

ВПЛИВ ЦИКЛОСПОРИНУ А НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КУЛЬТИВОВАНИХ КЛІТИН ГІПОКАМПА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Надійшла 02.12.14

Присутність амілоїдних бляшок і нейрофібрилярних клубків та прояви інтенсивної нейродегенерації в мозку є основними патологічними явищами, характерними для хвороби Альцгеймера (ХА). Механізми, що лежать в основі нейротоксичності протеїну, специфічного для ХА (амілоїду β_{1-42}), поки що залишаються не зовсім ясними. Є підстави вважати, що у відповідних процесах певну роль може відігравати відкриття мітохондріальних пор перехідної проникності (МППП). Ми з'ясували вплив вказаного протеїну на життєздатність культивованих клітин гіпокампа шурів. Використовували конфокальну мікроскопію після забарвлення клітин барвниками Hoechst 33258 та пропідіуму йодидом (ПЙ), що дозволяло визначати кількість живих та некротизованих одиниць. Якщо до культурального середовища додавали 2.0 мкМ амілоїду β_{1-42} , індекс загибелі (ІЗ) клітин гіпокампа (кількість клітин, забарвлених ПЙ, щодо загальної кількості обстежених одиниць) після 14 діб культивування складав у середньому $59 \pm 4\%$ порівняно з $28 \pm 6\%$ у контрольних умовах. Коли ж до середовища додавали не тільки амілоїд β_{1-42} , а й блокатор відкриття МППП циклоспорин А (1.25 мкМ), середній ІЗ дорівнював $42 \pm 6\%$. Отже, зміни в мітохондріях та відкриття МППП можуть бути досить значною мірою залучені в некротичну загибель клітин гіпокампа при ХА.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпокамп, культура клітин, амілоїд β_{1-42} , циклоспорин А, життєздатність, некроз, мітохондріальна пора перехідної проникності (МППП).

ВСТУП

Хвороба Альцгеймера (ХА) є однією з найпоширеніших патологій, від якої страждає помітна частина населення і яка, на жаль, не піддається ефективному лікуванню [1]. Ця хвороба є причиною найбільш поширеної форми деменції у людей похилого віку. При ХА відбувається прогресуюча загибель нейронів, особливо інтенсивна в межах гіпокампа [2–4]. Нейроповедінкові розлади, що супроводжують перебіг ХА, – це, в першу чергу, порушення пам'яті, мови, орієнтації та втрата практичних життєвих навичок [5].

Діагностика ХА на сьогодні базується на двох основних ознаках – накопиченні внутрішньоклітинних нейрофібрилярних тяжів, що складаються пе-

реважно з гіперфосфорильованої форми мікротрубочок, асоційованих з τ -білком, і відкладенні між нейронами позаклітинних бляшок. Основним компонентом таких бляшок є специфічний протеїн – агрегований β -амілоїд [6]. Накопичення даного білка в перебігу розвитку ХА, пов'язане зі змінами в його метаболізмі, викликає дегенерацію нейронів у важливих у когнітивному аспекті відділах мозку [7]. Як встановлено, молекула β -амілоїду являє собою частину більш довгої молекули білка-попередника, що складається із 695 амінокислотних залишків. Цей білок є інтегральним мембранним глікопротеїном, що зустрічається в різних тканинах організму та значно сконцентрований у синаптичних з'єднаннях нейронів [8].

Протягом тривалого періоду механізми впливу амілоїду β на нервові клітини було важко пояснити, поки не з'ясувалося, що фізіологічні властивості згаданого протеїну в значній мірі залежать від його фізичного стану та концентрації [9]. Найчастіше зустрічаються амілоїди β_{1-39} та β_{1-42} , причому

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).² Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ (Україна).

Ел. пошта: elena@biph.kiev.ua (О. О. Лук'янець).

останній є особливо токсичним для клітин. Він накопичується у вигляді вищезгаданих бляшок значною мірою в гіпокампі та судинах головного мозку, що й призводить до ініціації ХА [10, 11].

