitochondrial permeability transition, MPT) и необратимым повреждением органелл вследствие падения мембранного потенциала, разобщения окисления и фосфорилирования, набухания матрикса и высвобождения в цитозоль соединений с молекулярной массой < 1500 Да [3,7,8].

То обстоятельство, что необходимым условием проявления “обратной активности” уніпор-

тера является деполяризация митохондриальной мембраны, как известно, вызывающая открытие поры [3,7], ставит под сомнение участие унипортера в механизме высвобождения кальция из митохондрий при снятии мембранного потенциала.

Поэтому нами была предпринята попытка выявить относительную роль унипортера и митохондриальной поры в механизме высвобождения кальция из митохондрий печени крыс в условиях коллапса мембранного потенциала под действием разобщителя, карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразона (КЦХФ).

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс с массой тела 200–250 г. Печень после промывания охлажденным 0,9%-м раствором KCl (4 °C) измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды следующего состава (в мМ): сахароза – 250, Tris-HCl-буфер – 20 и ЭДТА – 1 (pH 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °C), после чего супернатант центрифугировали 15 мин при 11 000 g (4 °C). Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и хранили на льду при 4 °C.

Спектрофотометрическую регистрацию транспорта Ca^{2+} проводили, как описано нами ранее [9], при 654 нм в присутствии металлохромного индикатора арсеназо-III (конечная концентрация 70 мкМ), образующего комплексы с Ca^{2+} , и некоторыми другими катионами двухвалентных металлов (в частности Sr^{2+}), что позволяет регистрировать изменения их концентрации в среде инкубации. Для регистрации транспорта Ca^{2+} митохондрии вносили в среду следующего состава (в мМ): KCl – 120, KH_2PO_4 – 1, Na_2-ATP – 1, $MgCl_2$ – 1, $CaCl_2$ – 0,1, Tris-HCl-буфера – 20 (pH 7,4). Изменение поглощения света суспензией вследствие набухания органелл регистрировали в тех же условиях, но в отсутствие индикатора. Условия эксперимента подбирали таким образом, чтобы весь добавленный в среду кальций поглощался митохондриями. Транспортный процесс проводили в течение двух минут, после чего вызывали быструю деполяризацию мембраны митохондрий внесением в среду разобщителя КЦХФ (конечная концентрация 1 мкМ). Количество белка определяли по О. Н. Lowry et al. [10]. Конечная концентрация белка в суспензии составляла 1,0 мг/мл.

В работе использовали арсеназо-III, («Sigma», США), Na_2-ATP , Tris (основание), рутениевый красный («Fluka», Швейцария), КЦХФ («Sigma», США) и другие реактивы марки о. с. ч. и ч. д. а. Растворы готовили на бидистилляте. Достовер-

ность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Величину $p < 0,05$ считали статистически значимой.

Результаты и обсуждение

Для оценки вклада Ca^{2+} -унипортера в механизм индуцированного протонофором высвобождения кальция, аккумулированного в митохондриях печени крыс, был использован специфический ингибитор унипортера, рутениевый красный (РК), который вносили в среду инкубации после вызванной КЦХФ деполяризации митохондриальной мембраны (рис. 1, А).

Данные, приведенные на рис. 1, А, показывают, что при одновременном внесении с разобщителем РК относительно мало эффективен как ингибитор транспорта Ca^{2+} из-за наличия РК-нечувствительной компоненты в механизме высвобождения катиона из митохондрий (рис. 1, А, кривая 2). Однако, внесение РК в более поздние моменты времени (рис. 1, А; кривая 3) приводит к быстрому и полному подавлению выхода кальция из органелл.

