

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Крицкая Кристина Андреевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СЕТИ В МОДЕЛЯХ
КЛЕТОЧНОГО СТРЕССА

1.5.22. — Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., Бережнов А.В.

Пушино – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Общие сведения о механизмах динамики митохондриальной сети.....	11
1.1.1. Слияние, деление и транспорт митохондрий	11
1.1.2. Митофагия.....	14
1.2. Зависимость динамики митохондриальной сети от различных параметров	17
1.2.1. Внутриклеточный кальций и динамика митохондриальной сети.....	19
1.2.2. Связь динамики митохондриальной сети и продукции активных форм кислорода	20
1.2.3. Связь динамики митохондриальной сети и pH клетки	21
1.3. Связь динамики митохондриальной сети с заболеваниями	22
1.3.1. Динамика митохондриальной сети при нейродегенеративных заболеваниях	22
1.3.2. Динамика митохондриальной сети при метаболических и сердечно-сосудистых	24
1.3.3. Роль динамики митохондриальной сети в онкологических заболеваниях.....	26
1.4. Возможности фармакологической и нефармакологической коррекции динамики	27
митохондриальной сети.....	27
1.4.1. Фармакологическая регуляция деления и слияния митохондрий	27
1.4.2. Соединения, воздействующие на митофагию	28
1.4.3. Немедикаментозная модуляция динамики митохондриальной сети.....	29
1.5. Современные подходы к исследованию динамики митохондриальной сети	29
1.5.1. Флуоресцентная микроскопия и анализ изображений.....	29
1.5.2. Анализ графа митохондриальной сети	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Материалы	33
2.1.1 Реактивы.....	33
2.1.2. Оборудование	33
2.2. Объекты исследований	34
2.2.1 Фибробласты с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона.	34
2.2.2. Первичная нейрон-глиальная культура коры мозга крысы	34
2.2.3. Клеточные линии.....	35
2.2.4. Создание различных экспериментальных условий	35

2.3. Методы исследования	36
2.3.1. Измерения продукции активных форм кислорода	36
2.3.2. Измерение потенциала митохондриальной мембраны	36
2.3.3. Выживаемость клеток.....	36
2.3.4. Визуализация активации каспазы-3 при деполяризации митохондрий	37
2.3.5. Измерение уровня колокализации митохондрий и лизосом	38
2.3.6. Измерение внутриклеточного рН.....	39
2.3.7. Оценка морфологии митохондриальной сети	39
2.3.8. Представление и анализ митохондриальной сети как графа	41
2.6. Анализ экспрессии генов	41
2.7 Статистический анализ	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	
3.1. Разработка подхода для анализа морфологии митохондриальной сети в клетках млекопитающих	43
3.2. Митохондриальная сеть и апоптоз: критическая потеря митохондриальной сети, необходимая для индукции апоптоза в разных типах клеток	47
3.3. Изменение морфологии митохондриальной сети в фибробластах с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона	51
3.4. Оценка действия кратковременного закисления и добавки лактата и пирувата натрия на динамику митохондриальной сети в фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2	56
3.5. Влияние рекомбинантного HSP70 и его С-концевого фрагмента на индукцию митофагии и выживаемость в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 и клеток в токсической модели болезни Паркинсона	66
3.6. Действие активатора Nrf2 пути омавелоксолон на динамику митохондриальной сети в условиях окислительного стресса	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ	93
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	110

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности проблемы

Митохондрии являются клеточными органеллами, которые выполняют ряд жизненно важных функций – производят энергию, регулируют процессы гибели клетки, контролируют пролиферацию и дифференцировку, участвуют в метаболизме и сигнализации. В клетке митохондрии существуют в виде динамической структуры – митохондриальной сети, морфология которой меняется под воздействием различных внутренних и внешних факторов и зависит от динамики митохондриальной сети – процессов деления/слияния митохондрий, их транспорта, биогенеза и митофагии (Chen L. *et al.*, 2023).

Клеточный стресс представляет собой состояние, при котором клетка подвергается воздействию неблагоприятных факторов, нарушающих ее гомеостаз. Эти факторы могут быть разнообразными и включать окислительное повреждение, недостаток питательных веществ, воздействие токсинов, изменения pH среды и многое другое. Предполагают, что митохондриальная сеть как целостная структура играет ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза и в ответе на стрессорные факторы (Wai T., Langer T., 2016). Так, при недостатке питательных веществ или кислорода формируются сети с преобладанием удлиненных митохондрий, которые более устойчивы к апоптозу (Disatnik M.H. *et al.*, 2015; Martinou J.-C., Youle R.J., 2011; Rambold A.S. *et al.*, 2011). Усиление слияния митохондрий способствует эффективному распределению содержимого митохондриального матрикса, улучшая функциональность всей сети. С другой стороны, деление митохондрий позволяет изолировать поврежденные органеллы для их последующей деградации посредством митофагии, что важно для предотвращения избыточной продукции активных форм кислорода и развития окислительного стресса (Kujoth G.C. *et al.*, 2005).

Поддержание баланса динамики митохондриальной сети особенно критично для тканей с узкой специализацией и высокой метаболической активностью, таких как нервная и мышечная (Kageyama Y. *et al.*, 2012). Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что клеточный стресс тесно связан с нарушением динамики митохондриальной сети, что также может быть причиной развития многих заболеваний, включая нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и метаболические патологии. Помимо этого предполагают, что мутации, связанные с процессами динамики митохондриальной сети, могут увеличивать чувствительность к воздействию стрессорных факторов. В этом свете особое внимание привлекает болезнь Паркинсона – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, для которого рассматривают нарушение динамики митохондриальной сети и развитие окислительного стресса в качестве основных механизмов в патогенезе как

наследственных, так и спорадических форм (Angelova P.R., Abramov A.Y., 2018; Chen W., Zhao H., Li Y., 2023; Liu Y.J. *et al.*, 2020).

Несмотря на возросший интерес к изучению динамики митохондриальной сети, до сих пор не установлены конкретные особенности этой структуры, возникающие при действии различных видов стресса и связанные с патологическими состояниями, в частности, с болезнью Паркинсона. Прежде всего для этого необходимо усовершенствование подходов для количественной характеристики морфологических параметров митохондриальной сети. Кроме того, существует потребность в поиске новых агентов и воздействий для защиты клеток путем восстановления нарушенной динамики сети в условиях стресса. Моделирование клеточного стресса *in vitro* предоставляет возможность для изучения нарушения динамики митохондриальной сети и ее роли в развитии патологических состояний, а также поиске способов коррекции этих нарушений.

Цель работы состоит в исследовании нарушений динамики митохондриальной сети в моделях клеточного стресса, а также в поиске потенциальных способов коррекции этих нарушений. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать подход для количественной оценки морфологических параметров митохондриальной сети и экспериментально проверить его применимость в различных моделях клеточного стресса: при нарушении деления митохондрий, голодании, ингибировании дыхания, разобщении окислительного фосфорилирования и действии окислительного стресса.

2. Исследовать особенности морфологии митохондриальной сети в фибробластах пациентов с наследственной формой болезни Паркинсона и несущих мутации в генах, кодирующих белки PINK1, Parkin, LRRK2 и альфа-синуклеин в норме и при действии окислительного стресса.

3. Определить критическую долю деполяризованных митохондрий, необходимую для индукции апоптоза в клетках нейрон-глиальной культуры, фибробластах кожи и клетках рака молочной железы BT-474 в модели кальциевой перегрузки.

4. Изучить действие рекомбинантного белка теплового шока 70 и его С-концевого фрагмента, внутриклеточного закисления и добавки лактата и пирувата натрия, а также омавелоксолон на динамику митохондриальной сети и жизнеспособность клеток в моделях болезни Паркинсона и при действии окислительного стресса.

Научная новизна работы

В настоящей работе с использованием вновь созданного программного обеспечения разработан подход, основанный на автоматическом анализе конфокальных изображений,

для количественной оценки морфологических параметров митохондриальной сети в клетках млекопитающих. Впервые предложено использование комбинации трех характеристик графа митохондриальной сети («плотность графа», «средний кратчайший путь» и «средний коэффициент кластеризации») и трех морфологических параметров («площадь митохондриальной сети», «длина ветви», «соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий»), что позволяет более точно и без потери информации описывать нарушения морфологии митохондриальной сети при различных стрессовых воздействиях. Экспериментально показана применимость подхода для оценки морфологии митохондриальной сети клетки при мутациях, ассоциированных с болезнью Паркинсона, а также в условиях, связанных с нарушением деления митохондрий, голоданием, ингибированием дыхания, разобщением окислительного фосфорилирования и действием окислительного стресса.

Впервые получены данные о влиянии мутаций, ассоциированных с наследственной формой болезни Паркинсона, на морфологию митохондриальной сети в фибробластах в нормальных условиях и при действии окислительного стресса, а также выявлена связь этих мутаций с увеличением продукции активных форм кислорода.

Впервые установлено, что в условиях кальциевой перегрузки в клетках нейрон-глиальной культуры, фибробластах кожи и клетках рака молочной железы индукция апоптоза происходит при различной доле деполяризованных митохондрий, что связано, в том числе, с относительной экспрессией про- и анти-апоптотических факторов.

Впервые определена способность рекомбинантного белка теплового шока 70 и его С-концевого фрагмента индуцировать митофагию, увеличивать уровень митохондриального мембранного потенциала и снижать некротическую и апоптотическую гибели в клеточной токсической модели болезни Паркинсона, а также в фибробластах с мутациями, ассоциированными с нарушением динамики митохондриальной сети и болезнью Паркинсона.

Впервые показано влияние внутриклеточного закисления, опосредованного изменением рН внеклеточной среды, а также добавкой лактата и пирувата натрия на морфологию митохондриальной сети и митофагию, экспрессию генов, связанных митохондриальной динамикой и выживаемость клеток в токсической модели болезни Паркинсона и клетках с мутациями, ассоциированными с нарушением динамики митохондриальной сети и болезнью Паркинсона.

Впервые определена способность активатора Nrf2 пути – омавелоксолонa поддерживать связность митохондриальной сети и жизнеспособность клеток, несущих

мутации, ассоциированные с нарушением динамики митохондриальной сети и болезнью Паркинсона, в условиях окислительного стресса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы обусловлена углублением понимания изменений в динамике и морфологии митохондриальной сети, вызванных различными видами стрессорных воздействий и мутациями, ассоциированными с болезнью Паркинсона. Для различных типов клеток определена доля митохондрий, потеря потенциала в которых вызывает запуск апоптоза. С практической точки зрения, был разработан подход для анализа морфологических параметров митохондриальной сети в клетках млекопитающих. Кроме того, определено воздействие рекомбинантного белка теплового шока 70 и его С-концевого фрагмента, омавелоксолон, добавки лактата и пирувата натрия на морфологию и динамику митохондриальной сети в условиях клеточного стресса. Полученные результаты могут быть использованы для улучшения диагностики и разработки терапевтических стратегий заболеваний, связанных с нарушениями в динамике митохондриальной сети и митохондриальной дисфункцией.

Методология и методы диссертационного исследования

Для достижения поставленной цели и решения конкретных задач были использованы современные биофизические и молекулярные методы исследования. В рамках работы проводились эксперименты на разнообразных клеточных культурах, включая человеческие фибробласты от здоровых доноров и фибробласты с мутациями, связанными с наследственными формами болезни Паркинсона; смешанные нейрон-глиальные культуры крыс линии Sprague-Dawley, а также клетки рака молочной железы BT-474. Для достижения целей исследования применялись передовые биофизические методики, включая флуоресцентную и конфокальную микроскопию для визуализации клеток, а также методы ПЦР-анализа в реальном времени. Обработку и анализ полученных данных осуществляли с использованием специализированного программного обеспечения и оригинального программного кода.

Основные эксперименты были проведены с использованием приборной базы Института биофизики клетки РАН. В частности, эксперименты по конфокальной микроскопии были проведены с использованием оборудования Сектора Оптической микроскопии и спектрофотометрии Института биофизики клетки, входящего в состав центра коллективного пользования ФИЦ ПНЦБИ РАН (номер во всероссийском реестре ЦКП – 670266). Часть результатов по конфокальной микроскопии сверхвысокого

разрешения была получена с использованием технической базы лаборатории клеточной физиологии и патологии НТЦ Биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева и Института Неврологии Университетского Колледжа Лондона.

Все работы с животными и клеточными культурами были одобрены Комитетом по биоэтике Института биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН и проводились в соответствии с Законом №708н (23 августа 2010 г.) Минздрава РФ и с международно-правовыми нормами, указанными в Европейской конвенции ETS № 123 «О защите позвоночных животных, используемых для лабораторных экспериментов или иных научных целях», а также руководством по работе с лабораторными животными Института биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН (Разрешение № 4 от 14 марта 2022 г. и Разрешение № 3 от 12 марта 2023 г.)

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный подход позволяет выявить нарушения морфологии митохондриальной сети в клетках при мутациях, связанных с болезнью Паркинсона, а также при действии различных видов клеточного стресса.

2. Фибробласты с мутациями, ассоциированными с наследственными формами болезни Паркинсона, характеризуются изменениями в морфологии митохондриальной сети и увеличением скорости продукции АФК в нормальных условиях и при действии окислительного стресса.

3. Клетки нейрон-глиальной культуры, фибробласты кожи и клетки рака молочной железы ВТ-474 имеют разную чувствительность к индукции апоптоза в зависимости от доли деполяризованных митохондрий и относительной экспрессии про- и анти-апоптотических факторов.

4. Рекомбинантный белок теплового шока 70 и его С-концевой фрагмент, омавелоксолон, лактат и пируват натрия активируют митофагию и защищают клетки в условиях стресса.

Обоснование соответствия диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа соответствует пункту 2 (изучение клеточных органелл – митохондрий), пункту 13 (изучение клеточной гибели), пункту 18 (изучение клеток многоклеточных организмов в норме и патологии) и 22 (разработка и применение новых экспериментальных методов цифрового анализа изображений клетки) Паспорта научной специальности 1.5.22. – Клеточная биология (биологические науки).

Степень достоверности полученных результатов

Научные положения и выводы, представленные в работе, опираются на теоретический анализ и экспериментальные данные. Предоставленные результаты подтверждены с использованием передовых методов обработки данных и статистического анализа и характеризуются воспроизводимостью и статистической значимостью. Достоверность результатов также подтверждается применением адекватных и современных исследовательских методов и прецизионных приборов, которые соответствуют поставленным целям и задачам работы.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: «Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – Наука XXI века», (г. Пушкино, 2024 г.); «VII Съезд биофизиков России», (г. Краснодар, 2023 г.); Всероссийская конференция «Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине» (г. Орел, 2023 г.); Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пушкино, 2023 г.); «RusNeurochem 2022 Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрохимического общества» (г. Санкт-Петербург, 2022 г.); Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пушкино, 2021 г.); 45th FEBS Congress, «Molecules of life: Towards new horizons» (Online, 2021 г.).

Личный вклад автора

Все результаты, описанные в данной диссертации, были получены лично автором или при непосредственном участии автора. Научные положения и выводы исследования основываются на данных, собранных автором через его прямое участие в каждом этапе работы: от разработки концепции и планирования до проведения экспериментов, анализа собранных данных и последующего оформления результатов для публикации. Автор непосредственно участвовал в написании научных статей. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались и утверждались всеми соавторами работы, что гарантировало глубину и обоснованность представленных результатов.

Публикации

Содержание работы отражено в 25 публикациях, в том числе в 3 статьях в рецензируемых научных журналах (Scopus, Web of Science) и рекомендованных ВАК для публикации материалов по теме диссертации.

Связь работы с научными программами

Результаты, представленные в работе, получены при выполнении государственного задания ИБК РАН № 075-01512-22-02/004-00 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4. Часть результатов выполнена при поддержке гранта РНФ 22-24-01043 «Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона» (2022-2023) и гранта РФФИ 20-34-70074 «Роль окислительного стресса в нейродегенерации». Помимо этого, результаты также были получены в рамках гранта «Short-Term Fellowships 2021» от Европейского Биохимического сообщества (FEBS).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о механизмах динамики митохондриальной сети

В процессе эволюции в клетке возникла система контроля качества митохондрий, основу которой составляет динамика митохондриальной сети (МС), а именно – процессы деления/слияния, транспорта митохондрий, митохондриального биогенеза, а также митофагии (Chen W., Zhao H., Li Y., 2023). Морфология МС является отражением этих противоположных процессов. В последние годы появляется все больше данных, что МС необходимо рассматривать как целостную динамическую структуру, а не множество отдельных митохондрий. Осознание сложности архитектуры МС началось с фундаментальной работы В. П. Скулачева, в которой была установлена трехмерная организация МС в поперечнополосатой мышце диафрагмы (Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P., 1978). Впоследствии было показано, что МС участвует в контроле множества клеточных функций: эффективном распределении кислорода и метаболитов, кальциевой сигнализации, а также может играть роль своеобразного электрического «кабеля» (Chen W., Zhao H., Li Y., 2023; Zamzami N., Kroemer G., 2001; Abramicheva P.A. *et al.*, 2023).

1.1.1. Слияние, деление и транспорт митохондрий

Процесс слияния митохондрий (Рисунок 1) осуществляется за счет активности ГТФаз, которые связывают внешние мембраны митохондрий – митофузин-1 (Mfn1) и митофузин-2 (Mfn2) – и внутреннюю мембрану – динамин-подобным белком массой 120 кДа (Opa1) (Gao S., Hu J., 2021). Генетический нокаут белков Mfn1 и/или Mfn2 нарушает структуру митохондрий и вызывает клеточные дефекты, включая уменьшение размера митохондрий, фрагментацию МС, снижение митохондриального мембранного потенциала и скорости производства АТФ, что в конечном итоге подавляет пролиферацию клеток (Bertholet A.M. *et al.*, 2016). Наиболее эффективное слияние митохондрий наблюдается при одновременном присутствии обоих митофузинов (Chen H. *et al.*, 2003). Следует отметить, что отсутствие Mfn1 приводит к полной фрагментации МС, в то время как клетки, лишенные Mfn2, содержат лишь более высокую долю сфероидных митохондрий, что указывает на заметное различие в функциях этих белков (Gao S., Hu J., 2021).

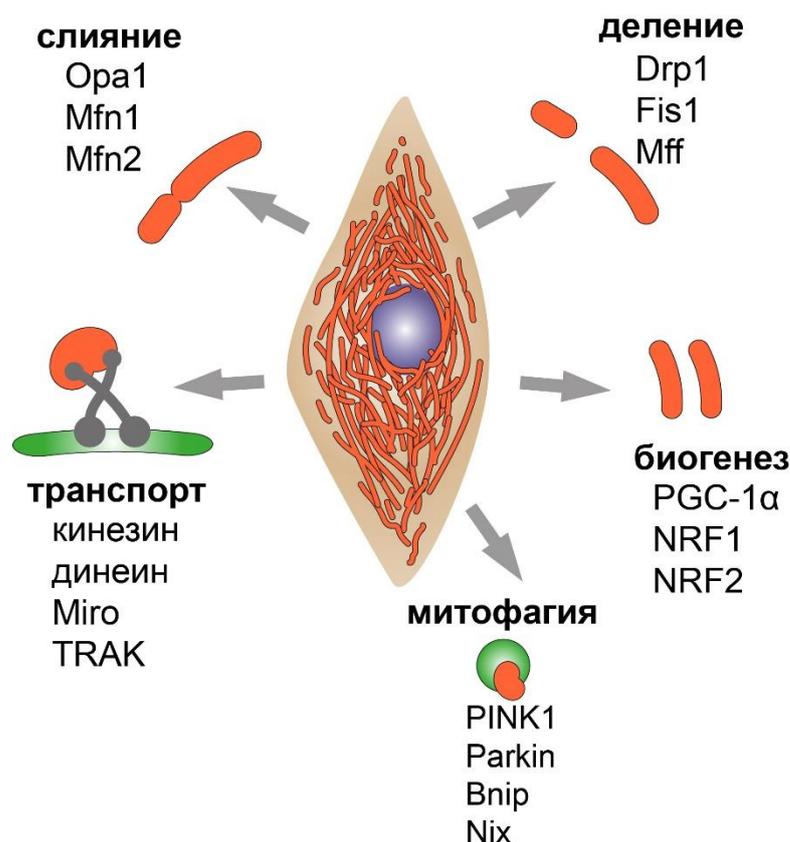


Рисунок 1. Процессы, лежащие в основе динамики митохондриальной сети. Слияние митохондрий осуществляется при помощи белков Opa1, Mfn1 и Mfn2, которые связываются с внутренней и внешней мембранами митохондрий. Деление митохондрий в основном опосредуется белком Drp1, который присоединяется к внутренней мембране митохондрий и формирует кольцеобразную структуру вокруг органеллы, что приводит к разделению ее на две отдельные части. Биогенез митохондрий в основном регулируется фактором PGC-1 α . Митофагия реализуется в PINK/Parkin-зависимом пути за счет работы белков PINK и Parkin, и в рецептор-опосредованном пути за счет работы белков BNIP и Nix. Транспорт митохондрий вдоль микротрубочек реализуется за счет комплексов моторных белков TRAK/Miro.

Помимо этого, различные посттрансляционные модификации также регулируют активность митофузинов: так, например, ацетилирование Mfn1 в позициях K222 или K491 ингибирует ГТФазную активность (Lee J.-Y. *et al.*, 2014), тогда как фосфорилирование Mfn1 в позиции T562, регулируемое каскадом MEK/ERK, ограничивает сборку этого белка, а также способствует взаимодействию с белком Bax, нарушая слияние митохондрий (Pyakurel A. *et al.*, 2015). Интересно отметить, что при недостатке глюкозы деацетилирование Mfn1 приводит к увеличению активности этого белка и повышает связность МС (Lebouche G.P. *et al.*, 2012). Транскрипционная регуляция митофузинов также влияет на слияние митохондрий в ответ на стресс: так, транскрипционный коактиватор PGC1- β , экспрессия которого увеличивается при физической нагрузке, также

повышает экспрессию Mfn2, тем самым способствуя слиянию митохондрий и увеличению эффективности окислительного фосфорилирования (Liesa M. *et al.*, 2008).