Отримані дані про те, що патогенез хронічних нейродегенеративних захворювань (у тому числі ХА) включає в себе відкривання мітохондріальних пор перехідної проникності (МППП). Цей процес, як правило, передуює посиленню апоптотичної та некротичної загибелі клітин [12]. Активация таких мультипротеїнових комплексів, побудованих із компонентів обох мембран мітохондрій, супроводжується драматичним посиленням неспецифічної проникності мембран даних органел, різким зменшенням їх мембранного потенціалу та полегшенням транспортування великомолекулярних речовин (масою 1500 Да і більше). Останнє, в свою чергу, призводить до швидкого виходу Ca^{2+} з матриксу мітохондрій в позамітохондріальний простір за його концентраційним градієнтом [13]. Існують дані про те, що формування МППП є феноменом, пов'язаним із рядом патологічних станів клітин печінки, м'язів та серцево-судинної системи. Інтенсивне відкривання МППП відбувається при низці інфекційних захворювань, розвитку злоякісних клітин, гострих та хронічних інтоксикаціях, у тому числі викликаних солями певних металів [14, 15]. Припускається, що цей процес може відігравати й досить важливу фізіологічну роль, забезпечуючи швидкий вихід надлишку акумульованого мітохондріями кальцію, регулювання об'єму даних органел, рН та окисно-відновної рівноваги в них, імпорт білків, звільнення матриксу від пошкоджених та зайвих молекул, позбавлення клітин від самих зруйнованих мітохондрій тощо [16–18]. Втім, хоча зв'язок між молекулярними ефектами, що супроводжують ХА, та розвитком неспецифічної проникності мітохондрій у клітинах ЦНС є очевидним, механізми, котрі лежать в основі вказаних процесів, і досі залишаються недостатньо вивченими.

Метою наших досліджень було з'ясування можливої ролі формування МППП у некротичній загибелі культивованих клітин гіпокампа шурів при моделюванні ХА.

МЕТОДИКА

Приготування первинної дисоційованої культури клітин гіпокампа. Дослідження були виконані на культурі клітин гіпокампа п'яти шурів з викорис-

танням відомої методики [19–22]. Для цього новонароджених шурів лінії Вістар декапітували, гіпокампи виділяли в стерильній охолодженій чашці Петрі, розрізали на декілька частин кожний та на 10 хв переносили в теплий (36 °С) розчин для ферментативної обробки, що вміщував 0.25 % трипсину («Sigma-Aldrich», США). Далі шматочки гіпокампа промивали декілька разів чистим холодним середовищем для культивування. Використовуючи дозатор об'ємом 1.0 мл, тканину диспергували до стану більш-менш однорідної суспензії. Додаючи необхідний об'єм поживного середовища, готували суспензію із щільністю $3 \cdot 10^5$ клітин у 1.0 мл; щільність вимірювали за допомогою камери Горяєва. Потім 200 мкл суспензії клітин наносили на покривні скельця розміром 20×20 мм, попередньо оброблені сумішшю полілізину (50 мкг/мл) та ламініну (5 мкг/мл). Після 2 год інкубації при 36 °С в атмосфері, збагаченій CO_2 до 5 %, у кожен чашку Петрі додавали по 2.0 мл поживного середовища наступного складу: 90 % мінімального середовища Ігла (MEM; «Sigma-Aldrich», США), 10 % кінської сироватки («Gibco», США) з доданням 2.2 г/л NaHCO_3 , 10 мкг/мл інсуліну та антибіотиків (50 од/мл бензилпеніциліну натрієвої солі та 50 мкг/мл стрептоміцину сульфату). Нейрони культивували в інкубаторі два тижні при 36 °С в атмосфері з 5 % CO_2 . З метою пригнічення проліферації гліальних клітин через три доби *in vitro* культуру обробляли фторурацилом (1.0 мкМ; «Sigma-Aldrich», США) протягом 24 год, після чого проводили повну заміну поживного середовища. Через кожні чотири дні 400 мкл розчину в чашках Петрі з клітинами заміняли на відповідний об'єм свіжого розчину. Клітини гіпокампа брали в експеримент на 12–13-й день культивування.