Известно, что Ca^{2+} -унипортер способен транспортировать не только ионы Ca, но и ряд других двухвалентных катионов (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} и др. [2,3]). Некоторые из них, также как и Ca^{2+} , являются индукторами неспецифической проницаемости митохондрий [3,11]. Согласно данным литературы [3,12], ионы Sr, наиболее близки к ионам Ca по своим химическим свойствам и физико-химическим характеристикам, не являются индукторами МРТ. Поэтому представляет интерес сравнительная оценка механизмов высвобождения Ca^{2+} и Sr^{2+} , вызываемого деполяризацией мембраны митохондрий. Результаты проведенного эксперимента (рис. 1, Б) показывают отсутствие РК-нечувствительной составляющей транспорта при высвобождении из органелл Sr^{2+} . Выход последнего полностью блокируется РК в любой момент времени (рис. 1, Б; кривые 2,3), что позволяет говорить как о реверсии унипортера, через который происходит высвобождение двухвалентных катионов в условиях коллапса мембранного потенциала, так и об отсутствии МРТ в случае Sr^{2+} , а также – идентифицировать РК-нечувствительную компоненту пассивного транспорта Ca^{2+} как митохондриальную пору, открытие которой ведет к высвобождению катиона из митохондриального матрикса. Таким образом, в присутствии кальция в матриксе митохондрий внесение разобщителя вызывает пермеабиллизацию внутренней мембраны органелл, связанную с открытием поры, и высвобождение ионов Ca, нечувствительное к блоктору унипортера.