Слияние внутренней митохондриальной мембраны в основном регулируется белком Opa1 (Spinazzi M. *et al.*, 2008). Opa1 также контролирует целостность крист митохондрий, поддержание целостности митохондриальной ДНК, биоэнергетику и сборку суперкомплексов дыхательной цепи, что напрямую влияет на эффективность митохондриального дыхания. Мутации в гене *OPA1* обнаруживаются у 60-70% пациентов с аутосомно-доминантной оптической атрофией, характеризующейся потерей клеток сетчатки и снижением зрения в раннем возрасте. Нарушение процессов слияния вследствие этой мутации также приводит к развитию болезни Шарко-Мари-Тута, для которой в клетках пациентов характерно наличие фрагментированной МС (Del Dotto V. *et al.*, 2018).

Противоположный слиянию – процесс деления митохондрий, который впервые был описан в работе И. А. Воробьева и Д. Б. Зорова на примере токсин-индуцированной фрагментации МС, является начальной стадией деградации дисфункциональных митохондрий, за которым может следовать селективная аутофагия (митофагия) (Vorobjev I.A., Zorov D.B., 1983). Основными компонентами машинерии деления митохондрий являются специфические эволюционно консервативные белки, главным образом ГТФазы, находящиеся во внешней, внутренней мембранах митохондрий, а также межмембранном пространстве. Деление митохондрий в основном происходит в местах, где внешняя митохондриальная мембрана сужается из-за полимеризации актина или взаимодействия с эндоплазматическим ретикулумом (Рисунок 1).

Процесс деления начинается с привлечения ГТФазы Drp1 с помощью различных адаптерных белков, включая белки mitochondrial fission 1 (Fis1), mitochondrial fission factor (Mff) и белки митохондриальной динамики MiD49 и MiD51 (Kraus F. *et al.*, 2021). Drp1 активируется специфическим митохондриальным липидом кардиолипином для формирования больших спиральных структур, что усиливает его ГТФазную активность в местах деления митохондрий. Аллостерическая регуляция Drp1 способствует его самосборке, конформационной трансформации и индукции деления митохондрий в ответ на стимул. Так, Drp1 находится в цитоплазме в неактивном состоянии, и его активация регулируется фосфорилированием, сумоилированием, убиквитинированием и S-нитрозилированием (Figueoa-Romero C. *et al.*, 2009). В частности, фосфорилирование Drp1 при S616 циклинзависимой киназой (Cdk)-1 во время митоза клетки способствует делению митохондрий. Кроме того, активность Drp1 также регулируется его сумоилированием: сумоилирование Drp1 предотвращает лизосомальную деградацию этого белка (Adaniya S.M. *et al.*, 2019). При метаболическом стрессе и ограничении субстрата, АМР-

активируемая протеинкиназа (АМРК) фосфорилирует Mff, что способствует связыванию Drp1 с Mff и привлечению этого белка из цитозоля к митохондриям (Cribbs J.T., Strack S., 2007; Toyama E.Q. *et al.*, 2016). Помимо влияния на митохондриальную функцию и морфологию МС, деление митохондрий необходимо для осуществления транспорта митохондрий, митофагии, деления клеток и регуляции апоптоза.

Основными компонентами, обеспечивающими транспорт митохондрий, являются микротрубочки и моторные белки, такие как кинезины и динеины (Рисунок 1). Кинезины отвечают за anterograde транспорт (от центра клетки к периферии), в то время как динеины осуществляют retrograde движение (от периферии к центру). У млекопитающих для транспорта митохондрий необходимо образование комплекса белков Miro и TRAK1 или TRAK2 с белками цитоскелета. Особенно важен транспорт митохондрий в нейронах, где эти органеллы должны преодолевать значительные расстояния для обеспечения энергией синапсов и других удаленных участков клетки. Нарушения в системе транспорта митохондрий ассоциированы с различными нейродегенеративными заболеваниями, например, с болезнью Хантингтона (Zheng Y.-R., Zhang X.-N., Chen Z., 2019).

Таким образом, процессы слияния/деления, транспорта митохондрий, осуществляемые сложной белковой машинерией, являются основой системы контроля качества митохондрий и, в свою очередь, имеют сложную посттрансляционную регуляцию, которая обеспечивает чувствительность МС к различным внутренним и внешним факторам.

1.1.2. Митофагия.

Митофагия – это эволюционно консервативный процесс, в результате которого дисфункциональные или избыточные митохондрии претерпевают деградацию посредством селективной аутофагии. Митофагия играет ключевую роль в контроле количества и качества митохондрий и, как правило, реализуется в два этапа. На первом этапе поврежденные участки МС идентифицируются и изолируются двумембранными аутофагосомами (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018). Далее аутофагосомы сливаются с лизосомами, образуя аутолизосомы, где поврежденные митохондрии расщепляются лизосомальными ферментами. В настоящее время наибольшее значение в митофагии млекопитающих придается пути, включающему киназу, индуцированную PТЕН (PINK1) и Parkin – убиквитин-лигазу E3 (Yang Y. *et al.*, 2008). PINK1 кодируется геном *PARK6*, тогда как Parkin – геном *PARK2*, и мутации в этих генах связаны с ранним началом аутосомно-рецессивной болезни Паркинсона (Lim K.-L. *et al.*, 2011; Piccoli C. *et al.*, 2008).

PINK1/Parkin-зависимый путь митозагии.

PINK1/Parkin-зависимый путь митозагии инициируется в результате распознавания поврежденных митохондрий. Ключевую роль в этом процессе играет киназа PINK1, которая выступает в роли сенсора митохондриального мембранного потенциала. В норме PINK1 импортируется в митохондрии через комплексы TOM и TIM, расположенные на внешней и внутренней мембранах соответственно. При прохождении через внутреннюю мембрану PINK1 подвергается протеолитическому расщеплению и деградации, что поддерживает его низкий уровень в здоровых митохондриях.

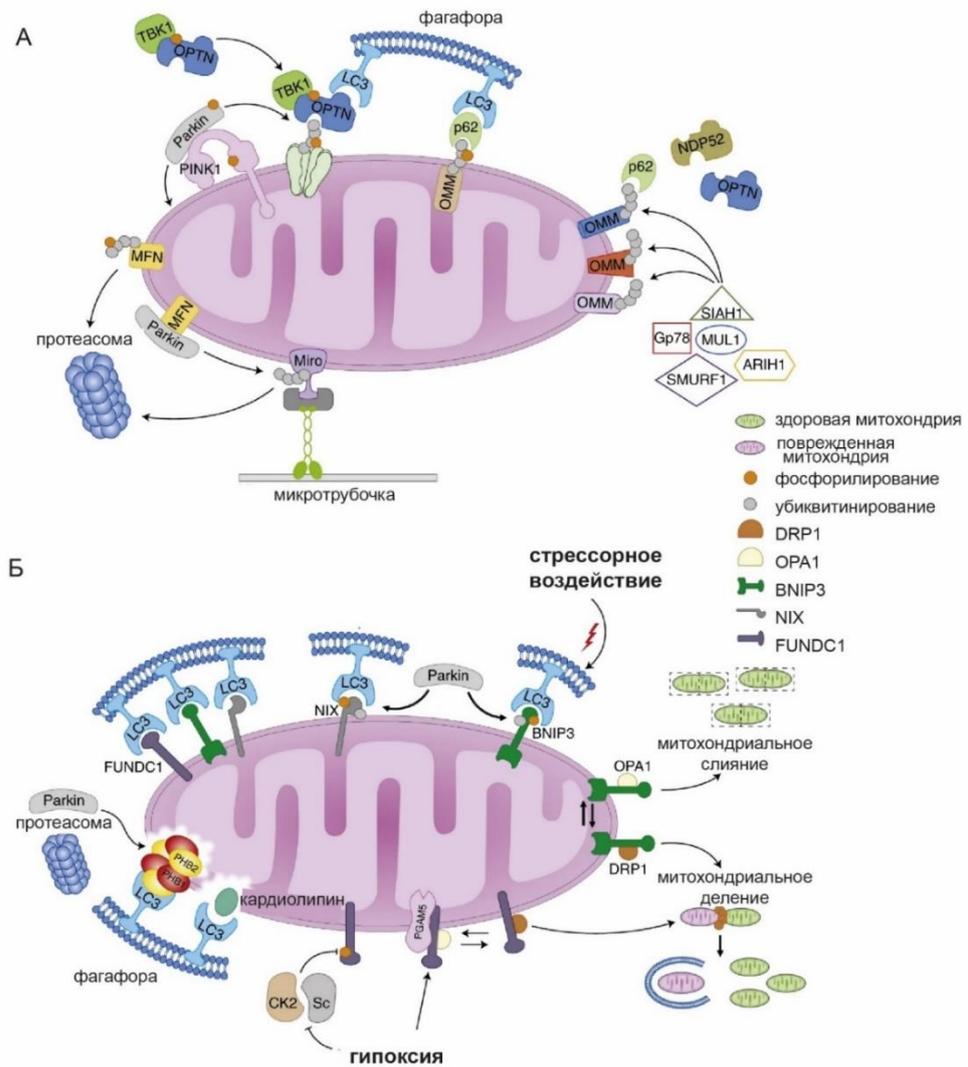


Рисунок 2. Механизмы митозагии. А) Путь митозагии PINK1/Parkin: адаптерные белки (P62, Optn, Ndp52) распознают фосфорилированные полиубиквитиновые цепи на митохондриальных белках и инициируют формирование аутофагосомы путем связывания с Lc3. Комплекс Optn–Tbk1 усиливает этот процесс, способствуя деградации митохондрий. Б) Рецептор-опосредованная митозагия: рецепторы митозагии (Bnip3, Nix, Fundc1) на внешней митохондриальной мембране взаимодействуют с Lc3, способствуя деградации поврежденных митохондрий. Различные рецепторы обеспечивают специфичность процесса в зависимости от тканей и стимулов. Адаптировано из (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018).

При повреждении митохондрий и снижении мембранного потенциала нарушается импорт PINK1 через комплекс TIM, что приводит к его накоплению на внешней мембране. Аккумулированный PINK1 запускает каскад событий, ведущих к рекрутированию Parkin. Этот процесс включает фосфорилирование убиквитина, связанного с Parkin, что стимулирует его перемещение к митохондриям. PINK1 также фосфорилирует сам Parkin, активируя его (Quinn P.M.J. *et al.*, 2020). Активированный Parkin выступает в роли амплификатора сигнала, убиквитинируя различные белки внешней митохондриальной мембраны, такие как митофузины (Mfn1/Mfn2) и mitoNEET. Образующиеся убиквитиновые цепи служат сигналом для распознавания поврежденных митохондрий аутофагосомами, что в конечном итоге приводит к их селективной деградации (Sarraf S.A. *et al.*, 2013). Этот механизм обеспечивает эффективное удаление дисфункциональных митохондрий, поддерживая тем самым здоровье клеточной популяции органелл.

Адаптерные белки аутофагии, такие как P62 и Optineurin, играют ключевую роль в формировании аутофагосом, связывая убиквитинированные митохондрии с Lc3. Уникальные посттрансляционные модификации Parkin и PINK1, а также их взаимодействие с адаптерными белками, обеспечивают точное регулирование митофагии, которое критически важно для поддержания клеточного гомеостаза и предотвращения заболеваний, связанных с митохондриальными дисфункциями (Lim K.-L. *et al.*, 2011; Yang Y. *et al.*, 2008).

Рецептор-опосредованный путь митофагии BNIP3/NIX.

Среди ключевых рецепторов, участвующих в процессе митофагии, выделяют белки Nix1, Vnр3 и Fundc1. Отличительной особенностью этих рецепторов является наличие в их структуре специфической последовательности LIR (LC3-interacting region). Эта последовательность обеспечивает взаимодействие рецепторов с белками семейства Map1lc3a/Gabarap, что необходимо для инициации процесса деградации митохондрий (Quinsay M.N. *et al.*, 2010; Rogov V.V. *et al.*, 2017). Vnр3 играет важную роль в адаптации клеток к гипоксическим условиям. В ответ на снижение уровня кислорода активируется транскрипционный фактор HIF1 α , который стимулирует экспрессию гена *BNIP3*. После синтеза белок Vnр3 подвергается посттрансляционной модификации – фосфорилированию по остаткам серина, расположенным вблизи LIR-мотива. Именно фосфорилированная форма Vnр3 эффективно связывается с Map1lc3a, запуская процесс митофагии. Fundc1, в свою очередь, является конститутивным компонентом внешней митохондриальной мембраны, присутствующим там даже в нормальных физиологических условиях. Однако его активность также регулируется в ответ на гипоксию, что позволяет клетке быстро реагировать на изменения кислородного режима путем модуляции процесса митофагии. Таким образом, наличие различных рецепторов митофагии обеспечивает клетке

возможность тонкой регуляции митофагии в ответ на различные стрессовые воздействия, в частности, на гипоксию (Wu W. *et al.*, 2014).

Белки Vnр3 и Nix, принадлежащие к семейству белков Bcl-2, участвуют во многих клеточных процессах, включая апоптоз, митохондриальную дисфункцию и митофагию (Murakawa T. *et al.*, 2015). Vnр3 и Nix играют роль в регуляции митофагии, отличную от функции пути PINK1/Parkin, но могут усилить митофагию, опосредованную этим путем, и в некоторых случаях компенсировать отсутствие этого пути (Liu L. *et al.*, 2012). Так, ранее была продемонстрирована возможность бессимптомной гомозиготной мутации в гене белка Parkin, при которой клетки бессимптомно сохраняли митохондриальную функцию за счет Vnр3/Nix пути митофагии.

Важно подчеркнуть также, что рецепторы митофагии участвуют в усилении деления митохондрий, способствуя сегрегации поврежденных митохондрий: так, Vnр3 ингибирует слияние митохондрий, опосредованное Opa1, и способствует рекрутированию Drp1 к митохондриям (Lee Y. *et al.*, 2011). Помимо этого, Vnр3 также предотвращает деградацию PINK1, что способствует рекрутированию Parkin и активации митофагии.

Таким образом, механизмы митофагии, регулируемые Vnр3 и Nix, представляют собой сложную сеть взаимодействий, важных для поддержания митохондриальной функции и клеточного гомеостаза, а также могут компенсировать дефициты в других путях митофагии.

1.2. Зависимость динамики митохондриальной сети от различных параметров

Динамика МС способствует адаптации клеток в различных условиях (Рисунок 3), включая депривацию или избыток субстрата, воздействие стресса (Kageyama Y. *et al.*, 2012). Так, при незначительном повреждении отдельные митохондрии могут сливаться с МС для обмена содержимого митохондриального матрикса с целью оптимизации дыхания и синтеза АТФ. Например, было показано, что митохондрии с нарушенной митохондриальной ДНК могут сливаться с остальной МС, способствуя тем самым эффективному перемешиванию и перераспределению митохондриальной ДНК, уменьшая степень гетероплазии (Youle R.J., Blik A.M., 2012).

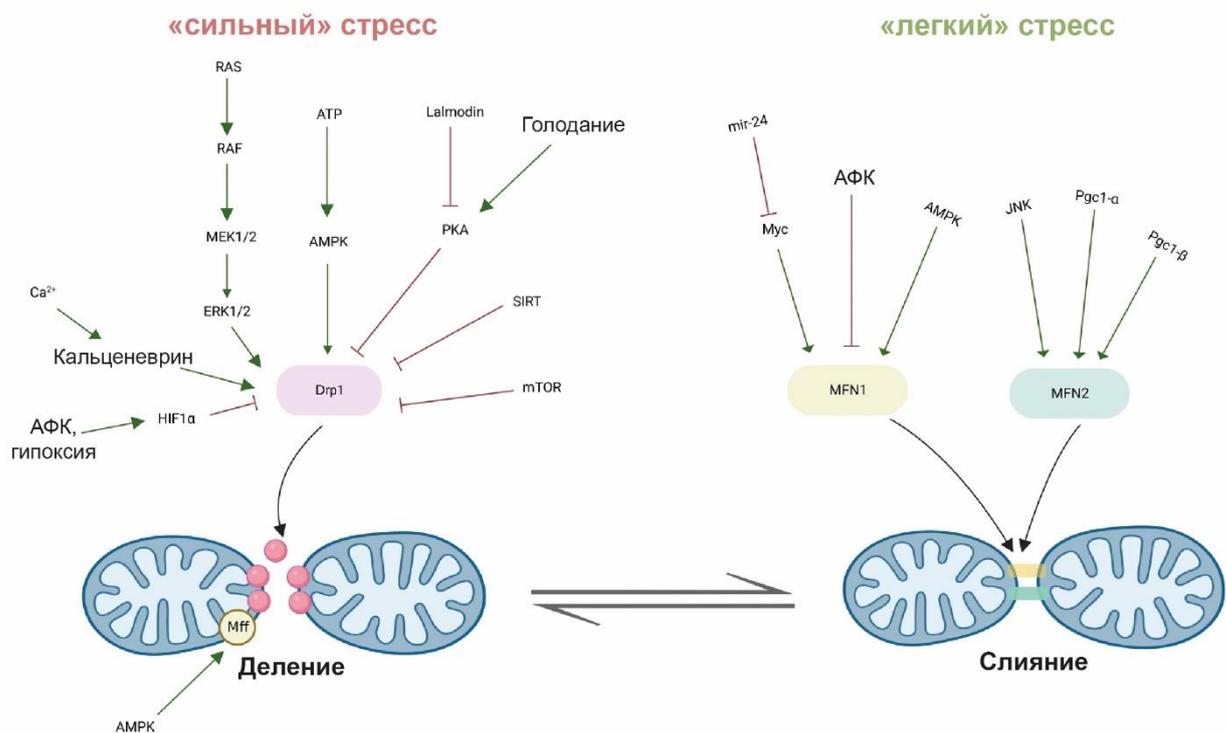


Рисунок 3. Сигнальные пути клетки, связанные с динамикой митохондриальной сети, в условиях стресса. Зеленые стрелки обозначают стимуляцию или активацию пути; красные указывают на подавление или деактивацию пути. Условно «легкий» стресс способствует преимущественному слиянию митохондрий, тогда как «сильный» стресс вызывает фрагментацию. Адаптировано из (Chen W., Zhao H., Li Y., 2023).

Регуляция клеточного метаболизма напрямую связана с динамикой МС: в условиях избытка питательных веществ в клетках обычно фрагментированная МС с нарушенным окислительным фосфорилированием, сниженным содержанием митохондриальной ДНК и повышенным уровнем митохондриальных АФК, в то время как при недостатке питательных веществ МС остается более связанной, поддерживая высокую скорость дыхания и производства АТФ (Cribbs J.T., Strack S., 2007; Kujoth G.C. *et al.*, 2005; Toyama E.Q. *et al.*, 2016). Регуляция динамики МС связана с сигнальным путем AMPK, который активируется при возрастающем уровне АМФ и АДФ. Содержание этого фермента особенно высоко в мозге, печени и скелетных мышцах – тканях с высокой потребностью в энергии и чувствительных к отсутствию питательных веществ. Кроме того, негативная регуляция мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR) также стимулирует слияние митохондрий при дефиците питательных веществ (Cribbs J.T., Strack S., 2007; Ducommun S. *et al.*, 2015; Rambold A.S. *et al.*, 2011). Увеличение связности МС может обеспечивать компенсаторные механизмы для противодействия метаболическим нарушениям, а недостаток митофузинов или снижение активности этих белков приводит к снижению скорости производства АТФ,

истощение митохондриальной ДНК и увеличению уровня продукции АФК (Rambold A.S. *et al.*, 2011; Wai T., Langer T., 2016).

Помимо путей, связанных с AMPK и mTOR, важную роль в метаболической регуляции клетки и динамики МС принимают сиртуины – семейство сигнальных белков, чувствительных к соотношению NAD^+ : NADH и абсолютным уровням этих кофакторов (Wai T., Langer T., 2016). Сиртуины, функционирующие как деацетилазы, модифицируют ключевые белки, участвующие в динамике МС: например, сиртуин 1 активирует белки, такие как deacetylase peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), который стимулирует биогенез митохондрий и поддерживает их функцию (Jäger S. *et al.*, 2007). Помимо этого, сиртуин 1 способствует деацетилированию Opa1, белка, необходимого для слияния митохондрий, тем самым способствуя сохранению целостности МС при стрессе. В добавок к этому, сиртуин 3 напрямую влияет на активность митофузинов путем деацетилирования этих белков и повышения тем самым их функциональной активности, что способствует эффективному слиянию митохондрий (Toyama E.Q. *et al.*, 2016; Wai T., Langer T., 2016).

1.2.1. Внутриклеточный кальций и динамика митохондриальной сети

Участие во внутриклеточной кальциевой сигнализации является одной из важнейших функций митохондрий. Потoki этого иона через внутреннюю мембрану митохондрий опосредуются специализированными транспортерами и каналами, связанными с многочисленными сигнальными путями (Hartmann J., Verkhratsky A., 1998, 1998). Морфология МС неразрывно связана с кальциевой буферной емкостью митохондрий: так, фрагментация МС в результате усиленного деления снижает кальциевую буферную емкость митохондрий за счет уменьшения площади поверхности крист, и наоборот, слияние митохондрий способствует кальциевым сигналам быстро распространяться по МС. Таким образом, баланс между делением и слиянием и сама архитектура МС имеет решающее значение для пространственно-временного формирования кальциевой сигнализации. Не только морфология МС влияет на передачу кальциевых сигналов, но и сама внутриклеточная концентрация этого иона взаимно регулирует динамику МС. Повышенный уровень митохондриального кальция может прямо влиять на активность Drp1 и стимулировать привлечение Drp1 к митохондриям (Han X.-J. *et al.*, 2008; Ji W. *et al.*, 2015). В добавок к этому кальций активирует кальций-кальмодулин-зависимую киназу II (CaMKII), которая, в свою очередь, фосфорилирует Drp1, также способствуя его транслокации к митохондриям (Xu S. *et al.*, 2016). Этот механизм особенно активен при повышенном метаболическом стрессе или повреждении клеток. Напротив,

митохондриальный кальций влияет на слияние митохондрий через взаимодействие с Opa1 и митофузинами: комплекс этих белков чувствителен к изменению заряда митохондриальной мембраны, который может колебаться из-за концентрации буферными органеллами кальция. Так, повышение уровня кальция в митохондриях может увеличивать стабильность этих белковых комплексов (Chen W., Zhao H., Li Y., 2023).

