

МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

Харечкина Е.С.¹, Никифорова А.Б.¹

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пушchino, e-mail: katya.kypri@gmail.com

Настоящая обзорная статья рассматривает существующие в настоящее время представления о механизмах, которые лежат в основе генерации активных форм кислорода при пермеабиллизации митохондриальных мембран. Рассмотрена роль ионов кальция и комплексов дыхательной цепи митохондрий. Обсуждается влияние уровня пиридиновых нуклеотидов, компонентов антиоксидантной системы, а также участие матричных Ca^{2+} -активируемых дегидрогеназ. В литературе имеются данные, показывающие, что индукция митохондриальной Ca^{2+} -зависимой поры вызывает конформационные перестройки дыхательных комплексов I, II и III, что усиливает генерацию активных форм кислорода. Вход кальция в матрикс митохондрий может увеличивать скорости продукции активных форм кислорода за счет активации пируватдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы, а также способствовать выходу цитохрома *c* в цитозоль при индукции митохондриальной поры. Выход глутатиона и восстановленных пиридиновых нуклеотидов через пору снижает антиоксидантную защиту матрикса митохондрий и увеличивает продукцию супероксид аниона и перекиси водорода. Явление всплеска активных форм кислорода, вызванного пермеабиллизацией митохондрий, сопровождается различными патологическими состояниями, включая ишемию с последующей реперфузией, поэтому понимание молекулярных процессов, лежащих в его основе, необходимо для дальнейшей разработки способов его фармакологической коррекции.

Ключевые слова: активные формы кислорода, митохондриальная пора, НАД(Ф), НАД(Ф)Н, дыхательная цепь митохондрий.

MECHANISMS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION UPON PERMEABILIZATION OF MITOCHONDRIAL MEMBRANES

Kharechkina E.S.¹, Nikiforova A.B.¹

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: katya.kypri@gmail.com

The review is devoted to the modern concepts of the mechanisms underlying the generation of reactive oxygen species upon permeabilization of mitochondrial membranes. The role of calcium and mitochondrial respiratory chain complexes is reviewed. The influence of the level of pyridine nucleotides, antioxidant system components, and the participation of matrix Ca^{2+} -activated dehydrogenases are discussed. There are data showing that mitochondrial permeability transition pore induction causes conformational rearrangements of respiratory complexes I, II and III, which enhance the generation of reactive oxygen species. The entry of Ca^{2+} into the mitochondrial matrix can increase the rates of reactive oxygen species production by activating pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase, and also promotes the release of cytochrome *c* into the cytosol upon mitochondrial pore induction. The release of glutathione and reduced pyridine nucleotides through the pore reduces the antioxidant defense of the mitochondrial matrix and increases the production of superoxide anion and hydrogen peroxide. The reactive oxygen species burst phenomenon upon mitochondrial permeabilization accompanies various pathological conditions, including ischemia followed by reperfusion, so understanding of the molecular processes underlying it is necessary for further development of methods for its pharmacological correction.

Keywords: reactive oxygen species, mitochondrial permeability transition pore, NAD(P), NAD(P)H, mitochondrial respiratory chain.

Пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий определяют как резкое увеличение ее проницаемости для ионов и растворов массой менее 1,5 kDa, приводящее к потере мембранного потенциала, набуханию митохондрий, разрыву их внешней мембраны и выходу апоптогенных факторов. Этот процесс происходит после открывания мегаканала,

известного как Ca^{2+} -зависимая неспецифическая митохондриальная пора (mPTP) [1]. Открывание mPTP, по-видимому, является ключевым фактором, вызывающим клеточную гибель и необратимые повреждения органов при многих патологических состояниях, таких как ишемия с последующей реперфузией, нейродегенеративные заболевания, мышечная дистрофия.