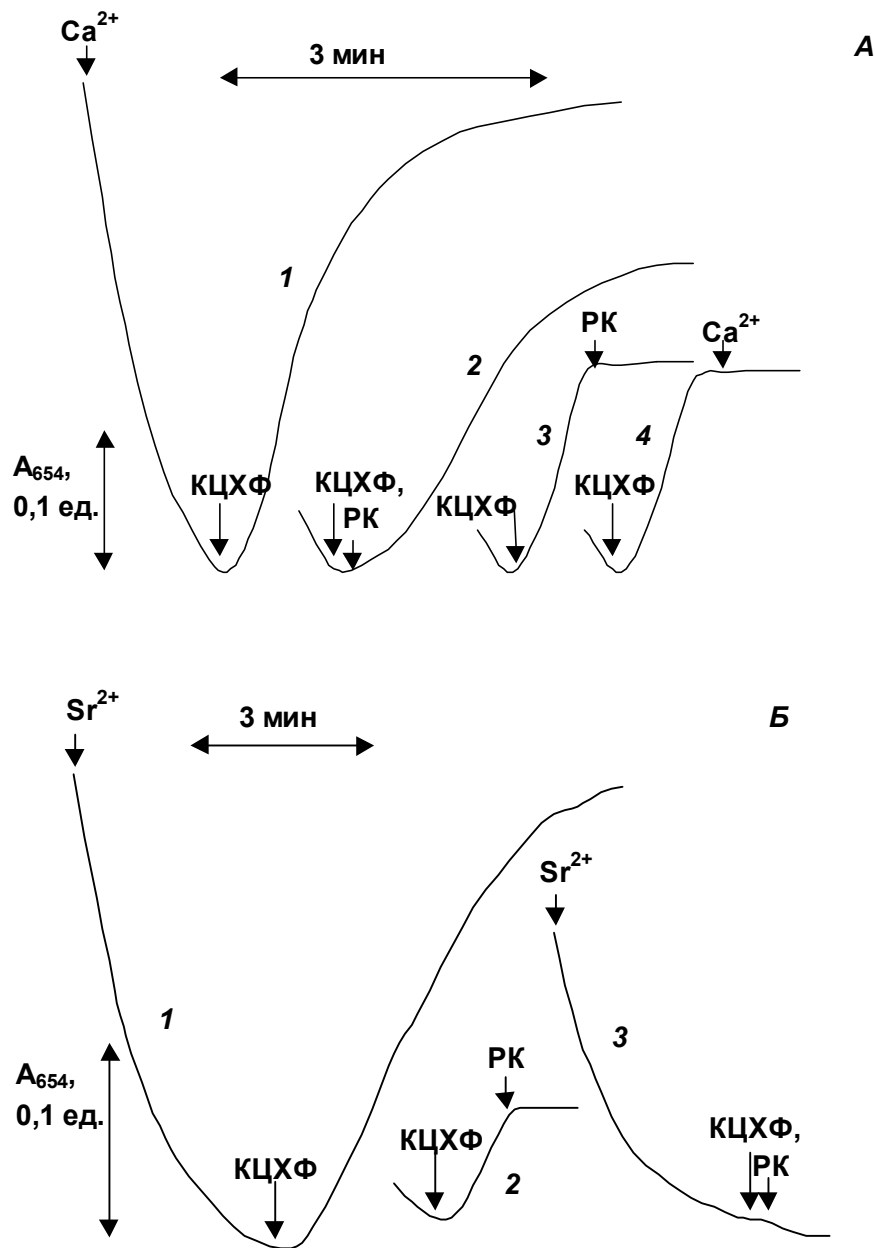


Рис. 1. Высвобождение кальция (А) и стронция (Б) из митохондрий печени крыс. Добавление реагентов указано стрелками. Концентрация добавленного Ca^{2+} составляет 30 мкМ (кривая 4). Состав среды инкубации здесь и ниже (в мМ): $KCl - 120$, $KH_2PO_4 - 1$, $Na_2-ATP - 1$, $MgCl_2 - 1$, $Tris-HCl-буфер - 20$ (рН 7,4), $CaCl_2 - 0,1$ (А) либо $SrCl_2$ (Б).

Исходя из результатов типичного эксперимента (рис. 1, кривые 1,2), можно сделать вывод, что если под действием КЦХФ весь кальций, аккумулированный органеллами, высвобождается в среду инкубации (рис. 1, А; кривая 1), то в присутствии блокатора унипортера происходит только частичное его высвобождение (рис. 1, кривая 2) и, следовательно, блокирование унипортера отчасти подавляет высвобождение катиона после снятия мембранного потенциала.

Для оценки относительного вклада унипортера и МРТ в Ca^{2+} -транспортный механизм унипортер заблокировали РК в разные моменты времени после внесения разобщителя и сброса мембранного потенциала. Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что с увеличением интервала между внесением КЦХФ и РК эффективность РК как ингибитора транспорта Ca^{2+} повышается (рис. 2, кривая 1), вплоть до полного подавления его выхода из митохондрий (рис. 1, А;

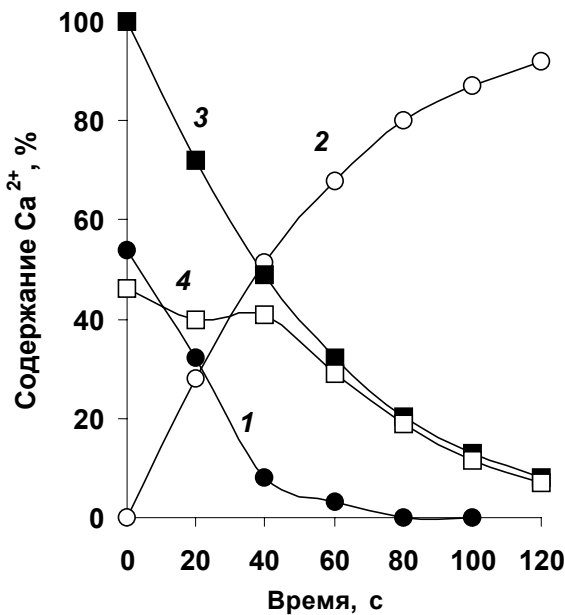


Рис. 2. Влияние рутениевого красного (РК) на высвобождение Ca^{2+} из митохондрий в условиях деполяризации мембраны: 1 — высвобождение Ca^{2+} в среду инкубации после добавления в нее РК. Изменение содержания Ca^{2+} в матриксе в отсутствие РК (кривая 3) и после его внесения (кривая 4) оценивали с учетом накопления катиона в среде в момент внесения ингибитора (кривая 2). В условиях эксперимента весь добавленный кальций поглощается митохондриями. Результаты достоверны, $p < 0,05$. По оси абсцисс отражен временной интервал, соответствующий внесению РК после снятия потенциала разобщителем. $t=0$ соответствует одновременному внесению реагентов, по оси ординат — изменение концентрации Ca^{2+} (в % от общего количества добавленного в среду Ca^{2+}).