Важно отметить, что снижение кальциевой буферной емкости в сочетании с нарушением выработки АТФ в результате чрезмерной фрагментации МС приводит к гибели клетки. Восстановление кальциевого гомеостаза с помощью вмешательств, нормализующих динамику МС, может иметь терапевтический потенциал при различных патологиях. Таким образом, уровни цитозольного кальция и кальциевая буферная емкость митохондрий имеет двунаправленную связь с динамикой МС, что играет роль при патологиях, связанных с нарушением внутриклеточного гомеостаза кальция (Abramov A.Y. *et al.*, 2017; Gandhi S. *et al.*, 2009; Ludtmann M.H.R., Abramov A.Y., 2018).

1.2.2. Связь динамики митохондриальной сети и продукции активных форм кислорода

Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза клетки под действием внешних или внутренних факторов приводит к избыточной продукции АФК, что вызывает окислительные повреждения биологических макромолекул (ДНК, белки, липиды и углеводы) и приводит к развитию окислительного стресса, лежащего в основе многих патологических состояний (Kujoth G.C. *et al.*, 2005; Youle R.J., Blik A.M. van der, 2012). Динамика МС тесно связана с регуляцией продукции АФК в клетках. Например, фрагментация митохондрий, обычно связанная с повышенной активностью Dgp1, может привести к увеличению образования АФК из-за нарушения транспорта электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий и снижения эффективности дыхания (Halliwell B., 2006; Trigo D. *et al.*, 2023). Митохондриальная ДНК, находясь в непосредственной близости к электрон-транспортной цепи, особенно уязвима к атаке свободных радикалов и окислительному повреждению. Митохондриальная ДНК кодирует компоненты четырех из пяти комплексов электрон-транспортной цепи (комплекс I и III-V), поэтому мутации в ней могут приводить к митохондриальной дисфункции, создавая замкнутый круг ухудшения функций митохондрий и нарушая динамику МС. Свободно-радикальная теория старения особенно подчеркивает взаимосвязь между постоянным накоплением мутаций митохондриальной ДНК и увеличением продукции АФК с возрастом (Gandhi S., Abramov A.Y., 2012; Kujoth G.C. *et al.*, 2005). С другой стороны, циклы деления и слияния митохондрий, обеспечивающие перемешивание митохондриальной ДНК между митохондриями в МС, могут служить дополнительным механизмом защиты клетки от

окислительного повреждения (Ahmad T. *et al.*, 2013; Guzman J.N. *et al.*, 2010; Trigo D. *et al.*, 2023).

Помимо этого, существует сложное взаимодействие между окислительным стрессом и митофагией в клетках: базальная митофагия способствует удалению окисленных белков и поврежденных митохондрий, снижая окислительный стресс, тогда как нарушения в этом процессе приводят к накоплению дисфункциональных митохондрий и усиленной продукции АФК (Frank M. *et al.*, 2012). Умеренное увеличение уровня продукции АФК может увеличивать уровень митофагии через активацию сигнальных белков, таких как АМПК и сиртуины, что стимулирует устранение поврежденных митохондрий и неправильно свернутых белков (Trigo D. *et al.*, 2023). С другой стороны, избыточный окислительный стресс ухудшает митофагию: АФК повреждают лизосомы, нарушают слияние аутофагосом с лизосомами и за счет инактивации транскрипционных факторов подавляют экспрессию генов, регулирующих аутофагию (Federico A. *et al.*, 2012; Niedzielska E. *et al.*, 2016; Yun H.R. *et al.*, 2020).

Таким образом, посредством регулирования динамики МС клетки могут адаптироваться к изменяющимся метаболическим требованиям и повреждающим воздействиям, оптимизируя баланс между производством и нейтрализацией АФК для поддержания клеточного гомеостаза и предотвращения развития окислительного стресса.

1.2.3. Связь динамики митохондриальной сети и pH клетки

Изменение внутриклеточного pH имеет значительное влияние на динамику МС. Так, изменение внутриклеточного pH влияет на митохондриальные буферные системы и может вызывать перераспределение ионов кальция в митохондриях, что в свою очередь вызывает реорганизацию морфологии МС (Hartmann J., Verkhatsky A., 1998; Luongo T.S. *et al.*, 2017). Кроме того, внутриклеточный pH может воздействовать на конформационную и посттрансляционную модификацию белков, участвующих в процессах слияния и деления: так, продолжительное понижение внутриклеточного pH, часто связанное с ишемическими условиями или гипоксией, может активировать пути, стимулирующие деление митохондрий (Marino M.L. *et al.*, 2012; Owens L.M. *et al.*, 1996). Кислая среда усиливает активность Drp1 через модуляцию фосфорилирования этого белка, увеличивая аффинность к митохондриальным рецепторам и способствуя транслокации Drp1 к митохондриям (Duan C. *et al.*, 2020). Напротив, повышение внутриклеточного pH, например, при восстановлении после кислотного стресса, может способствовать усилению митохондриального слияния (Wu W. *et al.*, 2014), что, возможно, связано с активацией факторов транскрипции, таких как Nrf2 и PGC-1 α .

Интересно, что как было недавно показано, одной из особенностей нейродегенерации может являться повышение рН в лизосомах, что может сказаться на эффективности митофагии (Quick J.D. *et al.*, 2023; Song Q. *et al.*, 2020). Поскольку активность многих лизосомальных ферментов оптимальна при более низком рН, эффективность митофагии зависит от кислотности лизосом. В результате поврежденные митохондрии могут накапливаться в клетках, способствуя повышению уровня АФК и развитию окислительного стресса. Помимо этого, повышенный рН в лизосомах может препятствовать деградации патологических белковых агрегатов при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона (БП), болезни Хантингтона (Quick J.D. *et al.*, 2023; Song Q. *et al.*, 2020). Таким образом, понимание взаимосвязей между изменениями рН и динамикой МС имеет важное значение для разработки терапевтических стратегий при заболеваниях, связанных с изменением рН.

1.3. Связь динамики митохондриальной сети с заболеваниями

1.3.1. Динамика митохондриальной сети при нейродегенеративных заболеваниях

Динамика МС имеет значительный вклад в развитие нейродегенеративных заболеваний вследствие того, что поддержание функциональной МС особенно важно для тканей, имеющих узкую специализацию и высокую метаболическую активность, к которым относится и нервная ткань (Kageyama Y. *et al.*, 2012). Поскольку нейроны являются постмитотическими клетками, они не могут разделять поврежденные митохондрии между дочерними клетками и, в отличие от делящихся клеток, в большей степени используют механизм слияния/деления для сохранения или восстановления функций поврежденных митохондрий (Del Dotto V. *et al.*, 2018; Iwata R., Casimir P., Vanderhaeghen P., 2020). Наиболее известными патологиями, при которых происходят мутации в белках, связанных со слиянием митохондрий, и образование сильно фрагментированной МС, являются болезнь Шарко–Мари–Тута (мутации в гене, кодирующем белок Mfn2) и доминантная атрофия зрительного нерва (мутации в гене, кодирующем белок Opa1) (Del Dotto V. *et al.*, 2018; Spinazzi M. *et al.*, 2008). В настоящее время предполагается, что нарушения морфологии и динамики МС играют значительную роль не только при болезни Шарко–Мари–Тута и доминантной атрофии зрительного нерва, но и при болезни Альцгеймера, БП и болезни Хантингтона. Так, патологические белковые агрегаты, характерные для этих нейродегенеративных заболеваний, могут напрямую влиять на процессы деления/слияния митохондрий и митофагию (Chen W., Zhao H., Li Y., 2023; Huang P., Galloway C.A., Yoon Y., 2011; Misgeld T., Schwarz T.L., 2017; Youle R.J., Blik A.M., 2012).

Показано, что бета-амилоид, играющий роль в патогенезе болезни Альцгеймера, активирует фосфорилирование Drp1, усиливая его привлечение к митохондриям и тем самым вызывая фрагментацию МС (Рисунок 4). Кроме того, бета-амилоид может подавлять экспрессию и функцию митофузинов и Opa1, что препятствует слиянию митохондрий и ухудшает функциональную целостность МС (Angelova P.R., Abramov A.Y., 2017; Kim D.I. *et al.*, 2016; Medala V.K. *et al.*, 2021).

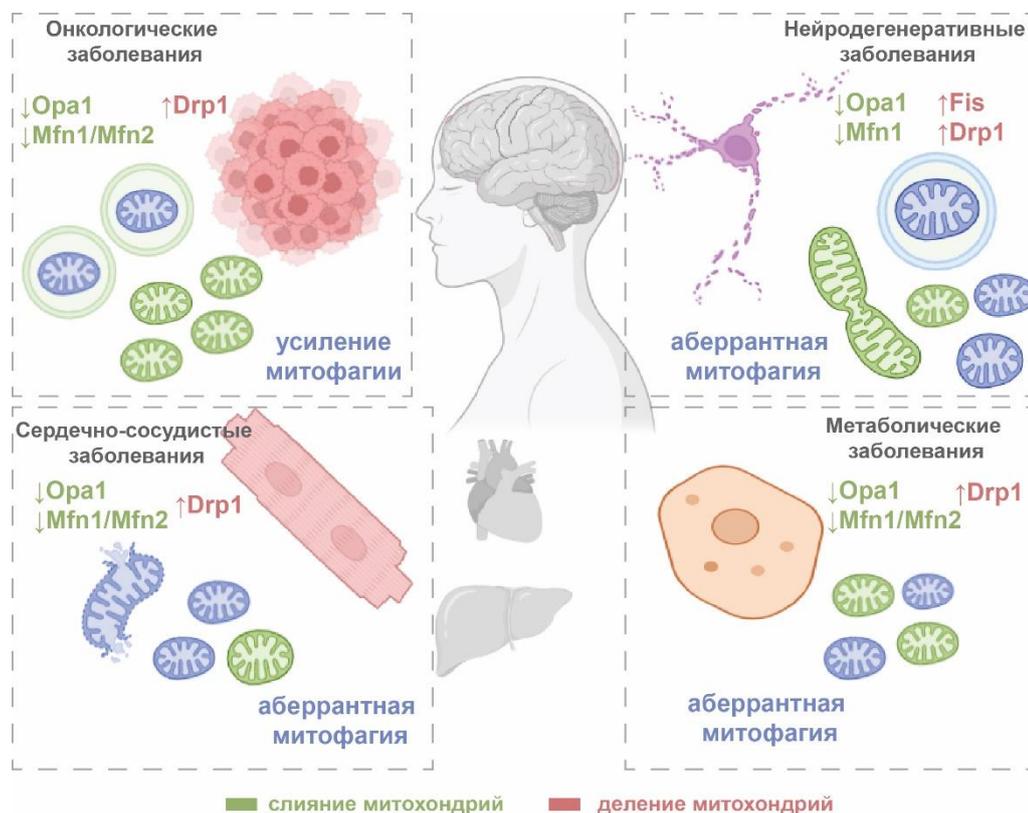


Рисунок 4. Нарушение динамики митохондриальной сети при различных заболеваниях. Нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и метаболические заболевания характеризуются в основном фрагментацией митохондриальных сетей вследствие усиления деления и нарушения слияния митохондрий, а также aberrантной митофагией. В случае онкологических заболеваний может происходить не только усиление деления, но и повышенная активация митофагии, что способствует выживанию опухолевых клеток. Рисунок выполнен с использованием интернет-ресурса <http://Biorender.com>

Агрегаты альфа-синуклеина, характерные для БП, могут либо напрямую вызывать фрагментацию и набухание митохондрий МС, либо индуцировать перенос белка Drp1 к митохондриям, усиливая деление этих органелл (Bido S. *et al.*, 2017; Kim D.I. *et al.*, 2016; Krzystek T.J. *et al.*, 2021; Medala V.K. *et al.*, 2021). Помимо этого, при БП в дофаминергических нейронах происходит накопление мутаций митохондриальной ДНК, что может вторично усиливать деление митохондрий и приводить к повышенной фрагментации МС (Abramov A.Y. *et al.*, 2010; Dölle C. *et al.*, 2016). Кроме того, семейные формы БП, для которых характерны мутации в генах, связанных с митофагией,

дополнительно подчеркивают важность динамики МС в развитии этой патологии. Ранние исследования на модели животной модели дрозофилы показали, что мутации, нарушающие функции белка Parkin, участвующего в регуляции митофагии, приводят к потере дофаминергических нейронов и митохондриальной дисфункции. Похожая ситуация и при мутации в PINK1 – киназе, непосредственно взаимодействующей с Parkin в процессе митофагии (Gandhi S. *et al.*, 2009). Кроме того, существует функциональная связь между киназами PINK1 и Parkin и митофузинами, что обеспечивает дополнительную регуляцию морфологии МС, которая может быть нарушена при БП (Gegg M.E. *et al.*, 2010).

При болезни Хантингтона, для которой характерно образование агрегатов белка хантингтина, происходит нарушение не только процессов слияния и деления митохондрий, но и транспорта митохондрий вдоль микротрубочек. Это влияет на эффективное распределение митохондрий в нейронах, важное для поддержания синаптической функции. Помимо этого, агрегаты хантингтина могут вызывать избыточную активацию Drp1, приводя к фрагментации митохондрий, что в конечном итоге нарушает эффективность окислительного фосфорилирования и увеличивает уязвимость нейронов к окислительному стрессу (Reddy P.H., 2014).

В последние годы научное сообщество все больше осознает критическую важность глиальных клеток в функционировании нервной системы, процессах старения и развитии нейродегенеративных заболеваний (Verkhatsky A., Semyanov A., 2025). Так, митохондрии астроцитов участвуют в регуляции не только окислительно-восстановительного баланса, но кальциевого гомеостаза и метаболизма нейротрансмиттеров в центральной нервной системе (Verkhatsky A. *et al.*, 2023). С возрастом и при нейродегенеративных заболеваниях наблюдается снижение функциональной активности митохондрий астроцитов и изменяется динамика МС, что приводит к нарушению способности этих клеток поддерживать нейроны и синаптическую пластичность (Поров А. *et al.*, 2023). Более того, появляющиеся данные свидетельствуют о том, что нарушение регуляции динамики МС, характеризующееся aberrantными событиями деления и слияния в глиальных клетках, тесно связано с воспалительной активацией глии (Rahman M.H., Suk K., 2020). Это, в свою очередь, может способствовать прогрессированию нейродегенеративных процессов.

1.3.2. Динамика митохондриальной сети при метаболических и сердечно-сосудистых заболеваниях

Метаболические нарушения, такие как ожирение, диабет и неалкогольная жировая болезнь печени также тесно связаны с изменением динамики МС, что преимущественно проявляется в преобладании процессов деления митохондрий и снижением слияния

(Galloway C.A. *et al.*, 2014; Jheng H.-F. *et al.*, 2012; Vincent A.M. *et al.*, 2010). При диабете 2 типа дисбаланс в сторону деления приводит к дисфункции митохондрий, нарушению окисления жирных кислот и накоплению липидов, в конечном итоге вызывает резистентность к инсулину и метаболический синдром (Jheng H.-F. *et al.*, 2012; Lin H.-Y. *et al.*, 2018; Sivitz W.I., Yorek M.A., 2009). Особо стоит отметить тот факт, что гипергликемия может по-разному влиять на МС в зависимости от типа клеток. Так, в недавнем исследовании было показано, что в первичных эндотелиоцитах гипергликемический стресс вызывал значительное увеличение числа митохондрий, уменьшение их размера, а также снижение связности МС, тогда как в фибробластах, напротив, гипергликемия вызывала уменьшение количества митохондрий и увеличение их размеров (Belosludtseva N.V. *et al.*, 2023). Помимо этого, разный уровень энергетических потребностей клеток также может определять изменение МС при диабете 2 типа (Jheng H.-F. *et al.*, 2012).

Избыток жирных кислот, связанный с ожирением, вызывает как количественные, так и качественные изменения в митохондриях. В животных моделях ожирения показал повышенную активность Fis1 – белок внешней митохондриальной мембраны, ответственный за рекрутирование Drp1 к митохондриям. Ингибирование Fis1 улучшает функцию митохондрий и снижает резистентность к инсулину (Kolac U.K., Donmez Yalcin G., Yalcin A., 2023; Lin H.-Y. *et al.*, 2018). В добавок к усилению деления, липидная перегрузка подавляет слияние митохондрий, снижая экспрессию митофузинов, в результате чего органеллы становятся меньше и многочисленнее. Восстановление экспрессии митофузинов может увеличить связность МС и улучшить метаболический гомеостаз. В гепатоцитах пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени также наблюдается увеличение экспрессии белка Drp1 и повышенная фрагментация МС (Bach D. *et al.*, 2003; Sivitz W.I., Yorek M.A., 2009).

Помимо метаболических нарушений, дисбаланс деления и слияния митохондрий вносит значительный вклад в патогенез ишемической болезни сердца и переход от ишемии к сердечной недостаточности: повышенное деление, опосредованное Drp1, является ранним событием при ишемическом повреждении сердца, усугубляя потерю кардиомиоцитов после инфаркта. На более поздних стадиях ишемического повреждения сердца происходит снижение экспрессии митофузинов и Opa1, что также способствует дисфункции митохондрий и гибели клеток (Dorn G.W. *et al.*, 2011; Guan L. *et al.*, 2019; Zhang Y. *et al.*, 2019). Воздействие митохондриально-направленных антиоксидантов и инсулина снижает фрагментацию МС и защищает клетки от ишемически-реперфузионного повреждения (Plotnikov E.Y. *et al.*, 2008).

1.3.3. Роль динамики митохондриальной сети в онкологических заболеваниях

Динамика МС играет важную роль во многих аспектах развития и прогрессирования онкологических заболеваний, таких как канцерогенез, метастазирование, развитие устойчивости к химиопрепаратам (Arismendi-Morillo G., 2009; Wallace D.C., 2012; Zhao J. *et al.*, 2013). Интересно отметить, что те механизмы динамики МС, которые в нормальных тканях приводят к гибели клеток, в перерожденных наоборот вызывают устойчивость к апоптозу. Например, увеличение фрагментации МС вследствие повышенной активации Drp1 в перерожденных клетках повышают скорость биогенеза митохондрий и рост опухоли (Wallace D.C., 2012; Zhao J. *et al.*, 2013). Помимо этого, нарушение динамики МС, наблюдаемое на начальных стадиях опухолевой трансформации клеток, может препятствовать высвобождению факторов апоптоза, таких как цитохром с, и подавлять чувствительность клеток к апоптотическим стимулам (Cassidy-Stone A. *et al.*, 2008; Kashatus J.A. *et al.*, 2015). Опухолевая трансформация также сопровождается увеличением уровня аутофагии и активным белковым ответом, в частности, повышением экспрессии шаперонов (Alhasan B. *et al.*, 2023). Кроме того, повышение уровня митофагии может способствовать онкогенезу, поддерживая метаболическую гибкость раковых клеток. Ускоренная деградация поврежденных митохондрий позволяет раковым клеткам избегать апоптоза, тем самым поддерживая их выживание и рост. В добавок к этому, изменения в экспрессии таких белков, как PINK1, Parkin, и Vnp3, влияют на активность митофагии опухолевых клеток и, соответственно, на их онкогенные свойства (Li S. *et al.*, 2022; Zhao J. *et al.*, 2013).

Таким образом, имеющийся в данный момент спектр данных убедительно показывает, что динамика МС при различных патологиях может стать перспективной мишенью для фармакологического воздействия. Нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и метаболические заболевания характеризуются в основном повышенной фрагментацией МС вследствие усиления митохондриального деления, связанного с увеличением активности Drp1 и Fis1, и нарушением слияния митохондрий, связанного со снижением активности митофузинов и Opa1. Помимо этого, при этих заболеваниях активность митофагии может быть снижена или, наоборот, компенсаторно увеличена (Рисунок 4). В случае онкологических заболеваний может происходить не только усиление деления митохондрий, но и увеличиваться уровень митофагии, что способствует выживанию опухолевых клеток. Однако до сих пор сложно определить, когда измененная динамика и морфология МС является причиной, а в каких случаях – отражением адаптации клетки при развитии заболевания. В этом свете необходимы дальнейшие исследования связи динамики МС с выживанием и гибелью клеток при патологиях. Помимо этого,

необходим поиск фармакологических агентов или нефармакологических воздействий, повышающих выживаемость клеток в случае нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний, и снижающих – в случае онкологических.

1.4. Возможности фармакологической и нефармакологической коррекции динамики митохондриальной сети

Коррекция динамики МС является перспективным подходом в лечении различных патологий, включая нейродегенеративные, метаболические, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Эта коррекция может осуществляться как фармакологически – с использованием специфических агентов, так и нефармакологически – с помощью различных воздействий, таких как физическая нагрузка, ограничение калорий и кетогенная диета. На наш взгляд, фармакологические агенты относительно динамики МС можно разделить на две большие группы: воздействующие на митохондриальное деление/слияние и на митофагию.

1.4.1. Фармакологическая регуляция деления и слияния митохондрий

Уменьшение скорости деления митохондрий является определяющей стратегией для лечения заболеваний, связанных с избыточной фрагментацией митохондрий. Для этой цели были разработаны различные ингибиторы деления, такие как Mdivi-1, P110, Dynasore и DRP1i. Так, Mdivi-1 является одним из первых ингибиторов, селективно блокирующих Drp1 (Bido S. *et al.*, 2017; Maimaitijiang A. *et al.*, 2016; Medala V.K. *et al.*, 2021; Whitley B.N., Engelhart E.A., Hoppins S., 2019). Это соединение доказало свою эффективность в моделях нейродегенеративных заболеваний, таких как БП и болезнь Альцгеймера, снижая гибель нейронов и улучшая поведенческие показатели в животных моделях. Кроме того, Mdivi-1 применяется для защиты кардиомиоцитов в условиях ишемического повреждения и предотвращения развития диабета 2 типа (Cui M. *et al.*, 2010; Medala V.K. *et al.*, 2021; Qi X. *et al.*, 2013). DRP1i – еще один ингибитор Drp1, который формирует водородные связи с ГТФазным доменом Drp1, защищая кардиомиоциты от повреждения в мышечной модели ишемии сердца. Другой пептидный агент, такой как P110, действует через подавление взаимодействия между Fis1 и Drp1, тем самым угнетая процесс деления митохондрий. Этот пептид также показал свою эффективность в моделях нейродегенеративных заболеваний, снижая некротическую гибель нейронов. Dynasore не обладает такой селективностью в ингибировании белков митохондриального деления, но влияет на ГТФазную активность Drp1, что демонстрирует потенциал в снижении гибели клеток при ситуациях, связанных с

повышенной фрагментацией МС (Bido S. *et al.*, 2017; Macia E. *et al.*, 2006; Whitley B.N., Engelhart E.A., Hoppins S., 2019).