Обробка клітин гіпокампа реагентами. Раніше було показано, що тривале культивування клітин ЦНС *in vitro* може використовуватись як модель для досліджень ХА [23]. В наших експериментах таке моделювання проводили, культивуючи клітини гіпокампа протягом 24 год у присутності 2.0 мкМ амілоїду β_{1-42} («Sigma-Aldrich», США). В окремій групі культур клітини перед додаванням амілоїду β_{1-42} попередньо інкубували протягом 30 хв у присутності 1.25 мкМ циклоспорину А («Sigma-Aldrich», США) – блокатора утворення МППП. Концентровані розчини амілоїду β_{1-42} та циклоспорину А готували на диметилсульфоксиді та зберігали при температурі –20 °С. Кінцева концентрація диметилсульфоксиду в середовищі не перевищувала 0.5 %.

Забарвлювання клітин гіпокампа. В експериментах використовували подвійне забарвлювання культивованих клітин гіпокампа за допомогою індикатора живих клітин Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США) та індикатора загиблих клітин пропідіуму йодиду – ПЙ («Sigma-Aldrich», США). Оброблені амілоїдом і контрольні нейрони перенесли на 10 хв у розчин ПЙ (кінцева концентрація 2.0 мкг/мл). Потім клітини фіксували, занурюючи на 20 хв у 4 %-вий розчин параформальдегіду, після чого вмішували на 20 хв у розчин Hoechst із кінцевою концентрацією 1.0 мкг/мл. Після кожного етапу забарвлювання клітини двічі промивали в 2.0 мл фосфатного буфера (0.1 М). Усі маніпуляції здійснювали при кімнатній температурі. Після забарвлювання покривні скельця з клітинами фіксували на предметних скельцях з використанням розчину Aqua-Poly/Mount («Polysciences Inc.», США). Зафіксовані препарати вивчали з використанням конфокальної мікроскопії.

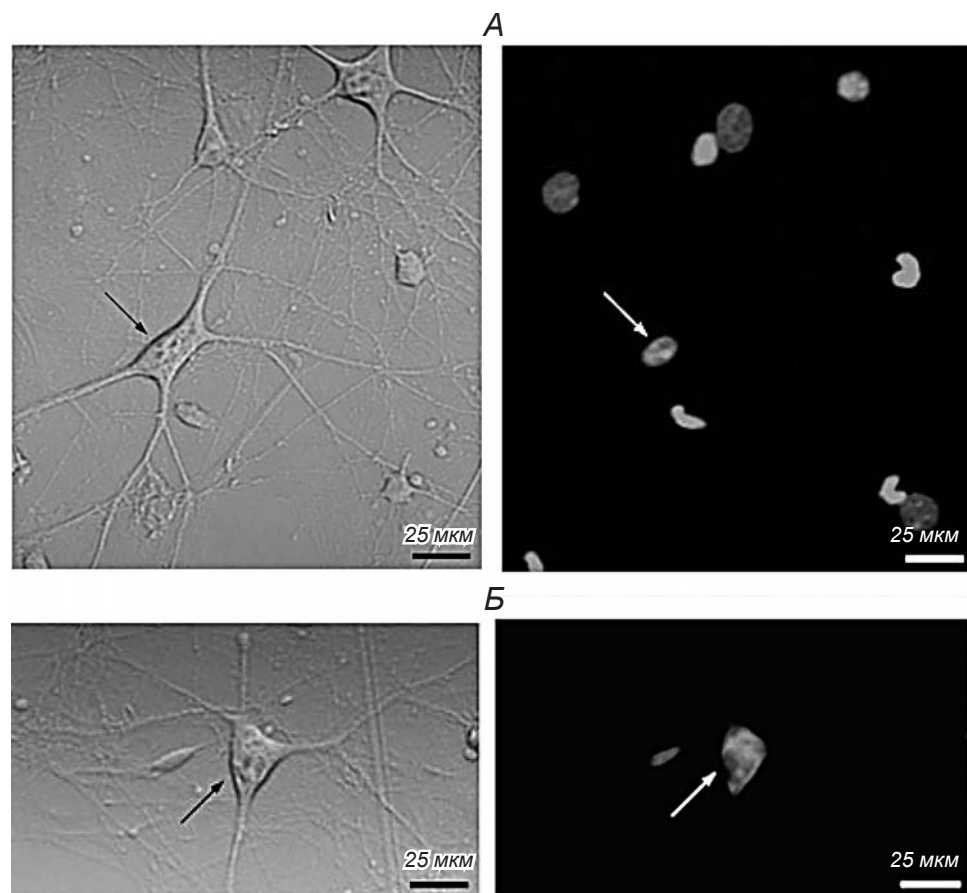
Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія. Для отримання флуоресцентних зображень та підрахунку кількості живих та некротизованих нейронів у дослідженнях використовували конфо-