кривая 3). При этом сопоставление данных, характеризующих изменение во времени эффективности ингибирующего действия РК, с временной зависимостью накопления кальция в среде инкубации под действием КЦХФ показывает, что к моменту полного подавления транспорта катиона блокатором унипортера накопленный Ca^{2+} не успевает полностью высвободиться из митохондрий (рис. 2, кривые 1, 2). Таким образом, несмотря на открытие митохондриальной поры, определенная часть накопленного кальция остается в матриксе и не высвобождается в инкубационную среду.

Чтобы убедиться в справедливости предположения о подавлении транспорта Ca^{2+} ингибитором унипортера, в среду инкубации после завершения транспортного процесса вносили Ca^{2+} -ионофор А23187, что во всех случаях приводит к

высвобождению кальция из митохондрий (рис. 3). Таким образом, экспериментально позволяют выявить следующие особенности механизма высвобождения кальция при деполяризации мембраны митохондрий: 1) в определенный момент времени после снятия мембранного потенциала выход Ca^{2+} подавляется блокатором унипортера; значительная часть его при этом остается в митохондриальном матриксе и высвобождается при внесении Ca^{2+} -ионофора; 2) подавление РК-нечувствительного выхода Ca^{2+} из митохондрий не связано с устранением трансмембранного градиента концентраций катиона, поскольку высвобождение его под действием А23187 наблюдается даже в присутствии небольших добавок Ca^{2+} (рис. 3, кривые 2, 3); 3) блокирование транспорта Ca^{2+} РК и высвобождение его при действии Ca^{2+} -ионофора указывает на восстановление целостности митохондриальной мембраны и свидетельствует об ограниченности временных рамок ее спонтанной пермеабиллизации, вызванной коллапсом мембранного потенциала в присутствии ионов Са в митохондриальном матриксе.

Поскольку эффективность РК, ингибирующего транспорт Ca^{2+} , повышается по мере накопления ионов Са в среде инкубации (рис. 2), можно предположить, что одной из причин подавления МРТ является повышение концентрации немитохондриального кальция, поскольку, как известно из литературы [12], ионы Са способны блокировать пору с наружной стороны внешней митохондриальной мембраны. Поэтому нами была поставлена задача выяснить влияние Ca^{2+} , добавленного в среду инкубации, на РК-нечувствительное высвобождение его из митохондрий. Для этого в среду инкубации непосредственно, после внесения КЦХФ и РК, добавляли Ca^{2+} заданной концентрации и регистрировали высвобождение его из митохондрий параллельно с регистрацией набухания органелл.

Результаты эксперимента показывают, что добавление Ca^{2+} к суспензии митохондрий дозозависимым образом повышает как скорость, так и амплитуду их набухания (рис. 4, А, кривые 1–3), а также ускоряет высвобождение катиона, свидетельствуя об активации митохондриальной поры. В то же время, следует отметить, что временная шкала обоих эффектов (набухания и высвобождения Ca^{2+}) сокращается, что может указывать также на быстрое подавление МРТ (рис. 4, Б), и сокращение времени существования поры в открытом состоянии. Восстановление барьерных свойств митохондриальной мембраны после завершения процессов набухания органелл и высвобождения из них Ca^{2+} подтверждалось, как и в отсутствие его добавок в среду,