Несмотря на обширное изучение ингибиторов деления митохондрий, исследования малых молекул, влияющих на слияние митохондрий, остаются ограниченными (Whitley B.N., Engelhart E.A., Hoppins S., 2019). В экспериментах на мышинной модели кардиомиопатии было показано, что сверхэкспрессия гемоксигеназы-1 увеличивает слияние митохондрий, усиливая также экспрессию митофузинов (Whitley B.N., Engelhart E.A., Hoppins S., 2019). Интересно отметить, что мелатонин активирует путь Notch1/Mfn2, способствуя увеличению уровня Mfn2 (Maneechote C. *et al.*, 2019; Zhang Y. *et al.*, 2019). Химическое соединение гидразон M1 восстанавливает слияние митохондрий в клетках MEF, генетически лишенных митофузинов. Активировать слияние митохондрий также могут препараты, модулирующие деубиквитиназу USP30. Так, ингибиторы USP30, среди которых есть такое вещество как 15-оксоспирамилактон (S3) – производное дитерпеноида, который предотвращает деубиквитинацию и деградацию обоих митофузинов, тем самым способствуя митохондриальному слиянию (Yue W. *et al.*, 2014). Еще один подход усиления слияния митохондрий – воздействие на белок Opa1. Например, как было показано, что пуникалагин предотвращает кардиомиопатию, вызванную диабетом, регулируя путь Stat3-Ptp1b и тем самым способствуя слиянию митохондрий, опосредованному Opa1 (Fu F. *et al.*, 2021; Guan L. *et al.*, 2019).

1.4.2. Соединения, воздействующие на митофагию

Основная сложность в разработке соединений, направленных на митофагию – это контроль их специфичности. Многие вещества, показывавшие способность активировать митофагию, среди которых ресвератрол, обладают плеiotропным действием. Ресвератрол – это природное полифенольное соединение, проявляющее антиоксидантные свойства. Было установлено, что он играет роль при многих заболеваниях посредством регуляции митофагии, и его активно тестировали в клинических исследованиях (Georgakopoulos N.D. *et al.*, 2017). В целом, клинические исследования по прямой модуляции митофагии остаются малочисленными. Кроме того, для активаторов митофагии важна специфичность в деградации именно поврежденных митохондрий без затрагивания здоровых (Masaldan S., Callegari S., Dewson G., 2022). Индукторы митофагии, используемые для экспериментов *in vitro* (среди которых FCCP, CCCP), как правило, являются митохондриальными токсинами, полностью деполаризующих митохондрии (Berezhnov A.V. *et al.*, 2016). Еще одно перспективное соединение, показавшее эффект в индукции митофагии и увеличении продолжительности жизни в животных моделях – это рапамицин, который косвенно

стимулирует митофагию за счет ингибирования mTOR (Cruz López K.G. *et al.*, 2019). Кроме того, вещества, увеличивающие уровень NAD⁺ (например, никотинамид рибозид или NMN), способствуют индукции митофагии через активацию сиртуинов, в особенности сиртуина 1 (Georgakopoulos N.D. *et al.*, 2017). Ранее в нашей лаборатории был показан эффект субстратов окислительного фосфорилирования в форме солей, таких как лактат и пируват натрия, на способность активировать митофагию по PINK1/Parkin независимому пути и увеличивать выживаемость в токсической MPP⁺-индуцированной модели болезни Паркинсона (Fedotova E.I. *et al.*, 2022).

1.4.3. Немедикаментозная модуляция динамики митохондриальной сети

Влияние на динамику МС могут оказывать и различные нефармакологические воздействия, среди которых можно выделить кетогенную диету (Rho J.M., 2017), интервальное голодание (Li L., Chen Y., Gibson S.B., 2013) и активные физические нагрузки (Safdar A. *et al.*, 2011). Дело в том, что, как было сказано ранее, непродолжительный недостаток субстрата активирует пути, связанные с АМПК и митофузинами, что в свою очередь, приводит к ингибированию деления митохондрий и активации слияния (Weig H.J. *et al.*, 2017). С другой стороны, продолжительный голод также приводит к активации митофагии и усилению деления митохондрий. Физические нагрузки временно увеличивают скорость продукции митохондриальных АФК, что в свою очередь, повышает активность PGC-1 α и, как следствие, приводит к повышению биогенеза митохондрий (Jäger S. *et al.*, 2007; Liesa M. *et al.*, 2008; Safdar A. *et al.*, 2011). Стоит также отметить интересный подход, – непродолжительную гиперкапнию, создаваемую вдыханием CO₂, вызывающую, вероятно активацию HIF1. Как было показано ранее, активация HIF1 модулирует динамику МС (Huang X., Zhao L., Peng R., 2023), что может оказывать терапевтическое влияние при увеличении фрагментации МС и улучшать поведенческие характеристики у мышей в модели токсин-индуцированной БП.

1.5. Современные подходы к исследованию динамики митохондриальной сети

1.5.1. Флуоресцентная микроскопия и анализ изображений

Современные подходы анализа митохондриальной функции и динамики МС включают различные виды микроскопии в сочетании с методами анализа изображений. Флуоресцентная микроскопия с применением красителей или флуоресцентных белков, специфичных к митохондриям позволяет визуализировать митохондрии в живых клетках. Количественные и качественные показатели МС возможно оценить с помощью различных

программных инструментов, таких как MiNA Analyze Morphology, Momito и Mito-Morphology (Ahmad T. *et al.*, 2013; Ouellet M. *et al.*, 2017; Valente A.J. *et al.*, 2017). На рисунке 5 представлены некоторые наиболее популярные параметры, применяемые для оценки морфологии МС и параметры, связанные с функцией митохондрий.

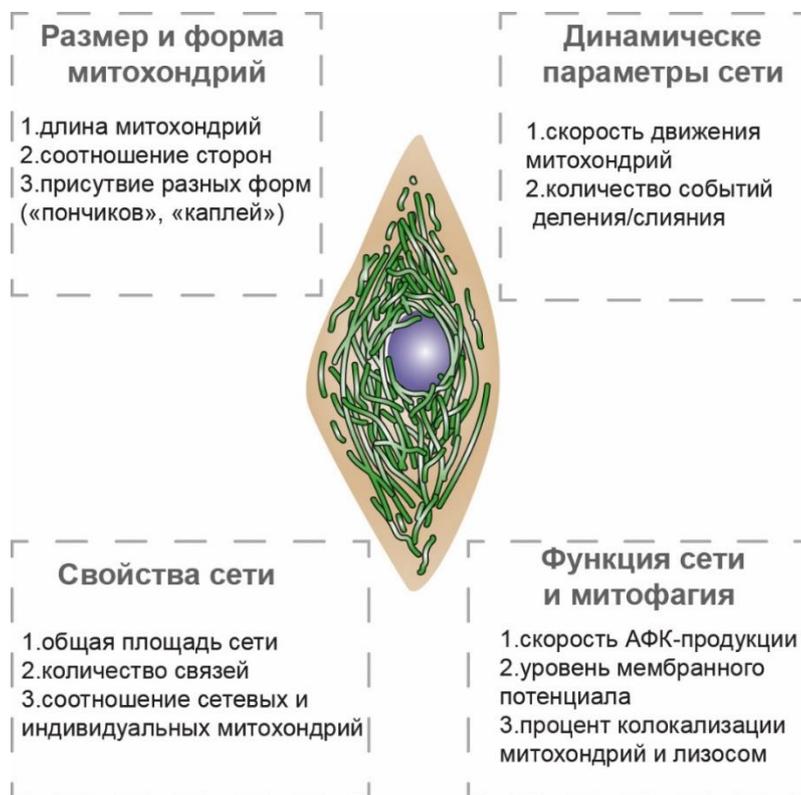


Рисунок 5. Наиболее популярные параметры, используемые для оценки динамики митохондриальной сети (МС) и функции митохондрий в целом. Так, для оценки отдельных митохондрий возможно использование таких параметров, как «длина митохондрии» и «соотношение сторон» (где 1 будет соответствовать шарообразной митохондрии), а также классифицирование формы митохондрий; для описания всей МС оценивается общая площадь сети, количество связей; динамические параметры включают в себя подсчет количества событий слияния/деления и скорости движения митохондрий; о функциональности МС можно судить исходя из оценки скорости продукции митохондриальных АФК, уровня митохондриального мембранного потенциала и степени колокализации митохондрий и лизосом.

Так, морфологические параметры МС, такие как: длина митохондрий, количество связей в МС, площадь митохондриальной сети, количество индивидуальных митохондрий и т.д. отражают изменения динамики МС. Например, показано, что при окислительном стрессе в клетке возникают так называемые «пончики» (полностью закольцованные митохондрии), увеличивается количество индивидуальных митохондрий, а соотношение сторон митохондрии стремится к 1, свидетельствуя о разбухании митохондриального

матрикса. Для количественной оценки митофагии используется метод исследования колокализации митохондрий и лизосом (Dolman N.J. *et al.*, 2013). О функциональном состоянии митохондрий можно судить исходя из уровня митохондриального мембранного потенциала, измеряя накопление потенциал-чувствительных флуоресцентных зондов вблизи митохондриальной мембраны (например, Rhodamine-123, JC-1) (Esteras N. *et al.*, 2020). Помимо этого, генетически-кодируемые сенсоры представляют собой мощный инструмент для изучения митохондрий в живых клетках, позволяя с высокой точностью и в режиме реального времени детектировать, например, концентрации H_2O_2 в матриксе митохондрий в ответ на различные физиологические и патологические стимулы (Ivanova A.D. *et al.*, 2024). Кроме того, Рамановская спектроскопия позволяет оценивать окислительно-восстановительное состояние митохондрий без использования флуоресцентных зондов (Kostyuk A.I. *et al.*, 2024).

1.5.2. Анализ графа митохондриальной сети

Анализ МС на основе графа, полученного из конфокального изображения МС клетки, является относительно новым направлением (Hoitzing H., Johnston I.G., Jones N.S., 2015). Следует отметить, что граф МС, является псевдографом, поскольку содержит элементы, недопустимые для простого графа. Важной особенностью графа МС является то, что узлами в нем являются связи между митохондриями, а ребрами – сами митохондрии (Lewis G.R., Marshall W.F., 2023). Ранее был создан подход для анализа МС дрожжевой клетки на основе математического аппарата, применяемого для описания простых графов различной природы (Harwig M.C. *et al.*, 2018; Viana M.P. *et al.*, 2020). На рисунке 6 изображены операции, существующие для МС. Они включают в себя: разные положения деления и слияния митохондрий, транспорт и биогенез митохондрий, а также митофагию (Lewis G.R., Marshall W.F., 2023).

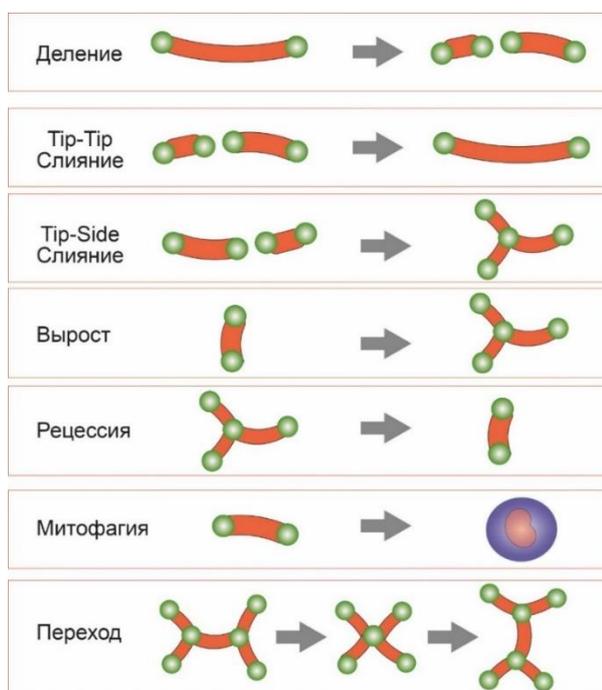


Рисунок 6. Схема элементарных операций, существующих в митохондриальной сети (МС) и отражающихся на строении графа. Так, в МС возможны разные положения деления и слияния митохондрий, транспорт и биогенез митохондрий, а также митофагия. Адаптировано из (Lewis G.R., Marshall W.F., 2023).

Стоит отметить, что существующие подходы к анализу МС могут упускать изменения динамики МС из-за происходящих зачастую одновременно разнонаправленных событий слияния/деления митохондрий, и чувствительны только к крайним вариантам фенотипа МС (например, тотальной фрагментированной МС). Кроме того, еще одним недостатком этих подходов является грубая количественная оценка без учета трехмерной архитектуры МС.

Таким образом, современная оценка МС сочетает в себе различные методы визуализации и компьютерный анализ изображений, что позволяет получить количественную характеристику МС в норме и при патологии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1 Реактивы

Растворы для работы и составляющие сред для клеточных культур: DMEM (Sigma-Aldrich, США), Neurobasal-A (Gibco, США), FBS (эмбриональная телячья сыворотка, Sigma), Supplement B27 (Gibco), раствор Хенкса (ПанЭко, Россия), раствор Хенкса без Ca^{2+} , Mg^{2+} (ПанЭко), пенициллин+стрептомицин (Sigma), L-глутамин (Gibco), раствор трипсин-ЭДТА 2.5% (Gibco), HEPES Na-соль (ПанЭко), сахароза (Helicon, Россия), глюкоза (Helicon), фосфатно-солевой буфер PBS (Helicon). *Флуоресцентные зонды:* Thermo Fisher Scientific (США): Hoechst 33342, TMRM (Тетраметилпродамин), Propidium Iodide (PI), Calcein-AM, BCECF-AM, MitoTracker Green, LysoTracker Red, H_2DCFDA ; MitoTracker Red CM-H(2)XROS, NucView-488 (Biotium, США). *Готовые смеси реактивов:* набор MMLV RT (Евроген, Россия), набор qPCRmix-HS SYBR и олигонуклеотиды (праймеры) (Евроген); *Вещества, для которых был исследован эффект на динамику митохондриальной сети:* H_2O_2 (Дальхимфарм, Россия), Sigma: FCCP, MPP^+ , феррутинин, Mdivi-1, лактат натрия и пируват натрия, циклоспорин А; омавелоксолон (MedChemExpress, США); образцы белка теплового шока (HSP70), в которых проведены точечные замены для улучшения стабильности, и его С-концевого фрагмента (C_ HSP70) были синтезированы и очищены под руководством д.б.н. Демьяненко С. В. на базе Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН.

2.1.2. Оборудование

Визуализацию клеток и оценку различных клеточных параметров проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000 B (Leica Microsystems, Вецлар, Германия), конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия) и Zeiss 900 CLSM (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Йена, Германия) и многофункционального планшетного ридера Spark10M (Tecan Group, Маннедорф, Швейцария).

2.2. Объекты исследований

В качестве объектов исследования использованы: первичная нейрон-глиальная культура мозга крысы, культуры человеческих фибробластов от пациентов с наследственной болезнью Паркинсона, линейные культуры: клетки рака протока молочной железы BT-474, мышечные фибробласты L929. Все работы с первичными и линейными культурами клеток, а также исследования с участием животных проводились в соответствии с требованиями законодательства и одобрены Комитетом по этике Института биофизики клетки РАН (Разрешение № 4 от 14 марта 2022 г.; Разрешение № 3 от 12 марта 2023 г.).

2.2.1 Фибробласты с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона.

Клеточные линии были любезно предоставлены профессором А. Ю. Абрамовым из Института неврологии Университетского колледжа Лондона (Великобритания). В исследовании использовались культуры фибробластов кожи, полученные от пациентов с генетически подтвержденной БП: 1) гетерозиготная мутация A53T в гене, кодирующем альфа-синуклеин; 2) гомозиготная мутация p.Trp90Leufsx12 в гене, кодирующем белок PINK1; 3) комбинация мутаций в генах, кодирующих белки PINK1 (p.Trp90Leu fs*12/WT) и Parkin (PARK2 R275W/WT); 4) мутация G2019S в гене, кодирующем LRRK2. Также были использованы три линии фибробластов от здоровых доноров соответствующего возраста в качестве контроля. Клетки выращивали в культуральных флаконах с площадью поверхности 25 см² в модифицированной среде Игла (DMEM), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамин и 1 mM пирувата натрия. Культивирование проводилось при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 100% влажностью. При достижении 80-85% конfluence клетки пассировали для поддержания культуры или высевали на круглые покровные стекла диаметром 25 мм для проведения экспериментов. В работе использовались клетки, прошедшие не более 18 пассажей.

2.2.2. Первичная нейрон-глиальная культура коры мозга крысы

Для извлечения мозга крыс линии Вистар в возрасте 1-3 дней усыпляли и декапитировали. Кору мозга отделяли от остального мозга и помещали в ледяной раствор Версена, без Ca²⁺/Mg²⁺. После этого ткань измельчали и обрабатывали 0,25% трипсином при 37°C (не более 10 минут). Инактивацию трипсина проводили двукратной промывкой в нейробазальной среде. Далее полученную клеточную суспензию центрифугировали в течение 3 минут при 2000 об/мин, супернатант осторожно удаляли, осадок ресуспендировали в культуральной среде и высевали на покровные стекла, покрытые полиэтиленгликолем. Для нейрон-глиальной культуры ростовая среда содержала

нейробазальную среду, добавку В-27 (2%), 0,5 мМ глутамин, пенициллин-стрептомицин. Культуры содержались при температуре 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ и 95% воздуха. В экспериментах использовали культуры в диапазоне 12–14 дней инкубации.

2.2.3. Клеточные линии

Линейные культуры (клетки рака протока молочной железы BT-474, мышинные фибробласты L929) культивировали в стандартных условиях в культуральных матрасах площадью 25 см² в полной культуральной среде, содержащей DMEM, 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин и 1 мМ пирувата натрия при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности и высевали на покровные стекла или пластмассовые планшеты для эксперимента.

2.2.4. Создание различных экспериментальных условий

Создание условий голода. Для создания условий голода полную инкубационную среду в клетках заменяли на среду без фетальной бычьей сыворотки на 24 часа до начала эксперимента. *Модель окислительного стресса.* Для создания модельных условий окислительного стресса в инкубационную среду с клетками добавляли перекись водорода в концентрациях от 50 мкМ до 250 мкМ на время от 30 минут до 1,5 часа в зависимости от целей эксперимента. *Ингибирование дыхания.* Для создания условий ингибирования дыхания митохондрий к клеткам в культуральную среду добавляли ингибитор I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий MPP⁺ в концентрации 500 мкМ на 24 часа до начала эксперимента. *Ингибирование деления митохондрий.* Для создания условий ингибирования деления митохондрий к клеткам в культуральную среду добавляли ингибитор Drp1 – Mdivi-1 в концентрации 5 мкМ на 24 часа до начала эксперимента. *Разобщение окислительного фосфорилирования.* Для создания модели разобщения окислительного фосфорилирования к клеткам в культуральную среду добавляли 1 мкМ FCCP на 30 минут до начала эксперимента. *Закисление.* Модель внутриклеточного закисления была создана за счет замены рабочего раствора Хэнкса с pH 7,4 на раствор с более низким pH на 30 минут, после чего клетки оставляли еще на 1 час в покое до начала эксперимента. *Активация Nrf2 пути.* Для активации Nrf2 пути к клеткам в культуральную среду добавляли 50 нМ омавелоксолон на 24 часа до эксперимента и до воздействия перекисью водорода. *Добавка рекомбинантного белка теплового шока 70 (HSP70) и его C-концевого фрагмента (C-HSP70).* HSP70 или его (C-HSP70) в концентрации 150 мкг/мл

был добавлен к клеткам в культуральную среду на время от 1 часа до 24 часов в зависимости от эксперимента.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Измерения продукции активных форм кислорода

Для детекции активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме клетки инкубировали с флуоресцентным индикатором H₂DCFDA в концентрации 10 мкМ на протяжении 40 минут при комнатной температуре, после этого клетки промывали раствором Хэнкса (Orarka M. *et al.*, 2016). Измерение интенсивности флуоресценции проводили с помощью мультимодального планшетного ридера или с использованием системы визуализации на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа. Применяли объектив с 20-кратным увеличением и набор фильтров FITC (длина волны возбуждения 494±10 нм, эмиссии 535±10 нм). Для оценки продукции АФК в митохондриях использовали специфичные флуоресцентные красители. В первом случае клетки инкубировали с MitoTracker Red CM-H₂XRos в концентрации 100 нМ в течение получаса. Альтернативно применяли краситель MitoSOX Red в концентрации 5 мкМ со временем инкубации 15 минут при комнатной температуре. После окрашивания клетки промывали раствором Хэнкса. Регистрацию флуоресцентного сигнала проводили с использованием 20-кратного объектива и набора фильтров Texas Red (возбуждение при 575±10 нм, регистрация при 624±20 нм).

2.3.2. Измерение потенциала митохондриальной мембраны

Для оценки митохондриального мембранного потенциала применяли флуоресцентный краситель TMRM (Esteras N. *et al.*, 2020). Клетки инкубировали с TMRM в концентрации 25 нМ в растворе Хэнкса в течение 40 минут при комнатной температуре. Визуализацию митохондриальной сети осуществляли с помощью конфокального микроскопа, оснащенного масляно-иммерсионным объективом с 63-кратным увеличением. Во время проведения измерений TMRM постоянно присутствовал в инкубационной среде. Для минимизации фототоксического эффекта интенсивность возбуждающего излучения поддерживали на низком уровне, используя 0,1-0,2% от максимальной мощности лазера. Возбуждение флуорофора производили лазером с длиной волны 561 нм. Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляли в диапазоне длин волн свыше 580 нм.

2.3.3. Выживаемость клеток

Выживаемость клеток оценивали с использованием метода двойного окрашивания с 5 мкМ Hoechst 33342 и 20 мкМ Propidium Iodide в растворе Хэнкса в течение 45 минут при комнатной температуре. Propidium Iodide может окрашивать только клетки с нарушенной мембранной проницаемостью при некрозе и начальных стадиях апоптоза, тогда как Hoechst 33342 окрашивает ДНК во всех клетках. Поскольку мертвые клетки отсоединяются от подложки и могут не войти в учет при визуализации с использованием микроскопии, для расчета выживаемости также учитывали плотность культуры клеток в контроле до различных воздействий.

