Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» Институт Биохимии им. А.Н. Баха

На правах рукописи

ГОЛЕВА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА

«Дисфункция и фрагментация митохондрий, митофагия и гибель

клеток дрожжей»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

1.5.4. Биохимия

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор Рената Александровна Звягильская

Москва – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
Глава 1. Окислительный стресс (OC) и активные формы кислорода в	клетке.9
Митохондриально-направленные антиоксиданты	13
Глава 2. Динамика митохондрий	17
Компоненты, участвующие в митохондриальном слиянии и делении	18
Митофузины (Mfns)	18
Нарушение митохондриальной динамики и заболевания	21
Глава 3. Митофагия	
Регуляция митофагии	25
Регуляция гибели клеток и аутофагии активными формами кислорода	(АФК)26
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
Реактивы	
Модельные организмы	
Условия культивирования дрожжей	
Выделение митохондрий печени крысы	
Аналитические методы	
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
Глава 1. Дрожжевые модели для исследования динамики митохондри	ий 37
Глава 2.1. Влияние SkQ1 и SkQThy на выделенные митохондрии печ	ени
крысы	
Глава 2.2. Влияние SkQ1 и SkQThy на клетки дрожжей	
Глава 3.1. Влияние SkQN и MitoK3 на энергетические параметры	53

изолированных митохондрий печени крысы	53
Глава 3.2. Влияние SkQN и MitoK3 на клетки дрожжей	62
Глава 4. Развитие окислительного стресса и связь с и фрагментацией	
митохондрий	65
Глава 5. Митофагия и ОС в дрожжах Saccharomyces cerevisiae	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
ВЫВОДЫ	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода;

КЦХФ – карбонилцианид м-хлорфенилгидразон;

мтДНК – митохондриальная ДНК;

ОС - окислительный стресс;

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан;

ЦсА – циклоспорин А (ЦсА);

Ар5А – Р₁,Р₅-ди(аденозин-5-)пентафосфат;

DCF-DA – 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2,7дигидрохлорфлуоресцеин диацетат);

ER – endoplasmic reticulum (эндоплазмотический ретикулум);

ERMES – endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure (сайт связывания эндоплазматического ретикулума и митохондрии);

MitoK3 – [10-(3-метил-1,4-диокси-1,4-дигидронафталин-2-ил) децил] трифенилфосфоний;

mPTP — mitochondrial permeability transition pore (митохондриальная Ca^{2+}/P_i -зависимая неспецифическая пора);

PI – Propidium iodide (пропидий йодид);

SkQN – [10- (1,4-диоксо-1,4-дигидронафталин-2-ил) децил] трифенилфосфоний;

SkQ1 – 10-(6-пластохинолил)децилтрифенилфосфоний;

SkQT1 – SkQT1(p) и SkQT1(m) в пропорции 1,4 (SkQT1(p) – 10-(6толухинолил)децилтрифенилфосфоний; SkQT1(m) – 10-(5толухинолил)децилтри-фенилфосфоний);

SkQThy – 10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинолил-6) децилтрифенилфосфоний;

TQ – тимохинон (2-изопропилІ-5- метилІ-1,4-бензохинон);

t-BHP – *трет*-бутилгидропероксид;

ΔΨ – трансмембранная разность электрических потенциалов.

ВВЕДЕНИЕ

<u>Актуальность темы и степень разработанности</u>. 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, в системе выбора клетки между жизнью и смертью [1]. В тоже время они являются основными источниками активных форм кислорода (АФК) в клетке, избыточное образование которых вызывает развитие окислительного стресса (ОС), играющего решающую роль в возникновении многочисленных возрастных заболеваний, включая артрит, диабет, деменцию, рак, атеросклероз, сосудистые заболевания, ожирение, остеопороз [2,3].

Митохондрии являются динамичными органеллами клетки, постоянно подвергаясь слиянию в общую сеть и делению, при этом их число и качество должно отвечать энергетическим потребностям клетки. В клетке выработан сложный механизм, отвечающий за удаление поврежденных И лаже избыточных митохондрий – митофагия. ОС может приводить к необратимой митохондрий, и стать отправной точкой фрагментации ДЛЯ запуска запрограммированной клеточной смерти. В последнее время в литературе все чаще указывают на дисфункцию и фрагментацию митохондрий, а качестве первичных маркеров нейродегенеративных заболеваний, в том числе связанных с отложением агрегированных белков [4-6].

Таким образом, изучение дисфункции, фрагментации митохондрий, митофагии, ОС и гибели клеток является важной и необходимой задачей на пути изучения социально значимых заболеваний.

Целью работы явилось изучение влияния дисфункции и фрагментации митохондрий на гибель клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Dipodascus magnusii*, а также изучение взаимосвязи ОС и митофагии в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи исследования

- Получение оптимальных моделей для изучения морфологии митохондрий в дрожжах.
- Изучение влияния новых митохондриально-направленных антиоксидантов и прооксидантов на выделенные митохондрии печени крысы и клетки дрожжей.
- Установление взаимосвязи между развитием ОС, фрагментацией митохондрий и митофагии в клетках дрожжей.

Научная новизна. Исследованы свойства нового митохондриальнонаправленного (т.е. транспортирующегося исключительно или преимущественно в митохондрии) антиоксиданта SkQThy, показана его эффективность в низких наномолярных концентрация в предотвращении ОС и гибели дрожжевых клеток, а также в предотвращении и обращении фрагментации митохондрий. Исследованы свойства нового митохондриальнонаправленного прооксиданта SkQN, показана его большая эффективность в сравнении с другим митохондриально-направленным прооксидантом MitoK3. На клетках Saccharomyces cerevisiae показана необходимость митофагии в устойчивости к окислительному стрессу. Впервые прослежена динамика развития окислительного стресса, начинающегося с его возникновения сначала только в митохондриях, а затем захватывающего всю клетку. Показано, что фрагментация митохондрий предшествует генерализованному ОС.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные указывают на участие фрагментации митохондрий и митофагии в качестве защитных механизмов при действии на клетки ОС. Тот факт, что фрагментация митохондрий предшествует генерализованному ОС и, по литературным является первичным маркером данным, ряда нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, означает, что ингибирование фрагментации митохондрий может стать новой стратегией в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями. Впервые показанное нами развитие ОС от митохондрий к генерализованному в объеме целой клетки указывает на важность и перспективность использования миохондриально-направленных препаратов в лечении заболеваний, связанных с OC. является наиболее эффективным SkQThy, ПО нашим данным, И перспективным ИЗ всех до сих пор исследованных препаратов. Митохондриально-направленный прооксидант SkQN позволяет рекомендовать его для использования при терапии рака.

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 продемонстрированно внутриклеточное распространение окислительного стресса в клетках дрожжей. Доказано, что фрагментации митохондрий предшествовала генерализованному ОС в дрожжах.

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

<u>Апробация работы</u> 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.

<u>Личный вклад автора.</u> Автор лично принимал участие в получении всех результатов.

<u>Структура и объем работы.</u> Работа изложена на 103 страницах печатного текста, содержит 43 рисунка. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (150 источников).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Окислительный стресс (OC) и активные формы кислорода в клетке

OC может инициироваться различными химически активными молекулами окислителей производных молекулярного кислорода, В совокупности называющихся активными формами кислорода (АФК), или активными формы азота (АФА), которые постоянно вырабатываются в организме при аэробном метаболизме. Эти соединения потенциально могут изменить основные структурные компоненты клетки, такие как белки, липиды и нуклеиновые кислоты [7], что в свою очередь влияет на взаимодействие между основными органеллами клетки [8] и даже может привести к ее гибели [9]. Основными видами АФК, генерируемых клеткой, являются супероксиданион радикал, гидроксил радикал, пероксид водорода и синглетный кислород. Пероксид водорода и другие АФК служат сигнальными молекулами и участвуют многочисленных физиологических В реакциях, таких как антимикробная защита, воспаление, миграция клеток, пролиферация клеток, ангиогенез, регуляция экспрессии генов и т. д. [10]. Дисбаланс между образованием АФК и работой эндогенных антиоксидантов в клетке называется окислительным стрессом (ОС) и приводит к окислительному повреждению молекул и клеток [11]. Избыточные АФК могут генерироваться в митохондриях или в результате дисфункции окислительно-восстановительных ферментов, или результате ОС по механизму положительной обратной связи [12]. В Окислительное повреждение вызывается не только АФК и АФА, но и другими окислителями, такими как, например, липиды. В клетке присутствуют как низкомолекулярные, так и белковые компоненты антиоксидантной защиты, призванные снижать окислительное повреждение АФК и АФА при их избытке [13]. Одна из гипотез о роли ОС представляет систему антиоксидантной защиты как важный фактор окислительно-восстановительного гомеостаза организма [14].

Что бы подчеркнуть положительное влияние АФК на клетки введены новые термины «окислительный эустресс» и «окислительный дистресс» [15]. Легкие окислительно-восстановительные стрессы могут защитить организм от последующих более серьезных стрессов и улучшают обмен веществ организма [16,17].

ОС играет решающую роль в развитии возрастных заболеваний [14], включая артрит, диабет, деменцию, рак, атеросклероз, сосудистые заболевания, ожирение, остеопороз [18,19]. В настоящее время старение считается нескольких механизмов, защищающих следствием отказа клетки ОТ повреждений, вызванных АФК [20]. Было выдвинуто предложение, что митохондрии играют решающую роль в физиологической передаче сигналов посредством АФК [21]. Генерация АФК часто коррелирует со структурой митохондриального ретикулума. Считается, что более длинные митохондрии имеют более эффективную структуру крист, защищены от деградации и обладают более высокой скоростью окислительного фосфорилирования [22]. Структурные изменения в митохондриях связывают с изменением активности дыхательной цепи. Это комплексов сопровождается изменениями биофизических свойств мембран, например, снижением текучести. Повреждение ОТ окисления сильно зависит от унаследованных ИЛИ приобретенных дефектов в ферментах, участвующих в передаче сигналов в клетке [14].

У пожилых людей митохондрии характеризуются снижением окислительного фосфорилирования, снижением продукции АТР, увеличением выработки АФК и снижением антиоксидантной защиты [23]. Количество митохондрий изменяется в ходе жизнедеятельности клетки. Это в некоторых случаях может вызывать перепроизводство АФК, что стимулирует индукцию окислительного повреждения ДНК и регуляцию фосфатаз, пролиферативных, апоптотических факторов и т. д. [24-26]. АФК могут быть сигналом для перераспределения малых ядерных РНК [27], которые являются критическими медиаторами метаболического стресса (последствий накопления продуктов

обмена). Это, в свою очередь, приводит к дисфункции митохондрий и повышает уязвимость клетки к окислительному стрессу [23,28]. АФК являются важным фактором развития липотоксичности, учитывая, что предварительная обработка антиоксидантами снижает уровень АФК и предотвращает гибель клеток [29,30]. Митохондриальная дисфункция и окислительновосстановительный дисбаланс могут постоянно поддерживать и способствовать развитию широкого спектра патологий, называемых «свободнорадикальными заболеваниями» (например, нейродегенерация, воспаление, рак и т. д.) [24,26,31,32].

Многие исследователи сосредоточены на различиях между нормальными и раковыми клетками, а также и множеством других клеточных патологий, сопровождающихся высокими уровнями АФК и нарушением внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза.

Внутриклеточные АФК, обычно, имеют митохондриальное происхождение [24]. Экспорт митохондриальных АФК в цитозоль можно контролировать путем регуляции переноса электронов на разных ступенях дыхательной цепи [21]. Однако конкретные механизмы генерации АФК в митохондриях нуждаются в дополнительных исследованиях.

Антиоксиданты могут контролировать автоокисление метаболитов, белков, липидов и нуклеиновых кислот, прерывая цепочку преобразования свободных радикалов или подавляя образование свободных радикалов и, следовательно, снижая ОС [14].

АФК привлекли внимание биологов после того, как в 1956 году Данхам Харман предложил свободно радикальную гипотезу старения [33]. На тот момент была популярна «теория накопления ущерба» по данной теории предполагается, что метаболический реакции, происходящие в живом организме, имеют некоторые неизбежные вредные побочные эффекты, и старение является постепенным накоплением разнообразных, вредных изменений, вызванных ими [34].

В своих работах 1983 и 1987 годах Харман описывал реакции свободных радикалов с клеточными компонентами (включая белки и нуклеиновые кислоты) приводящие к повреждению последних. Такого рода реакции ухудшают функциональную эффективность и репродуктивную способность клетки, а также стимулируют мутагенез, старение и рак. Харман также предложил, что свободные радикалы возникают, как побочные продукты реакций с участием молекулярного кислорода катализируются в клетке окислительными ферментами митохондрий, отвечающими за клеточное дыхание, и они могут служить в качестве биологических часов, которые определяют скорость старения [34].

Действительно, значительная, если не основная, доля активные формы кислорода, образующиеся в клетках животных, являются побочным продуктом митохондриального транспорта электронов. Митохондрии также производят активные формы азота, прежде всего оксид азота и пероксинитрит, которые участвуют в клеточной сигнализации и дегенеративных процессах, включая старение [35]. В 60-70 годах в работах Ларсена и Денсона была показана продукция перекиси водорода и супероксид радикала при работе митохондрий [34]. На тот момент складывалась следующая картина: митохондрии производят АФК как неизбежное побочный продукт дыхания; эти АФК постепенно наносят ущерб липидам, белки и ДНК; часть этого ущерба непоправима, и накопление такого ущерба приводит к постепенному угасанию жизненной функции, т. е. старению. Существует также «Митохондриальный порочный круг» - расширение этой гипотезы при условии, что АФК, образующиеся в качестве побочных продуктов дыхания ответственны за ущерб, прежде всего в митохондриях, в результате чего дальнейшее увеличение производства АФК и дисфункция митохондрий – формирует положительную обратную связь, которая в конечном итоге может привести к гибели клеток [36]. Связь между митохондриальной продукцией АФК и дегенеративными приводящими болезням старению, процессами, К И подтверждаются подавляющим числом экспериментальных данных. Тем не менее, механизмы

данного процесса оказался более сложным, чем просто неспецифические химические реакции, повреждающие биомолекулы [34].

Хотя многочисленные экспериментальные работы показывают, что мутации в митохондриальной ДНК участвуют в процессе старения, нет убедительных экспериментальных данных, показывающих, что окислительное повреждение ДНК является первичным источником накопления мутаций при старении. Многочисленные попытки использовать антиоксиданты ДЛЯ предотвращения последствий ОС не привели к желаемому результату [34]. Недавнее исследование на Drosophila melanogaster показало, что особенности, связанные с мутации мтДНК у позвоночных и плодовой мушки аналогичны, в том числе показано увеличение частоты мутаций с возрастом. Тем не менее, остается неясным, является ли ОС причиной увеличения мутагенеза с возрастом [37].

В экспериментах с использованием сверхчувствительного секвенирования показано, что преимущественно переходные мутации связанны с окислительным повреждением мтДНК [38].

Современная версия свободнорадикальной теории старения предполагает, что основным фактором, лежащим в основе процессов, ведущих к постепенному старению, не является прямой ущерб, причиняемый АФК клетке, но дисбаланс в сигнализации АФК/Митохондрии и генерируемые органеллами АФК играют центральную роль в регулировании запрограммированной гибели клеток и других жизненно важных процессов в живых организмах, начиная от одноклеточных эукариот и заканчивая людьми [34].

Митохондриально-направленные антиоксиданты

Неоднократно предпринимались попытки замедлить старение с помощью антиоксидантов. Однако традиционно использовавшиеся для этих целей низкомолекулярные антиоксиданты, такие как витамин Е или убихинон, действовали неселективно. Их распределение в клетке зависело от степени их липофильности и электрического заряда, необходимы были высокие

концентрации, что часто приводило к нежелательным последствиям. Наиболее успешным С этой точки зрения подходом оказалось использование антиоксидантов - катионов с адресной доставкой в митохондрии, место образования АФК [39]. Митохондрии являются единственным компартментом клетки, на внутренней мембране которых за счет работы дыхательной цепи генерируется отрицательная разность электрических потенциалов, движущая сила для транспорта и накопления катионов, благодаря чему их концентрация в митохондриях может увеличиваться на 3 порядка по сравнению с цитозолем и на 4-6 порядков по сравнению с внеклеточной средой.

Впервые идея использования катионов, проходящих через мембраны в качестве «локомотивов», адресно доставляющего вещество в митохондрии, была предложены в 1970 году в группе под руководством академика В.П. Скулачева [40]. Первая успешная реализация этой идеи произошла лишь 30 лет спустя, когда в группе М. П. Мерфи впервые были созданы митохондриальнонаправленные антиоксиданты, содержащие проникающий катион, трифенилфосфоний, соединенный С10-алифатической цепью с тиобутилом [41], витамином Е [42] и убихиноном, компонентом дыхательной цепи [43], Немного позже В.П. Скулачев предложил заменить убихинон в составе липофильного антиоксиданта на потенциально более мощный природный антиоксидант пластохинон, функционирующий в фотосинтетической цепи переноса электронов (в хлоропластах) в условиях повышенной концентрации кислорода и увеличенной продукции АФК. В рамках проекта, руководимого В.П. Скулачевым, был синтезирован SkQ1, где Sk означает проникающий катион, «Skulachev's ion» – термин, введенный Д. Грином [44], а Q – пластохинон. Показано, что он свободно проникал через бислойные липидные мембраны с образованием диффузионного потенциала расчетной величины, накапливался в митохондриях клеток и предохраняют их от апоптоза или некроза, вызванного АФК, снижал уровень перекисного окисления липидов и белков у стареющих животных, продлевал жизнь подоспоры, дафний. дрозофилы и мышей, оказывают положительный терапевтический эффект при

различных возрастных заболеваниях, таких как инфаркты сердца и почек, сердечная аритмия, инсульт головного мозга, некоторые формы рака, заболевания глаз (катаракта, ретинопатия, глаукома, увеит) и др. Более того, во всех случаях SkQ1 был более эффективным антиоксидантом, чем MitoQ [34].

Митохондриально-направленные (т.е., транспортирующиеся избирательно митохондрии) антиоксиданты В имеют существенное преимущество перед водорастворимыми антиоксидантами, поскольку они не только накапливаются электрофоретически в митохондриальных мембранах, но и имеют высокий коэффициент распределения в них, в результате чего их концентрация в липидном бислое внутренней митохондриальной мембраны увеличивается еще на 4 порядка, что позволяет использовать их в очень низких концентрациях. Кроме того, ОНИ, В отличие OT других катионовантиоксидантов, могут регенерироваться компонентами дыхательной цепи, т.е., быть соединениями многократного пользования. Это позволяет использовать их в очень низких концентрациях и снизить риски нежелательных побочных эффектов. Неудивительно, ЧТО исследования таких соединений И ИХ биологических эффектов in vitro и in vivo активно проводятся в последнее время. Изучены физико-химические свойства широкого спектра подобных соединений; вещества были испытаны в модельных системах, на животных и в клинике [34]. Ниже приведены некоторые примеры. Было обнаружено, что 2деметилпластохинон (соединение, содержащееся в большом количестве в семенах черного тмина, использовавшийся в прошлом как лекарство для лечения многих патологий человека), конъюгированный с липофильным большее значительно окно между концентрациями, катионом, имеет вызывающими антиоксидантный и прооксидантный эффект (при увеличении концентрации) по сравнению с MitoQ и даже SkQ1. Новое соединение легко восстанавливалось дыхательной цепью и было способно ингибировать апоптоз, вызванный пероксидом водорода, в пико- и наномолярных концентрациях в клеточных культурах [40].