Главным активатором mPTP является кальций, при этом чувствительность к катиону многократно увеличивается при окислительном стрессе [2]. Такие условия наблюдаются при ишемии/реперфузии, и считается, что они являются главным триггером открывания mPTP. Предположение о том, что основной всплеск активных форм кислорода (АФК) происходит при открывании поры и после, долгое время ставилось под сомнение, так как известно, что ее индукция приводит к разобщению митохондрий, а это, в свою очередь, снижает продукцию АФК [3]. Однако группой Д. Зорова было обнаружено, что аккумулялирование АФК в матриксе митохондрий сердечных миоцитов при фотоактивации тетраметилпроламиновых производных запускает индукцию mPTP, которая сопровождается многократно усиленной продукцией («всплеском») АФК. Данное явление авторы назвали АФК-индуцированный выход АФК («ROS - induced ROS releas» (RIRR)) [4]. Впоследствии появилось много работ, демонстрирующих всплеск АФК, вызванный индукцией mPTP [5-8]. Выход АФК в цитозоль может активировать редокс-чувствительные ферменты, а также запускать сложный сигнальный ответ и генерацию АФК в соседних митохондриях. Данный процесс имеет важное физиологическое и патологическое значение, поскольку может индуцировать гибель не только старых и поврежденных митохондрий и клеток, но и здоровых. Вопрос о путях образования АФК при индукции mPTP несет важную научную и практическую значимость, но к настоящему моменту остается открытым.

Цель исследования

Произвести обзор существующих в современной литературе данных и гипотез о сайтах и механизмах продукции АФК при пермеабилзации внешней мембраны митохондрий.

Комплекс I дыхательной цепи митохондрий

Комплекс I (НАДН-убихинон оксидоредуктаза) является одним из главных мест продукции АФК в митохондриях. Считается, что основными сайтами генерации АФК в нем выступают флавинмононуклеотид НАДН-связывающего сайта (сайт I_f), и убисемихинон коэнзим Q-связывающего сайта (сайт I_q) [9]. Продукция супероксида на сайте I_f происходит во время прямого транспорта электронов, когда ФМН находится в сильно восстановленном состоянии и зависит от соотношения НАДН/НАД⁺ в матриксе. Ингибитор коэнзим Q-связывающего сайта ротенон увеличивает продукцию супероксида, так как вызывает

возвращение электронов на ФМН. Продукция супероксида на комплексе I также происходит во время обратного транспорта электронов, когда пул коэнзима Q полностью восстановлен [10].

При патологических условиях увеличение эффективности АФК-генерирующих сайтов комплекса I могут быть связаны с его конформационными перестройками. Открывание mPTP сильно снижает ротенон-чувствительную активность НАДН-убихинон редуктазы и увеличивает продукцию H_2O_2 в присутствии $\geq 50 \mu M$ НАДН [8]. НАДН-убихинон оксидоредуктаза характеризуется медленным переходом из активного состояния в неактивное и наоборот. Это предполагает большие конформационные перестройки комплекса, по крайней мере той его части, которая вовлечена в ротенон-чувствительное восстановление убихинона [11]. Было показано, что комплекс I, выделенный из сердца крыс, подвергнутого 30-минутной аноксичной перфузии, переходил в неактивное состояние и возвращался к активному после реоксигенации [12]. Авторы предположили, что эти конформационные перестройки могут быть связаны с генерацией АФК после того, как ткани сердца, подвергшиеся коронарной окклюзии, реоксигенируются. Переход комплекса в неактивное состояние сопровождается специфическим демаскированием Cys39 субъединицы ND3 [13]. Было показано, что нитрозирующие соединения, обратимо модифицирующие данный цистеин, могут использоваться в качестве фармакологической защиты от генерации АФК при реперфузии [14].

Комплекс II дыхательной цепи митохондрий

Комплекс II, или сукцинат-убихинон оксидоредуктаза, является тетрамерным, содержащим железо-серные кластеры флавопротеином внутренней мембраны митохондрий. Он одновременно участвует в работе цикла Кребса и дыхательной цепи, осуществляя превращение сукцината в фумарат и восстанавливая убихинон до убихинола.