2.3.4. Визуализация активации каспазы-3 при деполяризации митохондрий

Для визуализации активации каспазы-3 в ответ на деполяризацию митохондрий клетки нагружали митохондриальным 25 нМ TMRM и 2 мкМ флуоресцентного субстрата каспазы-3 NucView-488 в растворе Хэнкса в течение 45 минут при комнатной температуре. Далее производили поэтапное добавление электрогенного ионофора кальция ферутина (Zamaraeva M.V. *et al.*, 1997), опосредующего вход ионов Ca^{2+} в митохондрии, до момента начала флуоресценции NucView-488, обозначающего активацию каспазы-3 (Cen H. *et al.*, 2008). После каждого шага добавления ферутина (5 мкМ), площадь МС подсчитывалась по флуоресценции TMRM с использованием плагина «Анализатор частиц» Fiji.

В настоящей работе оценивалась только деполяризация митохондрий, зависящая от открытия поры переходной проницаемости митохондрий (mPTP) и сопровождающаяся резкой потерей мембранного потенциала митохондрий (Рисунок 7А-А'). Для подтверждения mPTP-зависимой деполяризации митохондрий был проведен эксперимент с добавлением ферутина и предварительной инкубацией клеток с 0,5 мкМ циклопорина А в течение 30 минут (Рисунок 7Б-Б') (Ilyich T. *et al.*, 2018). Циклоспорин А является ингибитором циклофилина D, который, как предполагается, является частью поры mPTP (Broekemeier K.M., Dempsey M.E., Pfeiffer D.R., 1989; Haleckova A. *et al.*, 2022). Действительно, в присутствии циклопорина А происходила медленная нарастающая деполяризация митохондрий (Рисунок 7Б-Б'), а не быстрая и не обратимая как в случае контрольной культуры.

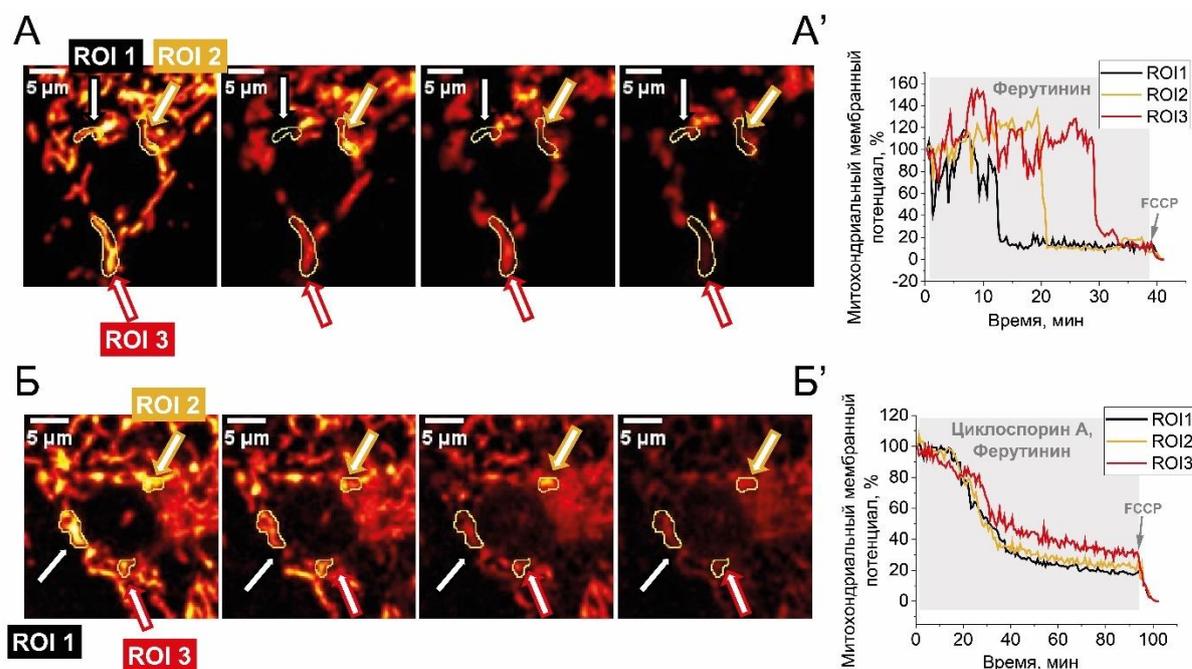


Рисунок 7. Подтверждение зависимости потери митохондриального мембранного потенциала от открытия поры переходной проницаемости (mPTP) при пошаговом добавлении феррутина. Изображение митохондриальной сети нейрона, окрашенной потенциал-чувствительным зондом TMRM во времени при пошаговом добавлении феррутина в А) контрольной культуре и Б) при предварительной инкубации с циклоспорином А (0,5 мкМ, 30 минут), стрелочками указаны ROI (region of interest), содержащие митохондрии соответствующих клеток; Митохондриальный мембранный потенциал выбранных ROI (в процентах от начального) во времени при пошаговом добавлении феррутина в А') контрольной культуре и Б') при предварительной инкубации с циклоспорином А (0,5 мкМ, 30 минут).

2.3.5. Измерение уровня колокализации митохондрий и лизосом

Для оценки уровня митофагии исследовали степень колокализации митохондрий и лизосом согласно методике, описанной в работах (Berezhnov A.V. *et al.*, 2016; Fedotova E.I. *et al.*, 2022). Клетки обрабатывали флуоресцентными красителями 0,3 мкМ MitoTracker Green и 0,1 мкМ LysoTracker Red. Окрашивание проводили в течение 40 минут в бессывороточной среде в CO₂-инкубаторе: митохондрии окрашивали до воздействия предполагаемыми индукторами митофагии, а лизосомы – сразу после. Для получения изображений использовали конфокальные микроскопы Leica TCS SP5 или Zeiss LSM710 с 63x объективом. В качестве источников возбуждения применяли аргоновый лазер (488 нм) и неон-гелиевый лазер (543 нм). Флуоресцентный сигнал регистрировали в диапазонах 525±25 нм и 665±35 нм. Для количественной оценки митофагии применяли макрос для программы ImageJ, разработанный для оценки процента площади изображения, занятой

митохондриями и лизосомами, и вычисления доли митохондрий, колокализованных с лизосомами (Berezhnov A.V. *et al.*, 2016; Fedotova E.I. *et al.*, 2022).

2.3.6. Измерение внутриклеточного pH

Для измерения внутриклеточного pH клетки загружали в течение 40 минут двухволновым флуоресцентным зондом BCECF-AM (5 мкМ), после чего трижды промывали раствором Хэнкса. Исследования проводились на многофункциональном планшетном ридере Spark10M. Для этого клетки предварительно высевали на 48-луночных культуральных планшетах. Флуоресценцию возбуждали на длинах волн 430 ± 10 нм и 510 ± 12 нм, а регистрировали на длине волны 560 ± 10 нм. Сначала проводили калибровку флуоресцентных сигналов для каждой культуры: рабочую среду заменяли на калибровочные растворы с высоким содержанием ионов калия и известными значениями pH с добавлением 10 мкМ нигерицина (Behbahan I.S., McBrien M.A., Kurdistani S.K., 2014). Затем по стандартному протоколу вычисляли уравнения калибровочной кривой (Рисунок 8).

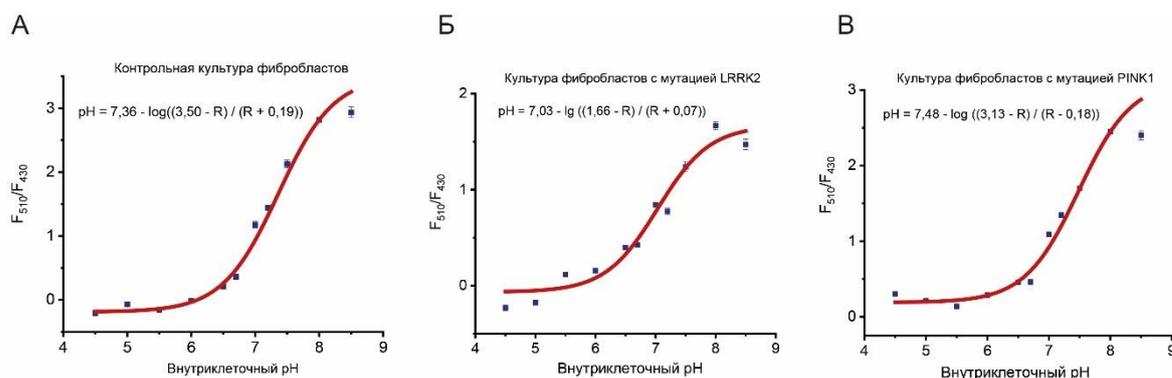


Рисунок 8. Калибровочные кривые, используемые для измерения внутриклеточного pH с помощью ратиометрического зонда BCECF-AM в культуре А) контрольных фибробластов; Б) фибробластов с мутацией гена белка LRRK2; В) фибробластов с мутацией гена белка PINK1.

Коэффициенты, полученные в калибровочных кривых для каждой исследуемой культуры, использовали для вычисления внутриклеточного pH при различных воздействиях.

2.3.7. Оценка морфологии митохондриальной сети

Для анализа морфологии МС изображения клеток, нагруженных TMRM (25 нМ), получали с помощью конфокального микроскопа Zeiss 900 CLSM с использованием х63 объектива (разрешение составляло 23,4 пикселя на микрон). Поскольку площадь следа МС может зависеть от объема клетки, мы предварительно оценили объем клеток с помощью

флуоресценции Calcein-AM (Weston S.A., Parish C.R., 1992). Calcein-AM в концентрации 5 мкМ загружали в клетки на 30 минут при комнатной температуре, после чего на конфокальном микроскопе получали изображения Z-стека и рассчитывали площадь флуоресценции. Значимых различий в объеме изучаемых линий фибробластов обнаружено не было. Далее мы использовали разработанными нами плагин Fiji для автоматической пакетной обработки MC клеток (Kritskaya K.A., Fedotova E.I., Berezhnov A.V., 2024). Протокол оценки морфологии MC был основан на подходах, описанных ранее. Этапы анализа показаны на рисунке 9.

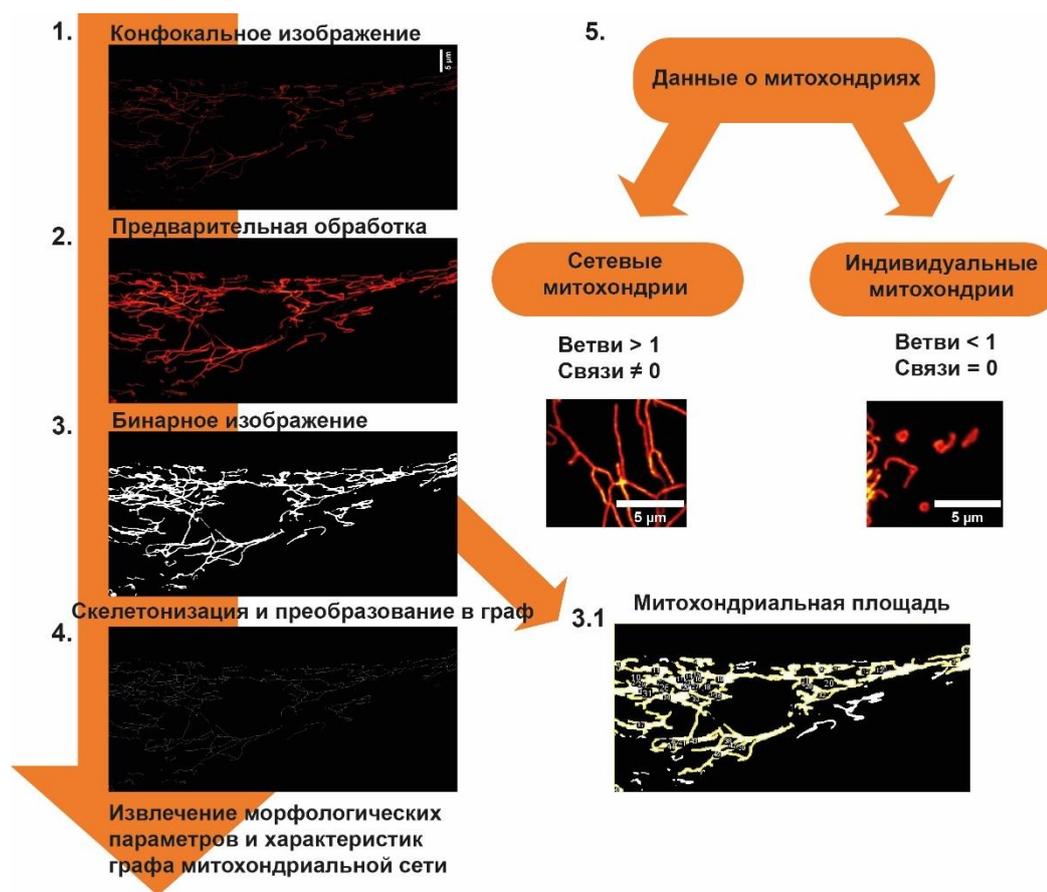


Рисунок 9. Алгоритм анализа морфологии митохондриальной сети (MC). 1) На первом этапе конфокальное изображение клеток, окрашенных TMRM, подвергается предварительной обработке; 2) Следующий этап включает получение бинаризованного изображения; 3) бинарное изображение преобразуется в скелетонизированное с помощью функции «Скелетонизация»; 3.1) бинарное изображение копируется и с помощью плагина «Анализ частиц» происходит подсчет площади митохондриального следа; 4) собирается таблица данных о каждом объекте и передается в среду R-Studio; 5) в R-Studio данные разделяются на два подмножества: «митохондриальные сети» и «отдельные митохондрии» по описанному правилу.

1) Исходное конфокальное изображение было подвергнуто предварительной обработке, которая включала вычитание фона, медианный фильтр и функции локального

повышения контраста (CLACHE). 2) Далее изображение было бинаризовано с использованием пороговой функции, вычисленной методом «Оцу». 3) Изображение было скелетонизировано с помощью функции «Скелетирование» и обработано с помощью встроенной функции «Анализ скелета». 3.1) Кроме того, полученное изображение копировалось, и митохондриальный след рассчитывался по сумме митохондриальных площадей в плагине «Анализатор частиц» Fiji. 5) Полученные данные о митохондриях передавались в среду программирования R и разделялись с помощью функции «фильтр» из пакета «dplyr» на два подмножества: «митохондриальная сети» и «индивидуальные митохондрии» по описанному правилу («митохондриальными сетями» считались объекты, состоящие более чем из одной ветви и содержащие ненулевое соединение, тогда как «индивидуальные митохондрии» состоят только из одной ветви и нулевого соединения).

2.3.8. Представление и анализ митохондриальной сети как графа

Для анализа графа митохондриальной сети использовали язык программирования Python 3. Сначала конфокальные или флуоресцентные изображения были загружены в среду разработки Jupyter Notebook при помощи библиотеки OpenCV в формате tif. Изображения преобразовывались в оттенки серого, после чего к ним применялось гауссово размытие для уменьшения шума. Следующим шагом была бинаризация обработанных изображений для выделения контуров объектов. Контурные точки были обработаны для нахождения центров каждого контура, что позволяло последующему анализу структурировать данные в форме графа.

Граф строился на основе найденных контуров, где узлы представляли собой центры контуров, а ребра добавлялись между узлами, расстояние между которыми было меньше 50 пикселей. Для работы с графом использовалась библиотека NetworkX, что позволило вычислить основные характеристики графа, такие как плотность графа, коэффициент кластеризации и средний кратчайший путь. Программный код, разработанный для анализа MC, доступен по ссылке https://github.com/mrLDP/TDA_Mito_Analysis.

2.6. Анализ экспрессии генов

Экстракцию тотальной РНК из клеточных культур проводили с применением коммерческого набора для выделения РНК (Евроген), следуя протоколу изготовителя. Концентрацию полученной РНК измеряли спектрофотометрически на длине волны 260 нм. Для синтеза комплементарной ДНК использовали обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей MMLV. Реакционная смесь объемом 20 мкл включала 1-2 мкг тотальной РНК, олиго(dT)-праймеры в концентрации 20 мкМ, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов

(dNTP, 10 мМ), дитиотреитол (DTT, 20 мМ) и 100 единиц фермента обратной транскриптазы. Синтез кодирующей ДНК проводили при 40°C в течение 45 минут, после чего реакцию останавливали нагреванием до 70°C на 10 минут. Полученные образцы кодирующей ДНК далее использовали для количественной ПЦР в реальном времени. ПЦР-смесь содержала 3 мкл кодирующей ДНК-матрицы, специфичные праймеры (прямой и обратный, по 10 мкМ каждый, Таблица 2 в Приложении), а также готовую реакцию смесь с интеркалирующим красителем SYBR Green и термостабильной ДНК-полимеразой (5X qPCRmix-HS SYBR, Евроген). После начальной денатурации (5 минут при 95°C) было проведено 40 циклов амплификации: денатурация при 95°C в течение 30 секунд, отжиг при температуре, характерной для праймера, в течение 20 секунд и элонгация при 72°C в течение 30 секунд. Экспрессию изучаемых генов оценивали методом ПЦР в реальном времени на усилителе DTlite (ООО НПО «ДНК-Технологии», Россия). Для определения загрязнения тотальной РНК примесями геномной ДНК устанавливали реакцию отрицательного контроля. В этих образцах флуоресцентный сигнал не наблюдался, что указывает на отсутствие примесей геномной ДНК. Относительный уровень экспрессии рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ или методом $2^{-\Delta Ct}$, где в качестве эталонного гена был взят ген *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) (Kozera B., Rapacz M., 2013).

2.7 Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием языка программирования R (пакета «dplyr») и OriginPro2018. Перед проверкой гипотезы все данные оценивались на предмет нормальности с использованием критерия Шапиро-Уилка ($p > 0,05$). Для статистических сравнений нормально распределенных данных использовали параметрические тесты. Различия между контрольными и экспериментальными группами анализировали с использованием непарного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$), а также одностороннего и двустороннего дисперсионного анализа (пост-критерий Тьюки с коррекцией Бонферрони). Для построения графиков использовался OriginPro2018. Ящичковые диаграммы показывают медиану и межквартильный размах, точки представляют отдельные значения данных.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Разработка подхода для анализа морфологии митохондриальной сети в клетках млекопитающих

МС представляет собой динамическую структуру, морфология которой изменяется в ответ на различные внутренние и внешние воздействия. Стандартные методы анализа МС, недостаточны для полного отражения динамики МС, поскольку они упускают важные локальные пространственные взаимодействия между митохондриями в МС. Для решения этой проблемы нами был разработан подход, основанный на автоматическом анализе конфокальных изображений клетки с использованием вновь созданного программного обеспечения, представляющий собой анализ морфологических параметров МС и оценку характеристик преобразованной в граф МС. Оценка характеристик графа МС позволяет получить информацию о локальных пространственных взаимодействиях в сетях МС, что совместно со стандартными морфологическими параметрами более полно описывает изменения морфологии МС, происходящие при патологических воздействиях. В этой главе мы экспериментально оцениваем применимость предложенного подхода для анализа МС при воздействии различных агентов и условий с заранее известными эффектами, влияющими как на усиление деления митохондрий: действие перекиси водорода (Zhou L. *et al.*, 2010), разобщение дыхания с помощью FCCP (Maro V., Marty M.C., Bornens M., 1982), ингибирование дыхания с MPP⁺ (Liu Y.J. *et al.*, 2020), так и на увеличение слияния митохондрий в МС: голодание с культуральной средой без питательной сыворотки (Rambold A.S. *et al.*, 2011), блокирование митохондриального деления с помощью Mdivi-1 (Ruiz A., Alberdi E., Matute C., 2018). Исследования были проведены на линии мышечных фибробластов L929. Выбор морфологических параметров МС и характеристик графа МС осуществлялся на основе анализа главных компонент. Были выявлены наиболее значимые параметры, объясняющие большую часть вариативности данных при различных экспериментальных воздействиях. Далее проводился анализ корреляций между параметрами для исключения избыточных, сильно коррелирующих переменных. В результате был сформирован оптимальный набор независимых и информативных параметров, наиболее полно характеризующих состояние МС в исследуемых условиях. Этот подход позволил минимизировать количество анализируемых параметров МС при сохранении максимальной информативности.

Таким образом, мы выбрали морфологические параметры МС: «площадь МС», «соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий» и «размер митохондрий в составе

МС», как ранее нами было описано в (Kritskaya K.A., Fedotova E.I., Berezhnov A.V., 2024). Так, площадь МС (суммарная площадь флуоресценции TMRM в μm^2) значительно увеличивалась при воздействии Mdivi-1 (5 μM , 24 часа) – ингибитора Drp1, белка, опосредующего митохондриальное деление (Cui M. *et al.*, 2010), что указывает на разрастание сети в отсутствие деления (Рисунок 10Б).