Также SkQ1, **MitoTEMPO** было обнаружено, что а также нитроксид), (митохондриально-направленный снижали индуцибельную экспрессию синтазы оксида азота в печени и уровень NO в крови и плазме. Предполагается, что внутриклеточные сигнальные пути, опосредованные NO и АФК, вероятно, связаны друг с другом через митохондрии и взаимодействуют для регулирования воспалительных внутриклеточных процессов [7]. Показано также, что митохондриально-направленные антиоксиданты, вводимые сразу после реперфузии головного мозга, уменьшали его повреждение головного мозга и помогали сохранить более высокий неврологический статус; катионные конъюгаты пластохинона децилродамином были наиболее с антиишемических многообещающими кандидатами В качестве митохондриально-направленных препаратов [45].

У мышей, потребляющих В течение жизни митохондриальнонаправленный антиоксидант SkQ1, замедлялось развитие возрастной сердечной дисфункции (кардиомиопатия, сердечная недостаточность, гипертрофия и миокарда), диффузный фиброз предположительно из-за уменьшения воспаления. У крыс ежедневные внутрибрюшинные инъекции SkQT1 и митохондриально-направленнго тимохинона в течение 5 дней после травмы головного мозга, ослабляли вызванный неврологический дефицит.

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры митохондрий крыс показало, что применение SkQ1 предотвращало развитие возрастных деструктивных изменений митохондриального ретикулума при саркопении скелетных мышц как в контрольной группе крыс линии Wistar, так и у крыс линии OXYS, страдающих от чрезмерного ОС и ускоренного старения [46].

SkQ1 в наномолярных концентрациях предотвращал или замедлял возрастные изменения у здоровых крыс линии Wistar, а также церебральную дисфункцию и уменьшал патологическое накопление β-амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка у крыс OXYS [47].

Глазные капли, содержащие 250 нМ SkQ1 и предназнченые для лечения синдрома сухого глаза, катаракты и глаукомы уже прошли клинические испытания (фаза I-III в России, фаза I-II в США). Вероятно, активное использование миохондриально-направленных лекарств будет иметь положительное влияние на широкий спектр таких возрастных заболеваний, как хроническое воспаление, атеросклероз и старение в целом [34].

Глава 2. Динамика митохондрий

Митохондрии представляют собой высоко динамичные органеллы, которые постоянно перемещаются в клетке, подвергаются фрагментации и слиянию (в совокупности эти процессы называются динамикой митохондрий) [48]. Митохондриальная динамика имеет множество функций: определяет величину пула ATP, доступной для биохимических реакций, способность клетки отвечать на повреждения, иммунный ответ и устойчивость к болезням, включая неврологические заболевания, рак, мышечную дистрофию, ишемическую болезнь сердца, хроническое заболевание печени и цирроз печени [49].

Наличие у митохондрий двух мембран, внешней и внутренней, предопределяет сложность процесса слияния митохондрий. Слияние внешней мембраны катализируется митофузином Mfn1p и его близким гомологом Mfn2p у млекопитающих, которые соответствуют дрожжевому белку Fzo1p [50]. Слияние внутренней мембраны опосредуется Opa1p у млекопитающих и Mgm1p у дрожжей. Митохондриальное деление опосредуется другой динамин-подобной GTPa3oй, Drp1p (Dnm1 в дрожжах) [51-53]. Описана также вовлеченность липидов, в частности митохондриального кардиолипина, в динамику митохондрий, слияния внутренней митохондриальной мембраны [54].

Непрерывное слияние и деление митохондрий играет ключевую роль в поддержании целостности митохондрий [55]. Предполагается, что циклы

митохондриального деления и слияния позволяют клетке отсортировать и изолировать поврежденные митохондрии [56].

Компоненты, участвующие в митохондриальном слиянии и делении Митофузины (Mfns)

Mfn1p и Mfn2p на 60-63% идентичны по аминокислотному составу. Для Mfn1 характерна почти повсеместная экспрессия, тогда как для Mfn2p характерны некоторые тканевые предпочтения (высокий уровень экспрессии найден в мозге и надпочечниках [57]. Mfn1p локализован исключительно в митохондриях. Mfn2p присутствует не только в митохондриях, но и в MAM (mitochondria-associated membrane) мембранах, связанных с митохондриями [58].

Mfn1p критичен для контакта и слияния митохондрий, тогда как Mfn2 обладает более низкой GTPазной активностью и, наряду со слиянием митохондрий, выполняет и другие функции [59]. Тем не менее, Mfn2p, содержащий несколько консервативных доменов, обеспечивает олигомеризацию двух соседних митохондрий с помощью гепта-повторных доменов и регулирует распределение, форму и контроль качества митохондрий. обеспечивает взаимодействие Mfn2p также между митохондриями И эндоплазматической сетью Mfn2p и регулирует стресс эндоплазматического ретикулума (ER) и передачу сигналов инсулина [58,60] [61]. Другое уникальное свойство Mfn2p заключается взаимодействует В том, ЧТО ОН С проапоптотическими белками Bcl-2, Bax И, возможно, Bak [52]. Эти влияют на морфологию взаимодействия митохондрий [52]. Снижение количества Mfn2p приводит к снижению величины мембранного потенциала, генерируемого на внутренней митохондриальной мембране, потребления кислорода и утечке протонов, тогда как избыточная экспрессия Mfn2 способствует окислительному фосфорилированию [61].

в дрожжах - Mgm1p), 100 кДа- белок, локализованный в межмембранном пространстве митохондрий или связан с внешней стороной внутренней митохондриальной мембраны, контролирует слияние внутренней митохондриальной мембраны, регулирует стабильность митохондрий и вместе сМІСОЅ (сайт митохондриального контакта и система организации крист) контролирует форму крист [69-71]. Форма крист определяет высвобождение цитохрома С в ответ на апоптотические стимулы и регулирует сборку суперкомплексов дыхательной цепи [62-64]. Потеря L-Opa1 способствует фрагментации митохондрий и разрушению крист, что приводит к гибели клеток Мутации в гене, кодирующем данный белок, вызывают аутосомно-[65]. доминантную атрофию зрительного нерва [66].

Fzo1p

Дрожжевой митофузин Fzo1p – интегральный мембранный белок, участвующий в соединении и слиянии наружной мембраны митохондрий дрожжей. Fzo1p имеет интактный N-концевой GTPазный домен; мишень для разрушения убиквитинлигазой SCF-Mdm30p и цитозольной убиквитинсистемой [67]. Митофузин дрожжей протеасомной Fzo1p образует высокомолекулярные комплексы и его сборка во время слияния мембран, вероятно, включает образование комплексов высокого порядка. В соответствии с этой возможностью, митофузины образуют олигомеры как в цис- (на одном и том же липидном бислое), так и в транс-положении, чтобы обеспечить прикрепление и слияние мембран. Fzo1p присоединяется к Mgm1p и Ugo1p для завершения слияния митохондрий [68].

Drp1p

Белок Drp1p необходим для митохондриального деления. В отличие от митофузинов и Opa1, имеющих мембранную природу, Drp1p преимущественно присутствует в цитозоле и связывается с поверхностью митохондрий через

многочисленные рецепторы/адаптеры Drp1p [75-78], что позволяет Drp1p дополнительно олигомеризоваться и обволакивать митохондрии [52].

Наличие множества рецепторов/адаптеров Drp1p позволяет регулировать Drp1p в ответ на энергетическое состояние клетки и физиологию клетки, включая апоптоз и митофагию. Регуляция активности Drp1p опосредуется не только на уровне модификации Drp1p, но также на уровне модификации рецептора/адаптера Drp1p. Недавно было обнаружено, что Mff, основной рецептор Drp1p, фосфорилируется AMP-киназой в ответ на ингибирование цепи переноса электронов [69], но при голодании активируется и сама AMPкиназа, непосредственно фосфорилирующая и инактивирующая Drp1p [70], вследствие чего митохондрии имеют тенденцию к удлинению [71].

Dnm1p

Динамин-подобная GTPaзa, рекрутируемая при делении митохондрий в комплексы с Fis1p, Mdv1p и Caf4p на внешней стороне митохондрий мембрана для стимулирования деления органеллы [72].

Fis1p

Белок, участвующий в делении митохондрий и пероксисом; может играть определенную роль в прикреплении белковых агрегатов к митохондриям, чтобы сохранить их в материнской клетке; необходим для локализации Dnm1p Mdv1p митохондриального деления; опосредует И BO время этанолиндуцированный апоптоз И этанол-индуцированную фрагментацию митохондрий [73].

Mdv1p

Периферический белок цитозольной поверхности наружной мембраны митохондрий; требуется для деления митохондрий; взаимодействует с Fis1p и с самособирающейся олигомерной формой Dnm1p; содержит повторы WD. Mdv1p имеет паралог Caf4p, возникший в результате дупликации генома [74].

Caf4p

Белок, содержащий повторы WD40, ассоциированный с комплексом Ссг4-NOT; взаимодействует с Fis1p, Mdv1p и Dnm1p и играет роль в делении

митохондрий; Caf4p имеет паралог Mdv1p, возникший в результате дупликации всего генома [75].

У *S. cerevisiae* морфология митохондрий зависит от наличия кислорода в среде, типа и концентрации источника углерода для роста, фазы роста, фазы клеточного цикла и других факторов. Выращенные в аэробных условиях клетки содержат увеличенные трубчатые митохондриальные структуры. Фрагментация митохондрий в клетках дрожжей может быть вызвана ОС, ингибиторами цепи переноса электронов, мутациями митохондриальной ДНК, тепловым шоком, влиянием агентов, способствующих гибели клеток, при хронологическом и репликативном старении, в ответ на дисбаланс в обмене веществ [76].

Нарушение митохондриальной динамики и заболевания

Нарушение митохондриальной динамики вовлечено в старение и различные заболевания человека, включая оптическую нейропатию, глаукому [48], диабет, рак, острую почечную недостаточность [77,78] сердечнососудистые заболевания [100], и возрастные нейродегенеративные болезни, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и боковой амиотрофический склероз [79].

Drp1 определяет размер, форму и распределение митохондрий по всему нейрону, от тела клетки до аксонов и нервных окончаний. Десятилетия интенсивных исследований в нескольких группах показали, что Drp1p в большем количестве представлен в терминальных нейронах и участвует в формировании и прорастании синапсов [80]. Повышенные уровни Drp1p были обнаружены в болезненных состояниях и вызывали чрезмерную фрагментацию митохондрий, что приводило к дисфункции митохондрий и повреждению нейронов.

За последние два десятилетия было разработано несколько ингибиторов Drp1p, в том числе Mdivi-1, Dynasore, P110 и DDQ, их положительные эффекты были показаны при использовании различных моделей от культур клеток до мышиных моделей нейродегенеративных заболеваний [81]. Недавние

генетические исследования показали, что частичное снижение уровня Drp1p защищает OT митохондриальной И синаптической токсичности, индуцированной мутантными белками. Основываясь на данных, полученных на культурах клеток, мышиных моделях и гистологических образцах мозга при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях, авторы с осторожностью говорят, что снижение Drp1p является многообещающей терапевтической мишенью при болезни Альцгеймера И других неврологических заболеваниях [49,81].

Мутации в генах, кодирующих Mfn2p и Opa1p, ответственны за болезнь Шарко-Мари-Тута и доминантную атрофию зрительного нерва, соответственно GDAP1 [82]. Мутации В генах, кодирующих И SLC25A46, два митохондриальных белка, индуцирующих деление митохондрий, также связаны с заболеванием Шарко-Мари-Тута [68]. Мутации в Mfn2p, Opa1p и Drp1p вызывают наследственные невропатии, где в качестве патофизиологического механизма было предложено нарушение транспорта и распределения митохондрий, что приводило к дистальной аксональной дегенерации [83]. Очень редкие мутации Drp1p серьезно нарушают развитие нервной системы, и недавно было показано, что некоторые мутации Drp1p индуцируют атрофию зрительного нерва [68].

Глава З. Митофагия

Аутофагия – это катаболический процесс, в результате которого удаляются цитоплазматические белки и органеллы.

Первоначально считалось, что аутофагия представляет собой неселективный процесс. Однако последующие исследования показали, что аутофагия избирательно удаляет клеточные компоненты. К ним относятся митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), пероксисомы, рибосомы, липидные капли и др. Эти селективные аутофагические процессы называются митофагия, ER-фагия, пексофагия, рибофагия и т.д. [84]. Таким образом,

аутофагия представляет собой очень важный механизм контроля качества в клетках [84].

В процессе митофагии выделяют пять основных стадий: инициация, нуклеация, элонгация, слияние и деградация. Вокруг митохондрий или других компонентов, подлежащих удалению (cargo), образуется двухмембранная изолирующая везикула (фагофор), которая увеличивается в размерах путем добавления вновь синтезированных белков и липидов, становится замкнутой, формируя структуру, называемую аутофагосомой [84], внутри которой находится cargo, цитоплазматические компоненты, подлежащие удалению. Затем внешняя мембрана аутофагосомы сливается с вакуолярной (в дрожжах) или лизосомальной (в клетках млекопитающих) мембраной, а оставшаяся одномембранная структура, называемая аутофагийным тельцем, попадает внутрь вакуоли или лизосомы, где происходит его деградация до мономеров с участием литических ферментов c последующим использованием образовавшихся мономеров для синтеза *de novo* [84].

Митохондрии играют ключевую роль в клетке, отвечая за синтез АТР, пролиферацию, редокс-гомеостаз и гомеостаз кальция, регуляцию апоптоза. В процессе синтеза АТР митохондрии также продуцируют активные формы кислорода (АФК) [85]. Качество и количество митохондрий должны всегда соответствовать энергетическим потребностям клетки [84]. Этой цели и служит митофагия, селективная аутофагия направленная на удаление поврежденных избыточных митохондрий, поддержания или для митохондриального гомеостаза [86]. Митофагия функционирует как ранняя защитная реакция клетки, способствуя адаптации к стрессу путем удаления поврежденных митохондрий. Напротив, повышенный ОС и апоптотические протеазы могут инактивировать митофагию, позволяя осуществить гибель клеток [87].

Хотя изучение аутофагии началось еще в 60-х годах прошлого века на клетках млекопитающих с использованием сканирующего электронного микроскопа, молекулярный механизмы процесса был впервые описан для дрожжей. В 90-х годах из дрожжей были выявлены 37 генов, связанных с

аутофагией (*ATG*-гены), и охарактеризованы биологические свойств белков (Atg) [88]. В последние годы молекулярный механизм митофагии широко изучался в клетках дрожжей и млекопитающих. В частности, идентификация рецептора митофагии Atg32 способствовала значительному прогрессу в понимании митофагии у дрожжей [86].

Ниже перечислены процессы, протекающие при аутофагии (неизбирательной и избирательной) и белки, участвующие в них у дрожжей *S. cerevisiae*:

1. Сигнальные белки, необходимые для индукции аутофагии (протеинкиназа Tor1, протеинкиназа A, Sch9, Tap42 и фосфатаза типа 2A).

2. Упаковка белка или органеллы, доставляемых для деградации, cargo (Atg19, Atg11 и Atg8).

3. Образование преаутофагосомной структуры, фагофора (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 и Atg31).

4. Зарождение везикул (Atg6, Atg9 и фосфатидилинозитол-3-киназа).

5. Развитие и созревание везикул (Atg3-5, Atg6, Atg7, Atg8, Atg10, Atg12, Atg14 и Atg16).

6. Рециркуляция белков (Atg1, Atg2, Atg18, Atg23 и Atg27).

7. Гомотипическое слияние изолирующей мембраны (Tlg2).

8. Доставка и гетеротипичное слияние между аутофагосомой и вакуолей (v- и t-SNAREs, Ccz1, Mon1, комплекс HOPS).

9. Внутривакуолярная деградация везикул (Atg15, протеиназа A и протеиназа [84].

Белок Atg32, характерный И уникальный белок дрожжей, был идентифицирован благодаря общему геномному скринингу дрожжей с дефектом митофагии. Atg32 состоит из 529 аминокислот и имеет один трансмембранный домен, локализован на наружной мембране митохондрий и ее N- и C-концы ориентированы в цитозоль и межмембранное пространство [89]. Atg32 митохондрий соответственно является митохондриальным рецептором и взаимодействует с Atg8 и Atg11 [90]. Atg8 конъюгирован с убиквитин-подобной фосфатидилэтаноламином посредством системы конъюгации и локализуется на изолирующей мембране [90]. Большинство адапторных и рецепторных белков для селективной аутофагии имеет консервативную WXXL-подобную последовательность, называемую взаимодействующим семейством Atg8. Atg8 взаимодействует с адапторными или рецепторными белками через мотив AIM/LIR для избирательного распознавания и локализации адаптора или рецептора на мембране с последующей изоляцией органеллы. Atg32 также имеет AIM/LIR на своем Nконец и взаимодействует с Atg8 [91]. Взаимодействие Atg32/Atg8 способствует увеличению изолирующей мембраны. Взаимодействие Atg32/Atg11 играет решающую роль в инициации митофагии митохондрий. N-конец Atg32 взаимодействует с Atg11 в условиях, индуцирующих митофагию [92]. Взаимодействие Atg32/Atg11 регулируется фосфорилированием Atg32 [92].

Регуляция митофагии

У млекопитающих известно 2 типах митофагии: (1) митохондриальная PINK1 (серин/треонинкиназа) и ЕЗ-лигаза PRKN/PARK2/паркинопосредованная митофагия и (2) рецептор-опосредованная митофагия с участием BNIP3L/Nix, BNIP3, FKBP8, FUNDC1 и BCL2L13 [93].

Один из путей инициации митофагии происходит с участием убиквитина. В этой модели поврежденная митохондрия распознается паркином. ЕЗпаркин/убиквитинлигаза локализованная в цитозоле клетки вблизи внешней мембраны митохондрий, проникает В митохондрии при потере ИМИ мембранного потенциала. Под ее действием присходит убиквитинирование белков миохондриальной мембраны. Убиквитинированные концы белков выступают в качестве маркеров, помечающих дефектную митохондрию [87]. PINK1 является одним из 4х обнаруженных субстратов паркина, в норме этот белок транспортируется внутрь митохондрий, где расщепляется митохондриальными протеазами. При отсутствии мембранного потенциала деградация PINK1 невозможна [87]. В литературе на данный момент предлагают три схемы того, каким образом PINK1 связывает паркин. 1) прямой контакт и взаимодействие PINK1 с паркином. 2) активация паркина путем фосфорилирования. 3) PINK1 фосфорилирует паркинсодержащие субстраты на митохондриях. Однако последней гипотезе противоречат данные, согласно которым паркин способен фосфорилироваться и без участия PINK1 [87].