Возможность образования АФК флавином фумаратредуктазы *E. coli* (сайт II_f) в присутствии низких концентраций дикарбоновых кислот впервые была показана в работе [15]. Впоследствии продукция АФК была продемонстрирована на субмитохондриальных частицах митохондрий бычьего сердца [16] и скелетных мышц [17]. Ингибитор комплекса II атпенин A5 и ингибитор комплекса III стигмателлин, который блокирует окисление убихинола комплексом III, стимулируют продукцию АФК комплексом II в присутствии сукцината. Малонат, напротив, ингибирует генерацию АФК комплексом II, что указывает на то, что АФК образуются на полностью восстановленном флавиновом сайте II_f [16], хотя не исключены и другие сайты [18]. Зависимость продукции перекиси водорода от концентрации сукцината имеет колоколообразную форму: уровень перекиси растет с увеличением концентрации субстрата до 400 μM , затем значительно снижается при миллимолярных

концентрациях, обычно используемых для энергизации митохондрий. Причиной этого явления является то, что комплекс II генерирует АФК только тогда, когда его флавиновый сайт F_1 не занят дикарбоновыми кислотами [16]. Сукцинат и другие интермедиаты цикла Кребса, которые взаимодействуют с сайтом связывания дикарбоновых кислот, могут ограничивать доступ к нему кислорода и, таким образом, подавлять продукцию АФК комплексом II. Уровень сукцината и фумарата в матриксе увеличивается во время ишемии/гипоксии, однако это не предотвращает образование АФК. Напротив, было показано, что аккумулялирование сукцината во время ишемии сильно коррелирует с продукцией АФК и повреждениями при реперфузии [19]. Авторы предположили, что главным источником АФК в данных условиях является обратный поток электронов через комплекс I [10]. Однако, в условиях длительной ишемии, когда мембраны полностью деполяризуются, данный механизм вряд ли осуществим. Альтернативный механизм генерации АФК предполагает получение доступа кислорода к восстановленному сайту F_1 из-за снижения содержания дикарбоновых кислот в его непосредственной близости в результате ускорения выхода сукцината и фумарата из матрикса при индукции mPTP [6]. Данный механизм требует ингибирования комплекса II на уровне восстановления убихинона либо ингибирования окисления убихинола комплексом III.

Конформационные перестройки комплекса II также могут способствовать всплеску АФК при пермеабиллизации мембран. Было показано, что при понижении внутриклеточного pH, наблюдающегося при апоптозе, происходит диссоциация комплекса II: субъединицы сукцинатдегидрогеназы SDHA и SDHB, осуществляющие окисление сукцината до фумарата и перенос электронов через железо-серные кластеры, отделяются от сайта восстановления коэнзима Q сукцинат CoQ оксидоредуктазы (SQR) [20]. Это приводит к ингибированию активности SQR, при этом сукцинатдегидрогеназная активность остается в норме. Такая диссоциация приводит к прямому одноэлектронному восстановлению кислорода железо-серным кластером комплекса II. И хотя известно, что низкий pH является ингибитором mPTP, тем не менее данный механизм всплеска АФК может иметь место при ишемии, когда происходит падение pH. В это время могут происходить конформационные перестройки комплекса II, и впоследствии, при реперфузии, когда pH восстанавливается до исходного уровня, открывается mPTP и наблюдается всплеск АФК, образуемых на диссоциированном комплексе.