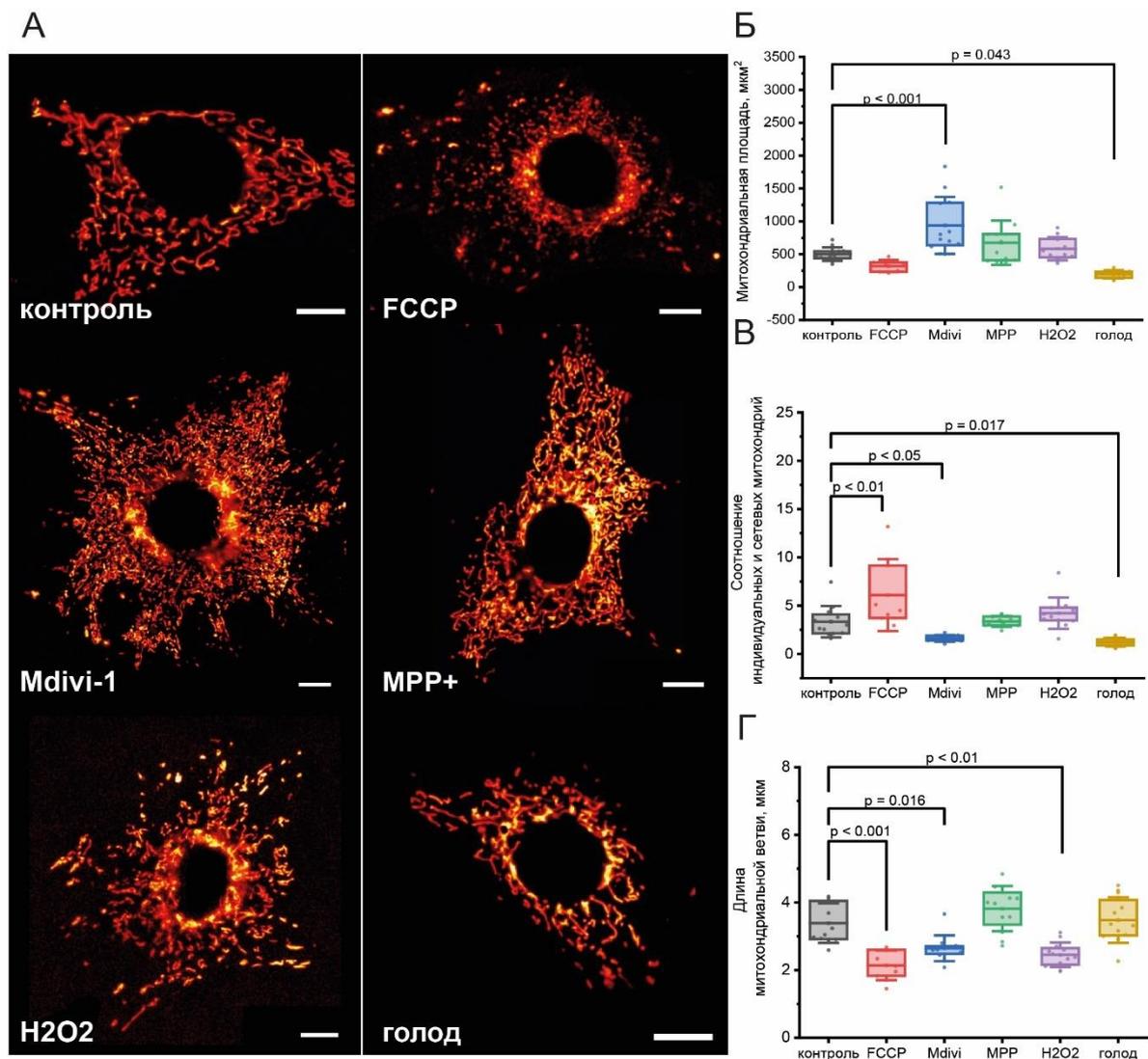


Рисунок 10. Изменение морфологии митохондриальной сети (МС) в фибробластах мыши L929 при различных воздействиях. А) Репрезентативные изображения фибробластов, окрашенных потенциал-чувствительным зондом TMRM: контрольных клеток, обработанных FCCP (5 μM , 1 час); Mdivi-1 (5 μM , 24 часа); MPP⁺ (500 μM , 24 часа); H₂O₂ (250 μM , 1 час); подвергшихся голоду (культуральная среда без сыворотки, 24 часа). Масштаб – 10 μm . Анализ морфологии МС при соответствующих воздействиях: Б) Площадь следа митохондриальной сети в μm^2 , измеренная по флуоресценции и TMRM, В) Соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий и Г) Длина наибольшей митохондрии в составе МС. $n = 12$ клеток в 3 независимых экспериментах. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,0083$).

Напротив, в условиях голода площадь МС значительно уменьшалась, что согласовывается с литературными данными, в которых показана активация аутофагии (Li L., Chen Y., Gibson S.B., 2013) и митофагии (Rambold A.S. *et al.*, 2011) при голодании, способствующая снижению площади МС (Рисунок 10Б). Как и ожидалось, соотношение индивидуальных митохондрий к сетевым значительно увеличивалось при воздействии разобщителя дыхания FCCP (5 мкМ в течение 1 часа), что свидетельствует о фрагментации МС. Наоборот, при голоде это соотношение значительно снижалось по сравнению с МС контрольных клеток, свидетельствуя об увеличении связности МС, что также согласуется с литературными данными (Li L., Chen Y., Gibson S.B., 2013; Rambold A.S. *et al.*, 2011) (Рисунок 10В). Другой важный параметр морфологии МС, такой как длина ветви в составе МС (Рисунок 10Г), ожидаемо уменьшался при воздействии FCCP и перекиси водорода (250 мкМ в течение 1 часа), что свидетельствует о фрагментации и разрушении митохондриальных структур. Стоит отметить, что в случае воздействия Mdivi-1 также уменьшалась средняя длина ветви в составе МС (Рисунок 10Г). Принимая во внимания тот факт, что при действии Mdivi-1 увеличивалось соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий в сторону последних (Рисунок 10В), можно сделать вывод, что ингибирование деления приводит к образованию более разветвленных сетей с более короткими митохондриями. Таким образом, морфологический анализ при исследуемых воздействиях выявил изменения МС, которые согласуются с литературными данными.

Далее представлены выбранные нами характеристики преобразованной в граф МС: «плотность графа МС», «средний коэффициент кластеризации» и «среднюю длину пути в графе МС» (Рисунок 11). Плотность графа МС – показатель, отражающий общее количество связей между узлами (митохондриями) в сети – значительно снижалась при воздействии FCCP и перекиси водорода, указывая на снижение связности в МС (Рисунок 11А). В то же время голод и Mdivi-1 значительно увеличивали плотность графа МС, указывая на усиление связности МС (Рисунок 11А). Средний коэффициент кластеризации графа, измеряющий локальную связанность узлов (насколько вероятно, что соседние митохондрии одного узла также являются соседями), увеличивался в клетках, обработанных Mdivi-1, и в клетках после голода в течение 24 часов, что свидетельствует о более тесной локальной связи между митохондриями (Рисунок 11А). Напротив, средний коэффициент кластеризации значительно снижался при воздействии FCCP, H₂O₂ и MPP⁺, что свидетельствует о разрушении локальной кооперации между митохондриями (Рисунок 11В). Средняя длина пути, отражающая количество шагов, необходимых для перехода от одного узла к другому, увеличивалась при этих воздействиях, указывая на разобщение и фрагментацию сети (Рисунок 11Б). При этом средняя длина пути снижалась в клетках,

обработанных Mdivi-1, и после голода, что указывает на сокращение среднего расстояния между митохондриями (Рисунок 11Б).

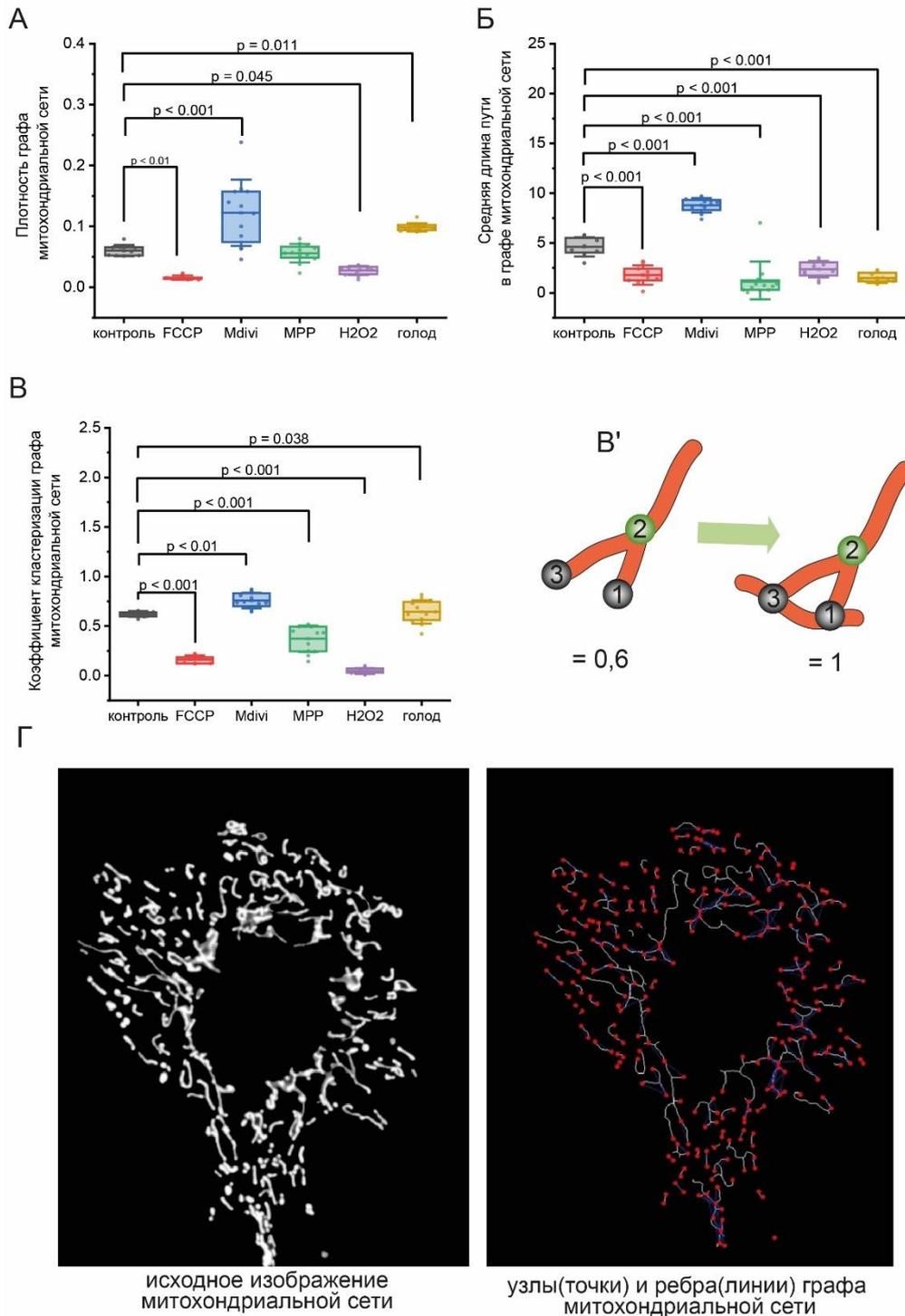


Рисунок 11. Анализ характеристик графа митохондриальной сети (МС) в фибробластах мыши L929 при различных воздействиях. А) Плотность графа МС, Б) Средняя длина пути в графе МС и В) Коэффициент кластеризации графа МС, полученного на основе автоматического анализа конфокальных изображений и флуоресценции потенциал-чувствительного зонда TMRM: в контрольных клетках; клетках, обработанных FCCP (5 мкМ, 1 час); Mdivi-1 (5 мкМ, 24 часа); MPP⁺ (500 мкМ, 24 часа); H₂O₂ (250 мкМ, 1 час); и при воздействии голода (культуральная среда без питательной сыворотки, 24 часа). n = 12 клеток в 3 независимых экспериментах. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного

сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,0083$). В) Визуализация примера увеличения коэффициента кластеризации сети графа МС: оранжевые структуры представляют митохондрии локальной МС, цифрами обозначены узлы МС, коэффициент кластеризации (снизу) для узла «2» в первом случае и при возрастании локальной связности для этого узла во втором случае. Г) Пример: исходное изображение МС и преобразованная нашим алгоритмом в граф МС клетки.

Интересно, что изменения, вызванные MPP^+ – известного токсина, действие которого у животных приводит к развитию симптомов паркинсонизма (Liu M. *et al.*, 2023), что широко используется для создания животной и клеточной моделей БП, не были выявлены только лишь морфологическими методами анализа МС (Рисунок 10), тогда как анализ графа МС показал значительные различия после добавки MPP^+ в течение 24 часов, подчеркивая важность комплексного анализа параметров МС для полного понимания изменений в этой структуре.

Таким образом, разработанный нами комплексный подход, сочетающий морфологические параметры и характеристики графа МС, позволяет более детально и без потери информации понять структурные изменения МС при действии различных видов стресса. Это может быть критически важно для оценки действия ранее неисследованных патологических условий, а также разработки терапевтических стратегий для лечения заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией.

3.2. Митохондриальная сеть и апоптоз: критическая потеря митохондриальной сети, необходимая для индукции апоптоза в разных типах клеток

Митохондрии являются ключевыми регуляторами «судьбы» клетки (Kroemer G., Reed J.C., 2000), однако до сих пор не было проведено количественного анализа того, какая потеря митохондрий является критической и приводит к индукции апоптоза в различных типах клеток. В данной главе мы оценивали, при каком проценте деполяризованных митохондрий (относительно общей площади МС), происходит индукция каспазы-3 – одного из главных ферментов, запускающих каскад реакций программируемой гибели клетки. Наше предположение заключалось в том, что разные типы клеток, такие как клетки нейрон-глиальной культуры, фибробласты и опухолевые клетки могут быть по-разному чувствительны к индукции апоптоза в зависимости от потери митохондрий из МС.

Для проверки этой гипотезы мы создали модель постепенной кальциевой перегрузки, поэтапно добавляя клеткам, окрашенным потенциал-чувствительным митохондриальным зондом TMRM и флуоресцентным субстратом каспазы-3, ферутинин – электрогенный кальциевый ионофор. Важно отметить, что благодаря своему

положительному заряду ферутинин накапливается в митохондриях, вызывая их кальциевую перегрузку и деполяризацию (Puyich T. et al., 2018). Предварительно мы проверили, обусловлена ли деполяризация митохондрий в этом эксперименте кальциевой перегрузкой, а именно, зависит ли она от митохондриальной поры переходной проницаемости (mPTP) – структуры, участвующей в гибели клетки при патологических условиях. Для этого мы провели серию экспериментов с ингибитором митохондриальной поры – циклоспорином А (Рисунок 7) (Broekemeier K.M., Dempsey M.E., Pfeiffer D.R., 1989). Действительно, в присутствии циклоспорина А, ступенчатые добавки ферутинина вызывали деполяризацию митохондрий при более высоких концентрациях ферутинина (Рисунок 7Б), а также менялся характер деполяризации – становился плавным и нарастающим (а не резким и скачкообразным как в контрольных условиях), что косвенно свидетельствует о mPTP-зависимом механизме потери потенциала (Рисунок 7Б').

Ступенчатое добавление ферутинина вызывает постепенную потерю митохондрий из МС в клетках нейрон-глиальной культуры (Рисунок 12А), фибробластах (Рисунок 12Б) и клетках рака молочной железы BT-474 (Рисунок 12В). Как видно из графиков (Рисунок 12А'-В'), в которых красная кривая соответствует площади МС (в процентах от начальной), а зеленая – флуоресценции субстрата каспазы-3 NucView-488 (в процентах от начальной), в определенный момент времени после очередной добавки ферутинина в исследуемых клетках резко возрастает флуоресценция NucView-488, что соответствует индукции каспазы-3 и соотносится с различной площадью потери МС в клетках нейрон-глиальной культуры (Рисунок 12А'), фибробластах (Рисунок 12Б') и клетках рака молочной железы BT-474 (Рисунок 12В').

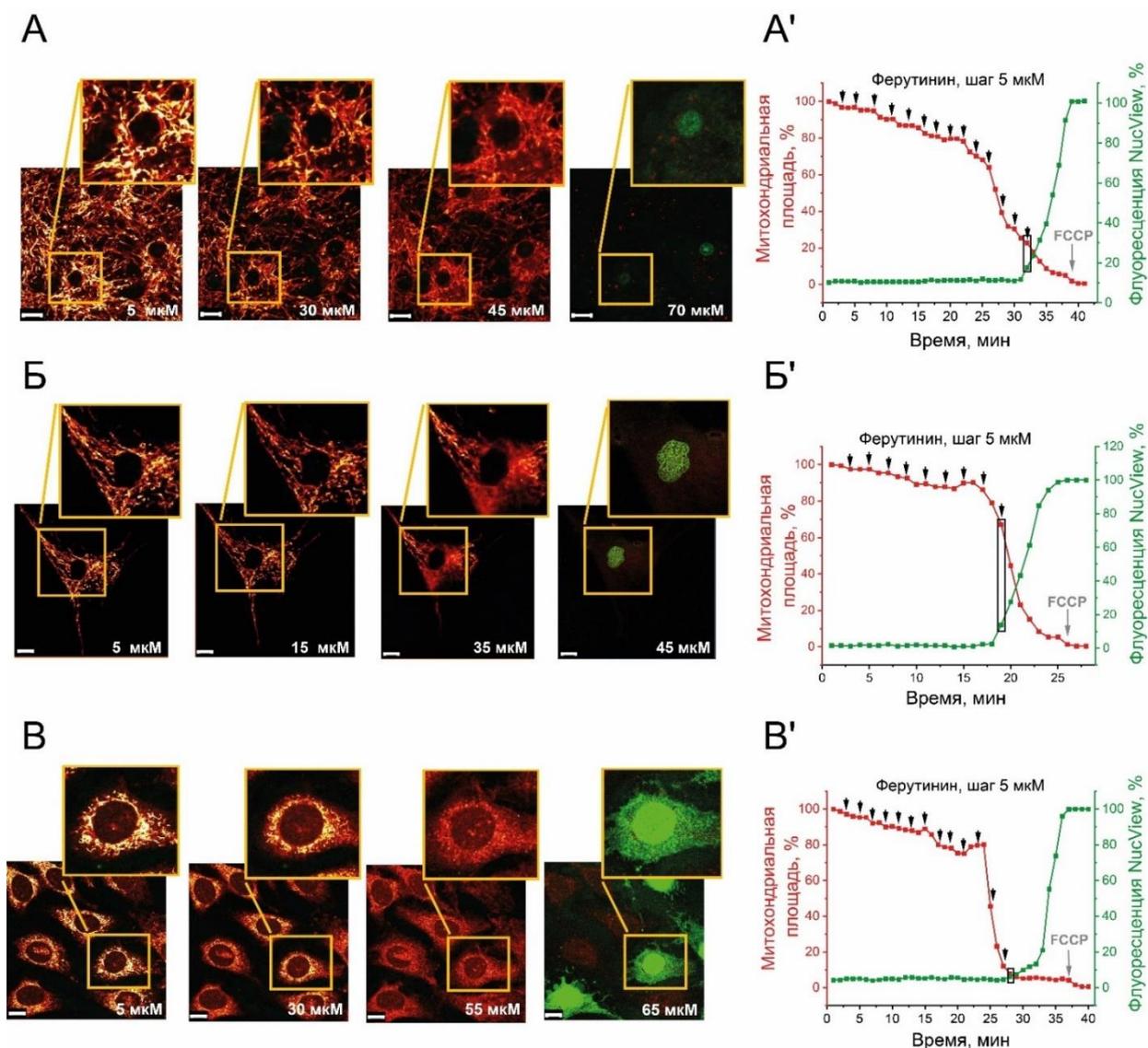


Рисунок 12. Активация каспазы-3 при потере критической доли митохондрий из общей митохондриальной сети в нейрон-глиальной культуре, фибробластах и опухолевых клетках. Микрофотографии, где красным псевдоцветом обозначены митохондрии (окраска TMRM), оставшиеся при добавлении соответствующей концентрации феррутина (в мкМ) и субстрат каспазы-3 NucView-488, флуоресценция которого резко возрастает при активации каспазы-3 (зеленый псевдоцвет) в А) нейрон-глиальной культуре, Б) фибробластах и В) опухолевых клетках. Репрезентативные графики изменения площади МС (в процентах от изначальной) и флуоресценции субстрата каспазы-3 NucView-488 (в процентах от начальной) и при постепенном добавлении феррутина во времени в А') нейрон-глиальной культуре, Б') фибробластах и В') опухолевых клетках.

Было обнаружено, наиболее чувствительными к апоптотическим стимулам являются фибробласты кожи человека, у которых индукция апоптоза наблюдалась при потере всего 30-40% площади митохондрий из МС, тогда как клетки нейрон-глиальной оказались менее чувствительными, и индукция апоптоза у них происходила при потере более 80-90% площади МС (Рисунок 13А).

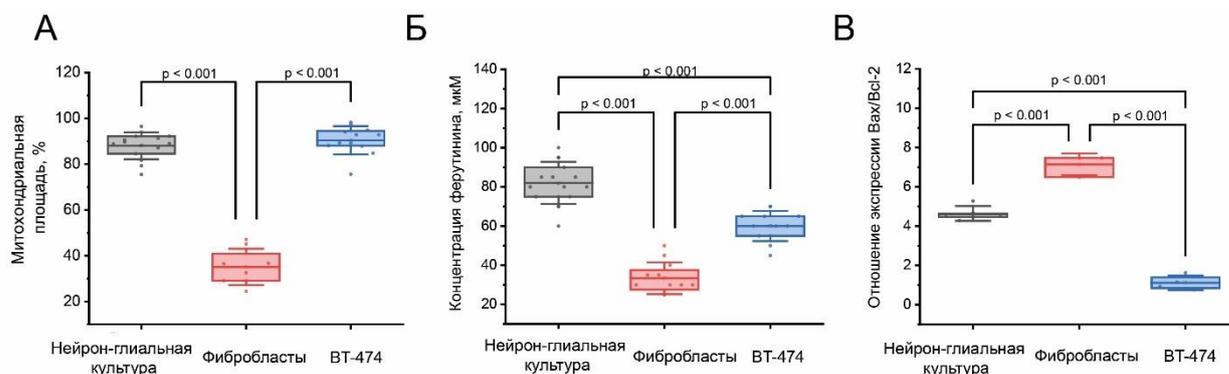


Рисунок 13. Зависимость активации каспазы-3 от митохондриальной площади, концентрации ферутина и соотношения экспрессии про и антиапоптотических генов в разных типах клеток. А) График критической доли деполаризованных митохондрий (от общей митохондриальной площади), необходимой для запуска каспазы-3 в нейрон-глиальной культуре, фибробластах и опухолевых клетках рака молочной железы ВТ-474. Б) Концентрация ферутина в мкМ (при пошаговом добавлении), при которой наблюдалась индукция каспазы-3 в нейрон-глиальной культуре, фибробластах и клетках рака молочной железы ВТ-474. $n = 12$ клеток в 4 независимых экспериментах. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,005$; * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$). В) Соотношение экспрессии проапоптотических (Bax) и антиапоптотических генов (Bcl-2) в нейрон-глиальной культуре, фибробластах и опухолевых клетках рака молочной железы ВТ-474. $n = 4$ независимых эксперимента. Относительную экспрессию исследовали с помощью ПЦР в реальном времени и рассчитывали методом $2^{-\Delta Ct}$, где в качестве референсного гена был взят ген *GAPDH*. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,05$; ** $p < 0,001$).