Обнаружение белка адаптора аутофагии p62/SQSTM1 (p62) существенно продвинуло ученых в понимании механизмов митофагии. Белок p62 связывается с убиквитинированными белками через его убиквитиносвязанный (UBA) домен и с LC3 на фагофоре через его LC3-взаимодействующую область (LIR) [94].

Регуляция гибели клеток и аутофагии активными формами кислорода (АФК)

Митохондрии являются как основным источником, так и мишенью для АФК. Хотя клетки развили высокоэффективную антиоксидантную систему, которая может нейтрализовать АФК при нормальных условиях, поврежденные митохондрии могут генерировать АФК в количествах, превышающих возможность антиоксидантной системы, что может приводить к клеточной смерти. АФК могут вызывать окислительную модификацию митохондриальных белков, липидов, и мтДНК, что приводит к дисфункции митохондрий. АФК также может способствовать открытию mPTP [95].

АФК могут напрямую регулировать образование аутофагосом. Atg4 включает превращение LC3-I в липидированный LC3-II, его встраивание в аутофагосому и рециркуляцию LC3-II. Atg4 подвергается окислению и последующей инактивации, что приводит к накоплению LC3-II. Интересно, что повышенный окислительный/нитрозативный стресс может ингибировать митофагию путем модификации и инактивации паркина. Паркин содержит несколько консервативных цистеиновых остатков, которые важны для поддержания его растворимости, но они также подвержены модификации

окислительным и нитрозативным стрессом, что приводит к инактивации и агрегации [95].

Основной сигнальный путь, который регулирует рост и метаболизм клеток, находится под контролем комплекса мишени рапамицина 1 (TORC1). У S. cerevisiae комплекс SEA является одним из вышестоящих регуляторов TORC1. Комплекс SEA способствует деградации митохондрий либо путем митофагии, либо путем общей аутофагии. Кроме того, подкомплекс SEACIT участвует в поддержании контактных участков вакуоли с митохондриями. Комплекс SEA, по-видимому, является важной связью между путем TORC1 и регуляцией контроля качества митохондрий. Комплекс мишени рапамицина 1(mTORC1) является отличительной чертой важнейшего сигнального пути, который контролирует рост эукариотических клеток, определяет доступность кислорода и питательных веществ, реагирует на стрессы в окружающей среде и регулирует продолжительность жизни [96,97]. При условии избытка питательных веществ mTORC1 способствует анаболическим процессам, тогда как ограничение питательных веществ или воздействие рапамицина или его производных ингибирует киназу mTORC1 и инициирует [96].

Среди многих функций, выполняемых mTORC1, одна из наиболее сложных включает регуляцию митохондриального гомеостаза. mTORC1 необходим биогенеза, фосфорилирования митохондриального для белков и регуляции митофагии, [98]. Кроме того, митохондриальных функция обеспечивает обратную митохондриальная связь c mTORC1. Например, АФК, генерируемые при митохондриальной деполяризации, могут влиять на передачу сигналов mTORC1 в зависимости от концентрации, низкий уровень АФК может индуцировать активность mTORC1, в то время как высокий уровень АФК репрессирует mTORC1 [96], У дрожжей (где префикс «m» в названии mTORC1 опущен) ретроградный сигнальный путь (RTG) приводит к подавлению TORC1 из-за дисфункции митохондрий, однако многие детали связи между путем mTORC1 и митохондриями остаются неясными [96].

В дрожжах S. cerevisiae рецепторные белки митофагии фосфорилируются киназами. Данный процесс облегчает взаимодействие с каркасным адаптерным белком Atg11, в дальнейшем связывая основные белки аутофагии для аутофагосом. Ha инициации образования данный момент полный молекулярный механизм ингибирования ЭТОГО фосфорилирования для митофагии неизвестен.

При индукции митофагии Atg32 фосфорилируется по остаткам Ser114 и Ser119 с помощью казеинкиназы 2 (СК2), которая является важным триггером для взаимодействия Atg32-Atg11. Хотя СК2 является конститутивно активной и распространенной киназой, Atg32 фосфорилируется только в условиях, индуцирующих митофагию (например, азотное голодание). Предполагают, что фосфорилирование Atg32 отрицательно регулируется по пока неизвестными механизмами [93].

В работе Furukawa и Kanki 2018 года была выявлена Ppg1 фосфотаза, делеция которой влияет на состояние фосфорилирования Atg32. Удаление гена *PPG1* приводит к конститутивному взаимодействию Atg32-Atg11 и ускоренной митофагии. Белковые фосфатазы PP2A (Pph21 и Pph22) и PP2A-подобные (Pph3 и Sit4) взаимодействуют с несколькими ассоциированными белками, такими как Tpd3 (каркасная субъединица) и Cdc55 / Rts1 (регуляторные субъединицы). Тем белки необходимы не менее, ЭТИ функции Ppg1 для ДЛЯ дефосфорилирования Atg32, что позволили авторам предположить, о связи Ppg1 со специфическими белками. При помощи протеомного подхода на основе масс-спектрометрии были идентифицированы белки, ассоциированные с Ppg1. Идентификация Ppg1 как негативного регулятора фосфорилирования Atg32 дополняет сведения о регуляции митофагии у дрожжей, хотя полная картина регуляции митофагии остается неясной [93].

Хотя митофагия является консервативным процессом эукариот, среди факторов митофагии млекопитающих не выявлено гомологов Atg32. Только белки комплекса Far дрожжей имеют гомолог млекопитающих, называемый STRiatin-Interacting Phosphatase And Kinase (STRIPAK) комплекс. Изучение

роли этого комплекса в митофагии может улучшить понимание этого процесса у млекопитающих [93].

Некоторые химиотерапевтические препараты вызывают митохондриальную дисфункцию, образование избыточных количеств АФК и накопление других цитотоксичных веществ. Митофагия представляет собой цитопротекторный процесс при адаптации к химиотерапевтическому медикаментозному лечению [99]. Повышенная митофагия может привести к недостаточной апоптозу клеток из-за функциональности митохондрий. Индуцированная митофагия также может стать многообещающей стратегией терапевтического вмешательства при различных видах рака. Так, два Mito-CP Mito-Metformin, митохондриально-направленных препарата, И высвобождают ULK1 из-под mTOR-опосредованного ингибирования, снижают потенциал митохондриальной мембраны и прекращают пролиферацию клеток колоректального рака посредством митофагии [99].

.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы

В работе использовали бактоагар, бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от примеси жирных кислот, дрожжевой экстракт, маннит, пептон, пероксидазу хрена, пируваткиназу, сорбит производства Becton Dickinson and Company (США); глицерин, сахарозу производства МР Biomedicals (CIIIA); ADP, ATP, CaCl₂, KCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgCl₂, NaCl, NADH, $NADP^+$, (NH₄)₂SO₄, P1,P5-Di(adenosine-5')pentaphosphate (Ap5A), аминотриазол, галактозу, глюкозу, карбонилцианид маденилаткиназу, хлорфенилгидразон (КЦХФ), конканавалин А, кумасси бриллиантовый малат, олигомицин, пальмитиновую кислоту, голубой G-250. пируват, пируваткиназу, ротенон, сафранин О, сукцинат, *трет*-бутилгидропероксид (t-ВНР), феноловый красный, фосфоенолпируват, циклоспорин А, ЭГТА, ЭДТА, Sigma-Aldrich (Германия); Dihydroethidium Трис производства (дигидроэтидиум), H₂DCF-DA (2', 7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат), Hoechst 33258, MitoSox Red, Mitotracker Green FM, Mitotracker Red CmxRos, Mitotracker Red FM, Propidium iodide (пропидиум иодид) Sytox Green производства Life Technologies (США); Amplex Red, Mdivi1 производства Cayman Chemicals (США). Na₃C₆H₅O₇ производства Химмед (Россия).

SkQ1, SkQThy и SkQT1 были синтезированы в группе Г.А. Коршуновой в институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. SkQN и MitoK3 были предоставлены К.Г. Лямзяевым, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

Модельные организмы

В работе использовали:

1) Крысы линии Wistar, самцы в возрасте 2 месяцев.

2) *Y*. lipolytica, облигатные аэробы, Дрожжи штамм. выделенный профессором Звягильской Р.А. из микрофлоры листьев пустынных растений (пустыня Негев, Израиль) и идентифицированный на основании совокупности морфологических, физиологических, биохимических характеристик И молекулярно-генетического анализа как анаморфа Y. lipolytica (Wick.) van der Walt and Arx [100].

3) Дрожжи аэробного типа обмена *D. magnusii*, штамм ВКМ-261, гигантские клетки которого являются удобной моделью для визуализации органелл в клетке с помощью флуоресцентных красителей [1].

4) Дрожжи *S. cerevisiae* дикого типа и мутанты:

- 1. мутант со свехэкспрессией *atg32* при росте на галактозе;
- 2. мутант с со сверхэкспрессией *atg32* и *atg33* при росте на галактозе;
- 3. мутант со сверхэкспрессией *fzo1*, кодирующего белок, ответственный за слияние митохондрий;
- 4. rho⁻⁻мутант, лишенный, нормально функционирующих митохондрий.

Вышеперечисленные мутанты были любезно предоставлены Д. А. Кнорре, ведущим научным сотрудником Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

Мутанты с одиночными делециями генов:

- 1. мутант с делецией гена *dnm*, продукт которого отвечает за деление митохондрий;
- 2. мутант с делецией гена *fis1*, продукт которого отвечает за деление митохондрий;
- 3. мутант с делецией гена *atg1*, продукт которого участвует в образовании преаутофагосомы;
- 4. мутант с делецией гена *atg5*, продукт которого участвует в образовании преаутофагосомы;
- 5. мутант с делецией ген*а atg8*, продукт которого отвечает за сборку фагофора;
- 6. мутант с делецией гена *atg11*, продукт которого отвечает за сборку фагофора;

- 7. мутант с делецией гена *mmn1*, продукт которого входит в состав ERMES;
- 8. мутант с делецией гена *mdm10*, продукт которого входит в состав ERMES мутант с делецией гена *mdm34*, продукт которого входит в состав ERMES, были любезно предоставлены А. И. Александровым, ведущим научным сотрудником ФИЦ биотехнологии РАН.

Условия культивирования дрожжей

Клетки дрожжей *Y. lipolytica* выращивали в 750-мл колбах Эрленмейера (рабочий объем 100 мл) при 28° С на роторной качалке (220 об/мин) на полусинтетической среде [101], содержавшей в качестве источника углерода и энергии 1,3%-ый сукцинат, и собирали в ранней экспоненциальной фазе роста (ОП_{540 нм} = 1).

Для получения псевдо-мицелиального роста клетки *Y. lipolytica* выращивали в 750-мл колбах Эрленмейера (рабочий объем 100 мл) при 28 °С на роторной качалке (220 об/мин) на среде YPD (2% бактопептон, 1% дрожжевой экстракт, 1% глюкоза, 0,2%-ый KH₂PO₄), 100 мМ цитрат, pH 7,0, клетки выращивали до поздней экспоненциальной фазы роста (ОП_{540 нм} = 3,5-4,0) [1].

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae* выращивали, как описано для других культур, на полусинтетических селективных средах, содержащих в качестве источника углерода 1%-ую глюкозу или 0,9%-ую галактозу с добавлением 0,1% глицерина, в зависимости от поставленной задачи.

Выделение митохондрий печени крысы

Митохондрии печени крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования, как описано в [102]. Использованные препараты митохондрий печени крысы соответствовали общепринятым критериям физиологической целостности, они характеризовались высокими скоростями дыхания, высокими величинами дыхательного контроля (показателя эффективности сопряжения дыхания и фосфорилирования), отношениями ADP/O, близкими к теоретически ожидаемым максимумам для изученных субстратов, и сохраняли активность в течение, по крайней мере, 5 часов (при хранении их на льду) [102].

Аналитические методы

Скорость поглощения кислорода митохондриями определяли полярографическим методом в ячейке (рабочий объём 1 мл) с закрытым кислородным электродом типа Кларка. Величины дыхательного контроля рассчитывали, как рекомендовано в [103]. Основная среда инкубации содержала 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Трис-фосфатный буфер, pH 7,2.

Потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране, регистрировали на спектрофотометре DU-650 (Beckman Coulter, CША), используя двухволновой режим (511–533 нм) с 20 мкМ сафранином О в качестве потенциалзависимого зонда [104]. Состав сред инкубаций указан в подписях к рисункам.

Набухание митохондрий регистрировали спектрофотометрически на спектрофотометре Cary 300 Bio (Varian, CША) по уменьшению оптической плотности митохондриальной суспензии при 540 нм. Основные среды инкубации были дополнены 40 мМ КСІ.

Об открытии неспецифической Са²⁺/Рн-зависимой поры в митохондриях печени крысы судили, как принято в литературе [105], по совокупности двух параметров – уменьшению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий, выделенных и инкубированных в средах без ЭГТА.

Синтез АТР митохондриями регистрировали двумя методами. Первый из них основан на небольшом сдвиге pH при превращении ADP в ATP [106], основные среды инкубации были дополнены 25 мкМ феноловым красным (pH-зависимым красителем) и все среды инкубации и добавляемых растворов были тщательно доведены до значения pH 7,1. Синтез ATP, инициированный добавлением 500 мкМ ADP, определяли спектрофотометрически на

спектрофотометре Beckman Coulter DU-650 (США), используя пару длин волн 557 и 618 нм.

Второй метод основан на сопряжении синтеза ATP с восстановлением NADP в ферментативных реакциях с участием NADP, глюкозы, гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Синтез ATP, инициированный добавлением ADP, прослеживали спектрофотометрически на спектрофотометре Varian Cary 300 Віо при длине волны 340 нм. Основная среда инкубации была дополнена 6 мкМ Ap5A (ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями (0,2 мг белка/мл).

Образование пероксида водорода митохондриями определяли флуорометрически путем измерения окисления Amplex Red до резоруфина, 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 резофурина, продукта окисления Amplex Red, измеряли при комнатной температуре с помощью спектрофлуорофотометра RF 5301 PC (Shimadzu, Япония) при длинах волн возбуждения и испускания 563 и 587 нм, соответственно. Сигналы калибровали с помощью 0–5 мкМ H₂O₂ (определено по поглощению при 240 нм).

Гибель клеток выявляли двумя различными маркерами. Клетки, собирали в ранней экспоненциальной фазе роста (ОП = 1,0). Образцы нагружали либо 1,5 мкМ пропидидий иодидом (propidium iodide, PI), либо 1 мкМ SYTOX Green Dead Cell Stain в фосфатном буфере, pH 5,5, в темноте в течение 30 мин. Метод основан на окрашивании нуклеиновых кислот, зонд проникает только в клетки с нарушенной цитоплазматической мембраной. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, CША), с лазером с длиной волны испускания 488 нм и детектором, регистрирующим флуоресценцию в красной области» [1].

Для определения ОС в дрожжах, клетки собирали в экспоненциальной фазе роста, инкубировали с *t*-BHP в течение -2 часов, после чего промывали в

50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5, и нагружали флуоресцентными зондами: H₂DCF-DA для детектирования пероксида водорода, MitoSox Red или Dihydroethidium для детектирования супероксид-анион-радикала. Измерения проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, CШA).

Для визуализации митохондрий В клетке использовали ряд MitoTracker Green FM, MitoTracker Red флуоресцентных зондов FM, MitoTracker Red CmxRos. Фрагментацию митохондрий в клетке оценивали флуоресцентной микроскопии, флуоресцентный методами используя микроскоп BX-51 (Olympus, Япония), или флуоресцентный микроскоп Axioscop 40 (Zeiss. Германия). Обработка изображений была выполнена С использованием программного обеспечения Icy bioimage software.

Для окрашивания ДНК клеток использовали Hoechst 33258.

Для **Time-lapse) микроскопии** клетки *D. magnusii* собирали В экспоненциальной фазе роста, промывали в 50 мМ фосфатном буфере, рН 5,5, и окрашивали 250 нМ MitoTracker Green FM и либо 14 мкМ H₂DCF-DA и 1 мкМ MitoSox Red в течение 30 мин. Окрашенные клетки промывали свежей порцией инкубационной среды, высевали в планшеты для микроскопии, покрытые конканавалином А, и подвергали воздействию 750 мкМ *t*-BHP. Окрашенные помощью клетки анализировали С инвертированного моторизованного микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) с системой автофокусировки PerfectFocus. Система была оснащена 100-кратным объективом Apo TIRF Oil (NA1.49) EM-CCD камерой iXonDU-897E И охлаждаемой (Andor, Великобритания) с использованием программного обеспечения NIS-Elements 4.0. Съемки проводили в течение 120 мин с интервалами от 15 сек до 3 мин. Обработку изображений выполняли с использованием программного обеспечения Icy bioimage software [1].

ЗD-реконструкция структуры митохондрий *D. magnusii.* Клетки, собранные в экспоненциальной фазе роста, инкубировали в свежей порции среды выращивания (контрольный вариант) или подвергали воздействию 150 мкМ *t*-BHP в течение 1 ч, затем промывали 50 мМ фосфатным буфером, pH 5,5

и нагружали 200 нМ MitoTracker Green FM. Окрашенные клетки анализировали с помощью инвертированного моторизованного микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) с системой автофокусировки PerfectFocus. Система была оснащена 100-кратным объективом Apo TIRF Oil (NA1.49) и охлаждаемой EM-CCD камерой iXonDU-897E (Andor, Великобритания) с использованием программного обеспечения NIS-Elements 4.0. Последовательные оптические срезы деконволюции выполняли с использованием алгоритма слепой деконволюции AutoQuant, включенного в пакет NIS-Elements. Трехмерная реконструкция была выполнена с использованием программного обеспечения Icy bioimage software [1].

Морфологию митохондрий *S. cerevisiae* оценивали методом флуоресцентной микроскопии путем последовательной съемки Z-стеков изображений с последующей деконволюцией. Клетки выращивали до ранней экспоненциальной фазы роста (ОП=1), инкубировали с действующими веществами, затем отмывали в 50 мМ PBS pH 5,5, нагружали 200 нМ MitoTracker Green FM в течение 30 мин. Съемку осуществляли с помощью системы визуализации Evos M7000 (Thermo Fisher, США) с соответствующим набором флуоресцентных кубов и моторизованным столиком. Деконволюцию проводили по алгоритму Richardson-Lucy (45 итераций), с использованием программного обеспечения Icy bioimage software.