Комплекс III дыхательной цепи митохондрий

Комплекс III (убихинол-цитохром *c* оксидоредуктаза) – еще один возможный сайт образования АФК. Данный белок осуществляет перенос электронов от убихинона на цитохром *c* в процессе функционирования так называемого Q-цикла. В ходе данного

процесса происходит образование нестабильного семихинона, который может передавать электрон на кислород, образуя при этом супероксидный радикал. Однако в нормальных условиях такая реакция маловероятна, так как семихинон быстро окисляется цитохромом b. Резкое возрастание уровня супероксида происходит при ингибировании комплекса антимицином А, а также при ишемии длительностью более 30 минут [7]. Одной из причин данного явления могут быть его конформационные перестройки, вызванные связыванием ингибитора [21]. На изолированных митохондриях сердца было показано, что комплекс III, заингибированный с помощью антимицина А, генерирует значительное количество АФК в присутствии Mg^{2+} и $НАД^+$ и в отсутствие экзогенных субстратов при индукции mPTP кальцием и аламетицином. Авторы показали, что в этих условиях продукция перекиси водорода относится к Mg^{2+} -зависимой генерации НАДН малатдегидрогеназой. Продукция H_2O_2 ингибировалась стигмателлином и пирицидином, что указывает на важность НАДН-зависимого восстановления убихинона для генерации АФК в данных условиях. Эти данные подтверждают гипотезу, согласно которой во время ишемии при индукции mPTP увеличение концентрации Mg^{2+} , $НАД^+$ в матриксе активирует малатдегидрогеназу, которая восстанавливает $НАД^+$, используя малат, концентрация которого повышается вследствие увеличения уровня сукцината и фумарата. Восстановленные эквиваленты поступают на заингибированный комплекс III, в результате чего происходит всплеск АФК [7].

Роль пиридиновых нуклеотидов в генерации АФК

Ранее было показано, что окисление НАД(Ф)Н матрикса митохондрий предшествует открыванию mPTP [22]. Кроме того, индукция поры приводит к утечке пиридиновых нуклеотидов в цитозоль клетки [23]. Данное изменение баланса НАД(Ф)Н должно влиять на продукцию АФК при пермеабилзации митохондрий. Зависимость генерации АФК от концентрации НАДН была исследована группой А. Виноградова. Было показано, что максимальная продукция супероксида достигает максимума при концентрации НАДН 10-50 μM , при миллимолярных концентрациях продукция радикала тормозится [11]. Так как физиологические концентрации НАДН/ $НАД^+$ пары матрикса находятся в миллимолярном диапазоне, то вклад комплекса I в генерацию АФК в нормальных условиях может быть незначительным. Было обнаружено, что в пермеабилзованных митохондриях происходит высокая, зависящая от отношения $НАД(Ф)Н/НАД(Ф)^+$ и стимулируемая ионами аммония продукция H_2O_2 . При этом выход перекиси водорода был нечувствителен к дикумаролу (ингибитору НАДН-хинон оксидоредуктазы) и НАДН-ОН (ингибитору комплекса I), что указывает на матриксную локализацию H_2O_2 -генерирующего сайта. Исследуемый белок обладал НАДН:липоамид оксидоредуктазной активностью и был идентифицирован как дигидролипоамиддегидрогеназа [11]. Данный белок является важным компонентом (так

называемым E3 компонентом) двух ФАД-содержащих митохондриальных ферментов: α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса и пируватдегидрогеназного комплекса. Согласно данным, полученным на очищенных комплексах и на изолированных митохондриях [24], компонент E3 отвечает за продукцию супероксида и перекиси водорода. Было показано, что пермеабелизованные митохондрии сердца крыс, окисляющие НАДН, продуцируют около 50% перекиси водорода за счет работы комплекса I, а остальные 50% приходятся на долю дигидролипоамиддегидрогеназы [13].

Восстановленные формы пиридиновых нуклеотидов не только поставляют электроны в дыхательную цепь митохондрий, но также регулируют редокс-статус матрикса через про- и антиоксидантные белки. Одним из таких белков является глутатион, который, совместно с НАДФН, является субстратом антиоксидантных белков глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы [2]. При открывании mPTP может происходить выход НАДФН и глутатиона, что вызывает накопление H_2O_2 [23]. Более того, в данных условиях из-за падения мембранного потенциала никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназа (НАДФН-трансгидрогеназа) не может поддерживать высокий уровень восстановленного НАДФ^+ , что способствует окислительному стрессу [22]. В физиологических условиях данный фермент осуществляет регенерацию НАДФН в прямой реакции, используя НАДН в качестве субстрата. Эта реакция энергетически выгодна, поскольку трансгидрогенирование между НАДН и НАДФН связано с протонным градиентом вдоль внутренней мембраны. Однако в патологических условиях она может протекать в обратном направлении, регенерируя НАДН для синтеза АТФ за счет утилизации НАДФН [25]. Таким образом, антиоксидантная защита, связанная с уровнем восстановленности НАДФ^+ , падает, что способствует продукции H_2O_2 .

