

*На правах рукописи*

ГОЛЕВА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА

**Дисфункция и фрагментация митохондрий, митофагия и гибель  
клеток дрожжей**

1.5.4. Биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена в лаборатории биоэнергетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Научный руководитель:** **Звягильская Рената Александровна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФИЦ Биотехнологии РАН.

**Официальные оппоненты:** **Миронова Галина Дмитриевна**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующая лабораторией митохондриального транспорта ФГБУН институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

**Кулаковская Татьяна Валентиновна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН.

**Ведущая организация:** ФГБУН институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Защита **состоится** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. \_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук, на соискание учёной степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва Ленинский проспект, д. 33 строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33 строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.233.01  
Кандидат биологических наук А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень разработанности

Митохондрии, помимо общеизвестной энергетической роли, выполняют и другие ключевые функции в клетке. Они прочно интегрированы в общий клеточный обмен, играют основную роль в таких глобальных процессах, как проведение клеточных сигналов, пролиферация, воспаление, выбор клетки между жизнью и смертью [Рогов и др., 2019]. В то же время они являются основными источниками активных форм кислорода (АФК) в клетке, дисфункция митохондрий приводит к развитию окислительного стресса (ОС), играющего решающую роль в возникновении многочисленных возрастных заболеваний, включая артрит, диабет, деменцию, рак, атеросклероз, сосудистые заболевания, ожирение, остеопороз и др. [Rogov et al. 2019; Barbouti et al. 2020].

ОС может приводить к необратимой фрагментации митохондрий и стать отправной точкой для запуска запрограммированной клеточной гибели. Митохондрии являются динамичными органеллами, постоянно подвергающимися слиянию в общую сеть и делению, при этом их число и качество должно отвечать энергетическим потребностям клетки. В клетке выработан сложный молекулярный механизм, отвечающий за удаление поврежденных или избыточных митохондрий – митофагия. В последнее время в литературе все чаще указывают на дисфункцию и фрагментацию митохондрий в качестве первичных маркеров нейродегенеративных заболеваний, в том числе связанных с отложением агрегатов белков [Zhang et al., 2017; Zhang et al. 2019].

Дрожжи и высшие эукариоты, несмотря на резкие различия в структурной организации клеток, имеют консервативные внутриклеточные молекулярные механизмы, управляющие регуляцией сигнальных путей, фолдинг белков, контроля качества митохондрий, секреторных путей и даже клеточной смерти и выживания. Более того, дрожжи, простейшие эукариотические организмы, с их быстрым ростом на простых средах определенного состава, быстрым ответом на факторы стресса, относительной простотой генетических манипуляций и наличием высокопроизводительных технологий скрининга [Sampaio-Marques and Burhans, 2019; Cogonas-Serna and Valenti, 2020], становятся все более популярной, а иногда и предпочтительной моделью для понимания разных аспектов клеточной биологии и патологий человека.

В настоящее время все больше исследований посвящено ОС и митохондриальной дисфункции. Патологии, связанные с митохондриальной дисфункцией, можно разделить на две большие группы: первая, вызываемая

мутациями и передающимися наследственным путем, и вторая, связанная с дисфункцией митохондрий, вызываемой старением организма, воспалением и аутоиммунными процессами, при которых в клетках развивается ОС. Предлагаются различные подходы в лечении и профилактике социально значимых заболеваний, в том числе с использованием антиоксидантов, а в ряде случаев и прооксидантов - для лечения рака. Остается нерешенной проблема доставки лекарственных препаратов к их мишеням в организме и необходимость применения их в высоких концентрациях, что может приводить к побочным действиям. Наиболее перспективными веществами в решении данной проблемы могут выступать митохондриально-направленные липофильные катионы, обладающие адресной доставкой в клетки и митохондрии в соответствии с мембранным потенциалом, генерируемым на цитоплазматической и митохондриальной мембранах. Прежде чем переходить к их клиническим и даже доклиническим исследованиям, необходимо оценить их влияние на биоэнергетику клетки, показать эффективность и безопасность.

Таким образом, **целью работы** явилось изучение влияния новых митохондриально-направленных антиоксидантов и прооксидантов на функциональные параметры изолированных митохондрий печени крысы, а также изучить взаимосвязь между ОС, дисфункцией и фрагментацией митохондрий, митофагией и гибелью клеток дрожжей.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить свойства новых синтезированных митохондриально-направленных антиоксиданта SkQThy и прооксиданта SkQN, используя в качестве моделей выделенные прочно-сопряженные митохондрии печени крысы и клетки дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Dipodascus magnusii*.
- 2) Изучить распространение индуцированного прооксидантом ОС в клетках дрожжей *D. magnusii*.
- 3) Изучить влияние ОС на фрагментацию митохондрий и митофагию в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используя мутанты с делециями генов, кодирующих белки митофагии.

**Научная новизна.** Исследовано действие новых митохондриально-направленных антиоксиданта SkQThy и прооксиданта SkQN на выделенные митохондрии печени крысы и клетки дрожжей. Показано, что SkQThy является наиболее эффективным антиоксидантом из семейства SkQ, а SkQN как прооксидант более эффективен, чем другой митохондриально-направленный прооксидант MitoK3. На клетках *S. cerevisiae* показана необходимость митофагии в устойчивости к ОС. Впервые на дрожжевых клетках прослежена динамика развития ОС, индуцированного *tert*-бутилпероксидом. Он возникал вначале только в

митохондриях, а затем выявлялся в объеме всей клетки (генерализованный ОС). Показано, что фрагментация митохондрий запускалась митохондриальными АФК и всегда предшествовала генерализованному ОС.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные указывают на участие фрагментации митохондрий и митофагии в качестве защитных механизмов при действии ОС на клетки. Тот факт, что фрагментация митохондрий предшествует генерализованному ОС и, по литературным данным, является первичным маркером ряда нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, означает, что предотвращение фрагментации митохондрий может быть новой стратегией в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями. Показанное нами исходное развитие ОС в митохондриях указывает на важность и перспективность использования митохондриально-направленных препаратов в лечении заболеваний, связанных с окислительным стрессом. SkQThy, по нашим данным, является наиболее эффективным и перспективным из всех до сих пор исследованных митохондриально-направленных антиоксидантов.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту.**

1) SkQThy оказался наиболее эффективным антиоксидантом из всех ранее изученных митохондриально-направленных антиоксидантов, более того не имеющим прооксидантной активности при увеличении концентраций. Он не только предотвращал фрагментацию митохондрий, вызванную ОС, но и обращал её. SkQThy может быть рекомендован в качестве потенциального терапевтического средства при борьбе с патологиями, связанными с окислительным стрессом.

2) SkQN оказывал прооксидантное действие на митохондрии печени крысы и дрожжевые клетки. SkQN оказался более эффективным прооксидантом по сравнению с MitoK3, но обладал более мягким побочным действием на митохондрии дрожжей. SkQN может быть рекомендован в качестве потенциального терапевтического средства при лечении раковых заболеваний.

3) Впервые продемонстрировано внутриклеточное распространение ОС в клетках дрожжей. Доказано, что фрагментация митохондрий предшествовала генерализованному окислительному стрессу в дрожжах.

4) Установлено, что нарушения митофагии влияют на устойчивость дрожжей *S. cerevisiae* к ОС, а фрагментация митохондрий не является фактором, необходимым для запуска митофагии у дрожжей.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: XI Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» – 2016, Москва; International Conference

«Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases» – 2016, Долгопрудный; XXIX - XXXII Зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2017, 2018, 2019, 2020 Москва; Международный молодежный научный форум Ломоносов – 2018, 2019, Москва. 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» – 2020, Moscow; 3-й Российский микробиологический конгресс – 2021, Псков.