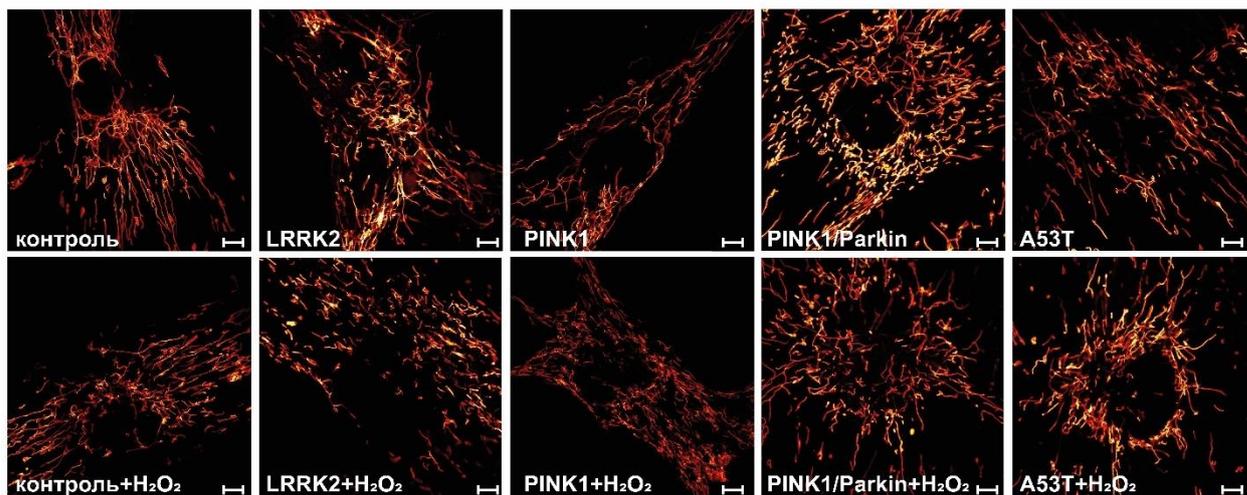
Клетки рака молочной железы ВТ-474 показали чувствительность (Рисунок 13А) к индукции каспазы-3 на уровне нейрон-глиальной культуры (при 80-90% потери площади МС), однако такая потеря МС достигалась меньшей по сравнению с нейрон-глиальной культурой концентрацией ферутина (Рисунок 13Б). Для активации каспазы-3 в фибробластах также необходима наименьшая концентрация ферутина по сравнению с клетками нейрон-глиальной культуры и клетками рака молочной железы ВТ-474 (Рисунок 13Б). Мы также оценили, связана ли обнаруженная зависимость с различием в экспрессии мРНК генов, кодирующих про- и антиапоптотические белки в исследуемых клетках (Рисунок 13В). Действительно, как видно из рисунка 13В, соотношение экспрессии про- (Bax) и анти- апоптотических (Bcl-2) генов белков в этих культурах также отличается. Так, например, в фибробластах соотношение Bax/Bcl-2 выше, чем в нейрон-глиальной культуре (Рисунок 13В), тогда как наименьшее соотношение представлено в клетках рака молочной железы ВТ-474 (Рисунок 13В), что также может объяснять разную чувствительность к

индукции апоптоза при потере митохондрий МС. Таким образом, мы показали, что клетки нейрон-глиальной культуры, фибробласты и опухолевые клетки обладают разной чувствительностью в индукции каспазы-3 в зависимости от потери митохондрий МС, что также соотносится с экспрессией мРНК про- и антиапоптотических генов в этих культурах.

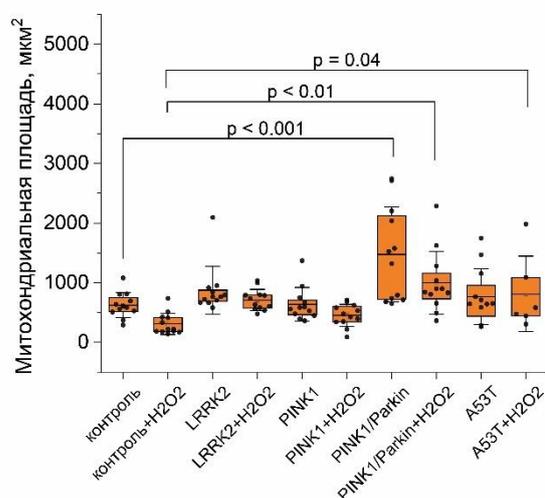
3.3. Изменение морфологии митохондриальной сети в фибробластах с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона

В этой части работы мы стремились оценить, как влияют мутации, связанные с наследственной формой БП на морфологию МС в нормальных условиях и в условиях стресса, и как это связано с такими параметрами, как скорость цитозольной и митохондриальной АФК-продукции в этих клетках. В исследовании использовались культуры фибробластов кожи, полученные от пациентов с генетически подтвержденной БП: 1) гетерозиготная мутация А53Т в гене, кодирующем альфа-синуклеин; 2) гомозиготная мутация в гене, кодирующем белок PINK1; 3) комбинация мутаций в генах, кодирующих белки PINK1 и Parkin; 4) мутация в гене, кодирующем LRRK2. Нами были оценены такие параметры МС, как общая площадь МС, длина митохондрий в составе МС, средний коэффициент кластеризации в графе МС, длина индивидуальных митохондрий. Изображения МС фибробластов были получены по флуоресценции TMRM: окрашивание митохондрий с помощью потенциал-зависимого зонда в этом случае дает уверенность в том, что оцениваются только митохондрии, имеющие заряд (Рисунок 14А).

A



Б



В

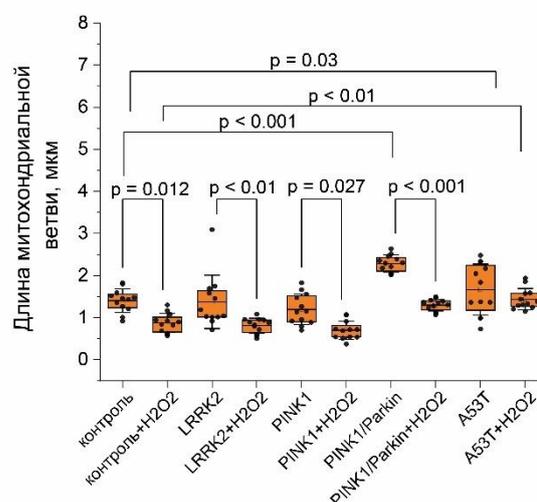


Рисунок 14. Морфология митохондриальной сети в фибробластах, несущих мутации, связанные с наследственной болезнью Паркинсона. А) Репрезентативные микрофотографии фибробластов, окрашенных TMRM и полученные с помощью конфокальной микроскопии сверхразрешения (масштаб – 10 мкм). Б) Площадь митохондриального следа, измеренная в нормальных условиях и после стресса с H_2O_2 (150 мкМ в течение 1 часа). В) Длина митохондриальной ветви в МС в нормальных условиях и после H_2O_2 -индуцированного стресса (150 мкМ в течение 1 ч). $n = 12$ клеток в 3 независимых экспериментах. Статистическую значимость для контрольных и мутированных фибробластов определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с критерием множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,005$). Статистическую значимость для клеточных линий до и после воздействия перекиси водорода определяли с использованием непарного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$).

Площадь МС (Рисунок 14Б) во всех фибробластах, за исключением фибробластов PINK1/ParKin, существенно не отличалась от контрольных фибробластов (для контроля она составила 625 ± 196 мкм²; для LRRK2 – 873 ± 399 мкм²; PINK1 – 639 ± 279 мкм²; A53T – 765 ± 368 мкм²). Площадь МС фибробластов PINK1/ParKin была в 2,3 раза больше, чем в

контроле, и составила 1474 ± 793 мкм². При воздействии перекиси водорода площадь МС во всех фибробластах имела тенденцию к уменьшению, однако в фибробластах PINK1/Parkin и A53T она все еще оставалась значительно выше, чем в контрольных клетках (в 3,2 и 2,6 раза соответственно).

После этого мы исследовали длину митохондрий в составе МС (Рисунок 14В). Длина митохондриальной ветви в МС является важным параметром, показывающим адаптацию клетки, например, к недостатку субстрата или стрессу (Wai T., Langer T., 2016). Как было описано в разделе «Материалы и методы», МС считается структурой, содержащей строго более одной ветви и ненулевое соединение. Длина митохондриальных ветвей была выше в фибробластах PINK1/Parkin ($2,28 \pm 0,19$ мкм) и A53T ($1,66 \pm 0,6$ мкм) по сравнению с контролем ($1,41 \pm 0,27$ мкм), а также остальными мутантными фибробластами (LRRK2 – $1,37 \pm 0,63$ мкм; PINK1 – $1,19 \pm 0,36$ мкм). Добавление перекиси водорода ожидаемо вызвало митохондриальное деление, что привело к уменьшению длины митохондриальных ветвей почти во всех фибробластах, за исключением A53T. Коэффициенты уменьшения длины митохондрий были следующие: контроль – 1,60; LRRK2 – 1,65; PINK1 – 1,70; PINK1/Parkin – 1,79.

Далее мы оценили длину отдельных митохондрий в мутантных и контрольных фибробластах (Рисунок 15А), поскольку нас интересовало, какие митохондрии составляют популяцию этих органелл, не относящихся к МС. Мы предположили, что длина отдельных митохондрий должна быть меньше длины митохондриальной ветви в составе МС. Действительно, длина индивидуальных митохондрий для всех изученных линий была ниже сетевых (контрольные фибробласты – $0,88 \pm 0,38$; LRRK2 – $0,64 \pm 0,44$; PINK1 – $0,37 \pm 0,17$; PINK1/Parkin – $0,82 \pm 0,2$; A53T – $0,99 \pm 0,47$). В то же время в клетках с мутацией гена белка PINK1 она оказалась существенно ниже (в 2,3 раза), чем в контрольных клетках.

После добавления перекиси водорода для всех изученных фибробластов наблюдается тенденция к уменьшению длины отдельных митохондрий; однако этот параметр существенно снижался только в контрольных клетках (в 1,9 раза) и клетках PINK1/Parkin (в 2 раза), возможно, из-за более высоких исходных значений. Мы решили проверить, связано ли уменьшение длины индивидуальной митохондрии в фибробластах PINK1 с разбуханием матрикса, для чего исследовали соотношение сторон митохондрий в этих клетках. Действительно, как видно из рисунка 15А', соотношение сторон индивидуальных митохондрий у фибробластов PINK1 ниже, чем в контрольных фибробластах в нормальных условиях, а также при действии перекиси водорода. Кроме того, в условиях стресса у фибробластов PINK1 соотношение сторон митохондрий

приближается к 1, что соответствует шарообразным митохондриям с поврежденным матриксом (Ahmad T. *et al.*, 2013).

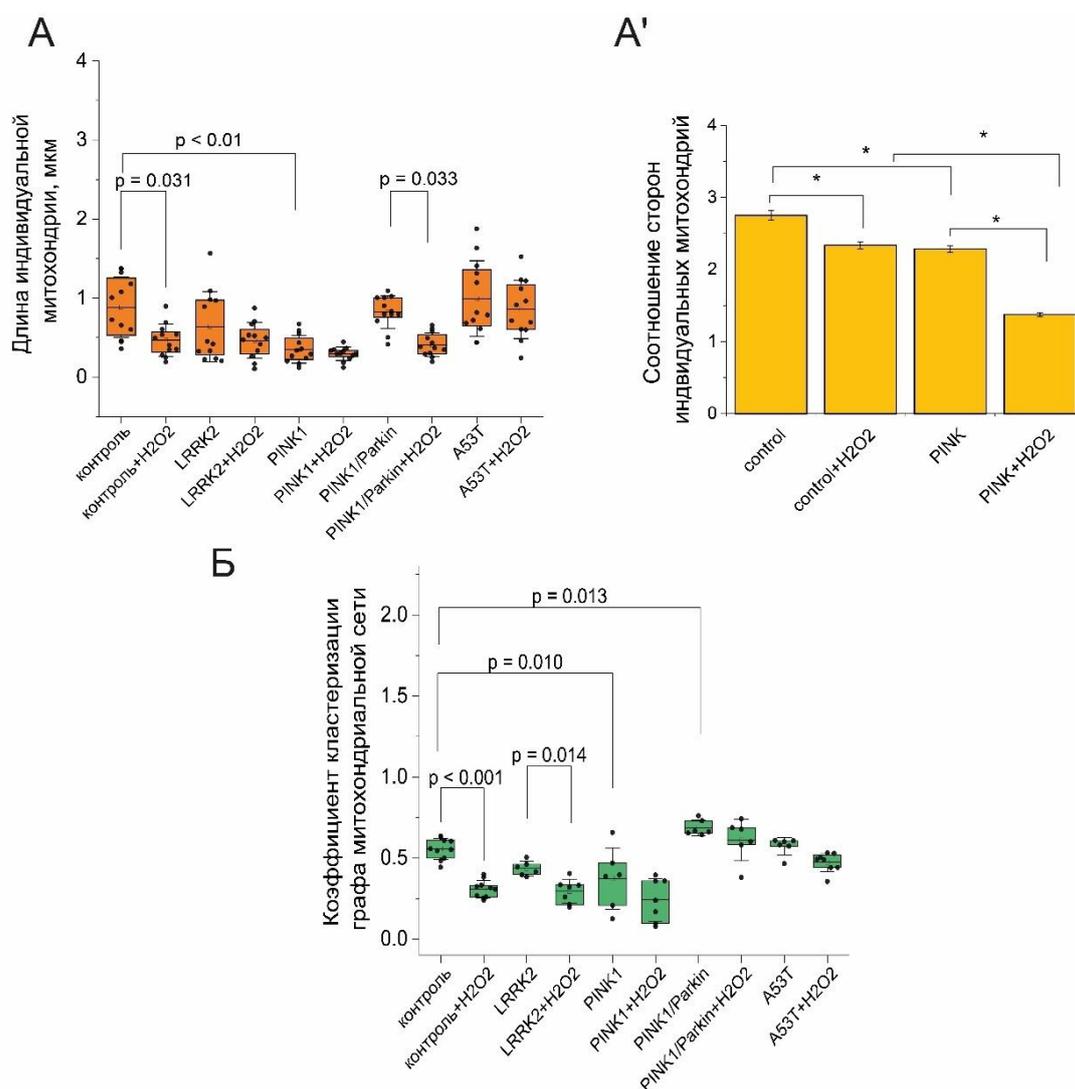


Рисунок 15. Длина индивидуальных митохондрий и связность митохондриальной сети в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона. А) Средняя длина отдельных митохондрий в исследуемых фибробластах до и после обработки перекисью водорода (150 мкМ, 1 час) стресса. А') Соотношение сторон в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией PINK1 в нормальных условиях и после стресса, индуцированного перекисью водорода (150 мкМ, 1 час). Б) Коэффициент кластеризации графа МС в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона. $n = 12$ клеток в 3 независимых экспериментах. Статистическую значимость для контрольных и мутантных фибробластов определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с критерием множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,005$). Статистическую значимость для клеточных линий до и после воздействия пероксида определяли с использованием непарного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$).

После мы исследовали связность МС фибробластов (Рисунок 15Б), рассчитав средний коэффициент кластеризации митохондрий в МС. Изменение связности

митохондрий может указывать на адаптацию клеток к уменьшенному поступлению субстрата, нарушению биоэнергетики и процессов деления/слияния митохондрий (Wai T., Langer T., 2016). Было установлено, что в нормальных условиях средний коэффициент кластеризации МС в фибробластах PINK1 меньше, чем в контрольных клетках, и напротив, этот показатель значимо больше в клетках с двойной мутацией генов белков PINK1/Parkin. В условиях стресса в контрольных фибробластах и фибробластах LRRK2 значимо снижается средний коэффициент кластеризации митохондрий в МС, тогда как в клетках PINK1, PINK1/Parkin и A53T он не изменяется (Рисунок 15Б).

Помимо оценки морфологии МС мы проанализировали другие жизненно важные показатели клетки, такие как скорость митохондриальной и цитозольной АФК-продукции (Рисунок 16).

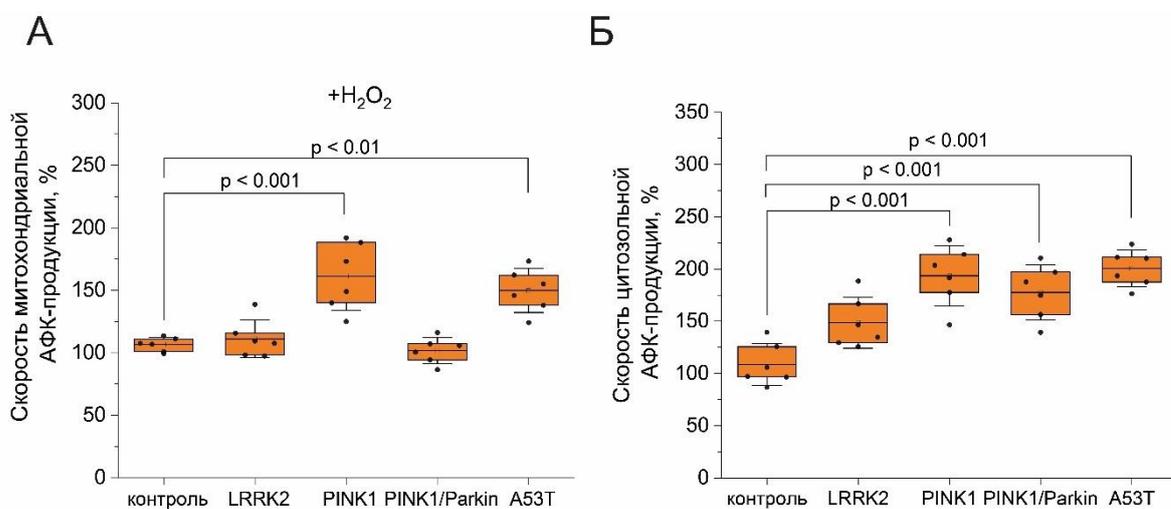


Рисунок 16. Продукция активных форм кислорода (АФК) в контрольных фибробластах и в фибробластах с мутациями, связанными с болезнью Паркинсона. А) Скорость продукции митохондриальных АФК, оцененная по временной кинетике зондов MitoSOX Red и MitoTracker Red CM-H₂XRos (их флуоресцентных производных после окисления) после стресса, вызванного перекисью водорода (50 мкМ, 1 час), в процентах от контроля. Б) Скорость продукции цитозольных АФК, оцененная по временной кинетике флуоресценции DCF (химически восстановленной и ацетилированной формы зонда 2',7'-дихлорфлуоресцеина H₂DCFDA) в процентах от контроля. Два контроля объединяются, и проценты рассчитываются на основе среднего значения двух контрольных клеточных линий. n = 60 клеток в 3 независимых экспериментах. n = 60 клеток в 3 независимых экспериментах. Диаграммы показывают медиану и межквартильный диапазон, а точки представляют среднюю скорость продукции цитозольных или митохондриальных АФК из 10 клеток. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение p = 0,0083).

Скорость митохондриальной АФК-продукции была измерена по временной кинетике зондов MitoSOX Red и MitoTracker Red CM-H₂XRos (их флуоресцентных

производных после окисления). Поскольку мы не обнаружили значимых различий в этом показателе в нормальных условиях, мы предположили, что экзогенный стресс сможет показать различия для мутантных и контрольных фибробластов. Таким образом, после добавления перекиси водорода (50 мкМ, в течение 1 часа) было обнаружено (Рисунок 16А) значительное увеличение скорости митохондриальной АФК-продукции фибробластами PINK1 (в 1,6 раза – $163,5 \pm 32,1\%$) и A53T (в 1,4 раза – $147,6 \pm 21,3\%$) относительно контроля, принятого за 100%.

Далее с использованием временной кинетики флуоресценции DCF (химически восстановленная и ацетилированная форма 2',7'-дихлорфлуоресцеина H₂DCFDA) была оценена скорость цитозольной АФК-продукции (Рисунок 16Б). Значительное увеличение скорости цитозольной АФК-продукции было обнаружено почти для всех мутантных фибробластов: PINK1 – в 1,9 раза ($191,5 \pm 36,6\%$), PINK1/Parkin – в 1,8 раза ($180,3 \pm 31,1\%$) и у фибробластов A53T в 1,9 раза ($199,4 \pm 21,4\%$) по сравнению с контролем, принятым за 100% (за исключением фибробластов LRRK2, где наблюдалась только тенденция).

Таким образом, в настоящей главе диссертации нами было показано, что в фибробластах от пациентов с мутациями, связанными с БП, происходит изменение морфологии МС, а также увеличение скорости цитозольной и митохондриальной АФК-продукции в обычных условиях и при окислительном стрессе.

3.4. Оценка действия кратковременного закисления и добавки лактата и пирувата натрия на динамику митохондриальной сети в фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2

Нарушение митохондриальной динамики и системы контроля качества митохондрий является одной из причин развития БП. Ранее нами было установлено, что лактат и пируват натрия увеличивает уровень митофагии и защищает клетки в модели БП с нейротоксином MPP⁺ (Fedotova E.I. *et al.*, 2022), однако вопрос о механизмах такого действия остался открытым. В частности, неясно, связано ли действие лактата и пирувата натрия с метаболическими свойствами этих молекул или же с их способностью снижать внутриклеточный pH, тем самым активируя процессы митофагии? Лактат и пируват натрия могут подкислять цитозоль за счет ионов H⁺, высвобождаемых при их клеточном импорте и метаболизме, в то же время, будучи ключевыми интермедиатами гликолиза и цикла трикарбоновых кислот, они могут влиять на функцию митохондрий через метаболические пути.

В настоящей работе мы исследуем то, как подкисление внутриклеточной среды само по себе изменяет митохондриальную динамику в клетках, где митохондриальная динамика нарушена и может ли подкисление небольшой продолжительности (30 минут) обладать защитным действием и активировать аутофагию и митофагию. Объектом нашего исследования служат фибробласты от пациентов с установленной БП и несущие мутации генов белков PINK1 и LRRK2, а также культура фибробластов от условно здорового донора.