кальний лазерний скануючий мікроскоп FV1000-VX61WI та програмне забезпечення «Olympus» (Японія). Довжини хвиль збуджуючого лазерного випромінювання становили 352 (при використанні Hoechst 33258) та 543 (при використанні ПЙ) нм. Підрахунок нейронів проводили в п'яти просторово віддалених ділянках кожного препарату. Використання фазового контрасту дозволяло відрізнити нейрони від гліальних клітин.

Статистичний аналіз. Під час статистичної обробки отриманих числових результатів визначали середні арифметичні значення, середньоквадратичні відхилення, похибки середнього та коефіцієнт варіації. Міжгрупове порівняння даних виконували з використанням *t*-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наші дослідження були присвячені встановленню можливої ролі формування МППП у некротичній загибелі культивованих клітин гіпокампа при моделюванні ХА. З даною метою, як вказувалося вище, за добу до експериментального обстеження куль-



Р и с. 1. Мікрофотографії культивованих пірамідних нейронів гіпокампа (типіві зображення).

На *A* – флуоресценція Hoechst 33258 у живому нейроні (вказано стрілкою), на *B* – флуоресценція пропідіуму йодиду в некротизованому нейроні (вказано стрілкою). Зліва – фазовий контраст, справа – конфокальна мікроскопія.

тивовані клітини або інкубували в присутності амілоїду β_{1-42} , або послідовно інкубували з блокаторм відкриття МППП циклоспорином А [24, 25], а потім з амілоїдом. Після цього використовували подвійне забарвлення клітин двома барвниками, що зв'язуються з ДНК (Hoechst та ПЙ). Hoechst 33258 є синім флуоресцентним барвником із максимумами збудження та випромінювання 352/461 нм. При зв'язуванні з ДНК живих клітин Hoechst утворює на зображенні сині локуси (рис. 1, А). Червоний флуоресцентний барвник ПЙ (максимуми збудження та випромінювання $\sim 543/617$ нм) проникає тільки в мертві клітини (Б). Комбіноване забарвлення вказаними агентами дає змогу відрізнити живі та мертві (некротизовані) нейрони за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії.