**По материалам диссертационной работы опубликовано** 6 статей в зарубежных и отечественных журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ, и 12 тезисов в материалах конференций.

**Личный вклад автора.** Автор проводил сбор и анализ литературных данных по теме исследования, принимал непосредственное участие в получении всех результатов и их интерпретации.

**Методы исследования.** В работе использовали широкий спектр биохимических методов, ряд методов микробиологии и клеточной биологии (культивирование микроорганизмов, проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия).

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 102 страницах печатного текста, содержит 43 рисунка. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения и выводов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрено современное состояние исследований в области ОС клетки и митохондрий как основного источника АФК. Подробно рассмотрен процесс фрагментации и слияния митохондрий, подчеркнуты различия в процесс митофагии у животных клеток и дрожжей. Представлены последние работы в области исследования митохондриально-направленных антиоксидантов.

### Материалы и методы

**Организмы и условия выращивания дрожжевых клеток.** В работе использовали дрожжи аэробного типа обмена *Y. lipolytica* и *D. magnusii*. Клетки выращивали в 750-мл колбах Эрленмейера при 28°C на роторной качалке (220 об/мин) на полусинтетической среде, содержащей в качестве источника углерода и энергии 1,3% сукцинат (*Y. lipolytica*) или 1%-

ый глицерин (*D. magnusii.*), и собирали в ранней экспоненциальной фазе роста ( $OP_{540\text{ нм}} = 1$ ).

Дрожжи *S. cerevisiae* W303 и их мутанты, выращивали на полусинтетических селективных средах, содержащих в качестве источника углерода 0,9%-ую галактозу с добавлением 0,1%-ого глицерина.

**Прочно-сопряженные митохондрии печени крысы** выделяли по методу, разработанному в лаборатории [Rogov et al., 2016].

**Скорость поглощения кислорода** определяли полярографическим методом в ячейке с закрытым кислородным электродом типа Кларка. Основная среда инкубации содержала 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Трис-фосфатный буфер, рН 7,2, 0,5 мМ ЭГТА, 20 мМ Трис-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка).

**Потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране**, регистрировали на спектрофотометре Beckman Coulter DU-650 (США), используя двухвалковой режим (511–533 нм) с 20 мкМ сафранином О в качестве потенциал-зависимого зонда.

**Набухание митохондрий** определяли на спектрофотометре Varian Cary 300 Bio (США) по уменьшению оптической плотности митохондриальной суспензии при 540 нм. Основные среды инкубации были дополнены 40 мМ КСl.

**Об открытии неспецифической  $Ca^{2+}/P_n$ -зависимой поры** в митохондриях печени крысы судили, как принято в литературе [Bernardi et al., 2006], по совокупности двух параметров – уменьшению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий, выделенных и инкубированных в средах без ЭГТА.

**Синтез АТФ** митохондриями регистрировали с помощью метода (с феноловым красным), основанного на регистрации небольшого сдвига рН при превращении ADP в АТФ [Zharova and Vinogradov, 2006], слегка модифицированного. Основная среда инкубации была дополнена 6 мкМ Ар5А (ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями (0,2 мг белка/мл).

**Образование пероксида водорода** митохондриями определяли путем измерения окисления Amplex Red, сопряженного с ферментативным восстановлением пероксида водорода пероксидазой хрена. Основная среда инкубации была дополнена 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы), 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 м.е./мл) и митохондриями (0,25 мг белка/мл). Флуоресценцию резорурфина, продукта окисления Amplex Red, измеряли при комнатной температуре с помощью спектрофлуорофотометра Shimadzu RF 5301 PC (Япония) при 563/587 нм (длины волн возбуждения и испускания, соответственно).

**Жизнеспособность дрожжевых клеток** определяли методом проточной цитометрии после их окрашивания 1,5 мкМ Propidium Iodide (PI) или SYTOX Green Dead Cell Stain с помощью проточного цитометра Becton Dickinson FACSCalibur (США), снабженного лазером с длиной волны испускания 488 нм и детекторами, регистрирующим флуоресценцию в красной и зеленой области спектра.

**Окислительный стресс в клетках дрожжей** индуцировали добавлением прооксиданта *трет*-бутилгидропероксида (*t*-ВНР) и определяли по изменению интенсивности флуоресценции маркеров активных форм кислорода H<sub>2</sub>DCF-DA, MitoSOX Red, Dihydroethidium. Флуоресценцию измеряли с помощью проточного цитометра Becton Dickinson FACSCalibur (США).

**Для визуализации митохондрий в клетках *D. magnusii***, в контроле и после воздействия различных веществ, клетки окрашивали флуоресцентным зондом MitoTracker Green FM. Фрагментацию митохондрий в клетках оценивали, используя микроскоп Zeiss Axioskop 40, 100× с иммерсионным объективом, (Germany).

**Для time-lapse микроскопии** клетки *D. magnusii*, собранные в экспоненциальной фазе роста, окрашивали 15 мкМ H<sub>2</sub>DCF-DA и 1 мкМ MitoSOX Red в течение 30 мин. Окрашенные клетки осаждали в планшетах для микроскопии, покрытых конканавалином А, и подвергали воздействию 750 мкМ *t*-ВНР. Визуализацию клеток проводили с интервалом в 3 мин с использованием инвертированного моторизованного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E с системой автофокусировки PerfectFocus (Япония).

**Для выявления взаимосвязи митофагии и ОС** клетки дрожжей *S. cerevisiae* выращивали на несбраживаемых субстратах (галактоза + глицерин), что предполагает обязательное участие митохондрий в энергоснабжении клеток. Клетки выращивали до ранней экспоненциальной фазы роста (ОП=1) и нагружали 200 нМ MitoTracker Green FM в течение 30 мин. О протекании процесса митофагии судили по уменьшению объема митохондрий. ОС индуцировали добавлением прооксиданта *t*-ВНР. Для всех вариантов были получены 3D модели митохондриальных структур в условиях нормоксии и ОС, которые анализировали под микроскопом EVOS M7000 Imaging System. Съемку осуществляли с помощью системы визуализации Thermo Fisher Evos M7000 (USA) с соответствующим набором флуоресцентных кубов и моторизованным столиком. Деконволюцию проводили по алгоритму Richardson-Lucy.

**Статистический анализ.** Все эксперименты проводились не менее трех раз со сходными результатами. В цитометрических исследованиях анализировали 15000 клеток; при исследовании распространения окислительного стресса в клетках дрожжей в каждом опыте анализировали не

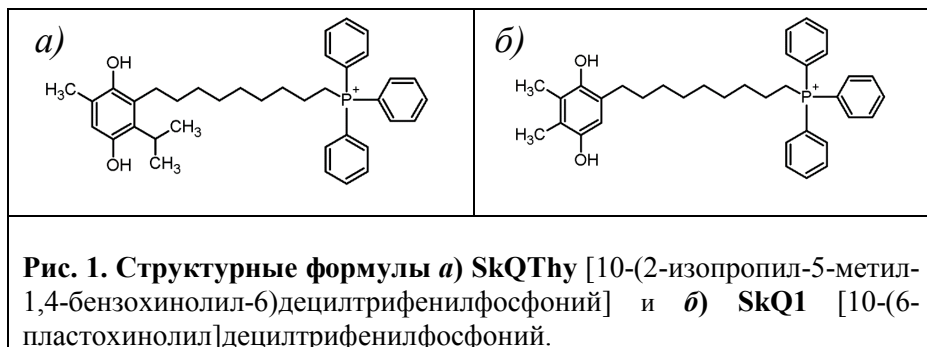


менее 100 клеток. Данные представлены в виде  $X_{\text{mean}} \pm SD$ ;  $n = 3$ . Статистический анализ проводился с помощью одностороннего теста ANOVA.