Статистический анализ. Все эксперименты проводились минимум в трех биологических повторностях. Для классификации морфологии митохондрий в каждом испытании исследовали не менее ста клеток. Данные представлены в виде Xmean \pm SD; n = 3. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего теста ANOVA.
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 1. Дрожжевые модели для исследования динамики митохондрий

В отличие от статических органелл, митохондрии различных эукариот, от дрожжей до человека, изменяют размер и форму, подвергаясь делению и слиянию, процессам, которые управляются клеточным механизмом, состоящим белков [107]. Молекулярный механизм слияния и из динамин-подобных деления достаточно хорошо изучен. У S. cerevisiae слияние и деление антагонистически регулируются белками Fzo1 и Dnm1 [51]. Fzo1 является белком семейства митофузинов GTPa3, ответственным за слияние митохондриальной внешней мембраны. Fzo1 соединяется с Mgm1 и Ugo1 для завершения слияния митохондрий [51]. Dnm1 также является белком, связанным с динамин-подобными GTPазами, располагающийся на наружной мембране митохондрий, связывающий в комплексы Fis1, Mdv1 и Caf4, что способствует делению митохондрий [72]. Было предложено несколько механизмов, вовлекающих липиды в динамику митохондрий, в том числе кардиолипин, необходимый для слияния внутренней митохондриальной мембраны [54]. Непрерывное слияние и деление (динамика митохондрий) играют ключевую роль в поддержании целостности митохондрий [55] за счет, как полагают, сегрегации поврежденных митохондрий [56].

Обычно выращенные в аэробных условиях дрожжевые клетки содержат митохондриальный ретикулум (сеть митохондрий). Фрагментация митохондрий (потеря митохондриального ретикулума) в клетках дрожжей может быть индуцирована ОС [56,72], ингибированием электрон-транспортной цепи, мутациями митохондриальной ДНК [69], в ответ на тепловой шок [108], на экспрессию агентов, стимулирующих гибель клеток [109] как при хронологическом, так и при репликативном старении [110], в ответ на дисбаланс в обмене веществ [111,112].

Хотя *S. cerevisiae* широко используется в качестве модели эукариот для изучения различных аспектов жизнедеятельности клетки, это не самый лучший

модельный организм для исследований динамики митохондрий, поскольку они содержат мелкие, плохо структурированные митохондрии [1].

Нами были предложены другие, более перспективные модельные системы для демонстрации динамики митохондриальной сети.

Прежде всего, это дрожжи аэробного типа обмена *D. magnusii*, их гигантские клетки содержат разветвленную митохондриальную сеть, что делает их исключительно удобной моделью для визуализации митохондрий в клетке с помощью современных методов флуоресцентной микроскопии.

На Рис. 1.1. показаны различия в размерах дрожжевых клеток *D. magnusii, S. cerevisiae* и филаментозной и дрожжеподобной форм *Y. lipolytica* [1].



Другой многообещающей моделью являются облигатные аэробные дрожжи *Y. lipolytica*. Клетки способны изменять свою морфологию, в

зависимости от условий выращивания, переходя от дрожжевой формы к псевдо-мицелиальной [1]. Мы предположили, что мицелиальные клетки У. *lipolytica* будут иметь удлиненные митохондрии. Перед нами стояла задача подбора селективных сред выращивания, обеспечивающих максимальные размеры клеток дрожжей. Как правило, Y. lipolytica растет в виде смеси дрожжеподобных И коротких мицелиальных клеток. Для получения удлиненных мицелиальных клеток, их выращивали на изменённой среде YPD (2% бактопептона, 1% дрожжевого экстракта, 1,3 % сукцината, 0,2 % КН₂РО₄), дополненной 100 мМ цитратным буфером, рН 7.0, и собирали на поздней фазе экспоненциального роста (ОП $_{(590)}$ = 3,0-3,5).



Рис. 1.2. Митохондрии в норме в клетках *D. magnusii* (a) и *Y. lipolytica* (б) и фрагментация митохондриального ретикулума (*в-г*) под действием 250 мкМ *t*-BHP. Клетки окрашены 200 нМ MitoTracker Green FM.

В норме *D. magnusii* и *Y. lipolytica*, содержат митохондрии, легко выявляемые с помощью флуоресцентного зонда MitoTracker Green FM, как описано в разделе «Материалы и методы (Рис. 1.2. *a*, *б*); Обработка клеток 250 мкМ прооксидантом *t*-BHP приводила к фрагментации митохондриального ретикулума (Рис. 1.2. *в*, *г*).

Чтобы проследить динамику миохондрий в реальном времени в одиночных клетках *D. magnusii*, мы использовали Time lapse микроскопию (покадровую сьемку) (Рис. 1.3.) и систему трехмерной реконструкции (Рис. 1.4). Оба метода подтвердили представление о том, что в «нормальных» условиях клетки *D. magnusii* сохраняли митохондриальный ретикулум в течение как минимум 55-60 минут (Рис. 1.3. *a*); Митохондриальный ретикулум фрагментировался под действием прооксиданта *t*-BHP.



Рис. 1.3. Тіте Іарѕе микроскопия клеток *D. magnusii*. Клетки отмывали от среды инкубации в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5; окрашивали 200 нМ MitoTracker Green FM в течение 30 мин, затем отмывали от излишков красителя свежей порцией среды инкубации. *а)* Контрольные клетки исследовали под микроскопом в течение 50 минут с интервалом 3 мин. В клетках *б)* ОС индуцировали добавлением 150 мкМ *t*-BHP в среду инкубации. Клетки снимали в течение 9 минут с интервалом 15 сек.



В *D. magnusii* фрагментация митохондрий индуцировалась также нарушением процессов окисления и фосфорилирования, в ответ на действие разобщителя (КЦХФ) (Рис.1.5. *a*), ингибитора дыхательной цепи антимицина A, (Рис.1.5 δ) и катионного разобщителя C₄R1, ингибирующего комплекс I дыхательной цепи и синтез АТФ (Рис.1.5. *в*).



Рис. 1.5. Фрагментация митохондрий дрожжей *D. magnusii* под действием 2 мкМ КЦХФ *a*); 2 мкМ Антимицина А *б*); 1 мкМ С4R1 *в*). Клетки инкубировали с указанными веществами в течение 1 часа, отмывали в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5, и нагружали 200 нМ MitoTracker Green в течение 30 мин.

Мы полагаем, что использование дрожжей D. magnusii и Y. lipolytica, относительно простых одноклеточных организмов, быстро растущих на средах простого состава, относительно легко поддающихся изменению физиологического и генетического статуса, было бы полезным для решения проблем (см. Введение), связанных с взаимодействием между митохондриальной динамикой и митохондриальной дисфункцией, клеточным циклом, старением, митофагией и гибелью клеток.

Глава 2.1. Влияние SkQ1 и SkQThy на выделенные митохондрии печени крысы

В рамках проекта, руководимого академиком В.П. Скулачевым, был синтезирован ряд веществ семейства SkQ обладающих антиоксидантными свойствами. Ранее в лаборатории были протестированы SkQ1 и SkQT1, при этом SkQT1 проявил себя как более эффективный антиоксидант [102]. Однако SkQT1 оказался нестабильным веществом, что препятствует его использованию в качестве лекарственного препарата и делает необходимым поиск других эффективных и более стабильных митохондриально-направленных антиоксидантов.

Такое соединение – SkQThy – было синтезировано в лаборатории В.П. Скулачева (Рис. 2.1.1)





Рис. 2.1.2. SkQ1 – [10-(6-пластохинолил)] децилтрифенилфосфоний.

Было проведено сравнительное исследование SkQThy с SkQ1 (Рис. 2.1.2), ранее синтезированным и даже прошедшим клинические испытания [34,113-115].

Использованные препараты митохондрий печени крысы соответствовали общепринятым критериям физиологической целостности: характеризовались высокими скоростями дыхания, высокими (от 8 до 13) величинами дыхательного контроля при окислении NAD-зависимых субстратов.

SkQThy восстанавливался компонентами дыхательной цепи митохондрий и это восстановление блокировалось добавлением антимицина А (Рис.2.1.3).



Рис. 2.1.3. Восстановление SkQThy дыхательной цепью митохондрий печени крысы. Реакцию инициировали добавлением 10 мкМ SkQThy в нулевое время (кривые 1-3). АА-момент добавления антимицина А (1,6 мкг /мг белка) (кривые 2 и 3). Основная среда инкубации содержала 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Трис-фосфатный буфер, pH 7,2, 20 мМ Трис-сукцинат, и митохондрии (0,5 мг белка/мл).

В низких концентрациях SkQThy, как и SkQ1 и классический разобщитель КЦХФ стимулировал окисление сукцината (Рис. 2.1.4. *a*) и NADзависимых субстратов (глутамат и малат) (Рис. 2.1.4. *б*) в состоянии 4 дыхания, что формально свидетельствовало о его разобщающем эффекте, вероятнее всего, вследствие совместного транспорта с эндогенными жирными кислотами [116,117]. Важно отметить, что SkQThy и SkQ1 имели большие интервалы («окна») между концентрациями, оказывающими стимулирующее и ингибирующее действие на дыхание по сравнению с КЦХФ; для SkQThy это «окно» было больше, чем для SkQ1.



Рис. 2.1.4. Влияние различных концентраций КЦХФ (1), SkQ1 (2) и SkQThy (3) на дыхание митохондрий печени крысы в состоянии 4 при окислении сукцината *a*) или глутамата + малата δ). Основная среда инкубации содержала 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Трис-фосфатный буфер, pH 7,2. В основную среду инкубации были добавлены 0,5 мМ ЭГТА, митохондрии (5 мг/мл) и *a*) 20 мМ Трис-сукцинат + ротенон или δ) 20 мМ Трис-глутамат + 5 мМ малат. V₀ – скорость дыхания в состоянии 4 перед добавлением SkQ1 или SkQThy составляла 25 и 10 нг-атом О/мин на мг белка при окислении сукцината и глутамата + малата, соответственно.

Более высокие концентрации SkQ1 и SkQThy ингибировали дыхание митохондрий в состоянии 3 (в присутствии 0,9 мМ ADP) при окислении сукцината (Рис. 2.1.5. *a*) и NAD-зависимых субстратов (Рис. 2.1.5. *б*).



крысы. Среды инкубации, как на рис. 2.1.4. Состояние 3 дыхания инициировали добавлением 0,9 мМ АДФ. 100% соответствует скорости дыхания в состоянии 3 перед добавлением SkQ1 или SkQThy (210 и 160 нг-атом О/мин на мг белка при окислении сукцината или глутамата + малата соответственно).

SkQ1 и SkQThy (Рис. 2.1.6.) снижали мембранный потенциал в митохондриях печени крысы. Деполяризация внутренней мембраны в митохондриях с помощью SkQThy была незначительно-менее выражена по сравнению со SkQ1 при окислении NAD-зависимых субстратов.



Рис. 2.1.6. SkQThy и SkQ1 снижали мембранный потенциал митохондрий печени крысы. Основная среда инкубации, как на рис. 1.2.4, была дополнена 20 мкМ сафранином О.

разобщающие концентрации SkQThy, существенно Низкие. не усиливали деполяризующее действие пальмитиновой кислоты. На рисунке 2.1.7. а) видно, что кривая деполяризации мембраны заметно сместилась в сторону более низких концентраций пальмитиновой кислоты, оказывающих тот эффект. Точно так же, же разобщающий В присутствии пальмитата происходило значительное снижение мембранного потенциала, вызванное SkQ1 или SkQThy (Рис. 2.1.7. б-в).



При выделении и инкубации митохондрий в среде без ЭГТА имели место спонтанное снижение мембранного потенциала (Рис. 2.1.8. *a*, кривая *l*) и набухание митохондрий (Рис. 2.1.8. *б*, кривая *l*), что свидетельствует об открытии циклоспорин А-чувствительной, Ca2+-Pi-зависимой неспецифической митохондриальной поры (mPTP). Спонтанная деполяризация мембраны и набухание полностью ингибировались в присутствии 0,5 мМ ЭГТА или 1,8 мкМ ЦсАЦсА, (Рис. 2.1.8., *a-б*, кривые *2*, соответственно), 40

ингибиторами поры. SkQ1 (Рис. 2.1.8. δ , кривые 3) и SkQThy (Рис. 2.1.8 δ , кривые 4) значительно увеличили деполяризацию мембраны (Рис. 2.1.8. δ , кривые 3 и 4) и амплитуду набухания (Рис. 2.1.8. δ , кривые 3 и 4), что отражает последующее открытие mPTP. SkQ-индуцированная деполяризация мембраны (Рис. 2.1.8. a, кривые 3 и 4) и набухание (Рис. 2.1.8. δ , кривые 3 и 4) также были заингибированы ЭГТА или ЦсА. Данные, представленные на рисунке 2.1.8., свидетельствуют о том, что оба SkQ, будучи «разобщителями», как ожидалось, способствовали открытию mPTP, и SkQThy был менее активен в этом процессе, чем SkQ1.



Рис. 2.1.8. SkQ1 и SkQThy стимулировали открытие mPTP. В среде с ЭГТА или ЦсА не наблюдалось спонтанной деполяризации (a, кривая l) и набухания (b, кривая l) митохондрий; спонтанная деполяризация мембраны (a, кривая 2) и набухание (b, кривая 2) митохондрий, выделенных и инкубированных в среде без ЭГТА и ЦсА; эффект SkQ1 (a-b, кривые 3) и SkQThy (a-b, кривые 4) при спонтанной деполяризации мембраны (a) и набухании (b). Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг / мг), митохондриями (0,5 мг белка / мл) и либо (a) 20 мкМ сафранином O, либо (b) 40 мМ KCl. Где указано, добавлены 0,5 мМ ЭГТА, 1,8 мкМ ЦсА, 4 мкМ SkQ1 (a, кривая 3) или 4 мкМ SkQThy (a, кривая 4).

При анализе синтеза АТР для предотвращения открытия mPTP, основная инкубационная среда была дополнена ЭГТА, активность аденилаткиназы (ответственной за интерконверсию ATP/ADP) ингибировали добавлением Ap5A. Используемые концентрации SkQ1 и SkQThy были выбраны, исходя из их деполяризующих эффектов (0, 20, 50 и 80%)

соответственно) (Рис. 2.1.9.). Олигомицин, известный ингибитор синтеза ATP в митохондриях, был использован в качестве негативного контроля. Оба SkQ ингибировали синтез ATP в соответствии с их деполяризующим эффектом, что свидетельствует об отсутствии специфического их ингибирующего действия на синтез ATP митохондриями.



Рис. 2.1.9. Влияние SkQ1 и SkQThy на синтез АТР митохондриями печени крыс. Основная среда инкубации была дополнена, 0,5 мМ ЭГТА, 20 мМ трис-глутаматом + 5 мМ трис-малатом, Ap5A 1 мкг/мл, 20 мкМ феноловый красный и митохондрии (0,5 мг белка / мл).

Антиоксидантное действие SkQ1 и SkQThy измеряли, оценивая их влияние на продукцию пероксида водорода митохондриями, в качестве дыхательного субстрата использовали сукцинат. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ сукцинатом, 0,5 мМ ЭГТА (для ингибирования открытия mPTP) и 6 мМ аминотриазолом (для ингибирования каталазы). Оба SkQ в низких концентрациях снижали скорость генерации пероксида водорода (Рис. 2.1.10. *а*). Важно отметить, что антиоксидантный эффект SkQ1, наблюдаемый в диапазоне концентраций от 0,5 до 7,5 мкМ, при более высоких его концентрациях сменялся на активацию продукции пероксида водорода, возможно, из-за появления уже прооксидантной активности (Рис. 2.1.10. кривая *1*); напротив, антиоксидантный эффект SkQThy сохранялся BO всем (Рис. 2.1.10 исследованном диапазоне концентраций кривая 2),что

40

свидетельствует о том, что SkQThy, в отличие от SkQ1, не проявлял прооксидантную активность в используемых концентрациях. Та же тенденция имеет место при добавлении в среду инкубации 50 мкМ *t*-BHP (хорошо известный прооксидант) (Рис. 2.1.10. δ). Повышенная продукция пероксида водорода, вызванная *t*-BHP, была существенным образом снижена обоими веществами, но более высокие концентрации SkQ1 (Рис. 2.1.10. δ , кривая 1), в отличие от SkQThy (Рис. 2.1.10. δ , кривая 2) оказывали дополнительный прооксидантный эффект.



Глава 2.2. Влияние SkQ1 и SkQThy на клетки дрожжей

750 мкМ *t*-ВНР вызывал ОС и гибель клеток *Y. lipolytica* (Рис. 2.2.1.), что было определено методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентных красителей H₂DCF-DA и PI, соответственно. После окрашивания клетки разделялись на 4 популяции по уровням флуоресценции: Q1 (низкая флуоресценция обоих красителей) – живые клетки без ОС; Q2 (высокая флуоресценция DCF (продукта окисления H₂DCF-DA) и низкая флуоресценция PI) – живые клетки, подвергшиеся ОС; Q3 + Q4 (высокая флуоресценция PI) – мертвые клетки (Рис. 2.2.1.). Числа внутри Q секторов показывают процент превалирующих клеток в популяции. На рисунке 2.2.1. *а* показаны контрольные клетки без добавления прооксиданта с низким уровнем OC и клеточной гибелью. Добавление прооксиданта усиливало OC и увеличивало популяцию мёртвых клеток (Рис. 2.2.1. δ). 800 нМ SkQ1 (Рис. 2.2.1. ϵ) и 250 нМ SkQThy (Рис. 2.2.1. ϵ) вызывали снижение OC стресса и почти полное устранение гибели клеток, причем SkQThy был более эффективен, чем SkQ1, так как он ингибировал эти процессы при более низких оптимальных концентрациях.



Рис. 2.2.1. Влияние SkQ1 и SkQThy на OC и клеточную смерть клеток дрожжей *Y. lipolytica.* Клетки преинкубировали с 800 нМ SkQ1 (*в*) или 250 нМ SkQThy (*г*) в течение 1 ч., затем промывали свежей порцией среды инкубации и инкубировали с 750 мкМ *t*-BHP (*б*, *в*, *г*) в течение 2 ч. После этого клетки промывали 50 мМ фосфатным буфером, pH 5,5 и нагружали красителями H₂DCF-DA и PI в течение 30 минут. Использован метод проточной цитометрии.

Гибель дрожжевых клеток сопровождалась конденсацией хроматина (Рис. 2.2.2.), что позволяет предположить доминирование апоптоза в структуре клеточной смерти. Предварительная инкубация клеток с SkQ1 и SkQThy значительно снижала процент мертвых клеток и клеток с конденсированным хроматином.



Рис. 2.2.2. Влияние SkQ1 и SkQThy на конденсацию хроматина и клеточную смерть дрожжей *Y. lipolytica*. Клетки преинкубировали с 800 нам SkQ1 или 500 нМ SkQThy в течение 30 мин., затем инкубировали с 750 мкМ *t*-BHP в течение 60 мин.; нагружали 2 мкМ PI и Hoechst 33258 (5 мкг/мл) в течение 30 мин.