У контрольних умовах частка живих нейронів становила в середньому $72 \pm 6\%$, а некротизованих (забарвлених ПЙ) – $28 \pm 6\%$ щодо загальної кількості обстежених клітин ($n = 3211$). Нормована кількість нежиттєздатних клітин розглядалася нами як індекс клітинної загибелі (ІЗ). Наявність досить значної кількості загиблих одиниць у контрольних умовах пояснюється неминучим пошкодженням деякої частини клітин у процесі приготування культури, зокрема при виготовленні клітинної суспензії (рис. 2, А). Після ізольованої інкубації культивованих клітин у присутності амілоїду β_{1-42} частка живих клітин дорівнювала в середньому $41 \pm 4\%$, а забарвлених ПЙ – $59 \pm 4\%$ щодо загальної кількості спостережуваних одиниць ($n = 2815$). Отже, ІЗ клітин гіпокампа в культурах, оброблених амілоїдом, перевищував відповідний індекс у контрольних культурах більш ніж удвічі ($P < 0.001$) (Б). Після комбінованої інкубації клітин гіпокампа із циклоспорином А та амілоїдом частка живих нейронів складала $58 \pm 6\%$, а некротизованих одиниць – $42 \pm 6\%$ щодо загальної кількості клітин ($n = 2974$). Іншими словами, попередня обробка культур клітин гіпокампа блокатормом відкриття МППП різко зменшувала інтенсивність загибелі вказаних клітин в результаті дії амілоїду β_{1-42} (В). Інкремент ІЗ порівняно з контрольними значеннями даного індексу становив у цьому разі лише 50, а не 111%, як в умовах ізольованої дії амілоїду (при порівнянні груп 2 та 3 різниця вірогідно, $P < 0.05$). Отже, попередня обробка культур циклоспорином А не призводила до повного блокування дії амілоїду, котрий індукує дегенерацію, але істотно зменшувала такі негативні наслідки.

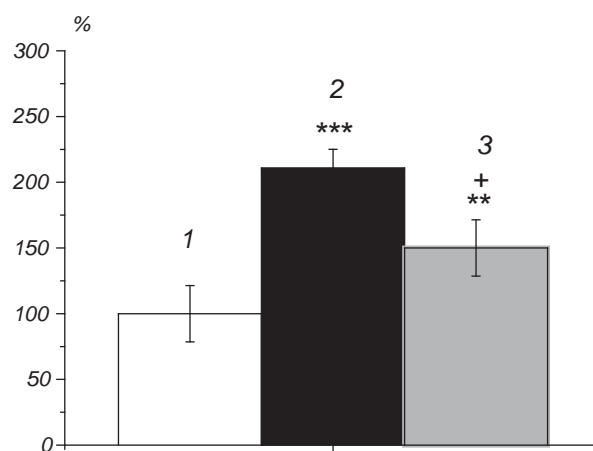


Рис. 2. Нормовані кількості некротизованих нейронів у культурі клітин гіпокампа (значення індексу загибелі – ІЗ) в умовах контролю (1), після ізольованої інкубації з амілоїдом β_{1-42} (2) та після послідовної інкубації з циклоспорином А та амілоїдом β_{1-42} (3).

За 100% прийнято середнє значення ІЗ у контролі. Двома та трьома зірочками позначена вірогідність різниці ІЗ порівняно з контролем ($P < 0.01$ та $P < 0.001$ відповідно), хрестиком – вірогідність різниці при порівнянні ІЗ у групах 2 та 3 ($P < 0.05$).

Потрібно підкреслити, що на сьогодні кількість досліджень, подібних нашому, є досить обмеженою [26–29]. Загалом відомо, що на ранній стадії розвитку патологічних феноменів, супроводжуваних ХА, порушення процесів окиснення та інші негативні чинники можуть призводити до інтенсивного незворотного відкриття МППП, а це, в свою чергу, викликає потужний клітинний стрес [30]. Надмірна генерація активних форм кисню під впливом β -амілоїду призводить до посилення перекисного окиснення ліпідів та утворення альдегід-4-гідроксинонєналу. Останній є потужним активатором подальшого відкриття МППП завдяки прямій взаємодії цього агента зі структурним компонентом даних пор – аденіннуклеотидтранслоказою [31]. Результатом є інтенсифікація апоптозу та некротичної загибелі клітин. За деякими даними, β -амілоїд здатний і безпосередньо впливати на проникність мембран мітохондрій [32]. Слід згадати, що результати експериментів, проведених на астроцитарно-нейронній культурі, показали наступне. Амілоїд- β діє переважно на астроцити, внаслідок чого саме в цих клітинах особливо інтенсивно генеруються активні форми кисню та відбувається деполаризація мітохондрій. Наступна загибель нейронів є значною мірою лише непрямим наслідком