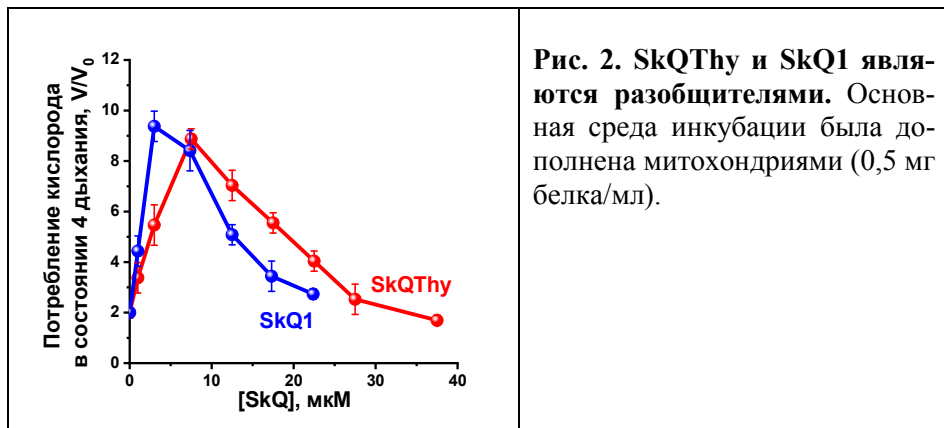
## Основные результаты исследования и их обсуждение

### Влияние SkQThy на выделенные митохондрии печени крысы и клетки дрожжей

Как указывалось выше, ОС играет решающую роль в возникновении многочисленных возрастных и нейродегенеративных заболеваний. Наиболее перспективными в ослаблении ОС являются митохондриально-направленные липофильные антиоксиданты-катионы, имеющие существенные преимущества по сравнению с классическими водорастворимыми антиоксидантами, поскольку они транспортируются в клетки и митохондрии в соответствии с мембранным потенциалом, генерируемым на цитоплазматической и митохондриальной мембранах, благодаря чему их концентрация в митохондриях может увеличиваться на несколько порядков по сравнению с исходной. Более того, липофильные антиоксиданты имеют высокий коэффициент распределения в мембране, в результате чего их концентрация в мембране увеличивается еще на четыре порядка. Наконец, являясь компонентами дыхательной цепи или их аналогами, они восстанавливаются (регенерируются) дыхательной цепью, что обеспечивает их многократное функционирование. Это позволяет использовать их в низких, нетоксичных концентрациях. В рамках проекта, руководимого В.П. Скулачевым, был синтезирован митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy (Рис. 1, *a*), производное тимохинона, и мы сравнивали его действие с действием ранее синтезированным антиоксидантом SkQ1 (Рис. 1, *b*).



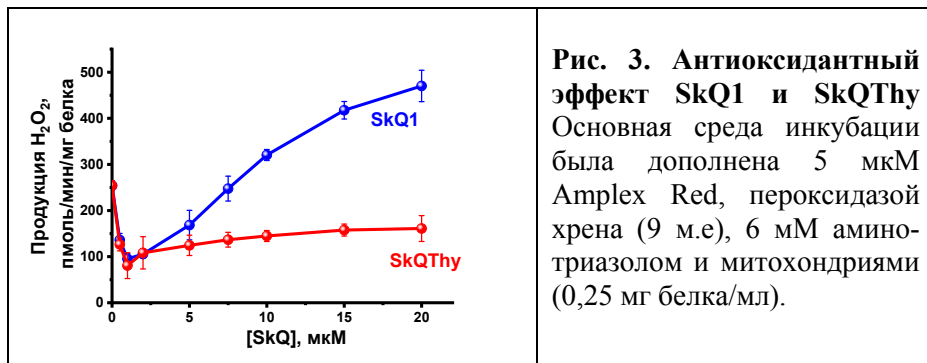
В низких концентрациях SkQThy, так же, как и SkQ1, стимулировал дыхание в состоянии 4, что формально свидетельствовало о его разобщающем эффекте (Рис. 2). При этом так называемое «окно» между восходящей и нисходящей частями кривой для SkQThy было шире, чем для SkQ1 свойство, важное для препаратов с потенциальным терапевтическим использованием.



**Рис. 2. SkQThy и SkQ1 являются разобщителями.** Основная среда инкубации была дополнена митохондриями (0,5 мг белка/мл).

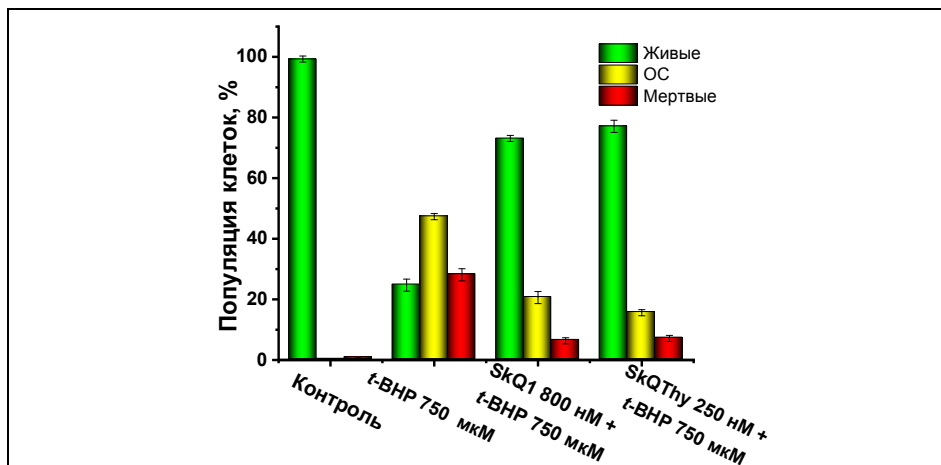
SkQ1 и SkQThy восстанавливались дыхательной цепью, снижали мембранный потенциал, промотировали открытие циклоспорин-чувствительной  $Ca^{2+}$ -Pi – зависимой неспецифической митохондриальной поры, ингибировали синтез АТФ, в точном соответствии с их деполяризующим эффектом, связанным с совместным транспортом с эндогенными жирными кислотами (не показано).

SkQ1 и SkQThy проявляли антиоксидантное действие в низких концентрациях и снижали как естественную продукцию пероксида водорода митохондриями, так и в присутствии прооксиданта *t*-ВНР. Важно, что при увеличении концентраций SkQThy, в отличие от SkQ1, не проявлял прооксидантного действия (Рис.3), что необходимо для потенциального терапевтического препарата для предотвращения ОС.