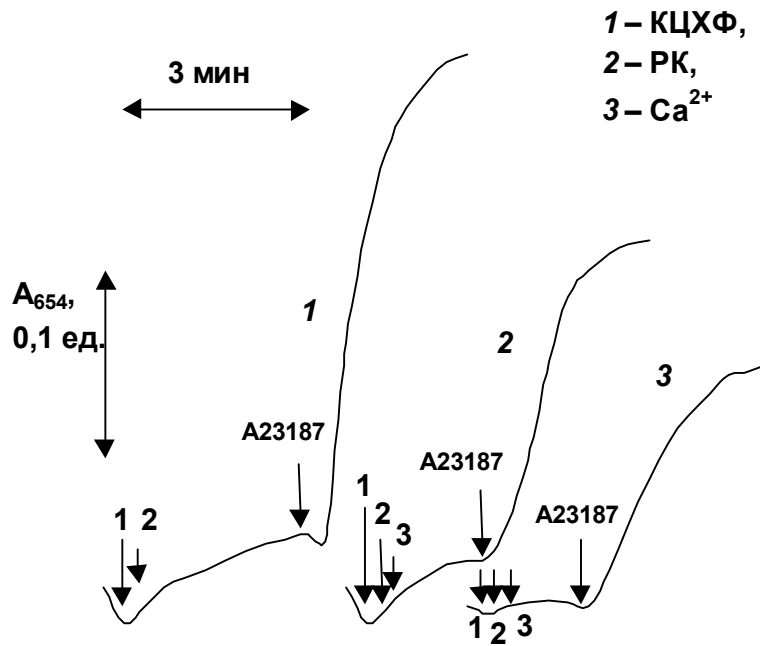


Рис. 3. Высвобождение Ca²⁺ из митохондрий под действием Ca²⁺-ионофора A23187. Начальные участки кривых, соответствующие накоплению Ca²⁺, не приведены. Последовательность добавок: КЦХФ (1), РК (2), Ca²⁺ (3). Концентрации добавленного Ca²⁺ составляли: 0, 30 мкМ, 60 мкМ – кривые 1–3 соответственно. Время добавления реагентов указано стрелками.

внесением A23187 и высвобождением кальция, оставшегося в митохондриальном матриксе, что еще раз свидетельствует об ограниченности во времени открытого состояния поры. Высвобождение Ca²⁺ после внесения Ca²⁺-ионофора в этой серии опытов, как и раньше, показывает, что подавление РК-нечувствительного транспорта Ca²⁺ не связано с устранением градиента концентраций катиона (рис. 3, кривые 2,3).

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о том, что внемитохондриальный кальций является модулятором функционирования поры: он не только активирует МРТ непосредственно после снятия мембранного потенциала, но, возможно, также сокращает временной интервал, в течение которого пора находится в открытом состоянии, способствуя тем самым ее закрытию. Последнее предположение нуждается в дальнейшем подтверждении, в то же время, далеко не очевидным является и объяснение наблюдаемой активации МРТ добавками кальция.

Так, в качестве ответа на этот вопрос можно было бы предположить существование определенных сайтов с наружной стороны митохондриальной мембраны, связывание кальция с которыми активирует МРТ. Однако, как известно из литературы [12], а также показано нами ранее в работе [9], внемитохондриальный кальций сам

по себе не только не вызывает открытия поры как в энергизованных, так и в деэнергизованных митохондриях, но скорее оказывает на нее ингибирующее действие [12]. Эти данные позволяют предположить, что наблюдаемая активация МРТ после внесения в среду Ca²⁺ происходит в течение лишь строго определенного временного интервала, соответствующего открытому состоянию поры, и обусловлена возможным входом катиона в матрикс либо межмембранное пространство митохондрий в момент открытия поры в условиях деполяризации мембраны.

Чтобы убедиться в возможности подобного, хотя и кажущегося маловероятным предположения (поскольку вход Ca²⁺ в митохондрии заблокирован РК и отсутствием потенциала на митохондриальной мембране), Ca²⁺ вносили в среду инкубации в разные моменты времени вслед за разобщителем и блокатором унипортера в концентрации вызывающей максимальное набухание органелл (рис. 5). Приведенные результаты показывают, что активация МРТ происходит лишь при внесении кальция в среду непосредственно после сброса мембранного потенциала (рис. 5, кривые 1,2). Внесение кальция в более поздние моменты времени приводит к быстрому ослаблению эффекта (рис. 5, кривые 3–5) и даже его полному устранению (рис. 5, кривая 5), а также