Роль кальция в генерации АФК

Известно, что увеличение концентрации кальция в матриксе митохондрий запускает индукцию mPTP, при этом чувствительность поры к катиону увеличивается при окислительном стрессе, повышением уровня фосфата и снижением пула адениновых нуклеотидов [1]. Концентрация ионов кальция в матриксе митохондрий находится в пределах примерно 10 нМ. При этом их кальциевая емкость очень высока, изолированные митохондрии способны секвестрировать более 1М кальция из среды, поддерживая концентрацию свободного кальция в микромолярных пределах, в которых происходит регуляция Ca^{2+} -зависимых ферментов [26]. К таким ферментам относятся пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. Их активация приводит к усилению дыхания и синтеза АТФ и, вероятно, к повышению продукции АФК [24; 27].

В процессе пермеабелизации митохондриальных мембран происходит выход из межмембранного пространства и матрикса примерно 100 белков, в том числе таких важных

элементов антиоксидантной защиты, как глутатион и цитохром *c* [28].

Цитохром *c* является положительно заряженным белком, который связан с кардиолипином на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, а также с дыхательными комплексами III и IV. Было показано, что выход цитохрома *c* является двухступенчатым процессом, включающим отсоединение белка от внутримембранных связывающих сайтов и последующую его транслокацию через внешнюю мембрану [29]. Ca^{2+} может усиливать диссоциацию цитохрома *c* от внутренней мембраны, так как является его конкурентом за связывание с отрицательно заряженным кардиолипином. Это способствует выходу цитохрома *c* в цитозоль при индукции mPTP. Более того, АФК, образуемые при пермеабиллизации мембран, могут вызывать окисление кардиолипина, приводящее к изменению его физических свойств, что также может усиливать выход цитохрома *c* из митохондрий и способствовать еще большей генерации АФК. Пониженный уровень белка замедляет транспорт электронов от комплекса III к комплексу IV и, таким образом, увеличивает продукцию АФК в Q-цикле. Кроме того, цитохром *c* сам по себе является эффективным антиоксидантом, способным эффективно восстанавливаться супероксид анионом [30]. Таким образом, повышение концентрации кальция в митохондриях оказывает стимулирующее влияние на АФК-продуцирующие ферменты матрикса и приводит к падению антиоксидантной защиты, тем самым увеличивая общий уровень АФК, генерируемый митохондриями.

Заключение

Митохондрии являются одновременно потенциальным источником и мишенью действия АФК, приводящим к потере митохондриальных функций и, как следствие, к необратимому повреждению клеток при многих патологических процессах. Важную роль при этом играет mPTP, индукция которой может приводить к мощной генерации АФК, оказывающих повреждающее действие на соседние органеллы и целые клетки. В настоящее время причины данного явления слабо изучены, хотя в литературе имеется несколько гипотез. Предполагается, что в основе всплеска АФК могут лежать конформационные перестройки комплексов дыхательной цепи, активация дегидрогеназ матрикса в результате действия Ca^{2+} , изменение баланса НАД(Ф)Н/НАД(Ф)⁺ матрикса и истощение антиоксидантной системы. Дальнейшее исследование механизмов и сайтов продукции АФК при индукции mPTP представляется необходимым, поскольку их точное определение позволит разработать способы их регуляции для предупреждения развития многих патологических состояний организма.