В норме клетки *D. magnusii* имеют разветвленным митохондриальным ретикулумом (Рис. 2.2.3. *а*). Однако под действием *t*-BHP происходило нарушение целостности митохондриального ретикулума и фрагментация митохондрий (Рис. 2.2.3. б). В контрольном опыте было показано, что SkQ1 и SkQThy сами по себе не влияли на жизнеспособность и морфологию митохондрий дрожжей. Предварительная инкубация дрожжевых клеток с 800 нМ SkQ1 (Рис. 2.2.3. в) или 250 нМ SkQThy (Рис. 2.2.3. г) предотвращали t-ВНР-индуцированную фрагментацию митохондрий. Более того, инкубация клеток с уже фрагментированными митохондриями (рис. 2.2.3. б) с 800 нМ SkQ1 (Рис. 2.2.3. д) или 250 нМ SkQThy (Рис. 2.2.3. е) приводила к восстановлению митохондриального ретикулума, причем SkQThy ДЛЯ оптимальная действующая концентрация была ниже, чем для SkQ1.



Рис. 2.2.3. Фрагментация митохондрий дрожжей *D. magnusii* под действием *t*-BHP и защитный эффект SkQ1 и SkQThy *a*) контрольные клетки; δ) клетки после инкубации с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2 часов; *в*) предварительная инкубация с 800 нМ SkQ1 в течение 1 часа и последующая инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2х часов; *г*) предварительная инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2x часов; *г*) предварительная инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2x часов; *г*) предварительная инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2x часов; *г*) инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2-х часов и последующая инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2-х часов и последующая инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2-х часов и последующая инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 1 часа; *е*) предварительная инкубация с 250 мкМ *t*-BHP в течение 1 часа.

SkQThy, как и другие митохондрильно-направленные антиокиданты семейства SkQ [34], транспортируется и накапливается в клетках и митохондриях в соответствии с мембранным потенциалом, генерируемым на

цитоплазматической или митохондриальной мембранах. В результате его концентрация в митохондриях должна увеличиться на несколько порядков по сравнению с начальной [117]. Более того, для SkQThy отмечается более высокий коэффициент распределения между мембраной и водной фазой по сравнению с другими исследованными SkQ [34], что может способствовать дальнейшему повышению концентрации SkQThy в митохондриях. SkQThy, как и другие члены семейства SkQ, может быть эффективно восстановлен дыхательной цепью митохондрий (Рис. 2.1.3.).

Накопление SkQThy в митохондриях за счет мембранного потенциала деполяризует мембрану, подавляя тем самым выработку АФК дыхательной цепью и снижая движущую силу накопления катиона, обеспечивая тем самым защиту митохондрий от коллапса мембранного потенциала [113,114,116,117].

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.

Глава 3.1. Влияние SkQN и MitoK3 на энергетические параметры изолированных митохондрий печени крысы

Согласно литературным данным, раковые клетки обладают более высоким уровнем эндогенного окислительного стресса по сравнению с нормальными здоровыми клетками [118,119]. Повышенная продукция АФК и повышенные уровни окисленной ДНК и продуктов перекисного окисления липидов были обнаружены в клинических образцах крупных опухолей [120]. Более того, уровни ферментов антиоксидантной защиты были значительно повышены в первичных раковых тканях [121], что свидетельствует об адаптации раковых клеток к окислительному стрессу. При умеренных уровнях АФК способствуют образованию и развитию опухоли путем модулирования различных сигнальных путей, в то время как при высоких уровнях АФК повреждение, наносимое ими, может ограничивать рост опухоли.

Хиноны могут подвергаться одноэлектронному восстановлению С образованием семихиноновых радикалов, которые реагируют с кислородом с образованием супероксид-анион радикала. Природные и синтетические производные прооксиданта 1,4-нафтохинона широко изучаются в качестве противоопухолевых препаратов, убивающих раковые клетки в основном за счет стимуляции выработки АФК [122,123]. Производные 1,4-нафтохинона были эффективны против клеток рака легких [124], а 2-метокси-1,4-нафтохинон [125] и 5,7-диметокси-1,4-нафтохинон [126] – против некоторых видов рака. Наиболее изученный 2-метил-1,4-нафтохинон (менадион) обладал сильной противоопухолевой активностью в отношении различных типов опухолей [127,128], особенно в сочетании его с аскорбатом [129,130] и другими химиотерапевтическими средствами [131].

Митохондрии являются основным источником АФК в опухолевых клетках [132,133]. Поэтому одним из наиболее перспективных направлений в создании новых противоопухолевых терапевтических препаратов является адресное воздействие на митохондрии. Эффекты различных окислительновосстановительных агентов, включая производные 1,4-нафтохинона, крайней опосредованы, по мере, частично, компонентами электронтранспортной цепи митохондрий, способной к одноэлектронному восстановлению хинонов [134]. В целом, общепризнанно, что влияние на окислительно-восстановительный метаболизм митохондрий может быть многообещающей стратегией противораковой фармакологии. В соответствии с этой концепцией были разработаны различные катионные агенты, накапливающиеся преимущественно в митохондриях опухолевых клеток [135]. Большинство из них содержат катион трифенилфосфония (ТРР⁺), который был введен В.П. Скулачевым и коллегами в лабораторную практику в конце 60-х годов [136]. Одним из первых агентов, нацеленных на митохондрии с использованием ТРР⁺, был хинон MitoQ [43], который может быть

54

восстановлен дыхательной цепью, и обладает сильной антиоксидантной активностью в низких дозах, но в высоких концентрациях может усиливать выработку АФК и действовать как прооксидант [137]. Следуя этому подходу, производное (MitoK3) митохондриально-направленное менадиона было недавно синтезировано путем конъюгирования ТРР⁺ и алифатического линкера в положении -C3 кольца нафтохинона [138]. Показано, что MitoK3 индуцирует разрушение разных линий раковых клеток с различной эффективностью. MitoK3 накапливается в изолированных митохондриях печени крыс, используя мембранный потенциал в качестве движущей силы и снижая величину дыхательного контроля. Авторы предположили, модификация что нафтохинонового кольца менадиона влияла на его окислительновосстановительные свойства и что механизмы цитотоксического действия менадиона и MitoK3 были различными [139].

В попытке улучшить прооксидантную активность митохондриальнонаправленных нафтохинонов в лаборатории биоэнергетики клетки института Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского был синтезирован 1,4нафтохинон, конъюгированный с ТРР + (SkQN). По сравнению с MitoK3 это соединение является более активным окислительно-восстановительным согласно более агентом, электрохимическим измерениям, И реакционноспособным в качестве электрофила из-за отсутствия метильной группы в нафтохиноновом кольце. Структурные формулы SkQN и MitoK3 показаны на рисунке 3.1.1.



Рис. 3.1.1. Структурные формулы *a*) SkQN - [10- (1,4-диоксо-1,4-дигидронафталин-2-ил)децил]трифенилфосфоний и б) MitoK3 - [10-(3-метил-1,4-диокси-1,4-дигидронафталин-2-ил) децил] трифенилфосфоний.

исследовано влияние SkQN и MitoK3 на функциональные Было параметры выделенных митохондрий печени крысы. Показано, что оба вещества SkQN и MitoK3 восстанавливаются компонентами дыхательной цепи митохондрий (Рис.3.1.2.). Антимицин А, ингибитор комплекса III дыхательной цепи, полностью ингибировал этот процесс. Это предполагает возможность многократного действия SkQN И MitoK3, что крайне полезно при использовании в терапевтических целях.



Рис. 3.1.2. Восстановление SkQN (а) и MitoK3 (б) дыхательной цепью митохондрий. Среда инкубации содержала: 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Tris-фосфатный буфер, pH 7,2, 0,5 мМ ЭГТА, 20 мМ Tris-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка), митохондрии (0,5 мг белка/мл). АА – антимицин А.

Для выявления прооксидантного действия SkQN и MitoK3 мы напрямую измеряли продукцию пероксида водорода выделенными митохондриями печени крысы, в качестве субстрата дыхания использовался сукцинат (Рис. 3.1.3.). Оба вещества в низких (даже наномолярных) увеличивали генерацию митохондриями пероксида водорода, то есть проявляли прооксидантный

эффект, при этом прооксидантный эффект SkQN был выше, чем у MitoK3 в тех же концентрациях.



Рис. 3.1.3. Прооксидантное действие SkQN и MitoK3 на изолированные митохондрии печени крысы. Основная среда инкубации была дополнена 6 мМ аминотриазолом, 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 м.е.), 20 мМ Tris-глутаматом + 5 мМ Tris-малатом, митохондриями (0,25 мг белка/мл).

SkQN и MitoK3 в относительно низких концентрациях (до 10 и 15 мкМ, соответственно) стимулировали дыхание в состоянии 4 (Рис. 3.1.4.), что является формальным признаком того, что они являются разобщителями, однако в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА) связывающего жирные кислоты, стимулирующего действия не наблюдалось.



SkQN и MitoK3 вызывали деполяризацию внутренней митохондриальной мембраны при окислении сукцината и глутамата+малата (Рис. 3.1.5.). Концентрация, вызывающая 50%-е снижение мембранного потенциала митохондрий для SkQN была ниже, чем для MitoK3, следовательно, SkQN обладал более выраженным деполяризующим действием, чем MitoK3.



Рис. 3.1.5. Влияние SkQN и MitoK3 на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы. Основная среда инкубации была дополнена 1,8 мкМ циклоспорином A, 20 мкМ сафранином O и либо 20 мМ Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг/мг белка) (*a*), либо20 мМ глутаматом + 5 мМ малатом (*б*).

SkQN и MitoK3 усиливали деполяризующее действие жирных кислот (Рис. 3.1.6.). Кривая зависимости величины мембранного потенциала от концентрации пальмитата, сдвигалась в сторону более низких концентраций при добавлении MitoK3 и особенно SkQN.



SkQN и MitoK3 только в высоких концентрациях ингибировали дыхание в состоянии 3 (Рис. 3.1.7.), что свидетельствует об отсутствии специфического ингибирования комплексов дыхательной цепи.



гис. 5.1.7. Блияние SkQN (*a*) и Мпок**S** (*b*) на состояние 5 дыхания изолированных **митохондрий печени крысы.** Основная среда инкубации дополнена Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг/мг белка) и 900 нМ ADP.

SkQN и MitoK3 промотировали открытие mPTP, о чем судили по двум параметрам – снижению мембранного потенциала и набуханию митохондрий (см. материалы и методы), что показано на рисунках 3.1.8 и 3.1.9, соответственно.



Рис. 3.1.8. Действие SkQN (*a*) и MitoK3 (*б*) на мембранный потенциал митохондрии печени крысы в среде без ЭГТА или ЦсА. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг / мг), митохондриями (0,5 мг белка / мл) и 20 мкМ сафранином О.



Рис. 3.1.9. Действие SkQN и MitoK3 на набухание митохондрий печени крысы в среде без ЭГТА или ЦсА. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг / мг), митохондриями (0,5 мг белка /мл) и 40 мМ KCl.

SkQN и MitoK ингибировали синтез ATP, их ингибирующий эффект находился в строгом соответствии с деполяризующей активностью (Рис. 60

3.1.10.), что свидетельствуют об отсутствии специфического воздействия на синтез АТР.



Рис.3.1.10. Влияние SkQN (*a*) и MitoK3 (*б*) на синтез АТР митохондриями печени крысы, окисляющими сукцинат. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг / мг), 1 мМ NADP, 1,8 мкМ циклоспорином A, 6 мкМ Ap5A, 1 мМ глюкозой, гексокиназой (10 м.е./мл), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (3 м.е./мл) и митохондриями (0,5 мг белка /мл).

Таким образом, SkQN и MitoK3 были способны восстанавливаться компонентами дыхательной цепи митохондрий и проявляли прооксидантное действие в изученном диапазоне концентраций. В низких (10 мкМ) концентрациях SkQN и MitoK3 стимулировали дыхание в состоянии 4; снижали генерируемый внутренней мембране потенциал, на митохондрий; ингибировали синтез АТР в строгом соответствии с их деполяризующей активностью; промотировали открытие неспецифической Ca²⁺/P_н - зависимой циклоспорин-А-чувствительной митохондриальной поры (перечисленные эффекты были обусловлены их взаимодействием с жирными кислотами); снижали скорость дыхания в состоянии 3 только в высоких концентрациях;

Глава 3.2. Влияние SkQN и MitoK3 на клетки дрожжей

Комплексное исследования влияния SkQN и MitoK3 на функциональные параметры выделенных митохондрий показало их прооксидантное действие. Далее мы исследовали их влияние на клетки дрожжей *D. magnusii* методом проточной цитометрии. С помощью двойного окрашивания Dihydroethidium (DHE) зондом на анион радикал и Sytox Green зондом на клеточную смерть (см. раздел Материалы и методы) тестировали развитие окислительного стресса и гибель клеток. Для сравнения использовали *t*-BHP.

Найдено, что после инкубации дрожжей с SkQN, MitoK3 и *t*-BHP можно было выделить три популяции клеток по уровням флуоресценции: Q1 (низкая флуоресценция Sytox Green и DHE) – живые клетки без окислительного стресса, Q2 (высокая флуоресценция DHE и низкая флуоресценция Sytox Green) – живые клетки, подвергшиеся окислительному стрессу, Q3 (высокая флуоресценция обоих красителей) – мертвые клетки. Числа внутри Q секторов показывают процент превалирующих клеток в популяции (Рис. 3.2.1. *a*).



Рис. 3.2.1. Действие *t*-BHP, SkQN и MitoK3 на OC и гибель клеток дрожжей *D. magnusii*. Клетки инкубировали с действующими веществами в течение 2 часов, затем отмывали в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5, нагружали красителями 5 мкг/мл DHE и 5 мкМ SytoxGreen в течение 30 минут. Использован метод проточной цитометрии. *a)* Цифрами обозначен процент клеток в популяции: Q1 – живые клетки без OC стресса, Q2 – живые клетки с OC, Q3+Q4 - мертвые клетки б) данные проточной цитометрии, представленные в виде гистограмм

Эффективность митохондриально-направленных SkQN и MitoK3 по сравнению с классическим прооксидантом *t*-BHP гораздо выше, они действуют в более низких концентрациях. SkQN был более эффективным прооксидантом, как и в исследовании на выделенных митохондриях (Рис. 3.2.1.*б*). Таким образом, SkQN и MitoK3 могут рассматриваться как эффективные митохондриально-направленные прооксиданты.

Инкубация дрожжей *D. magnusii* в течение 2х часов с SkQN вызывала нарушение целостности митохондриального ретикулума, фрагментацию митохондрий, MitoK3 нарушал целостность и самих митохондрий (Рис. 3.2.2.).



Рис. 3.2.2. Морфология митохондрий дрожжей *D. magnusii:* контроль *(a),* инкубация клеток в течение 2х часов с 15 мкМ SkQN (б) и 15 мкМ MitoK3 (в). После инкубации клетки отмывали в 50 мМ фосфатном буфере pH 5,5 и нагружали 200 нМ MitoTracker Green.

Использование новых прооксидантов, нацеленных на митохондрии, было бы многообещающей стратегией противоопухолевой терапии [139]. Это было НИИ A.H. Белозерского подтверждено коллегами ИЗ ИМ. (доктора биологических наук группой Б.В. Черняка). Показан цитотоксичный эффект SkQN на культуры нормальных и опухолевых клетках человека. Инкубация клеток с различными концентрациями SkQN в течение 24 ч вызывала дозозависимый эффект в диплоидных подкожных фибробластах человека, в иммортализованных кератиноцитах человека, которые широко используются в качестве полунормальной модельной линии в исследованиях гомеостаза эпителия кожи, в клеточной линии карциномы предстательной железы человека DU145, и в клеточной линии карциномы легких человека А549. Исключительно

высокая чувствительность наблюдалась на клеточной линии рабдомиосаркомы человека [139].

Глава 4. Развитие окислительного стресса и связь с и фрагментацией митохондрий

В литературе описывается большое количество попыток отследить судьбу АФК в клетках. На клеточных моделях СНО (клеточная линия из яичников китайского хомячка) показано, что в присутствии пальмитата уровень липотоксичности супероксида повышается уже через 2 часа, а уровень других АФК возрастает лишь при длительной инкубации; увеличение уровня перекиси водорода наблюдали после 12 и 16 часов воздействия пальмитата [140]. Авторы выдвинули гипотезу о том, что ранняя генерация супероксида, вероятно, является пусковым механизмом для последующей амплификации АФК (образование перекиси водорода) [140].

В настоящее время преобладает точка зрения, что митохондрии являются основной инициаторной органеллой, ответственной за генерализацию активных кислорода в клетке [24,48,50]. Механизмы, лежащие в форм основе распространения окислительного стресса внутри клетки, находятся в фокусе внимания исследователей более 15 лет. Было высказано и затем доказано предположение, что индуцированный OC запускает распространение окислительного стресса в соседних митохондриях по принципу АФКиндуцированного выброса $A\Phi K$ (ROS-induced ROS release, RIRR) и затем освобождение образовавшихся АФК в цитозоль. Было предложено несколько моделей RIRR [141-144], однако большая часть исследований была проведена на кардиомиоцитах, специфических клетках, в которых большая часть митохондрий плотно упакована между миофибриллами, образуя высокоупорядоченную сеть, в результате чего митохондрии практически лишены динамики (слияния и деления). Очевидно, что кардиомиоциты не являются лучшей моделью для изучения взаимодействия окислительного стресса и митохондриальной динамики. Дрожжи D. magnusii, в отличие от

65

миоцитов, могут рассматриваться как типичная эукариотическая клетка, в которой свободно движущиеся митохондрии подвергаются делению и слиянию. Более того, благодаря гигантским размерам и простоте визуализации митохондрий в этих клетках появляется возможность проанализировать большое количество индивидуальных клеток современными методами проточной цитометрии и Time-lapse микроскопии (см. раздел Материалы и методы).

С помощью зонда MitoSox Red можно оценить OC, возникающий в митохондриях [145], а по окислению зонда H₂DCF-DA – генерализованный OC в клетке. MitoSox Red и H_2DCF -DA, выбранные в качестве индикаторов супероксид-анион радикала и пероксида водорода соответственно, не столь MitoSox Red. специфичны in vivo. митохондриально-направленный флуоресцентный зонд, окисляется не только супероксид-анион радикалом О2-, но и другими АФК [146]. При гибели клетки и нарушении ее целостности, что часто бывает при сильном OC, MitoSox Red перемещается в ядро, продукты окисления MitoSox Red могут интеркалировать в ДНК и двухцепочечную РНК [147], увеличивая флуоресценцию зонда в несколько раз. И лишь при сохранении целостности митохондриальной мембраны MitoSox Red может надежно тестировать митохондриальные АФК, главным образом супероксид-Поэтому в контрольных экспериментах были подобраны анион радикал. оптимальные концентрации MitoSox Red (1 мкМ), H₂DCF-DA (15 мкМ), t-BHP 750 (250)ИЛИ мкМ) И оптимальная допустимая продолжительность экспериментов. Флуоресценция окисленного MitoSox Red во всех экспериментах оценивалась лишь в течение 80 минут, пока не происходило колокализации MitoSox Red и Hoechst-33342 (маркер ядер) в клетках, подвергшихся ОС (Рис. 4.1.). Таким образом, при оптимальных условиях эксперимента 1 мкМ MitoSox Red выборочно детектировал митохондриальный OC.