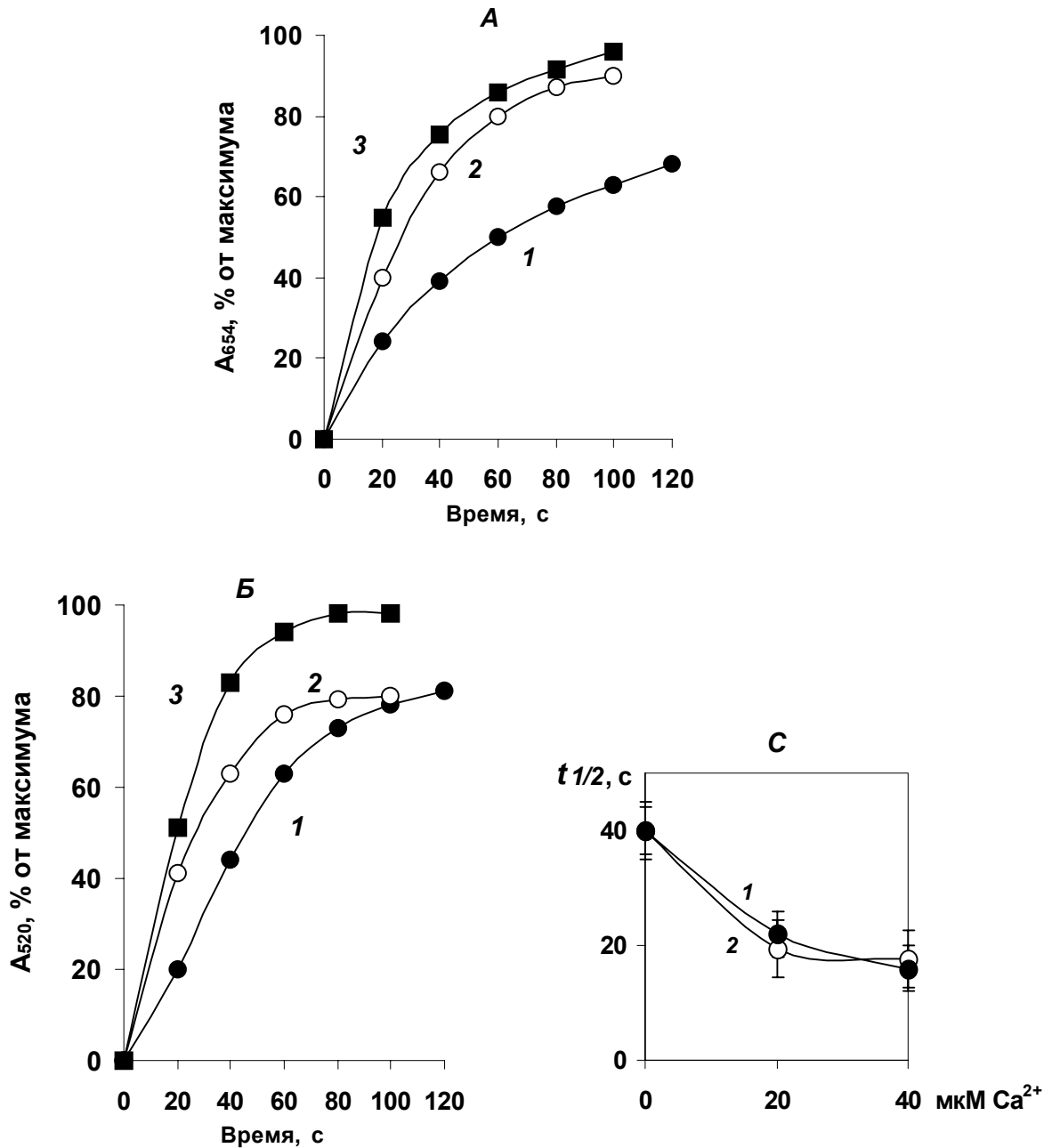


Рис. 4. Влияние Ca^{2+} на РК-нечувствительный выход кальция (А) и набухание митохондрий (Б). С – влияние добавленного Ca^{2+} (мкМ) на $t_{1/2}$ (с) набухания (кривая 1) и выхода Ca^{2+} (кривая 2). Время половинного изменения светопоглощения ($t_{1/2}$) находили непосредственно из графиков. Концентрации добавленного Ca^{2+} (в мкМ): 0 (кривая 1), 20 (кривая 2), 30 (кривая 3). Результаты достоверны, $p < 0,05$. По оси ординат изменение поглощения, в % от максимального, по оси абсцисс – время, с.