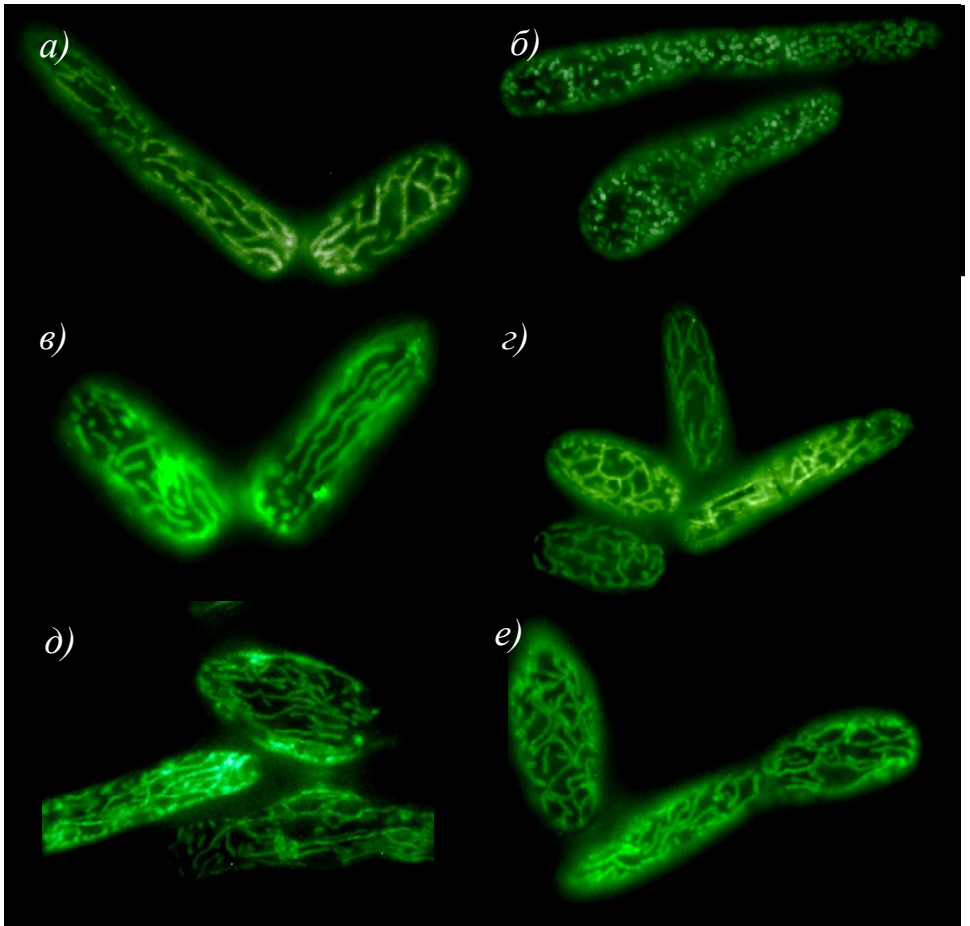
**Рис. 3. Антиоксидантный эффект SkQ1 и SkQThy**  
Основная среда инкубации была дополнена 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 м.е), 6 мМ аминокотриазолом и митохондриями (0,25 мг белка/мл).

SkQThy был гораздо более эффективным антиоксидантом, чем SkQ1 и на клетках, снижая ОС, индуцированный *t*-ВНР в клетках дрожжей *Y. lipolytica*, в присутствии гораздо более низких концентраций (Рис.4).



**Рис. 4. SkQ1 и SkQThy снижали уровень окислительного стресса и клеточной смерти в дрожжах *Y. lipolytica*.** Клетки предварительно инкубировали с 800 нМ SkQ1 или 250 нМ SkQThy в течение 1 ч., затем промывали свежей порцией среды инкубации, и инкубировали с 750 мкМ *t*-ВНР в течение 2 ч, после чего промыли в 50 мМ PBS, pH 5,5 и нагрузили красителями H2DCF-DA и Propidium Iodide в течение 30 мин. Популяции клеток анализировали методом проточной цитометрии.

В норме клетки дрожжей *D. magnusii* имеют разветвленный митохондриальный ретикулум (Рис. 5, а) Под действием прооксиданта *t*-ВНР митохондриальный ретикулум дрожжей *D. magnusii* фрагментируется (Рис.5, б). Предварительная инкубация клеток в течение часа с антиоксидантами предотвращала фрагментацию митохондрий, SkQThy (Рис.5, в.) и в этом случае оказался более эффективным антиоксидантом, вызывая тот же эффект при более низких концентрациях (Рис.5, в). Более того, митохондриально-направленные антиоксиданты не только предотвращали, но и обращали фрагментацию митохондрий (Рис.5, д-е), способствовали восстановлению митохондриального ретикулума. При инкубации в свежей среде роста без антиоксидантов не происходило спонтанного восстановления митохондриального ретикулума.

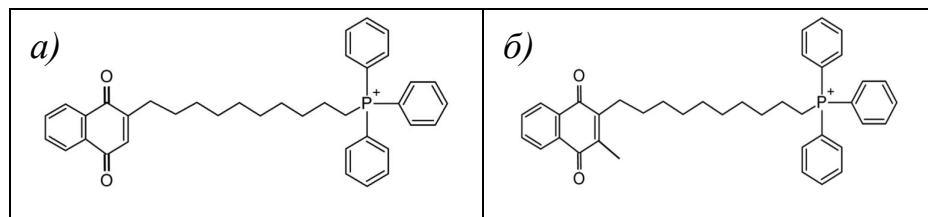


**Рис. 5. Митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ1 и SkQThy предотвращали (в, з) и обращали (д, е) фрагментацию митохондрий дрожжей *D. magnusii*.** Клетки предварительно инкубировали с 800 нМ SkQ1 или 250 нМ SkQThy в течение 1 ч., затем промывали свежей порцией среды инкубации, и инкубировали с 750 мкМ *t*-ВНР в течение 2 ч (в, з), в случае обращения фрагментации митохондрий сначала на клетки воздействовали прооксидантом, а затем в течение часа инкубировали с антиоксидантом (д, е) после чего промыли в 50 мМ PBS, pH 5,5 и нагурузили красителем 200 нМ MitoTracker Green.

Таким образом SkQThy оказался наиболее эффективным из всех ранее изученных митохондриально-направленных антиоксидантов, более того он не проявлял прооксидантной активности при увеличении его концентраций. SkQThy может быть рекомендован в качестве потенциального терапевтического средства при борьбе с патологиями, связанными с ОС.

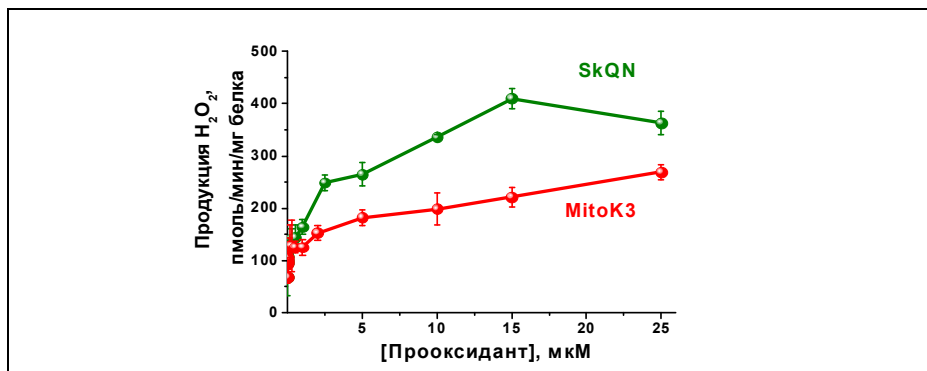
### Влияние прооксидантов SkQN и MitoK3 на выделенные митохондрии печени крысы и клетки дрожжей

Одним из современных направлений лечения раковых заболеваний является использование прооксидантов, вызывающих окислительный стресс и запускающих запрограммированную гибель раковых клеток по пути апоптоза. В рамках проекта, руководимого В.П. Скулачевым, был синтезирован новый митохондриально-направленный (транспортирующийся в митохондрии) SkQN, конъюгат производного нафтохинона и децилтрифенилфосфония с предполагаемым прооксидантным действием. Мы сравнили его действие с таковым известного ранее прооксиданта MitoK3 (Рис. 6).