Краситель H₂DCF-DA не является митохондриально-направленным. Попадая в клетку, он подвергается расщеплению внутриклеточными

66

эстеразами, теряя при этом способность проникать через мембраны, т.е. секвестрируется и, по-видимому, оказывается равномерно распределен в цитоплазме. Окисляясь, его флуоресценция многократно возрастает. Поскольку флуоресценция DCF коррелирует с образованием пероксида водорода и OC, его можно считать индикатором внутриклеточного генерализованного окислительного стресса.



Рис. 4.1. Локализация MitoSox Red, DCF и Hoechst-33342 в контрольных клетках *D. magnusii* (верхняя панель) и в клетках, подвергающихся OC (нижняя панель). Клетки, собранные в фазе экспоненциального роста, промывали 50 мМ фосфатным буфером, pH 5,5, и нагружали 15 мкМ H₂DCF-DA (зеленая флуоресценция), 1 мкМ MitoSox Red (красная флуоресценция) и 5 мкг/мл Hoechst-33342 (синяя флуоресценция) в течение 30 мин; затем промывали свежей порцией инкубационной среды и добавляли 750 мкМ *t*-BHP. Окрашенные клетки исследовали под микроскопом каждые 20 минут.

Клетки *D. magnusii*, инкубировали в темноте, чтобы избежать чрезмерной фотоактивации MitoSox Red и автоактивации DCF. Окрашенные клетки исследовали с использованием двух независимых методов: проточной цитометрии и Time-lapse микроскопии.

Показано, что в контрольной пробе без добавления прооксиданта флуоресценция DCF находилась на низком уровне, на протяжении всего опыта, флуоресценция MitoSox Red так же не увеличивалась, но была выше, возможно отражая естественную продукцию AФK во время работы дыхательной цепи (Puc. 4.2.).



OC. индуцированный *t*-BHP, первоначально развивался только В митохондриях. Продукция АФК в митохондриях, детектируемая с помощью MitoSox Red, предшествовала появлению клетках дрожжей В генерализованного ОС, детектируемого с помощью DCF. Генерализованный ОС экспоненциально возрастал, но после длительного лаг периода (4.2.б.). Аналогичные результаты были получены с помощью Time-lapse микроскопии (4.3. а, б).



Для снижения окислительного стресса SkQ1, ΜЫ использовали эффективный заряженный митохондриально-направленный положительно антиоксидант, действующий в низких концентрациях (см. главы -2.1, 2.2). Предварительная инкубация дрожжевых клеток с SkQ1 приводила к существенному снижению продукции АФК митохондриями (рис. 4.4. *a*), при этом лишь незначительно ослабляя генерализованный ОС (рис. 4.4. б).



Рис. 4.4. Влияние SkQ1 на изменение в интенсивности флуоресценции во времени MitoSox Red (*a*) и DCF (*б*) в условиях OC. Клетки *D. magnusii* предварительно инкубировали с 800 нМ SkQ1 в течение 1 ч., отмывали 50 мМ фосфатным буфером pH 5,5 и нагружали 1 мкМ MitoSox Red and 15 мкМ H₂DCF-DA в течение 30 мин., вновь отмывали и помещали в среду выращивания с 750 мкМ *t*-BHP. Time-lapse микроскопия.

Митохондрии в клетке являются динамическими структурами, постоянно подвергаясь слиянию и делению. Митохондриально-направленный краситель MitoSox Red накапливался в митохондриях D. magnusii и позволял, помимо уровня митохондриальных АФК, наблюдать и морфологию митохондрий дрожжей. Слабая изначальная флуоресценция красителя позволяет следить и за динамикой митохондрий, и за OC (Рис. 4.3.). В контрольной пробе митохондриальный ретикулум сохранялся на протяжении всего эксперимента. В образце, инкубированном с прооксидантом, наблюдалась постепенная фрагментация митохондрий в клетках с течением времени, что сопровождалось увеличением уровня флуоресценции митохондриально-направленного красителя и DCF (Рис. 4.4.). Анализ более 100 индивидуальных клеток для образца внутри каждого одного эксперимента, показал, что BO всех увеличение флуоресценции DCF исследованных клетках красителя (распространение генерализованного окислительного стресса) имело место строго после завершения фрагментации митохондрий (Рис. 4.5.).



Рис. 4.5. Распределение по времени фрагментации митохондрий и генерализованного ОС в индивидуальных клетках *D. magnusii* в присутствии 750 мкМ *t*-ВНР. *a*) Красные шары – момент наступления полной фрагментации митохондрий в отдельной клетке, каждому красному шару соответствует зеленый шар – момент наступления генерализованного ОС в этой же клетке. *б*) Количественная оценка различий во времени фрагментации митохондрий и генерализации ОС.

За момент полной фрагментации митохондрий принимали момент времени, после которого в клетке не наблюдалось образования удлиненных митохондрий. Таким образом, фрагментация митохондрий является событием, строго предшествующим генерализации окислительного стресса, и, возможно, его необходимым условием.

4 основных вывода: 1) ОС, индуцированный *t*-BHP, Были сделаны первоначально развивался только в митохондриях, возникая почти сразу после контакта с прооксидантом; 2) Генерализация ОС имела длительный лаг-период 3) предварительная инкубация клеток с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 существенно снижала продукцию АФК митохондриями, незначительно снижая генерализованный OC; 4) фрагментация лишь митохондрий всегда предшествовала генерализованному ОС и, вероятнее всего, была связана с образованием митохондриальных АФК. Последние три наблюдения сделаны впервые, тем самым подчеркивая не только адекватность дрожжевых моделей для изучения клеточной биоэнергетики, но И ИХ преимущества перед другими моделями.

Глава 5. Митофагия и ОС в дрожжах Saccharomyces cerevisiae

Целью этой части работы было проследить взаимосвязь между ОС и митофагией. Как известно, митофагия является основным элементом контроля качества и количества митохондрий [148]. Дрожжи, в частности S. cerevisiae, удобной моделью для изучения являются молекулярных механизмов митофагии благодаря хорошей изученности генома, транскриптома и протеома, относительной простоте строения, быстроте и дешевизне генетических манипуляций, многочисленных белков-ортологов наличию человека, доступности мутантов. Группами под руководством Д.А. Кнорре, ведущего научного сотрудника НИИ им А.Н. Белозерского, и А.И. Александрова, лабораторией молекулярной генетики ведущего сотрудника института Биохимии им. А.Н. Баха, была собрана коллекция дрожжей S. cerevisiae с изменениями в экспрессии белков митофагии.

В литературе описано влияние различных факторов стресса на клетки дрожжей *S. cerevisiae* и их взаимосвязь с фрагментацией митохондрий, некоторые из которых весьма противоречивы [148]. Мы обратили внимание на то, что в большинстве этих исследований клетки выращивали на глюкозе в качестве источника углерода и энергии, т.е. в условиях так называемой глюкозной репрессии [149], при которой митохондрии теряют большую часть своих функций, в том числе и энергозапасающую, что может искажать результаты.

Мы показали, что клетки *S. cerevisiae* дикого типа (штамм W303), растущие в условиях глюкозной репрессии, были более устойчивы к окислительному стрессу, индуцированному прооксидантом *t*-BHP (Рис. 5.1. a, δ). Более того, клетки rho-, лишенные функциональных митохондрий и растущие исключительно за счет гликолиза, были еще более устойчивы к действию прооксиданта (Рис. 5.1. e).

72


Рис. 5.1. ОС и клеточная смерть дрожжей *S. cerevisiae* (дикий штамм и мутант rho⁻), выращенных на разных субстратах. *a*) штамм W303, выращенный на 1%-ой галактозе; *б*) штамм W303, выращенный на 2%-ой глюкозе. *в*) штамм W303 rho-, выращенный на 2%-ой глюкозе. Клетки, собранные в ранней логарифмической фазе роста, инкубировали с *t*-ВНР в течение 2 часов, затем отмывали от прооксиданта в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5, нагружали красителями 5 мкг/мл DHE и 10 мкМ Sytox Green в течение 30 минут. Затем клетки отмывали от красителей и исследовали на проточном цитометре. Представлены гистограммы.

Для изучения взаимосвязи митофагии с фрагментации митохондрий и дрожжей к ОС дрожжи S. cerevisiae устойчивостью выращивали на несбраживаемых субстратах (глицерин + галактоза), что предполагает обязательное участие митохондрий в энергоснабжении клетки (Рис. 5.2.). Для ингибирования фрагментации митохондрий были использованы штаммы дрожжей S. cerevisiae W303 dnm1 Δ (Рис. 5.2. б) с делецией гена, кодирующего белок, ответственный за фрагментацию митохондрий, и штамм W303 (дикого типа), который преинкубировали с блокатором митохондриального деления Mdivi1 (Рис. 5.2. в). В качестве индуктора ОС использовали прооксидант t-BHP. ОС и клеточную смерть детектировали методом проточной цитометрии, используя красители DHE, маркер на внутриклеточные активные формы кислорода, прежде всего на супероксид-анион радикал), и Sytox Green (маркер на клеточную смерть). Клетки разделялись на три популяции по уровням флуоресценции красителей. Клетки с низким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствовали популяции живых клеток, не подверженных окислительному стрессу (отмечено зеленым). Высокая флуоресценция DHE и низкая флуоресценция Sytox Green соответствовала популяции живых клеток, подверженных окислительному стрессу (отмечено желтым). Популяция с высоким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствовала мертвым клеткам (отмечено красным) (Рис. 5.2.).

Под действием *t*-BHP дрожжи W303 *dnm1* Δ (Рис. 5.2. *б*) и W303, преинкубированные с Mdivi1, ингибитором деления митохондрий (Рис. 5.2. *в*), показывали более высокий уровень ОС и клеточной смерти, чем клетки дикого типа W303 (Рис. 5.2. *а*), что указывает на важную роль фрагментации митохондрий для устойчивости к ОС.



Рис. 5.2. Влияние фрагментации митохондрий на устойчивость к окислительному стрессу дрожжей *S. cerevisiae a*) W303 (контрольный штамм); *б*) W303 *dnm*1 Δ *в*) W303, преинкубированный с Mdivi1 (50 мкМ, 30 минут). Клетки выращивали на модифицированной среде YPD (1%-ый пептон, 0,5%-ый дрожжевой экстракт, 0,8%-ая галактоза, 0,2%-ый глицерин) до ранней экспоненциальной фазы роста. К клеткам добавляли 750 мкМ *t*-BHP в течение 1,5 ч, после чего отмывали в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5 и нагружали 5 мкг/мл DHE и 10 мкМ Sytox Green в течение 30 минут. Затем клетки отмывали от красителей и исследовали на проточном цитометре.

Более выраженный эффект от добавки Mdivi1 по сравнению с делецией гена *dnm1* может быть объяснен неспецифичностью действия ингибитора Mdivi1, который, как известно [56], ингибирует также образование пероксисом.

Далее исследовали роль белков митофагии Atg32 и Atg33 в устойчивости к ОС, вызванному прооксидантом *t*-BHP. Atg32 – митохондриальный белок наружной мембраны митохондрий, необходимый для инициации митофагии; является рецептором и связывает белок аутофагии Atg11 и убиквитинподобный белок Atg8 на поверхности митохондрий [88]. Atg33 – белок, специфичный для митофагии, и не требуется для других видов аутофагии, присутствует у грибов, но не у других высших эукариот [150]. ОС тестировали с помощью флуоресцентного зонда DHE. Оценка окислительного стресса проводилась на основе измерений медианы флуоресценции DHE. Сверхэкспрессия гена (под галактозным промотером) белка Atg32 приводила к незначительному снижению устойчивости к окислительному стрессу (Рис. 5.3. а, б), вызванному прооксидантом, позволяя заключить, что сама по себе сверхэкспрессия Atg32 не влияет на процесс митофагии. Мутант со сверхэкспрессией и Atg32, и Atg33, проявлял большую устойчивость к окислительному стрессу, вызванному прооксидантом. Кроме того, фоновая продукция АФК была в 5 раз ниже, чем в контрольном штамме (Рис. 5.3. *a*, *b*).



Рис. 5.3. ОС в клетках *S. cerevisiae* дикого типа и мутантов со сверхэкспрессией белков миотофагии Atg32, и Atg33. *a*) W303 – контрольный штамм *б*) W303 Pgal-*atg32* (сверхэкспрессия *atg32* на галактозе) *в*) W303 Pgal-*atg32* Pgal-*atg33* (сверхэкспрессия *atg32* и *atg33* на галактозе). Клетки выращивали на модифицированной среде YPD (1%-ый пептон, 0,5%-ый дрожжевой экстракт, 0,8%-ая галактоза, 0,2%-ый глицерин) до ранней экспоненциальной фазы роста. Клетки инкубировали с 750 мкМ *t*-BHP в течение 1,5 ч. После этого клетки отмывали в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5 и нагружали 5 мкг/мл DHE в течение 30 минут. Затем клетки отмывали от красителя и исследовали на проточном цитометре.

Дрожжи с делецией гена *atg8*, кодирующего белок, участвующий в образовании фагофора, не имели окислительного стресса и клеточной смерти в контроле (Рис. 5.4. *a*). В присутствии прооксиданта *t*-BHP, значительно возрастала клеточная смерть, что свидетельствует о фундаментальной роли белка в поддержании жизнедеятельности клетки и защитной функции митофагии при ОС.

Клетки со сверхэкспрессией *atg11*, продукт которого участвует в доставке Cargo (внутриклеточные компоненты, подлежащие удалению) к месту деградации, имели высокий уровень ОС и в норме, и особенно в присутствии прооксиданта (Рис. 5.4. *б*).



Рис. 5.4. ОС и клеточная смерть дрожжей *S. cerevisiae* дикого типа и мутантов по некоторым белкам митофагии. *a*) W303 $atg8\Delta$ *б*) W303 Pgal-atg11 (сверхэкспрессия atg11 на галактозе). Клетки в ранней логарифмической фазе роста инкубировали с *t*-BHP в течение 2 часов, затем отмывали от прооксиданта в 50 мМ фосфатном буфере, pH 5,5, нагружали 5 мкг/мл DHE и 10 мкМ Sytox Green в течение 30 минут. Затем клетки отмывали от красителя и исследовали на проточном цитометре.

Таким образом, нами показано, что изменения в процессе митофагии влияют на устойчивость дрожжевых клеток к ОС.

Для некоторых исследованных вариантов с одиночными делециями генов митофагии были получены 3D модели митохондриальных структур в норме и в присутствии прооксиданта.

Показано, что ОС, вызванный *t*-BHP, приводил к фрагментации митохондрий и митофагии (тестировали по уменьшению массы митохондрий, выявляемых с помощью MitoTracker Green) в клетках *S. cerevisiae*, выращенных на галактозе (Puc. 5.8.).



Рис. 5.8. Морфология митохондрий (3D модели) *S. cerevisiae* в норме (*a*) и в присутствии прооксиданта 750 мкМ *t*-ВНР (*б*). Митохондрии выявляли с помощью 200 нМ MitoTracker Green. 3D-реконструкция митохондриальных структур.

Фрагментация митохондрий является необходимым этапом митофагии в клетках млекопитающих. Для дрожжей этот вывод не столь однозначен. Мутанты с делециями белков Fis1, Dnm1 (Puc. 5.9.), ответственных за деление митохондрий, ожидаемо сохраняли хорошо развитый митохондриальный ретикулум, а ОС не вызывал его полной фрагментации, но при этом изменял структуру митохондрий. Мутанты, лишенные белков Atg1 и Atg8 (Puc. 5.9.), участвующих на различных стадиях образования фагофора, обладали развитым митохондриальным ретикулумом, но, в отличие от контрольного штамма, не теряли его в присутствии *t*-BHP. Штамм с делецией *atg5* (Puc. 5.9.) в норме имел фрагментированные митохондрии.



Рис. 5.9. Морфология митохондрий (3D-реконструкция) мутантов *S. cerevisiae* с делецией генов, участвующих в митофагии (*dnm1*Δ, *fis1*Δ, *atg5*Δ, *atg8*Δ) в норме и в присутствии прооксиданта 750 мкМ *t*-BHP. Митохондрии выявляли при помощи 200 нМ MitoTracker Green

Мутанты, лишенные белков Atg1 и Atg11 (Рис.5.10.), участвующие на различных стадиях образования фагофора, обладали хорошо развитым митохондриальным ретикулумом, но, в отличие от контрольного штамма, не теряли его в присутствии *t*-BHP.



Для определения роли эндоплазматического ретикулума в митофагии у дрожжей мы исследовали мутанты *S. cerevisiae*, лишенные белков Mmm1, Mdm10 и Mdm34, входящие в комплекс ERMES (endoplasmic reticulummitochondria encounter structure), связывющий энндоплазматический ретикулум (ЭР) и митохондрии. Удаление белков комплекса ERMES вызывало усиленную митофагию в условиях ОС (Рис. 5.11.). Тем самым подтверждено, что белки ERMES, в особенности, Mdm10, необходимы для поддержания нормальной структуры митохондрий. Митофагия у дрожжей происходит даже при ингибировании митохондриального деления.



Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фрагментация митохондрий дрожжей может нести защитную функцию при ОС. Обнаружены неизвестные факты о перекрестной связи митофагии со структурой и динамикой митохондрий дрожжей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе было показано и детально изучено влияние окислительного стресса на клетки дрожжей аэробного типа обмена. Исследовано действие митохондриально-направленного SkQThy нового антиоксиданта на биоэнергетические параметры выделенных митохондрий и морфологию митохондрий в дрожжевых клетках. Показана его эффективность как антиоксиданта и отсутствие прооксидантного действия во всем диапазоне исследованных концентраций, что крайне важно для перспективного терапевтического препарата.

Исследован новый митохондриально-направленный препарат SkQN, показано его прооксидантное действие. Проведено сравнительное исследование SkQN с другим митохондриально-направленным прооксидантом MitoK3. Показано, что сами по себе митохондриальные прооксиданты не являются разобщителями, деполяризующими агентами, ингибиторами синтеза АТР или «открывателями» неспецифической разобщающее поры, a их И деполяризующее действие обусловлены взаимодействием c жирными кислотами. В клетках дрожжей SkQN и MitoK3 индуцировали OC, приводящий к фрагментации митохондрий и частичной гибели клеток. На основании полученных данных можно полагать, что SkQN и MitoK3 могут быть перспективными агентами в борьбе с раковыми заболеваниями.