к подавлению РК-нечувствительного выхода Ca^{2+} (рис. 1, А; кривая 4). Внесение Ca^{2+} -ионофора и высвобождение Ca^{2+} из матрикса (рис. 3, кривые 2,3), как уже отмечалось выше, указывает на восстановление интактности мембраны митохондрий. Полученный результат свидетельствует как об ограниченности временных рамок МРТ, так и о том, что активация МРТ внемитохондриальным

кальцием возможна только в условиях, когда пора находится в открытом состоянии (кривые 2 и 5, рис. 5).

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что высвобождение кальция из митохондрий в условиях коллапса мембранного потенциала происходит следующим образом. В начальный момент времени после снятия

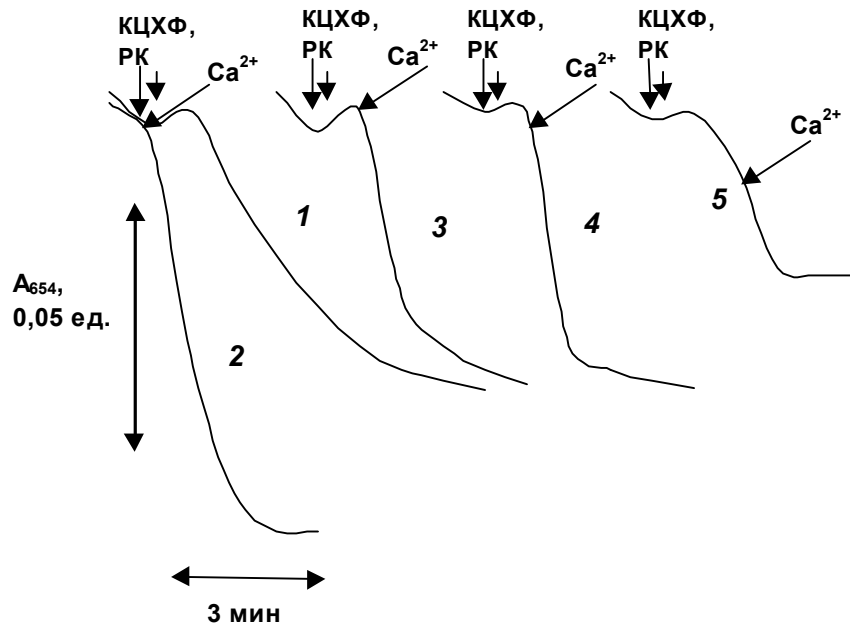


Рис. 5. Влияние добавок кальция на изменение светопоглощения суспензии после снятия мембранного потенциала КЦХФ. КЦХФ и РК вносили одновременно. Интервал между внесением КЦХФ и Ca^{2+} (в с): 5-10 (2), 20 (3), 30 (4), 60 (5). Конечная концентрация добавленного Ca^{2+} : 0 (1), 30 мкМ (2-5). Цифрами в скобках обозначено номер кривых. Светопоглощение измеряли в отсутствие арсеназо-III.

мембранного потенциала, когда концентрация внемитохондриального Ca^{2+} чрезвычайно низка и унипортер неактивен [2,7], накопленный в матриксе кальций высвобождается через пору, что соответствует РК-нечувствительной компоненте его транспорта. Накопление катиона в среде инкубации активирует унипортер, и скорость пассивного выхода Ca^{2+} из митохондрий резко возрастает вследствие согласованной работы поры и унипортера. Кальций, накапливающийся во внемитохондриальной среде, активирует МРТ и повышает скорость высвобождения катиона из матрикса, но, возможно, сокращает время открытого состояния поры. По мере накопления в среде, ионы Са блокируют пору, после чего оставшийся кальций выходит через унипортер, работающий в режиме реверсии, и преобладающим становится РК-чувствительный механизм его выхода из органелл (рис. 1, кривая 3).