**Рис. 6. Структурные формулы SkQN [10-(1,4-Диоксо-1,4-дигидронафталин-2-ил)децил] трифенилфосфоний (а) и MitoK3 (б) [10-(3-метил-1,4-Диокси-1,4-дигидронафталин-2-ил)децил] трифенилфосфоний**

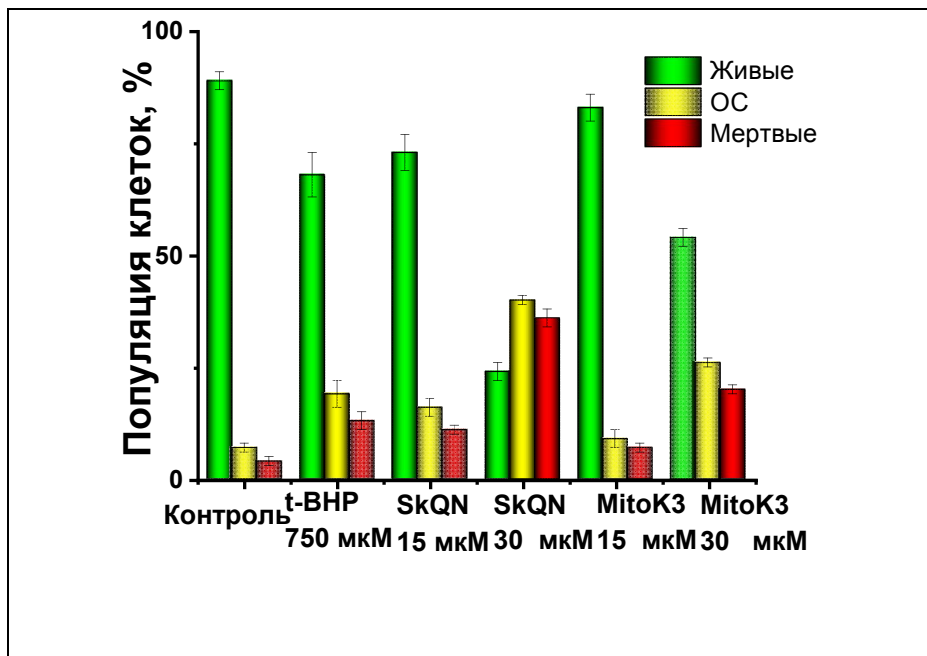
Было исследовано влияние SkQN и MitoK3 на функциональные параметры выделенных митохондрии печени крысы. SkQN и MitoK3 восстанавливались компонентами дыхательной цепи митохондрий печени крысы (не показано) и увеличивали генерацию митохондриями пероксида водорода, при этом SkQN был более эффективным прооксидантом при низких (до 15 мкМ) концентрациях (Рис.7).



**Рис. 7. Прооксидантное действие SkQN и MitoK3 на изолированные митохондрии печени крысы.** Основная среда инкубации была дополнена 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы), 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 м.е./мл) и митохондриями (0,25 мг белка/мл).

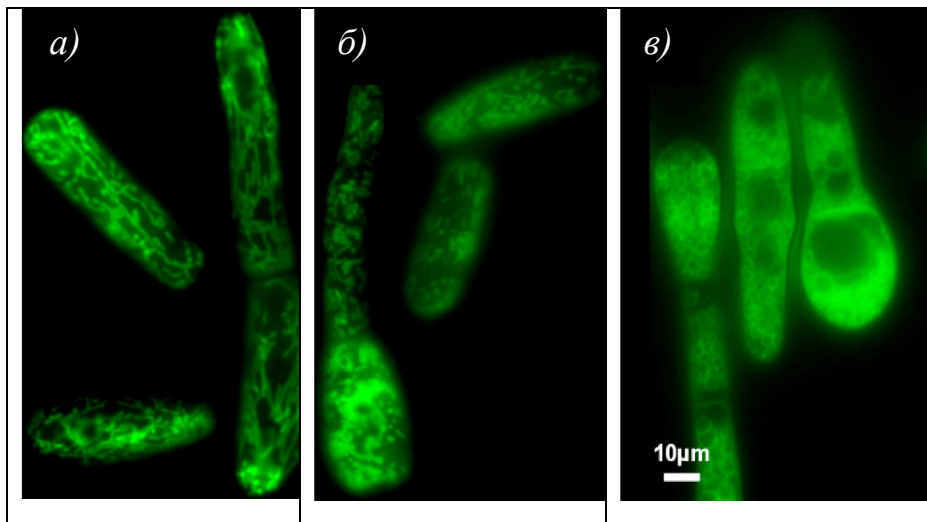
SkQN и MitoK3 в относительно низких концентрациях (до 10 и 15 мкМ соответственно) стимулировали дыхание в состоянии 4 (не показано), что является формальным признаком того, что они являются разобщителями, и снижали мембранный потенциал (не показано), однако в присутствии бычьего сывороточного альбумина, связывающего жирные кислоты, стимуляции дыхания и снижения мембранного потенциала не наблюдалось. SkQN и MitoK3 ингибировали скорость синтеза АТФ (не показано), ускоряли открытие неспецифической  $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_n$  зависимой циклопорин А-чувствительной митохондриальной поры (не показано), однако все перечисленные эффекты были обусловлены их взаимодействием с жирными кислотами. В более высоких концентрациях (50 мкМ) SkQN ингибировал дыхание изолированных митохондрий в состоянии 3 и в разобщенном состоянии (не показано).

Методом проточной цитометрии показано, что инкубация дрожжевых клеток с SkQN и MitoK3 вызывала окислительный стресс и гибель клеток (Рис. 8).



**Рис. 8. SkQN и MitoK3 вызывали окислительный стресс и гибель клеток дрожжей *D. magnusii*.** Клетки выращивали до ОП = 1 и в течение 2-х часов инкубировали с проксидантами, после чего отмывали от него и нагружали красителями Dihydroethidium и SYTOX Green Dead Cell Stain. Популяции клеток анализировали методом проточной цитометрии.

Мы проследили влияние SkQN и MitoK3 на морфологию митохондрий клеток дрожжей *D. magnusii*. Инкубация клеток в течение 2х часов с SkQN вызывала фрагментацию митохондрий. MitoK3 нарушал целостность митохондриальной сети и самих митохондрий (Рис. 9). Эффективность митохондриально-направленного прооксиданта SkQN в сравнении с классическим *t*-BHP была гораздо выше, он действовал в более низких концентрациях.