В дрожжах *D. magnusii,* имеющих в норме разветвленный митохондриальный ретикулум, обладающих активной митохондриальной динамикой, и полноценной дыхательной цепью, показано развитие ОС в клетке. Фрагментация митохондрий всегда предшествовала генерализованному ОС и, вероятно, была связана с внутримитохондриальными АФК. Предварительная инкубация клеток с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 снижала интенсивность окислительного стресса.

Изучено влияние различных белков митофагии на устойчивость дрожжей к окислительному стрессу. Митофагия у дрожжей происходит даже при ингибировании митохондриального деления. Показано, что белки ERMES, в

82

особенности Mdm10, необходимы для поддержания нормальной структуры митохондрий. Полученные данные свидетельствуют о том, что фрагментация митохондрий дрожжей может нести защитную функцию при ОС или нарушениях функции митохондрий.

Таким образом, изучение митофагии, развития ОС и клеточной смерти на простых моделях эукариотической клетки важно для более полного понимания протекания данных процессов в высших организмах при различных заболеваниях.

выводы

1) SkQThy является наиболее эффективный 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-BHP. SkQN вызывал фрагментацию митохондрий в то время как MitoK3 вызывал боле 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, лишенные белков Atg1, Atg8 и Atg11, участвующих в образовании фагофора, были устойчивы к окислительному стрессу, сохраняя митохондриальный ретикулум.

84

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rogov A. G., Ovchenkova A. P., Goleva T. N., Kireev I. I., Zvyagilskaya R. A. New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors // Anal Biochem. – 2017. – Vol. S0003-2697. – P. 30161-30166.

 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 Detrimental Effects of Benzalkonium Chloride // Oxid Med Cell Longev. – 2020. – Vol. 2020. – P. 8956504.

3. Barbouti A., Vasileiou P. V. S., Evangelou K., Vlasis K. G., Papoudou-Bai A., Gorgoulis V. G., Kanavaros P. Implications of Oxidative Stress and Cellular Senescence in Age-Related Thymus Involution // Oxid Med Cell Longev. – 2020. – Vol. 2020. – P. 7986071.

4. Goleva T., Rogov A., Zvyagilskaya R. Molecular Hall marks and Yeast Models // Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism. – 2017. – Vol. 7. – P. 394-401.

5. Zhang X., Wang W. A., Jiang L. X., Liu H. Y., Zhang B. Z., Lim N., Li Q. Y., Huang F. D. Downregulation of RBO-PI4KIIIalpha Facilitates Abeta42 Secretion and Ameliorates Neural Deficits in Abeta42-Expressing Drosophila // J Neurosci. – 2017. – Vol. 37, № 19. – P. 4928-4941.

6. Zhang Y., Zhang M., Zhu W., Yu J., Wang Q., Zhang J., Cui Y., Pan X., Gao X., Sun H. Succinate accumulation induces mitochondrial reactive oxygen species generation and promotes status epilepticus in the kainic acid rat model // Redox Biol. -2020. - Vol. 28. - P. 101365.

7. Weidinger A., Kozlov A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction // Biomolecules. – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 472-484.

Dai D. F., Chiao Y. A., Marcinek D. J., Szeto H. H., Rabinovitch P. S. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan // Longev Healthspan. – 2014. – Vol. 3. – P. 6.

9. Scheibye-Knudsen M., Fang E. F., Croteau D. L., Wilson D. M., 3rd, Bohr V. A.
Protecting the mitochondrial powerhouse // Trends Cell Biol. – 2015. – Vol. 25, № 3.
– P. 158-170.

10. Rhee S. G. Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling // Science. – 2006. – Vol. 312, № 5782. – P. 1882-1883.

11. Conti V., Izzo V., Corbi G., Russomanno G., Manzo V., De Lise F., Di Donato A., Filippelli A. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases // Front Pharmacol. – 2016. – Vol. 7. – P. 24.

12. Funada C., Tanino N., Fukaya M., Mikajiri Y., Nishiguchi M., Otake M., Nakasuji H., Kawahito R., Abe F. SOD1 mutations cause hypersensitivity to high-pressure-induced oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae // Biochim Biophys Acta Gen Subj. – 2022. – Vol. 1866, N_{2} 2. – P. 130049.

13. de Mello Barros Pimentel M. V., Bertolami A., Fernandes L. P., Barroso L. P., Castro I. A. Could a lipid oxidative biomarker be applied to improve risk stratification in the prevention of cardiovascular disease? // Biomed Pharmacother. – 2023. – Vol. 160. – P. 114345.

14. Tan B. L., Norhaizan M. E., Liew W. P., Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases // Front Pharmacol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1162.

15. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // Redox Biol. – 2017. – Vol. 11. – P. 613-619.

16. Zhu X., Wei Y., Yang B., Yin X., Guo X. The mitohormetic response as part of the cytoprotection mechanism of berberine : Berberine induces mitohormesis and mechanisms // Mol Med. – 2020. – Vol. 26, $N_{\rm P}$ 1. – P. 10.

17. Scialò F., Sriram A., Fernández-Ayala D., Gubina N., Lõhmus M., Nelson G., Logan A., Cooper H. M., Navas P., Enríquez J. A., Murphy M. P., Sanz A.

Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan // Cell Metab. – 2016. – Vol. 23, № 4. – P. 725-734.

18. Tan B. L., Norhaizan M. E., Huynh K., Heshu S. R., Yeap S. K., Hazilawati H., Roselina K. Water extract of brewers' rice induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activation of caspase-3 and caspase-8 and downregulates the Wnt/beta-catenin downstream signaling pathway in brewers' rice-treated rats with azoxymethane-induced colon carcinogenesis // BMC Complement Altern Med. – 2015. - Vol. 15. - P. 205.

19. Liu Z., Zhou T., Ziegler A. C., Dimitrion P., Zuo L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications // Oxid Med Cell Longev. – 2017. – Vol. 2017. – P. 2525967.

20. Gómez J., Mota-Martorell N., Jové M., Pamplona R., Barja G. Mitochondrial ROS production, oxidative stress and aging within and between species: Evidences and recent advances on this aging effector // Exp Gerontol. – 2023. – Vol. 174. – P. 112134.

21. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? // Adv Exp Med Biol. – 2012. – Vol. 942. – P. 93-136.

22. Cogliati S., Enriquez J. A., Scorrano L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality // Trends Biochem Sci. – 2016. – Vol. 41, № 3. – P. 261-273.

23. Chistiakov D. A., Sobenin I. A., Revin V. V., Orekhov A. N., Bobryshev Y. V.
Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria // Biomed Res Int.
2014. – Vol. 2014. – P. 238463.

24. Georgieva E., Ivanova D., Zhelev Z., Bakalova R., Gulubova M., Aoki I. Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of "Free Radical Diseases" // Anticancer Res. – 2017. – Vol. 37, № 10. – P. 5373-5381.

25. Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cell Signal. – 2012. – Vol. 24, N_{2} 5. – P. 981-990.

26. Jelic M. D., Mandic A. D., Maricic S. M., Srdjenovic B. U. Oxidative stress and its role in cancer // J Cancer Res Ther. – 2021. – Vol. 17, № 1. – P. 22-28.

27. Michel C. I., Holley C. L., Scruggs B. S., Sidhu R., Brookheart R. T., Listenberger L. L., Behlke M. A., Ory D. S., Schaffer J. E. Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress // Cell Metab. – 2011. – Vol. 14, $N_{\rm P}$ 1. – P. 33-44.

28. Eckmann J., Eckert S. H., Leuner K., Muller W. E., Eckert G. P. Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration // Int J Biochem Cell Biol. – 2013. – Vol. 45, No 1. – P. 76-80.

29. Brookheart R. T., Michel C. I., Listenberger L. L., Ory D. S., Schaffer J. E. The non-coding RNA gadd7 is a regulator of lipid-induced oxidative and endoplasmic reticulum stress // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284, № 12. – P. 7446-7454.

30. Borradaile N. M., Buhman K. K., Listenberger L. L., Magee C. J., Morimoto E.
T., Ory D. S., Schaffer J. E. A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death // Mol Biol Cell. – 2006. – Vol. 17, № 2. – P. 770-778.

31. Berliner J. L., Fujii H. Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels // Science. – 1985. – Vol. 227, № 4686. – P. 517-519.

32. Tang Z., Wang P., Dong C., Zhang J., Wang X., Pei H. Oxidative Stress Signaling Mediated Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy // Oxid Med Cell Longev. – 2022. – Vol. 2022. – P. 5913374.

33. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J Gerontol. – 1956. – Vol. 11, № 3. – P. 298-300.

34. Feniouk B. A., Skulachev V. P. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Mitochondria-Targeted Antioxidants // Curr Aging Sci. – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 41-48.

35. Larsen F. J., Schiffer T. A., Weitzberg E., Lundberg J. O. Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides // Free Radic Biol Med. – 2012. – Vol. 53, № 10. – P. 1919-1928.

36. Bandy B., Davison A. J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? // Free Radic Biol Med. – 1990. – Vol. 8, N_{2} 6. – P. 523-539.

37. Itsara L. S., Kennedy S. R., Fox E. J., Yu S., Hewitt J. J., Sanchez-Contreras M., Cardozo-Pelaez F., Pallanck L. J. Oxidative stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations // PLoS Genet. – 2014. – Vol. 10, N_{2} 2. – P. e1003974.

38. Kennedy S. R., Salk J. J., Schmitt M. W., Loeb L. A. Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage // PLoS Genet. – 2013. – Vol. 9, N_{2} 9. – P. e1003794.

39. Oyewole A. O., Birch-Machin M. A. Mitochondria-targeted antioxidants // Faseb
j. - 2015. - Vol. 29, № 12. - P. 4766-4771.

40. Severina, II, Severin F. F., Korshunova G. A., Sumbatyan N. V., Ilyasova T. M., Simonyan R. A., Rogov A. G., Trendeleva T. A., Zvyagilskaya R. A., Dugina V. B., Domnina L. V., Fetisova E. K., Lyamzaev K. G., Vyssokikh M. Y., Chernyak B. V., Skulachev M. V., Skulachev V. P., Sadovnichii V. A. In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: thymoquinone and its cationic derivatives // FEBS Lett. – 2013. – Vol. 587, № 13. – P. 2018-2024.

41. Burns R. J., Smith R. A., Murphy M. P. Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix // Arch Biochem Biophys. – 1995. – Vol. 322, $N_{\rm P}$ 1. – P. 60-68. 42. Smith R. A., Porteous C. M., Coulter C. V., Murphy M. P. Selective targeting of

an antioxidant to mitochondria // Eur J Biochem. – 1999. – Vol. 263, N_{2} 3. – P. 709-716.

43. Kelso G. F., Porteous C. M., Coulter C. V., Hughes G., Porteous W. K., Ledgerwood E. C., Smith R. A., Murphy M. P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, N_{2} 7. – P. 4588-4596.

44. Green D. E. The electromechanochemical model for energy coupling in mitochondria // Biochim Biophys Acta. – 1974. – Vol. 346, N_{2} 1. – P. 27-78.

45. Silachev D. N., Plotnikov E. Y., Zorova L. D., Pevzner I. B., Sumbatyan N. V., Korshunova G. A., Gulyaev M. V., Pirogov Y. A., Skulachev V. P., Zorov D. B. Neuroprotective Effects of Mitochondria-Targeted Plastoquinone and Thymoquinone in a Rat Model of Brain Ischemia/Reperfusion Injury // Molecules. -2015. -Vol. 20, $N_{2} 8. -P. 14487-14503.$

46. Vais V. B., Vangeli I. M., Bakeeva L. E. Ultrastructural changes in ageing lacrimal gland in Wistar rats // Bull Exp Biol Med. – 2014. – Vol. 157, № 2. – P. 268-272.

47. Stefanova N. A., Muraleva N. A., Skulachev V. P., Kolosova N. G. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 // J Alzheimers Dis. – 2014. – Vol. 38, N_{2} 3. – P. 681-694.

48. Michalska B. M., Kwapiszewska K., Szczepanowska J., Kalwarczyk T., Patalas-Krawczyk P., Szczepański K., Hołyst R., Duszyński J., Szymański J. Insight into the fission mechanism by quantitative characterization of Drp1 protein distribution in the living cell // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 8122.

49. Oliver D., Reddy P. H. Dynamics of Dynamin-Related Protein 1 in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases // Cells. – 2019. – Vol. 8, № 9.

50. Escobar-Henriques M., Anton V. Mitochondrial Surveillance by Cdc48/p97: MAD vs. Membrane Fusion // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21, № 18.

51. Dong F., Zhu M., Zheng F., Fu C. Mitochondrial fusion and fission are required for proper mitochondrial function and cell proliferation in fission yeast // Febs j. – 2022. – Vol. 289, № 1. – P. 262-278.

52. Tagaya M., Arasaki K. Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane // Adv Exp Med Biol. – 2017. – Vol. 997. – P. 33-47.

53. Yen J. H., Huang H. S., Chuang C. J., Huang S. T. Activation of dynamin-related protein 1 - dependent mitochondria fragmentation and suppression of osteosarcoma by cryptotanshinone // J Exp Clin Cancer Res. – 2019. – Vol. 38, № 1. – P. 42.

54. Pokorna L., Cermakova P., Horvath A., Baile M. G., Claypool S. M., Griac P., Malinsky J., Balazova M. Specific degradation of phosphatidylglycerol is necessary

for proper mitochondrial morphology and function // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1857, № 1. – P. 34-45.

55. Khan I. A., Ning G., Liu X., Feng X., Lin F., Lu J. Mitochondrial fission protein MoFis1 mediates conidiation and is required for full virulence of the rice blast fungus Magnaporthe oryzae // Microbiol Res. – 2015. – Vol. 178. – P. 51-58.

56. Lefevre S. D., Kumar S., van der Klei I. J. Inhibition of peroxisome fission, but not mitochondrial fission, increases yeast chronological lifespan // Cell Cycle. – 2015. – Vol. 14, № 11. – P. 1698-1703.

57. Lin J., Duan J., Wang Q., Xu S., Zhou S., Yao K. Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cardiometabolic Disease // Front Cardiovasc Med. – 2022. – Vol. 9. – P. 917135.

58. Hu Y., Chen H., Zhang L., Lin X., Li X., Zhuang H., Fan H., Meng T., He Z., Huang H., Gong Q., Zhu D., Xu Y., He P., Li L., Feng D. The AMPK-MFN2 axis regulates MAM dynamics and autophagy induced by energy stresses // Autophagy. – 2021. - Vol. 17, No 5. - P. 1142-1156.

59. Sidarala V., Zhu J., Levi-D'Ancona E., Pearson G. L., Reck E. C., Walker E. M., Kaufman B. A., Soleimanpour S. A. Mitofusin 1 and 2 regulation of mitochondrial DNA content is a critical determinant of glucose homeostasis // Nat Commun. – 2022. - Vol. 13, No 1. - P. 2340.

60. Puri R., Cheng X. T., Lin M. Y., Huang N., Sheng Z. H. Mul1 restrains Parkinmediated mitophagy in mature neurons by maintaining ER-mitochondrial contacts // Nat Commun. -2019. - Vol. 10, N 1. - P. 3645.

61. Huang D., Liu M., Jiang Y. Mitochonic acid-5 attenuates TNF-alpha-mediated neuronal inflammation via activating Parkin-related mitophagy and augmenting the AMPK-Sirt3 pathways // J Cell Physiol. – 2019. – Vol. 234, № 12. – P. 22172-22182.
62. Frezza C., Cipolat S., Martins de Brito O., Micaroni M., Beznoussenko G. V., Rudka T., Bartoli D., Polishuck R. S., Danial N. N., De Strooper B., Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion // Cell. – 2006. – Vol. 126, № 1. – P. 177-189.

63. Cogliati S., Frezza C., Soriano M. E., Varanita T., Quintana-Cabrera R., Corrado M., Cipolat S., Costa V., Casarin A., Gomes L. C., Perales-Clemente E., Salviati L., Fernandez-Silva P., Enriquez J. A., Scorrano L. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency // Cell. – 2013. – Vol. 155, No 1. – P. 160-171.

64. Patten D. A., Wong J., Khacho M., Soubannier V., Mailloux R. J., Pilon-Larose K., MacLaurin J. G., Park D. S., McBride H. M., Trinkle-Mulcahy L., Harper M. E., Germain M., Slack R. S. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand // Embo j. – 2014. – Vol. 33, № 22. – P. 2676-2691.

65. MacVicar T., Langer T. OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it // J Cell Sci. – 2016. – Vol. 129, № 12. – P. 2297-2306.

66. Anand R., Wai T., Baker M. J., Kladt N., Schauss A. C., Rugarli E., Langer T. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission // J Cell Biol. – 2014. – Vol. 204, N_{2} 6. – P. 919-929.

67. Higuchi-Sanabria R., Charalel J. K., Viana M. P., Garcia E. J., Sing C. N., Koenigsberg A., Swayne T. C., Vevea J. D., Boldogh I. R., Rafelski S. M., Pon L. A. Mitochondrial anchorage and fusion contribute to mitochondrial inheritance and quality control in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae // Mol Biol Cell. – 2016. – Vol. 27, No 5. – P. 776-787.

68. Delerue T., Tribouillard-Tanvier D., Daloyau M., Khosrobakhsh F., Emorine L. J., Friocourt G., Belenguer P., Blondel M., Arnauné-Pelloquin L. A yeast-based screening assay identifies repurposed drugs that suppress mitochondrial fusion and mtDNA maintenance defects // Dis Model Mech. – 2019. – Vol. 12, No 2.

69. Toyama E. Q., Herzig S., Courchet J., Lewis T. L., Jr., Losón O. C., Hellberg K., Young N. P., Chen H., Polleux F., Chan D. C., Shaw R. J. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress // Science. – 2016. – Vol. 351, No 6270. – P. 275-281.

70. Wikstrom J. D., Israeli T., Bachar-Wikstrom E., Swisa A., Ariav Y., Waiss M., Kaganovich D., Dor Y., Cerasi E., Leibowitz G. AMPK regulates ER morphology

and function in stressed pancreatic β -cells via phosphorylation of DRP1 // Mol Endocrinol. – 2013. – Vol. 27, No 10. – P. 1706-1723.

71. Mishra P., Chan D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics // J Cell
Biol. – 2016. – Vol. 212, № 4. – P. 379-387.

72. Wang I. H., Chen H. Y., Wang Y. H., Chang K. W., Chen Y. C., Chang C. R. Resveratrol modulates mitochondria dynamics in replicative senescent yeast cells // PLoS One. -2014. - Vol. 9, No 8. - P. e104345.