Следует отметить, что представления о реверсии унипортера подвергаются критике в современной литературе [2,3,7]. Т. Е. Gunter et al. [7] приводят ссылки на последние данные, свидетельствующие, что унипортеру свойственны характеристики кальциевого канала, обеспечивающего лишь вход катиона в митохондриальный матрикс, но не его высвобождение из органелл. Однако, несмотря на то, что приводимые доводы являются достаточно вескими, многие известные в литературе факты, как и наши собственные дан-

ные (такие, как частичное подавление выхода Ca^{2+} РК, а также полное подавление выхода Sr^{2+} ингибитором унипортера), затруднительно объяснить без допущения возможности пассивного выхода кальция по унипортеру в условиях коллапса мембранного потенциала.

Очевидно, что механизм транслокации Ca^{2+} по унипортеру, основному переносчику катионов двухвалентных металлов в митохондриях, нуждается в дальнейшем тщательном изучении. Проведенное исследование можно подытожить выводом, что индуцированная протонофором мембранная деполяризация приводит к повышению проницаемости митохондриальной мембраны под действием ионов Са вследствие открытия Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры. Выход катионов из органелл в этих условиях происходит в результате реверсии унипортера, а также через пору, что объясняет наличие РК-нечувствительной компоненты в механизме их высвобождения. В отличие от кальция, высвобождение стронция в тех же условиях эксперимента полностью блокируется РК, что указывает на отсутствие отличных от унипортера путей быстрого высвобождения Sr^{2+} в условиях коллапса мембранного потенциала. Экспериментальные данные также свидетельствуют об ограниченном периоде открытого состояния поры и показывают, что внемитохондриальный кальций является модулятором работы этого открывающегося под дей-

ствием ионов Са неселективного канала.

Таким образом, результаты, полученные нами в данной работе выявляют некоторые, до сих пор недостаточно изученные особенности Ca^{2+} -транспортных процессов в митохондриях, сопровождающихся повышением их неселективной проницаемости.

CALCIUM RELEASE FROM THE RAT LIVER MITOCHONDRIA UNDER COLLAPSE OF THE MEMBRANE POTENTIAL

O. V. Akopova, V. F. Sagach

Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: circul@serv.biph.kiev.ua

S u m m a r y

Ca^{2+} -release from rat liver mitochondria after protonophore (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, CCCP)-induced membrane depolarisation is studied. It is shown that the release of calcium is accompanied by an increase of the inner mitochondrial membrane permeability as the result of the opening of permeability transition pore (PTP). Calcium is released from mitochondria through the uniporter working in reverse mode and also by PTP mechanism which accounts for ruthenium red (RR)-insensitive component of total Ca^{2+} -release.

Unlike Ca^{2+} , the strontium release from the mitochondria is completely sensitive to RR, specific uniporter blocker, which shows the absence of rapid Sr^{2+} -efflux mechanisms other than uniporter of bivalent cations.

The data obtained also give an evidence that the lifetime of the open state of the pore is limited, and barrier properties of the mitochondrial membrane are restored after the closure of the pore.

К e y w o r d s: mitochondria, Ca^{2+} -efflux, protonophore, uniporter, mitochondrial pore.

1. Pozzan T. // Eur. J. Biochem. 2000. **267**. P. 5269–5273.
2. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. // Am. J. Physiol. 1994. **267**. P. C313–C339.
3. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. // J. Physiol. 2000. **529**, N 1. P. 37–47.
4. Ganitkevich V. Y. // Exp. Physiol. 2003. **88**, N 1. P. 91–97.
5. Carafoli E. // FEBS Lett. 1979. **104**. P. 1–5.
6. Ichas F., Jouaville L. S., Mazat J. P. // Cell. 1997. **89**. P. 1145–1153.
7. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. // FEBS Lett. 2004. **567**. P. 96–102.
8. Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A. // Immunol. Today. 1997. **18**. P. 44–51.
9. Акопова О. В., Сагач В. Ф. // Укр. біохім. журн. 2004. **76**, № 1. С. 48–55.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. **195**. P. 265–267.
11. He L., Lemasters J. J. // FEBS Lett. 2002. **512**. P. 1–7.
12. Bernardi P., Veronese P., Petronilli V. // J. Biol. Chem. 1993. **268**. P. 1005–1010.

Получено 17.02.2005