**Рис. 9. SkQN вызывал фрагментацию митохондрий, а MitoK3 разрушал митохондрий дрожжей *D. magnusii*: контроль (а), инкубация клеток в течение 2х часов с 15 мкМ SkQN (б) и 15 мкМ MitoK3 (в).**

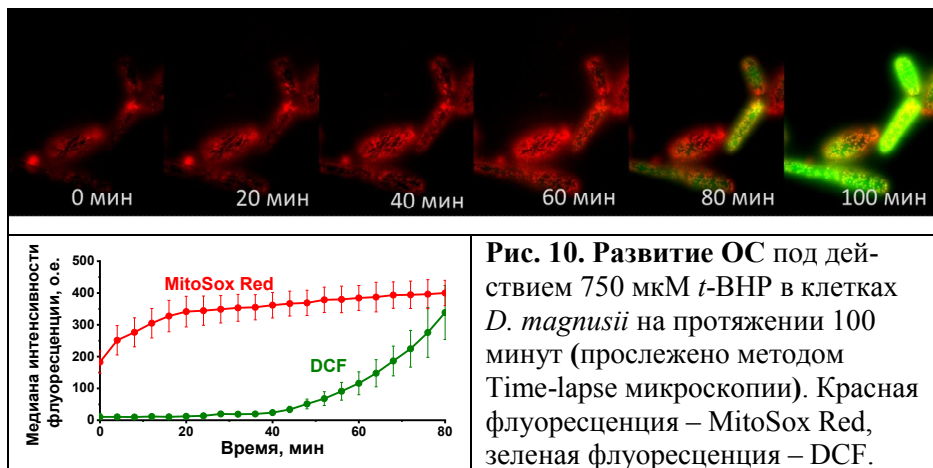
### **Развитие окислительного стресса в клетках дрожжей *D. magnusii* и его взаимосвязь с фрагментацией митохондрий**

В настоящее время преобладает точка зрения, что митохондрии являются основной инициаторной органеллой, ответственной за продукцию активных форм кислорода в клетке [Georgieva et al., 2017; Michalska et al., 2018; Escobar-Henriques and Anton, 2020]. Механизмы, лежащие в основе распространения окислительного стресса внутри клетки, находятся в фокусе внимания исследователей более 15 лет. Было высказано предположение, и затем доказано, что избыточный окислительный стресс запускается по принципу ROS-induced ROS release (RIRR) в соседних митохондриях с высвобождением образовавшихся АФК в цитозоль. Было предложено несколько моделей RIRR [Zhang et al., 2016; Zorov and Juhaszova, 2006, Millare et al., 2020], однако основные исследования были проведены на кардиомиоцитах, специфических клетках, в которых большая часть митохондрий плотно упакована между миофибриллами, образуя высокоупорядоченную сеть. В результате этого митохондрии практически были лишены динамики (движения, слияния и деления). Очевидно, что кардиомиоциты не являются лучшей моделью для изучения взаимо-



действия ОС и митохондриальной динамики. Дрожжи *D. magnusii*, в отличие от кардиомиоцитов, могут рассматриваться как типичная эукариотическая клетка, в которой свободно движущиеся митохондрии подвергаются слиянию и делению. Более того, эти клетки, благодаря своим уникальным гигантским размерам и, следовательно, простоте визуализации митохондрий, дают возможность анализировать большое количество индивидуальных клеток, используя современные методы проточной цитометрии и Time-lapse микроскопии.

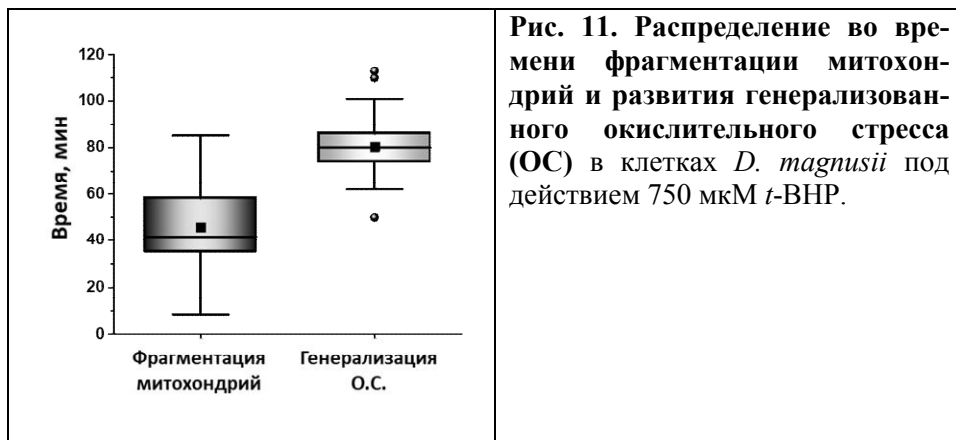
ОС индуцировали добавлением 750 мкМ *t*-ВНР, а детектировали методами флуоресцентной микроскопии, Time-lapse микроскопии и проточной цитометрии на протяжении 100 минут после начала воздействия прооксиданта. Для выявления различных форм АФК в клетке и их локализации использовали совместно два флуоресцентных зонда, которыми нагружались клетки до воздействия прооксиданта: H2DCFDA – маркер на пероксид водорода, обладающий после окисления зеленой флуоресценцией, и MitoSox Red – митохондриально-направленный маркер на супероксид-анион радикал, обладающий спектром эмиссии в красной области. Использование данной пары зондов удобно, так, как окрашивание MitoSox Red позволяет наблюдать и морфологию митохондрий. Показано, что воздействие прооксиданта *t*-ВНР приводило сначала к появлению активных форм кислорода только в митохондриях, а затем, спустя определенный лаг-период, к генерализованному (в масштабе целой клетки) ОС (Рис. 10). Для каждого анализа использовали более 100 индивидуальных клеток.



**Рис. 10.** Развитие ОС под действием 750 мкМ *t*-ВНР в клетках *D. magnusii* на протяжении 100 минут (прослежено методом Time-lapse микроскопии). Красная флуоресценция – MitoSox Red, зеленая флуоресценция – DCF.

Предварительная инкубация клеток с SkQ1 существенно снижала продукцию АФК митохондриями, лишь незначительно снижая генерализованный ОС (не показано).

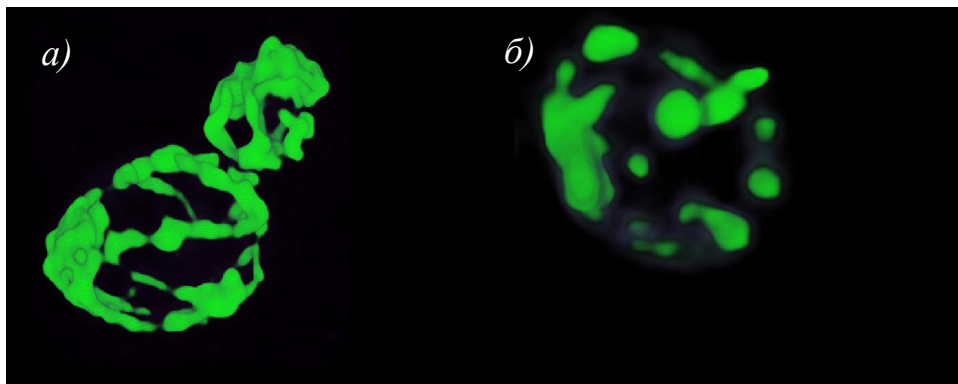
Фрагментация митохондрий всегда предшествовала генерализованному ОС и, вероятно, была связана с внутримитохондриальными АФК (Рис. 11). За фрагментацию митохондрий принимался момент времени, когда в клетке не было образования удлинённых митохондрий.