73. Keskin A., Akdoğan E., Dunn C. D. Evidence for Amino Acid Snorkeling from a High-Resolution, In Vivo Analysis of Fis1 Tail-Anchor Insertion at the Mitochondrial Outer Membrane // Genetics. -2017. - Vol. 205, No 2. - P. 691-705.

74. Koirala S., Guo Q., Kalia R., Bui H. T., Eckert D. M., Frost A., Shaw J. M. Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – Vol. 110, № 15. – P. E1342-1351.

75. Byrne K. P., Wolfe K. H. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species // Genome Res. -2005. - Vol. 15, No 10. - P. 1456-1461.

76. Rogov A. G., Ovchenkova A. P., Goleva T. N., Kireev, II, Zvyagilskaya R. A. New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors // Anal Biochem. – 2018. – Vol. 552. – P. 24-29.

77. Lee J., Choi J. A., Cho S. N., Son S. H., Song C. H. Mitofusin 2-Deficiency Suppresses Mycobacterium tuberculosis Survival in Macrophages // Cells. – 2019. – Vol. 8, № 11.

78. Shah S. I., Paine J. G., Perez C., Ullah G. Mitochondrial fragmentation and network architecture in degenerative diseases // PLoS One. -2019. - Vol. 14, No 9. - P. e0223014.

79. Reddy P. H., Reddy T. P., Manczak M., Calkins M. J., Shirendeb U., Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases // Brain Res Rev. -2011. - Vol. 67, N 1-2. - P. 103-118.

80. Joshi A. U., Ebert A. E., Haileselassie B., Mochly-Rosen D. Drp1/Fis1-mediated mitochondrial fragmentation leads to lysosomal dysfunction in cardiac models of Huntington's disease // J Mol Cell Cardiol. – 2019. – Vol. 127. – P. 125-133.

81. Joshi A. U., Minhas P. S., Liddelow S. A., Haileselassie B., Andreasson K. I., Dorn G. W., 2nd, Mochly-Rosen D. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration // Nat Neurosci. – 2019. – Vol. 22, N_{2} 10. – P. 1635-1648.

82. Wu W., Zhao D., Shah S. Z. A., Zhang X., Lai M., Yang D., Wu X., Guan Z., Li J., Zhao H., Li W., Gao H., Zhou X., Qiao J., Yang L. OPA1 overexpression ameliorates mitochondrial cristae remodeling, mitochondrial dysfunction, and neuronal apoptosis in prion diseases // Cell Death Dis. – 2019. – Vol. 10, No 10. – P. 710.

83. Trevisan T., Pendin D., Montagna A., Bova S., Ghelli A. M., Daga A. Manipulation of Mitochondria Dynamics Reveals Separate Roles for Form and Function in Mitochondria Distribution // Cell Rep. – 2018. – Vol. 23, $N_{\rm P}$ 6. – P. 1742-1753.

84. Mamaev D. V., Zvyagilskaya R. A. Mitophagy in Yeast // Biochemistry (Mosc).
2019. – Vol. 84, № Suppl 1. – P. S225-s232.

85. Murphy M. P., Smith R. A. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2007. – Vol. 47. – P. 629-656.

86. Furukawa K., Innokentev A., Kanki T. Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast // Front Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – P. 1479.

87. Youle R. J., Narendra D. P. Mechanisms of mitophagy // Nat Rev Mol Cell Biol.
2011. – Vol. 12, № 1. – P. 9-14.

88. Kanki T., Furukawa K., Yamashita S. Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1853, № 10 Pt B. – P. 2756-2765.

89. Furukawa K., Innokentev A., Kanki T. Mitophagy regulation mediated by the Far complex in yeast // Autophagy. – 2021. – Vol. 17, № 4. – P. 1042-1043.

90. Kumar R., Reichert A. S. Common Principles and Specific Mechanisms of Mitophagy from Yeast to Humans // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, № 9.

91. Shen Z. F., Li L., Zhu X. M., Liu X. H., Klionsky D. J., Lin F. C. Current opinions on mitophagy in fungi // Autophagy. – 2022. – P. 1-11.

92. Huang Y. J., Klionsky D. J. Yeast mitophagy: Unanswered questions // Biochim Biophys Acta Gen Subj. – 2021. – Vol. 1865, № 8. – P. 129932.

93. Furukawa K., Kanki T. Mitophagy in Yeast: A Screen of Mitophagy-Deficient Mutants // Methods Mol Biol. – 2018. – Vol. 1759. – P. 95-104.

94. Wang B., Nie J., Wu L., Hu Y., Wen Z., Dong L., Zou M. H., Chen C., Wang D.
W. AMPKalpha2 Protects Against the Development of Heart Failure by Enhancing Mitophagy via PINK1 Phosphorylation // Circ Res. – 2018. – Vol. 122, № 5. – P.
712-729.

95. Wei H., Liu L., Chen Q. Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1853, № 10 Pt B. – P. 2784-2790.

96. Ma Y., Moors A., Camougrand N., Dokudovskaya S. The SEACIT complex is involved in the maintenance of vacuole-mitochondria contact sites and controls mitophagy // Cell Mol Life Sci. – 2019. – Vol. 76, № 8. – P. 1623-1640.

97. Laplante M., Sabatini D. M. mTOR signaling in growth control and disease // Cell. – 2012. – Vol. 149, № 2. – P. 274-293.

98. Ruetenik A., Barrientos A. Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1847, № 11. – P. 1434-1447.

99. Guan Y., Wang Y., Li B., Shen K., Li Q., Ni Y., Huang L. Mitophagy in carcinogenesis, drug resistance and anticancer therapeutics // Cancer Cell Int. – 2021.
– Vol. 21, № 1. – P. 350.

100. Zvyagilskaya R., Andreishcheva E., Soares M. I., Khozin I., Berhe A., Persson B. L. Isolation and characterization of a novel leaf-inhabiting osmo-, salt-, and alkalitolerant Yarrowia lipolytica yeast strain // J Basic Microbiol. – 2001. – Vol. 41, N_{2} 5. – P. 289-303. 101. Andreishcheva E. N., Isakova E. P., Sidorov N. N., Abramova N. B., Ushakova N. A., Shaposhnikov G. L., Soares M. I., Zvyagilskaya R. A. Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast Yarrowia lipolytica // Biochemistry (Mosc). – 1999. – Vol. 64, N_{2} 9. – P. 1061-1067.

102. Rogov A. G., Goleva T. N., Trendeleva T. A., Ovchenkova A. P., Aliverdieva D. A., Zvyagilskaya R. A. New Data on Effects of SkQ1 and SkQT1 on Rat Liver Mitochondria and Yeast Cells // Biochemistry (Mosc). – 2018. – Vol. 83, N_{2} 5. – P. 552-561.

103. Chance B., Williams G. R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation // Nature. – 1955. – Vol. 175, № 4469. – P. 1120-1121.

104. Akerman K. E., Wikstrom M. K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential // FEBS Lett. – 1976. – Vol. 68, № 2. – P. 191-197.

105. Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M. A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target // Febs j. – 2006. – Vol. 273, № 10. – P. 2077-2099.

106. Zharova T. V., Vinogradov A. D. Requirement of medium ADP for the steadystate hydrolysis of ATP by the proton-translocating Paracoccus denitrificans Fo.F1-ATP synthase // Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol. 1757, № 5-6. – P. 304-310.

107. Chen H., Chan D. C. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission // Hum Mol Genet. – 2005. – Vol. 14 Spec No. 2. – P. R283-289.

108. Lewandowska A., Gierszewska M., Marszalek J., Liberek K. Hsp78 chaperone functions in restoration of mitochondrial network following heat stress // Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol. 1763, № 2. – P. 141-151.

109. Kissová I., Plamondon L. T., Brisson L., Priault M., Renouf V., Schaeffer J., Camougrand N., Manon S. Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy, and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast // J Biol Chem. – 2006. – Vol. 281, N_{2} 47. – P. 36187-36197.

110. Aerts A. M., Zabrocki P., François I. E., Carmona-Gutierrez D., Govaert G., Mao C., Smets B., Madeo F., Winderickx J., Cammue B. P., Thevissen K. Ydc1p ceramidase triggers organelle fragmentation, apoptosis and accelerated ageing in yeast // Cell Mol Life Sci. – 2008. – Vol. 65, № 12. – P. 1933-1942.

111. Peyta L., Jarnouen K., Pinault M., Guimaraes C., Pais de Barros J. P., Chevalier S., Dumas J. F., Maillot F., Hatch G. M., Loyer P., Servais S. Reduced cardiolipin content decreases respiratory chain capacities and increases ATP synthesis yield in the human HepaRG cells // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1857, N_{2} 4. – P. 443-453.

112. Yi J. K., Xu R., Jeong E., Mileva I., Truman J. P., Lin C. L., Wang K., Snider J., Wen S., Obeid L. M., Hannun Y. A., Mao C. Aging-related elevation of sphingoid bases shortens yeast chronological life span by compromising mitochondrial function // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, No 16. – P. 21124-21144.

113. Goleva T. N., Rogov A. G., Korshunova G. A., Trendeleva T. A., Mamaev D.
V., Aliverdieva D. A., Zvyagilskaya R. A. SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant // Mitochondrion. – 2019. – Vol. 49. – P. 206-216.

114. Skulachev V. P., Anisimov V. N., Antonenko Y. N., Bakeeva L. E., Chernyak
B. V., Erichev V. P., Filenko O. F., Kalinina N. I., Kapelko V. I., Kolosova N. G.,
Kopnin B. P., Korshunova G. A., Lichinitser M. R., Obukhova L. A., Pasyukova E.
G., Pisarenko O. I., Roginsky V. A., Ruuge E. K., Senin, II, Severina, II, Skulachev
M. V., Spivak I. M., Tashlitsky V. N., Tkachuk V. A., Vyssokikh M. Y.,
Yaguzhinsky L. S., Zorov D. B. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial
approach // Biochim Biophys Acta. – 2009. – Vol. 1787, № 5. – P. 437-461.

115. Skulachev V. P., Antonenko Y. N., Cherepanov D. A., Chernyak B. V., Izyumov D. S., Khailova L. S., Klishin S. S., Korshunova G. A., Lyamzaev K. G., Pletjushkina O. Y., Roginsky V. A., Rokitskaya T. I., Severin F. F., Severina, II, Simonyan R. A., Skulachev M. V., Sumbatyan N. V., Sukhanova E. I., Tashlitsky V. N., Trendeleva T. A., Vyssokikh M. Y., Zvyagilskaya R. A. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs) // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1797, N_{2} 6-7. – P. 878-889. 116. Severin F. F., Severina, II, Antonenko Y. N., Rokitskaya T. I., Cherepanov D. A., Mokhova E. N., Vyssokikh M. Y., Pustovidko A. V., Markova O. V., Yaguzhinsky L. S., Korshunova G. A., Sumbatyan N. V., Skulachev M. V., Skulachev V. P. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107, N_{2} 2. – P. 663-668.

117. Sukhanova E. I., Trendeleva T. A., Zvyagilskaya R. A. Interaction of yeast mitochondria with fatty acids and mitochondria-targeted lipophilic cations // Biochemistry (Mosc). -2010. - Vol. 75, No 2. - P. 139-144.

118. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROSmediated mechanisms: a radical therapeutic approach? // Nat Rev Drug Discov. – 2009. – Vol. 8, № 7. – P. 579-591.

119. Moloney J. N., Cotter T. G. ROS signalling in the biology of cancer // Semin Cell Dev Biol. – 2018. – Vol. 80. – P. 50-64.

120. Kumar B., Koul S., Khandrika L., Meacham R. B., Koul H. K. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype // Cancer Res. -2008. - Vol. 68, No 6. - P. 1777-1785.

121. Murawaki Y., Tsuchiya H., Kanbe T., Harada K., Yashima K., Nozaka K., Tanida O., Kohno M., Mukoyama T., Nishimuki E., Kojo H., Matsura T., Takahashi K., Osaki M., Ito H., Yodoi J., Murawaki Y., Shiota G. Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer // Cancer Lett. – 2008. – Vol. 259, № 2. – P. 218-230.

122. Redaelli M., Mucignat-Caretta C., Isse A. A., Gennaro A., Pezzani R., Pasquale R., Pavan V., Crisma M., Ribaudo G., Zagotto G. New naphthoquinone derivatives against glioma cells // Eur J Med Chem. – 2015. – Vol. 96. – P. 458-466.

123. Vafai S. B., Mevers E., Higgins K. W., Fomina Y., Zhang J., Mandinova A., Newman D., Shaw S. Y., Clardy J., Mootha V. K. Natural Product Screening Reveals Naphthoquinone Complex I Bypass Factors // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 9. – P. e0162686.

124. Zhang Y., Luo Y. H., Piao X. J., Shen G. N., Wang J. R., Feng Y. C., Li J. Q., Xu W. T., Zhang Y., Zhang T., Wang C. Y., Jin C. H. The design of 1,4-

naphthoquinone derivatives and mechanisms underlying apoptosis induction through ROS-dependent MAPK/Akt/STAT3 pathways in human lung cancer cells // Bioorg Med Chem. -2019. - Vol. 27, No 8. - P. 1577-1587.

125. Ong J. Y., Yong P. V., Lim Y. M., Ho A. S. 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK signaling pathways // Life Sci. – 2015. – Vol. 135. – P. 158-164.

126. Li K., Wang B., Zheng L., Yang K., Li Y., Hu M., He D. Target ROS to induce apoptosis and cell cycle arrest by 5,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivative // Bioorg Med Chem Lett. – 2018. – Vol. 28, № 3. – P. 273-277.

127. Badave K. D., Khan A. A., Rane S. Y. Anticancer Vitamin K3 Analogs: A Review // Anticancer Agents Med Chem. – 2016. – Vol. 16, № 8. – P. 1017-1030.

128. Ivanova D., Zhelev Z., Getsov P., Nikolova B., Aoki I., Higashi T., Bakalova R. Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect // Redox Biol. – 2018. – Vol. 16. – P. 352-358.

129. Tremante E., Santarelli L., Lo Monaco E., Sampaoli C., Ingegnere T., Guerrieri R., Tomasetti M., Giacomini P. Sub-apoptotic dosages of pro-oxidant vitamin cocktails sensitize human melanoma cells to NK cell lysis // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, N_{2} 31. – P. 31039-31049.

130. Ren X., Santhosh S. M., Coppo L., Ogata F. T., Lu J., Holmgren A. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress // Free Radic Biol Med. – 2019. – Vol. 134. – P. 350-358.

131. Nutter L. M., Cheng A. L., Hung H. L., Hsieh R. K., Ngo E. O., Liu T. W. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines // Biochem Pharmacol. – 1991. – Vol. 41, N_{2} 9. – P. 1283-1292.

132. Anderson R. G., Ghiraldeli L. P., Pardee T. S. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. -2018. -Vol. 1870, N 1. -P. 96-102.

133. Vyas S., Zaganjor E., Haigis M. C. Mitochondria and Cancer // Cell. – 2016. –
Vol. 166, № 3. – P. 555-566.

134. Thor H., Smith M. T., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S. A., Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells // J Biol Chem. – 1982. – Vol. 257, N 20. – P. 12419-12425.

135. Kalyanaraman B., Cheng G., Hardy M., Ouari O., Lopez M., Joseph J., Zielonka J., Dwinell M. B. A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds // Redox Biol. – 2018. – Vol. 14. – P. 316-327.

136. Liberman E. A., Topaly V. P., Tsofina L. M., Jasaitis A. A., Skulachev V. P. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria // Nature. – 1969. – Vol. 222, № 5198. – P. 1076-1078.

137. Antonenko Y. N., Avetisyan A. V., Bakeeva L. E., Chernyak B. V., Chertkov V. A., Domnina L. V., Ivanova O. Y., Izyumov D. S., Khailova L. S., Klishin S. S., Korshunova G. A., Lyamzaev K. G., Muntyan M. S., Nepryakhina O. K., Pashkovskaya A. A., Pletjushkina O. Y., Pustovidko A. V., Roginsky V. A., Rokitskaya T. I., Ruuge E. K., Saprunova V. B., Severina, II, Simonyan R. A., Skulachev I. V., Skulachev M. V., Sumbatyan N. V., Sviryaeva I. V., Tashlitsky V. N., Vassiliev J. M., Vyssokikh M. Y., Yaguzhinsky L. S., Zamyatnin A. A., Jr., Skulachev V. P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies // Biochemistry (Mosc). – 2008. – Vol. 73, № 12. – P. 1273-1287.
138. Teixeira J., Amorim R., Santos K., Soares P., Datta S., Cortopassi G. A., Serafim T. L., Sardao V. A., Garrido J., Borges F., Oliveira P. J. Disruption of

mitochondrial function as mechanism for anti-cancer activity of a novel mitochondriotropic menadione derivative // Toxicology. – 2018. – Vol. 393. – P. 123-139.

139. 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. Mitochondriatargeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent // Biochim Biophys Acta Bioenerg. – 2020. – Vol. 1861, No 8. – P. 148210.

140. Caputa G., Zhao S., Criado A. E., Ory D. S., Duncan J. G., Schaffer J. E. RNASET2 is required for ROS propagation during oxidative stress-mediated cell death // Cell Death Differ. -2016. - Vol. 23, No 2. - P. 347-357.

141. Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y., Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling // Oxid Med Cell Longev. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4350965.

142. Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // Physiol Rev. -2014. - Vol. 94, No 3. - P. 909-950.

143. Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review // Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol. 1757, № 5-6. – P. 509-517.

144. Millare B., O'Rourke B., Trayanova N. Hydrogen peroxide diffusion and scavenging shapes mitochondrial network instability and failure by sensitizing ROS-induced ROS release // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 15758.

145. Deweirdt J., Quignard J. F., Crobeddu B., Baeza-Squiban A., Sciare J., Courtois A., Lacomme S., Gontier E., Muller B., Savineau J. P., Marthan R., Guibert C., Baudrimont I. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells // Toxicol In Vitro. – 2017. – Vol. 45, No Pt 3. – P. 340-350.

146. Zielonka J., Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth // Free Radic Biol Med. – 2010. – Vol. 48, N_{2} 8. – P. 983-1001.

147. Horobin R. W., Stockert J. C., Rashid-Doubell F. Uptake and localisation of small-molecule fluorescent probes in living cells: a critical appraisal of QSAR

models and a case study concerning probes for DNA and RNA // Histochem Cell Biol. – 2013. – Vol. 139, No 5. – P. 623-637.

148. Innokentev A., Kanki T. Mitophagy in Yeast: Molecular Mechanism and Regulation // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 12.

149. Sukhanova E. I., Rogov A. G., Severin F. F., Zvyagilskaya R. A. Phenoptosis in yeasts // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77, № 7. – P. 761-775.

150. Kanki T., Wang K., Baba M., Bartholomew C. R., Lynch-Day M. A., Du Z., Geng J., Mao K., Yang Z., Yen W. L., Klionsky D. J. A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy // Mol Biol Cell. – 2009. – Vol. 20, № 22. – P. 4730-4738.