згаданих процесів [26]. Крім того, порушення регуляції рівня кальцію та відповідь ендоплазматичного ретикулума на стрес призводять до активації мітохондріальних ферментів і сенсibilізації мітохондріальних мембран щодо розвитку неспецифічної проникності [33]. Це було виявлено в експериментах на культурах клітин трансгенних мишей. Результати однієї з дослідницьких груп вказували на розвиток потужного некрозу в культурі клітин гіпокампа щурів під впливом амілоїду β_{25-35} порівняно з контролем [26]. Спостережуваний ефект було інтерпретовано як результат деполяризації мітохондріальних мембран та безпосередньо пов'язаного з цим пошкодження ферменту полі(АДФ-рибозо)-полімерази. Остання здатна в нормальних умовах відновлювати молекулу ДНК, а отже запобігати загибелі клітини. Наведені результати певною мірою узгоджуються з нашими спостереженнями. Втім, істотні методичні відмінності цитованої роботи (зокрема, інша довжина молекул β -амілоїду) роблять неможливим повноцінне порівняння наведених даних із результатами наших експериментів.

Таким чином, проведені нами дослідження дозволяють зробити висновок, що відкривання МППП є досить істотним фактором, безпосередньо задіяним у некротичну загибель нейронів гіпокампа під впливом амілоїду β_{1-42} . Даний процес у мітохондріях, очевидно, є одним із ключових нейротоксичних механізмів дії вказаного протеїну під час розвитку та перебігу ХА.

Всі стадії досліджень відповідали положенням Європейської Конвенції про захист тварин, які використовуються в наукових цілях (86/609/ЄС, 1986, Страсбург), і нормативам Комітетів із біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України.

Автори даної публікації – Є. В. Кравенська, В. В. Ганжа, О. М. Яворська та О. О. Лук'янець – вказують на відсутність будь-яких конфліктів у комерційних або фінансових відносинах, стосунках з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також у взаємовідносинах співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. V. T. Marchesi, "Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy," *FASEB J.*, **25**, 5-13 (2011).
2. Y. Mu and F. H. Gage, "Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease," *Mol. Neurodegener.*, **6**, 85 (2011).
3. E. V. Kravenska, V. V. Chopovska, E. N. Yavorskaya, et al., "The role of mitochondria in the development of Alzheimer's disease," *Tavrishesky Med.-Biol. Bull.*, **15**, 147-149 (2012).
4. K. Ubhi and E. Masliah, "Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives," *J. Alzheimer's Dis.*, **33**, Suppl. 1, S185-S194 (2013).
5. J. Hardy, "A hundred years of Alzheimer's disease research," *Neuron*, **52**, 3-13 (2006).
6. E. A. Schon and E. Area-Gomez, "Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease," *Mol. Cell Neurosci.*, **55**, 26-36 (2013).
7. S. Kar, S. P. Slowikowski, D. Westaway, et al., "Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease," *J. Psychiat. Neurosci.*, **29**, 427-441 (2004).
8. J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, et al., "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor," *Nature*, **325**, 733-736 (1987).
9. C. G. Glabe and R. Kaye, "Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis," *Neurology*, **66**, S74-S78 (2006).
10. J. A. Hardy and G. A. Higgins, "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis," *Science*, **256**, 184-185 (1992).
11. J. Hardy and D. J. Selkoe, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics," *Science*, **297**, 353-356 (2002).
12. G. Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death," *Physiol. Rev.*, **87**, 99-163 (2007).
13. A. Rasola and P. Bernardi, "The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis," *Apoptosis*, **12**, 815-833 (2007).
14. E. V. Kravenska, N. V. Nalyvaiko, N. V. Fedirko, et al., "Kinetic analysis of the calcium- and cadmium-induced development of nonspecific permeability of the mitochondrial inner membrane," *Neurophysiology*, **40**, 252-260 (2008).
15. Y. Kravenskaya and N. V. Fedirko, "Mechanisms underlying interaction of zinc, lead, and cobalt with nonspecific permeability pores in the mitochondrial membranes," *Neurophysiology*, **43**, 163-172 (2011).
16. T. E. Gunter, D. I. Yule, K. K. Gunter, et al., "Calcium and mitochondria," *FEBS Lett.*, **567**, 96-102 (2004).
17. E. Murphy, "Solving mitochondrial mysteries," *J. Mol. Cell Cardiol.*, **78**, 1-2 (2014).
18. P. Picone, D. Nuzzo, L. Caruana, et al., "Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy," *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2014**, 1-11 (2014).
19. V. M. Shkryl, L. M. Nikolaenko, P. G. Kostyuk, et al., "High-threshold calcium channel activity in rat hippocampal neurones during hypoxia," *Brain Res.*, **833**, 319-328 (1999).
20. V. M. Shkryl, P. G. Kostyuk, and E. A. Lukyanetz, "Dual action of cytosolic calcium on calcium channel activity during hypoxia in hippocampal neurones," *NeuroReport*, **12**, 4035-4039 (2001).
21. E. A. Lukyanetz, V. M. Shkryl, O. V. Kravchuk, et al., "Action of hypoxia on different types of calcium channels in hippocampal neurones," *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1618**, 33-38 (2003).
22. E. A. Lukyanetz, V. M. Shkryl, O. V. Kravchuk, et al., "Effect