Список литературы

1. Halestrap A.P., Richardson A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015. Vol. 78. P. 129-141.
2. Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2004. Vol. 287 (4). P. 817-833.
3. Ruiz-Ramírez A., López-Acosta O., Barrios-Maya M.A., El-Hafidi M. Cell death and heart failure in obesity: role of uncoupling proteins // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Vol. 2016. P. 1-11.
4. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // *Physiological Reviews*. 2014. Vol. 94 (4). P. 909-950.
5. Andrienko T., Pasdois P., Rossbach A., Halestrap A.P. Real-time fluorescence measurements of ROS and $[Ca^{2+}]$ in ischemic/reperfused rat hearts: detectable increases occur only after mitochondrial pore opening and are attenuated by ischemic preconditioning // *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11 (12).
6. Korge P., John S.A., Calmettes G., Weiss J.N. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: the role of complex II // *The Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292 (24). P. 9896-9905.
7. Korge P., Calmettes G., John S.A., Weiss J.N. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III // *The Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292 (24). P. 9882-9895.
8. Batandier C., Leverve X., Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I // *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279 (17). P. 17197-17294.
9. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia reperfusion injury and cardioprotection // *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. Vol. 117. P. 76-89.
10. Chouchani E.T., Pell V.R., James A.M. et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury // *Cell Metabolism*. 2016. Vol. 23 (2). P. 254-263.
11. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // *Успехи биологической химии*. 2013. Т. 53. С. 245-296.
12. Maklashina E., Sher Y., Zhou H.Z. et al. Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002. Vol. 1556 (1). P. 6-12.

13. Grivennikova V.G., Kareyeva A.V., Vinogradov A.D. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797 (6-7). P. 939-944.
14. Chouchani E.T., Methner C., Nadtochiy S.M. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I // *Nature Medicine*. 2013. Vol. 19 (6). P. 753-759.
15. Imlay, J.A. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270. P. 19767-19777.
16. Siebels I., Droese S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. Vol. 1827 (10). P. 1156-1164.
17. Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V. et al. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287 (32). P. 27255-27264.
18. Grivennikova V.G., Kozlovsky V.S., Vinogradov A.D. Respiratory complex II: ROS production and the kinetics of ubiquinone reduction // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. Vol. 1858 (2). P. 109-117.
19. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS // *Nature*. 2014. Vol. 515. P. 431-435.
20. Lemarie A., Huc L., Pazarentzos E. et al. Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction // *Cell Death and Differentiation*. 2011. Vol. 18 (2). P. 338-349.
21. Huang L.S., Cobessi D., Tung E.Y., Berry E.A. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc₁ complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern // *Journal of Molecular Biology*. 2005. Vol. 351 (3). P. 573-597.
22. Vercesi A.E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1987. Vol. 252 (1). P. 171-178.
23. Peng T.I., Jou M.J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010. Vol. 1201. P. 183-188.
24. Starkov A.A. An update on the role of mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2013. Vol. 55. P. 13-16.
25. Nickel A.G., von Hardenberg A., Hohl M. et al. Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure // *Cell Metabolism*. 2015. Vol. 22 (3). P. 472-484.
26. Wei A.C., Liu T., Winslow R.L., O'Rourke B. Dynamics of matrix-free Ca²⁺ in cardiac

mitochondria: two components of Ca^{2+} uptake and role of phosphate buffering // *Journal of General Physiology*. 2012. Vol. 139 (6). P. 465-478.

27. Denton R.M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787 (11). P. 1309-1316.

28. Patterson S.D., Spahr C.S., Daugas E. et al. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition // *Cell Death and Differentiation*. 2000. Vol. 7 (2). P. 137–144.

29. Ott M., Robertson J.D., Gogvadze V. et al. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. Vol. 99 (3). P. 1259–1263.

30. Pereverzev M.O., Vygodina T.V., Konstantinov A.A., Skulachev V.P. Cytochrome c, an ideal antioxidant // *Biochemical Society Transactions*. 2003. Vol. 31. Pt. 6. P. 1312–1315.