**Рис. 11. Распределение во времени фрагментации митохондрий и развития генерализованного окислительного стресса (ОС) в клетках *D. magnusii* под действием 750 мкМ *t*-ВНР.**

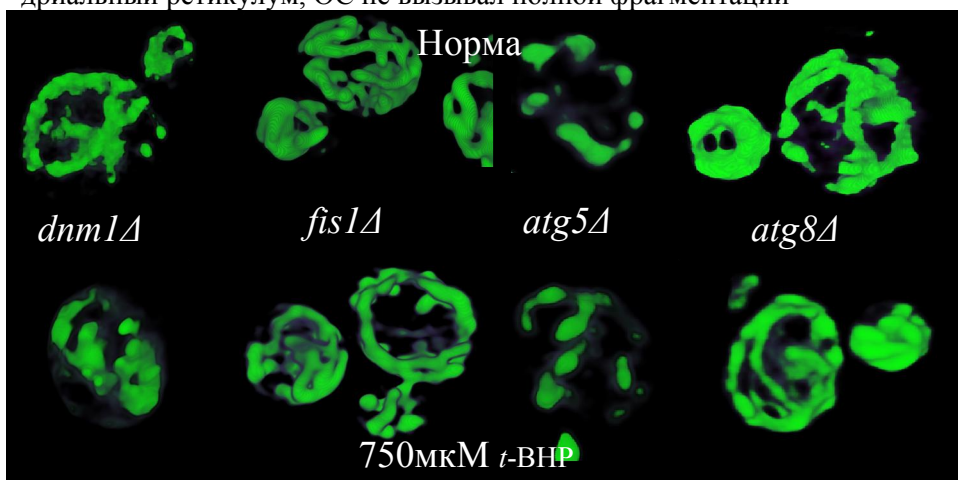
### **Митофагия в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae***

Целью этой части работы было проследить взаимосвязь между ОС и митофагией. Как известно, митофагия является основным элементом контроля качества митохондрий. Фрагментация митохондрий является необходимым этапом митофагии в клетках млекопитающих. Для дрожжей этот вывод не столь однозначен [Мамаев и Звягильская, 2019]. Для решения этого вопроса, с помощью ведущего научного сотрудника в НИИ им А.Н. Белозерского Д.А. Кнорре и ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной генетики института Биохимии им. Баха А.И. Александрова была собрана коллекция мутантов дрожжей *S. cerevisiae* с одиночными делециями генов, кодирующих основные белки митофагии, ОС, вызванный инкубацией с *t*-ВНР в течение двух часов, ожидаемо приводил к фрагментации митохондрий в клетках дикого типа *S. cerevisiae*, выращенных на галактозе (Рис.12.).



**Рис. 12.** Морфология митохондрий (3D модели) клеток дикого штамма дрожей *S. cerevisiae* в норме (а) и при действии 750 мкМ *t*-ВНР(б). Здесь и на последующих рисунках митохондрии окрашивали 200 нМ MitoTracker Green и анализировали под микроскопом EVOS M7000 Imaging System, Termofisher.

Мутанты с удаленными белками Dnm1 и Fis1(Рис.13.), ответственными за деление митохондрий, ожидаемо сохраняли развитый митохондриальный ретикулум, ОС не вызывал полной фрагментации

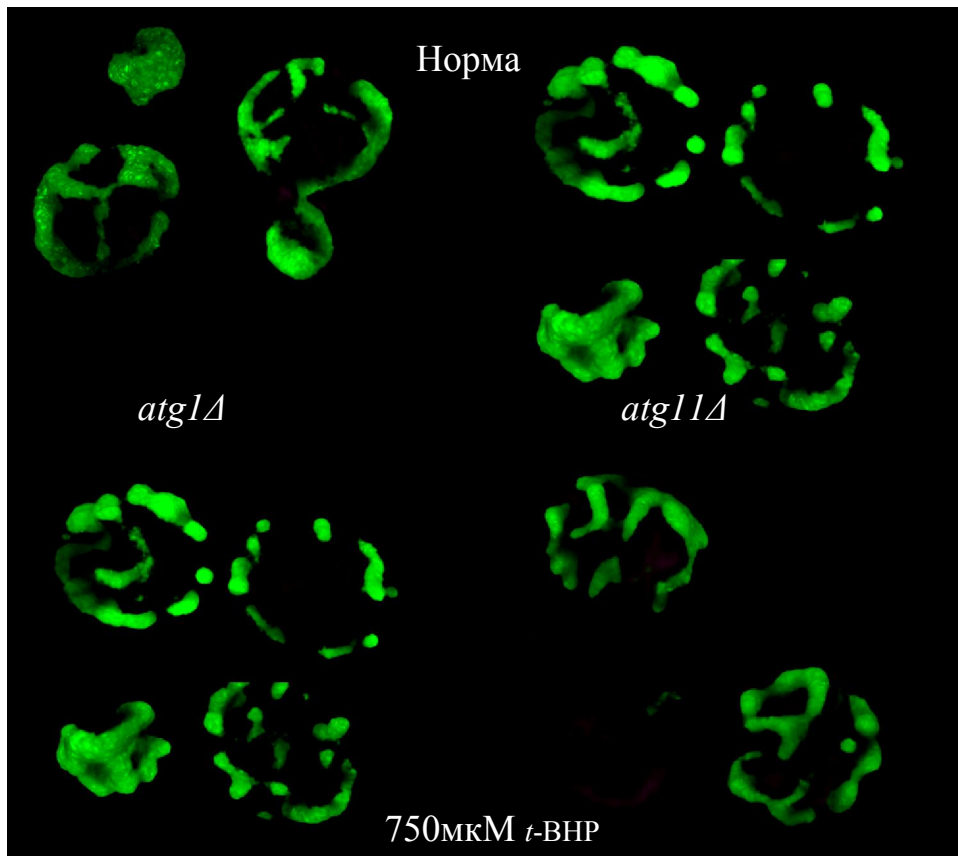


**Рис.13.** Морфология митохондрий (3D модели) мутантов *S. cerevisiae* с делецией генов, участвующих в митофагии (*dnm1Δ*, *fis1Δ*, *atg5Δ*, *atg8Δ*) в норме и при действии ОС, вызванного добавлением 750 мкМ *t*-ВНР.

митохондрий, но при этом изменял их структуру.

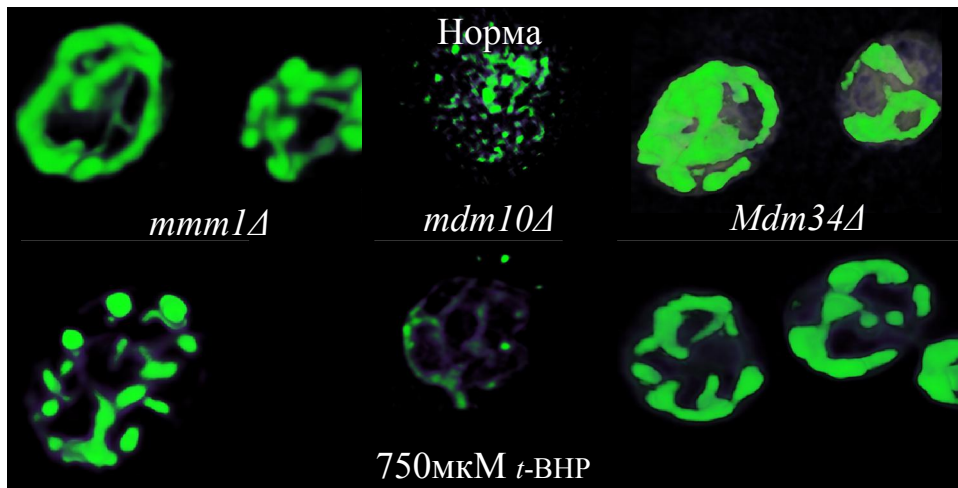
Штамм с делецией *atg5* (Рис.13.) изначально (в условиях нормоксии) обнаруживал фрагментированные митохондрии.

Мутанты, лишённые белков Atg8 (Рис.13.) Atg1 (Рис.14.), и Atg11 (Рис.14.), участвующие на различных стадиях образования фагофора, обладали хорошо развитым митохондриальным ретикуломом, но, в отличие от контрольного штамма, не теряли его в присутствии *t*-ВНР.