- of hypoxia on calcium channels depends on extracellular calcium in *CA1* hippocampal neurons," *Brain Res.*, **980**, 128-134 (2003).
23. Y. Zhou and W. L. Klein, "Abeta oligomers-induced toxicity is attenuated in cells cultured with NbActiv4 medium," *Neurotox. Res.*, **22**, 335-344 (2012).
 24. K. M. Broekemeier, M. E. Dempsey, and D. R. Pfeiffer, "Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria," *J. Biol. Chem.*, **264**, 7826-7830 (1989).
 25. I. Szabo and M. Zoratti, "The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A," *J. Biol. Chem.*, **266**, 3376-3379 (1991).
 26. R. Abeti, A. Y. Abramov, and M. R. Duchen, "Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death," *Brain*, **134**, 1658-1672 (2011).
 27. S. J. Bertrand, M. V. Aksenova, M. Y. Aksenov, et al., "Endogenous amyloidogenesis in long-term rat hippocampal cell cultures," *BMC Neurosci.*, **12**, 38 (2011).
 28. Q. Liu, X. Xie, R. J. Lukas, et al., "A novel nicotinic mechanism underlies beta-amyloid-induced neuronal hyperexcitation," *J. Neurosci.*, **33**, 7253-7263 (2013).
 29. B. Connor, E. J. Beilharz, C. Williams, et al., "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus," *Brain Res. – Mol. Brain Res.*, **49**, 283-290 (1997).
 30. J. K. Parks, T. S. Smith, P. A. Trimmer, et al., "Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress *in vivo* through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition *in vitro*," *J. Neurochem.*, **76**, 1050-1056 (2001).
 31. H. L. Vieira, A. S. Belzacq, D. Haouzi, et al., "The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal," *Oncogene*, **20**, 4305-4316 (2001).
 32. S. A. Oakes, S. S. Lin, and M. C. Bassik, "The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins," *Current Mol. Med.*, **6**, 99-109 (2006).
 33. R. Rizzuto, M. R. Duchen, and T. Pozzan, "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison," *Sci. STKE*, **2004**, re1 (2004).