**Рис.14.** Морфология митохондрий (3D модели) мутантов *S. cerevisiae* с делецией генов, участвующих в митофагии (*atg1Δ*, *atg11Δ*) в норме и при действии ОС, вызванного добавлением 750 мкМ *t*-ВНР.

Для выявления роли эндоплазматического ретикулума (ЭР) в митофагии у дрожжей мы исследовали мутанты *S. cerevisiae* лишённые белков Mmm1, Mdm10 и Mdm34 входящих в комплекс ERMES (endoplasmic reticulum–mitochondria encounter structure) связывающий ЭР и митохондрии. СО в дрожжах с отсутствующими белками комплекса ERMES усиливал митофагию (Рис.15.). Очевидно, что белки ERMES, в особенности, Mdm10, необходимы для поддержания нормальной структуры митохондрий.



**Рис.15. Морфология митохондрий (3D модели) мутантов *S. cerevisiae* с делецией генов комплекса ERMES в норме и при действии ОС, вызванного добавлением 750 мкМ *t*-ВНР.**

Штамм дрожжей *S. cerevisiae* *dnm1Δ* и дикий штамм W303, который предварительно инкубировали с блокатором митохондриального деления Mdiv1, показывали более высокий уровень окислительного стресса и клеточной смерти под действием *t*-ВНР или антимицина А, чем контрольный штамм W303.

Таким образом, нами были обнаружены некоторые неизвестные ранее факты о связи митофагии со структурой и динамикой митохондрий. Митофагия у дрожжей происходит даже при ингибировании митохондриального деления. Фрагментация митохондрий дрожжей может нести защитную функцию при ОС или нарушениях функции митохондрий.

## ВЫВОДЫ

- 1) SkQThy является наиболее эффективным антиоксидантом из всех до сих пор исследованных антиоксидантов семейства SkQ. SkQThy не только предотвращал, но и обращал фрагментацию митохондрий в клетках дрожжей и может быть полезным для облегчения патологий, связанных с окислительным стрессом.
- 2) SkQN и MitoK3 являются более эффективными прооксидантами чем *t*-ВНР. SkQN вызывал фрагментацию митохондрий в то время как MitoK3 вызывал более глубокие разрушения митохондриальной структуры. SkQN может быть рекомендован в качестве терапевтического препарата для борьбы с некоторыми видами рака.
- 3) При обработке дрожжевых клеток прооксидантом, окислительный стресс первоначально развивался только в митохондриях, вызывая их фрагментацию, которая предшествовала развитию генерализованного окислительного стресса.
- 4) В отличие от высших эукариот, митофагия у дрожжей происходила даже при ингибировании митохондриального деления. Белки Atg5 и Mdm10 необходимы для поддержания нормальной структуры митохондрий. Мутанты, лишённые белков Atg1, Atg8 и Atg11, участвующих в образовании фагофора, были устойчивы к окислительному стрессу, сохраняя митохондриальный ретикулум.

### Список публикаций по теме работы

#### Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) Rogov A.G., Ovchenkova A.P., **Goleva T.N.**, Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. New yeast models for studying mitochondrial morphological as effected by oxidative stress and other factors. *Anal Biochem.* 2018, 1;552:24-29.
- 2) Рогов А.Г., **Голева Т.Н.**, Тренделева Т.А., Овченкова А.П., Аливердиева Д.А., и Звягильская Р.А. Новые данные о сравнительном действии SkQ1 и SkQT1 на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей. *Биохимия.* 2018, 83:552-561.
- 3) **Goleva T.**, Rogov A, Korshunova G., Trendeleva T., Mamaev D., Aliverdieva D., Zvyagilskaya R. SkQThy, the novel promising mitochondria-targeted antioxidant. *Mitochondrion.* 2019, 49:206-216.
- 4) Rogov A.G., **Goleva T.N.**, Sukhanova E.I., Epremyan K.K., Trendeleva T.A., Ovchenkova A.P., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. Mitochondrial Dysfunctions May Be One of the Major Causative Factors Underlying Detri-

mental Effects of Benzalkonium Chloride. *Oxid Med Cell Longev.* 2020, 10; 2020:8956504.

5) **Goleva T.N.**, Lyamzaev K.G., Rogov A.G., Khailova L.S., Epremyan K.K., Shumakovich G.P., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Marmiy N.V., Zinevich T.V., Esipov D.S., Zvyagilskaya R.A., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2020, 1;1861:148210.

6) Rogov A.G., **Goleva T.N.**, Epremyan K.K., Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. Propagation of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species within the *Dipodascus magnusii* Cells. *Antioxidants (Basel).* 2021, 15;10:120.

### Материалы конференций:

1) Овченкова А.П., **Голева Т.Н.**, Рогов А.Г. Фрагментация митохондрий дрожжей // XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2017. – С.104.

2) Овченкова А.П., **Голева Т.Н.**, Рогов А.Г. Митохондриально-направленные антиоксиданты предотвращают и обращают фрагментацию митохондрий дрожжей *Dipodascus magnusii* // XI Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» – 2016. – С. 106–109.

3) Rogov A.G., Ovchenkova A.P., **Goleva T.N.**, Zvyagilskaya R.A. Correlation between oxidative stress, mitochondrial fragmentation and cell death in yeast // *Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases International Conference* – 2016. – P. 141.

4) **Голева Т.Н.** Влияние нового антиоксиданта SkQThy на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей // XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2018. – С.71.

5) **Голева Т.Н.**, Епремян Х.Х. Влияние нового митохондриально-направленного прооксиданта SkQN на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей // *Международный молодежный научный форум Ломоносов 2018 – электронный сборник тезисов.*

6) **Голева Т.Н.**, Рогов А.Г. Действие митохондриально-направленных прооксидантов SkQN и MitoK3 на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей // XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2019. – С.142.

- 7) **Голева Т.Н.**, Рогов А.Г. Развитие окислительного стресса в дрожжах // Международный молодежный научный форум Ломоносов 2019 – электронный сборник тезисов.
- 8) **Голева Т.Н.**, Рогов А.Г. Взаимосвязь фрагментации митохондрий и окислительного стресса // XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2020. – С.103.
- 9) **Goleva T.N.**, Rogov A.G., Epremyan K.K., Shumakovich G.P., Zvyagilskaya R.A. Effects of SkQN on rat liver mitochondria and yeast cells // «Homo Sapiens Liberatus» in celebration of the 85th birthday of professor V.P. Skulachev. - Moscow: TORUS PRESS, 2020. P. 52-53. DOI: 10.30826/HomoSapiens-2020-43. ISBN 978-5-94588-277-5.
- 10) Rogov A.G., **Goleva T.N.**, Epremyan K.K., Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. Propagation of prooxidant-induced oxidative stress within the yeast cells // Proceedings of the 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» in celebration of the 85th birthday of professor V.P. Skulachev. - Moscow: TORUS PRESS, 2020. P. 54-55. DOI: 10.30826/HomoSapiens-2020-43. ISBN 978-5-94588-277-5.
- 11) Mamaev D.V., Rogov A.G., **Goleva T.N.**, Zvyagilskaya R.A. Mitophagy in yeast cells // Proceedings of the 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» in celebration of the 85th birthday of professor V.P. Skulachev. - Moscow: TORUS PRESS, 2020. P. 56-57. DOI: 10.30826/HomoSapiens-2020-44.
- 12) Рогов А. Г., Голева Т. Н., Епремян Х. Х., Киреев И. И., Звягильская Р. А. Распространение окислительного стресса в клетках дрожжей // 3-й Российский микробиологический конгресс - 2021. – С.133.