Для начала мы хотели создать модель кратковременного закисления в исследуемых клетках. Внутриклеточный pH был измерен с использованием ратиометрического зонда BCECF-AM. Предварительно для каждой исследуемой культуры была проведена калибровка зонда для получения абсолютных значений pH, подробно описанная в материалах и методах (Рисунок 8). Для уменьшения внутриклеточного pH без использования фармакологических агентов мы краткосрочно (на 30 минут) изменяли внеклеточный pH, а затем возвращали к физиологическому уровню, после чего оставляли культуры в покое на 1 час. Были выбраны точки pH: 7,4; 7,0; 6,8; 6,6; 6,4; 6,0.

Как показывают эксперименты (Рисунок 17А), такое непродолжительное снижение внеклеточного pH закономерно снижает внутриклеточный pH.

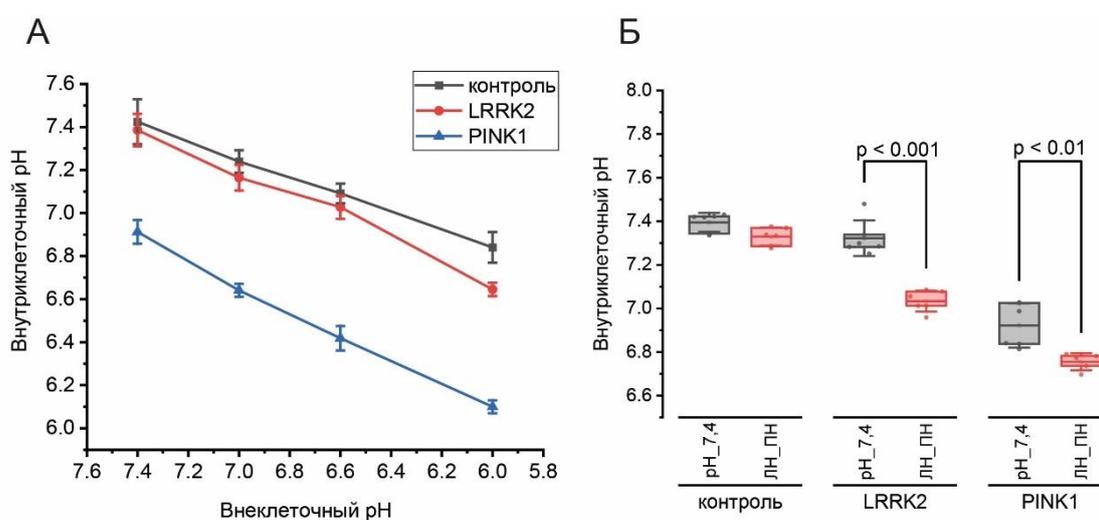


Рисунок 17. Изменение внутриклеточного pH в зависимости от pH внеклеточной среды и добавки лактата (ЛН, 10 мМ) и пирувата (ПН, 10 мМ) натрия. А) Изменение внутриклеточного pH в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, связанных с развитием наследственной формы болезни Паркинсона при закислении внеклеточной среды на 30 минут и Б) действии лактата (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия. n = 4 независимых эксперимента. Статистическую значимость внутриклеточного pH для клеточных линий до и после добавки лактата и пирувата натрия определяли с использованием непарного t-критерия Стьюдента (значение p < 0,05).

Интересно отметить, что в клетках PINK1 изначально значимо более низкий pH (6,8) изменялся под действием таких манипуляций до еще более низких значений по сравнению

с контрольными клетками. Также мы проверили, как влияет добавка смеси лактата и пирувата натрия на внутриклеточный pH. Оказалось, что добавка лактата и пирувата натрия приводила к снижению внутриклеточного pH в мутантных клетках – в LRRK2 до 7,0, и в PINK1 – до 6,6, который в течение 1 часа возвращался к исходному уровню (Рисунок 17Б). Таким образом, в фибробластах с мутациями наблюдались схожие закономерности при изменении внеклеточного pH и зависимо от этого внутриклеточного pH. Добавка лактата и пирувата натрия временно снижала внутриклеточный pH в фибробластах с мутациями, но не в контрольной культуре.

Исходя из вышеописанных экспериментов мы выбрали для исследований два значения pH – 6,0 и 6,6. Далее мы исследовали, как изменяется морфология МС (длина митохондрий в сетях, соотношении индивидуальных и сетевых митохондрий, связность МС), колокализация митохондрий и лизосом при снижении внеклеточного pH на 30 минут до значений 6,6 и 6,0 и инкубации клеток с 20 mM лактата и пирувата натрия в течении 24 часов.

Стоит отметить, что несмотря на изменение pH среды, длина митохондрий в сетях оставалась стабильной у всех исследуемых культур фибробластов (Рисунок 18А). Напротив, среднее количество связей при закислении (прямом и с помощью лактата и пирувата натрия) уменьшалось: в контрольных фибробластах количество связей становилось в 2,17 и 2,15 раз меньше при замене среды на среду с pH 6,0 и 6,6 соответственно; в культуре LRRK2 – в 3,79 раз (при pH 6,0), в 2,77 раз (при pH 6,6) и в 1,86 раза при действии лактата и пирувата натрия; в клетках PINK1 при среде с pH 6,0 – в 3,78, при среде с pH 6,6 – в 3,66 раз, при обработке лактатом и пируватом натрия – в 3,65 раз меньше (Рисунок 18Б). Эти данные свидетельствуют о том, что закисление среды приводит к снижению связности МС, особенно выраженному при снижении pH до 6,0 в клетках с мутацией гена белка PINK1. При этом стабильность длины митохондрий, несмотря на изменения в плотности МС, указывает на потенциальное ингибирование процессов митохондриального слияния под воздействием закисления.

Нами также было проанализировано соотношение индивидуальных митохондрий к сетевым, что позволяет оценить эффективность митохондриального слияния и митофагии, поскольку накопление индивидуальных митохондрий может указывать на дефекты в этих процессах. В эксперименте были измерены соотношения индивидуальных митохондрий к сетевым в контрольных фибробластах и клетках с мутациями в генах белков LRRK2 и PINK1 (Рисунок 18В).

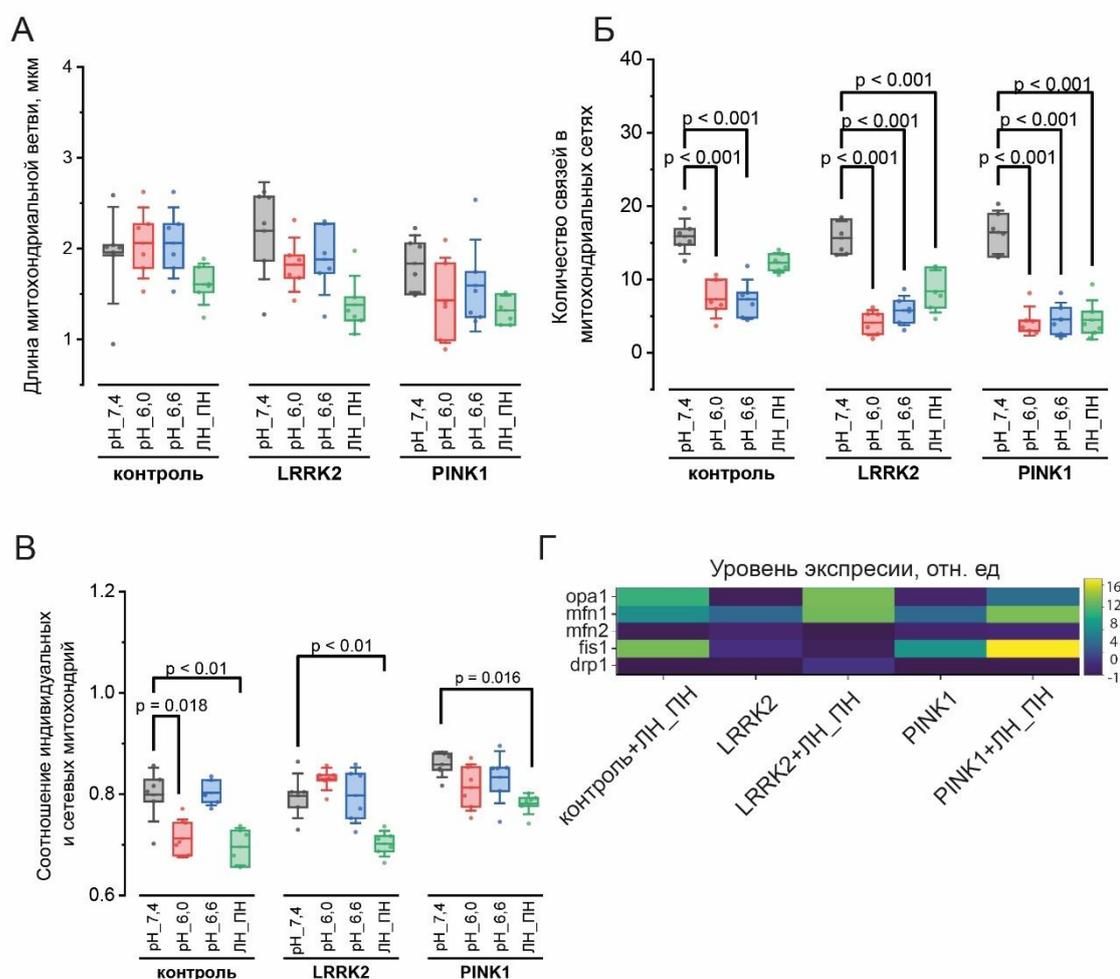


Рисунок 18. Влияние закисления и добавки лактата натрия (ЛН) и пирувата натрия (ПН) на динамику митохондриальной сети в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, связанных с развитием наследственной формы болезни Паркинсона. А) Длина митохондриальной ветви в сети, Б) Количество связей митохондрий в сети, В) Соотношение индивидуальных митохондрий к сетевым в контрольных фибробластах и фибробластах, несущих мутации генов белков LRRK2 и PINK1 после краткосрочного закисления, опосредованного заменой внеклеточной среды на 30 минут с pH 6,0 и 6,6 соответственно и добавкой лактата (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия на 24 часа. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,0167$). Г) Относительная экспрессия мРНК генов белков, связанных с митохондриальным делением и слиянием в фибробластах LRRK2 и PINK1 без обработок (относительно контрольных фибробластов), в контрольных фибробластах и мутантных фибробластах LRRK2 и PINK1 при действии лактата (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия в течение 24 часов (относительно этих же культур без обработок). Относительную экспрессию исследовали с помощью ПЦР в реальном времени и рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где в качестве референсного гена был взят ген *GAPDH*. На карте используется шкала относительной экспрессии, где цвета варьируются от фиолетового (низкая экспрессия) до желтого (высокая экспрессия). Статистическую значимость экспрессии для клеточных линий до и после воздействий определяли с использованием парного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$).

Результаты показали (Рисунок 18В), что в фибробластах PINK1 количество индивидуальных митохондрий было увеличено и составляло $0,9\pm 0,02$ по сравнению с контрольными клетками ($0,79\pm 0,05$) и клетками LRRK2 ($0,79\pm 0,04$), однако после обработки клеток лактатом и пируватом натрия, этот показатель в клетках PINK1 снизился до уровня, сопоставимого с контрольными фибробластами ($0,78\pm 0,02$), а также этот показатель значительно уменьшился в клетках LRRK2 ($0,70\pm 0,02$).

В добавок к исследованию морфологии МС нами проанализирован уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих белки, участвующие в динамике митохондрий при действии лактата и пирувата натрия в течение 24 часов. Слияние митохондрий – процесс, опосредованный согласованным действием белков Opa1, Mfn1 и Mfn2, и, наоборот, деление митохондрий зависит от активности Fis1, Drp1 и Mff (Twig G. *et al.*, 2008). Интересно, что в мутантных фибробластах LRRK2, и в большей степени PINK1, в условиях без добавок увеличена экспрессия генов белков Mfn1 и Fis1 по сравнению с контрольными фибробластами, хотя длина митохондрий остается неизменной, что, возможно, отражает адаптацию к окислительному стрессу, связанному с увеличенной АФК-продукцией в этих клетках (Рисунок 18Г). В контрольных фибробластах добавление лактата и пирувата натрия на 24 часа приводило к увеличению экспрессии мРНК генов белков Opa1, Mfn1 и Fis1. Обработка клеток LRRK2 лактатом и пируватом натрия привела к увеличению экспрессии мРНК генов белков Opa1 и Drp1, и еще большей Mfn1, при этом к снижению Fis1 (Рисунок 18Г).

Примечательно, что в клетках PINK1, обработка лактатом и пируватом натрия увеличивала экспрессию генов белков Opa1, Mfn1 и в особенности Fis1, повторяя картину экспрессии генов, наблюдаемую в контрольных клетках (Рисунок 18Г). Таким образом, как кратковременное закисление, так и добавка лактата и пирувата натрия, оказывают схожие эффекты на динамику МС в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями. В свою очередь, добавка лактата и пирувата натрия в течении 24 часов по-разному модулирует экспрессию мРНК генов белков, ответственных за слияние и деление митохондрий, что, вероятно, зависит от различного генетического фона мутантных и контрольных культур фибробластов.

Помимо морфологии МС нами была оценена степень колокализации митохондрий и лизосом при прямом закислении и действии лактата и пирувата натрия (Рисунок 19АБ).

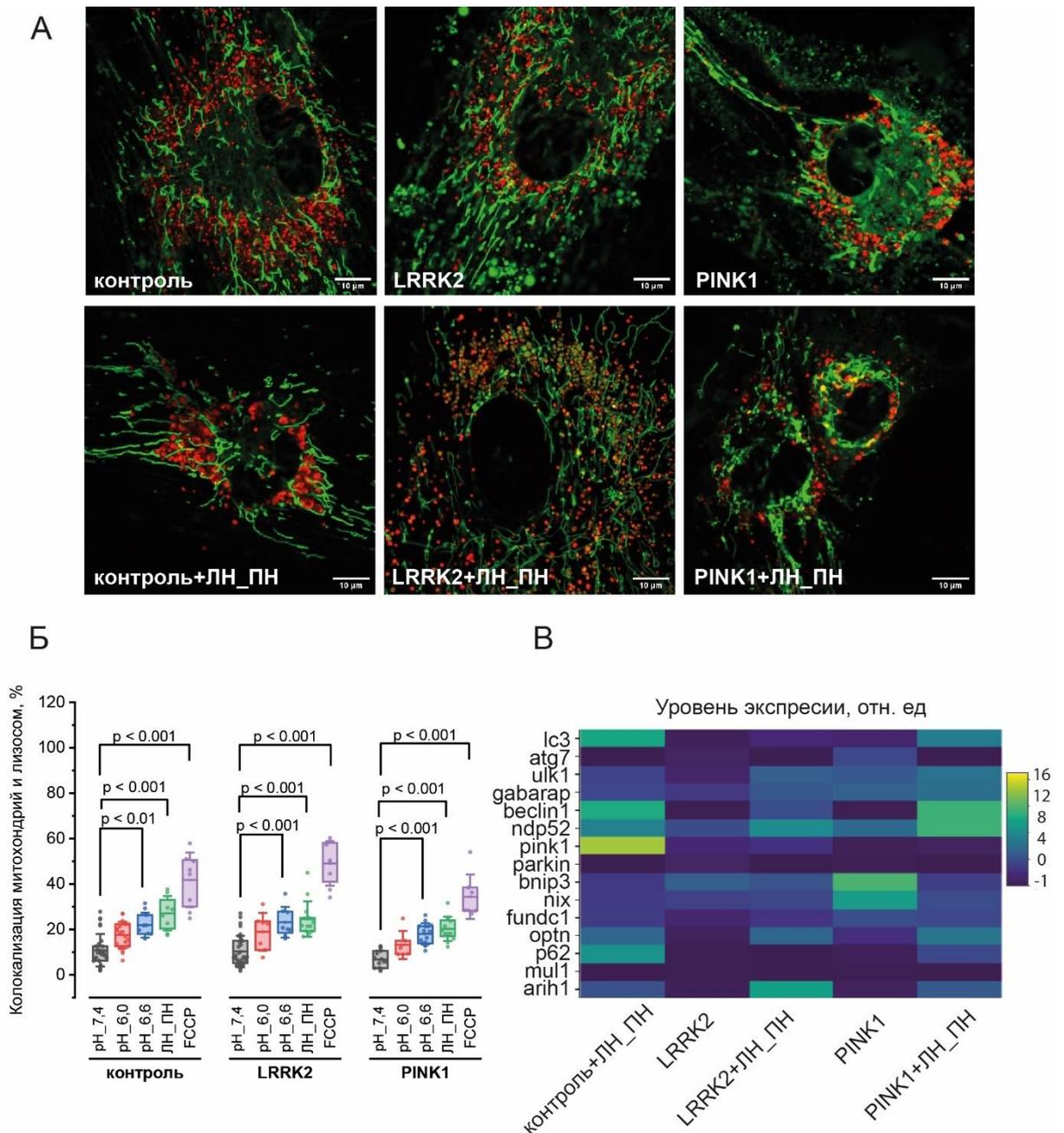


Рисунок 19. Влияние закисления и добавки лактата натрия (ЛН) и пирувата натрия (ПН) на митофагию в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, связанных с развитием наследственной формы болезни Паркинсона. А) Конфокальные изображения контрольных фибробластов и фибробластов с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, окрашенных флуоресцентными зондами, специфичными к митохондриям (MitoTracker Green) и лизосомам (LizoTracker Red) без обработки и после добавки лактата натрия (10 мМ) и пирувата натрия (10 мМ) на 24 часа; Б) Процент колокализации митохондрий и лизосом в клетках контрольных фибробластов и фибробластов с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 после краткосрочного закисления, опосредованного заменой внеклеточной среды на 30 минут с рН 6,0 и 6,6 соответственно и добавкой лактата натрия (10 мМ) и пирувата натрия (10 мМ) на 24 часа. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,0125$); В) Уровень относительной экспрессии мРНК генов белков, связанных с аутофагией и митофагией в контрольных фибробластах и фибробластах, несущих мутации генов белков

LRRK2 и PINK1 без обработки и после добавки лактата (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия на 24 часа. Относительную экспрессию исследовали с помощью ПЦР в реальном времени и рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где в качестве референсного гена был взят ген *GAPDH*. На карте используется шкала относительной экспрессии, где цвета варьируются от фиолетового (низкая экспрессия) до желтого (высокая экспрессия). Статистическую значимость экспрессии для клеточных линий до и после воздействий определяли с использованием парного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$).

Митохондриальный разобщитель FCCP был использован в качестве положительного контроля для максимальной индукции митофагии (Berezhnov A.V. *et al.*, 2016). Как показано на рисунке 19Б, кратковременное внеклеточное закисление значительно увеличивает колокализацию митохондрий и лизосом по сравнению с базальными уровнями в контрольных фибробластах, а также в мутантных фибробластах LRRK2 и PINK1. В частности, снижение внеклеточного pH до 6,0 повышало колокализацию с $10,83 \pm 6,15\%$ до $17,5 \pm 5,8\%$ в контрольных фибробластах; с $10,2 \pm 6,2\%$ до $19,1 \pm 7,1\%$ в фибробластах LRRK2; и с $6,7 \pm 3,8\%$ до $13,1 \pm 6,1\%$ в фибробластах PINK1 (Рисунок 19Б).

Интересно, что при более высоком pH, равном 6,6, увеличение колокализации было еще более выраженным во всех линиях фибробластов: в контрольных фибробластах до $21,8 \pm 5,4\%$; в фибробластах с мутацией LRRK2 – до $23,5 \pm 7,1\%$; в фибробластах PINK1 – до $18,3 \pm 4,6\%$ (Рисунок 19Б). Инкубация (24 часа) с лактатом и пируватом натрия также значительно повышала колокализацию митохондрий и лизосом: до $27 \pm 7,5\%$ в контрольных фибробластах; до $24 \pm 7,8\%$ в LRRK2; и $20 \pm 5,3\%$ в фибробластах PINK1 (Рисунок 19Б). Обработка митохондриальным разобщителем FCCP в течение 2 часов приводила к наиболее высоким уровням колокализации: $41,8 \pm 12\%$ в контроле; $49 \pm 9,7\%$ в LRRK2; и $34,4 \pm 9,9\%$ в фибробластах PINK1 (Рисунок 19Б).

Затем мы оценили влияние добавки лактата и пирувата натрия в течение 24 часов на уровни экспрессии мРНК ключевых генов, участвующих в путях митофагии и аутофагии и кодирующих белки, такие как PINK1, Parkin, адаптеры рецепторов аутофагии (P62, Optn, Ndp52), белки образования аутофагосом (Lc3, Atg7, Ulk1, Gabarap, Beclin1), а также рецепторы митофагии (Nix, Vnir3 и Fundc1) (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018).

Следует отметить, что в необработанных мутантных фибробластах PINK1 по сравнению с необработанными контрольными фибробластами мы наблюдали изначально повышенную экспрессию генов белков митофагии: Optn, Ndp52, Vnir3, Nix, Fundc1, а также аутофагии: Atg7, Ulk1 и Gabarap (Рисунок 19Б). В мутантных фибробластах LRRK2 также наблюдались повышенные уровни мРНК белков Ndp52, Gabarap, Vnir3 и Nix, что указывает на индукцию митофагии в мутантных линиях фибробластов, вероятно, посредством альтернативного пути, опосредованного Vnir3/Nix (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018), связанного со стрессом и гипоксическими состояниями (Рисунок 19Б).

После обработки лактатом и пируватом натрия контрольные фибробласты демонстрировали повышенную экспрессию генов белков PINK1, Aih1, P62, Optn, Ndp52 и Beclin1 по сравнению с необработанными контрольными клетками (Рисунок 19B). В фибробластах LRRK2 добавка лактата и пирувата натрия приводила к увеличению экспрессии генов белков Aih1, Optn, Ndp52 и Ulk1, в то время как у мутантов PINK1 индуцировались гены белков Aih1, P62, Optn, Lc3, Ulk1 и Beclin1 (Рисунок 19B). Таким образом, проведенный анализ экспрессии генов согласуется с данными микроскопии и подтверждает предположение о том, что обработка лактатом и пируватом натрия, как и внутриклеточное закисление могут активировать пути контроля качества митохондрий, нарушенные при БП, однако это происходит за счет разных механизмов в контрольных и мутантных фибробластах. Далее мы исследовали, какое влияние кратковременное закисление и добавка лактата и пирувата натрия оказывает на такие жизненно важные показатели клетки, как уровень митохондриального мембранного потенциала, а также уровень выживаемости исследуемых культур фибробластов (Рисунок 20).

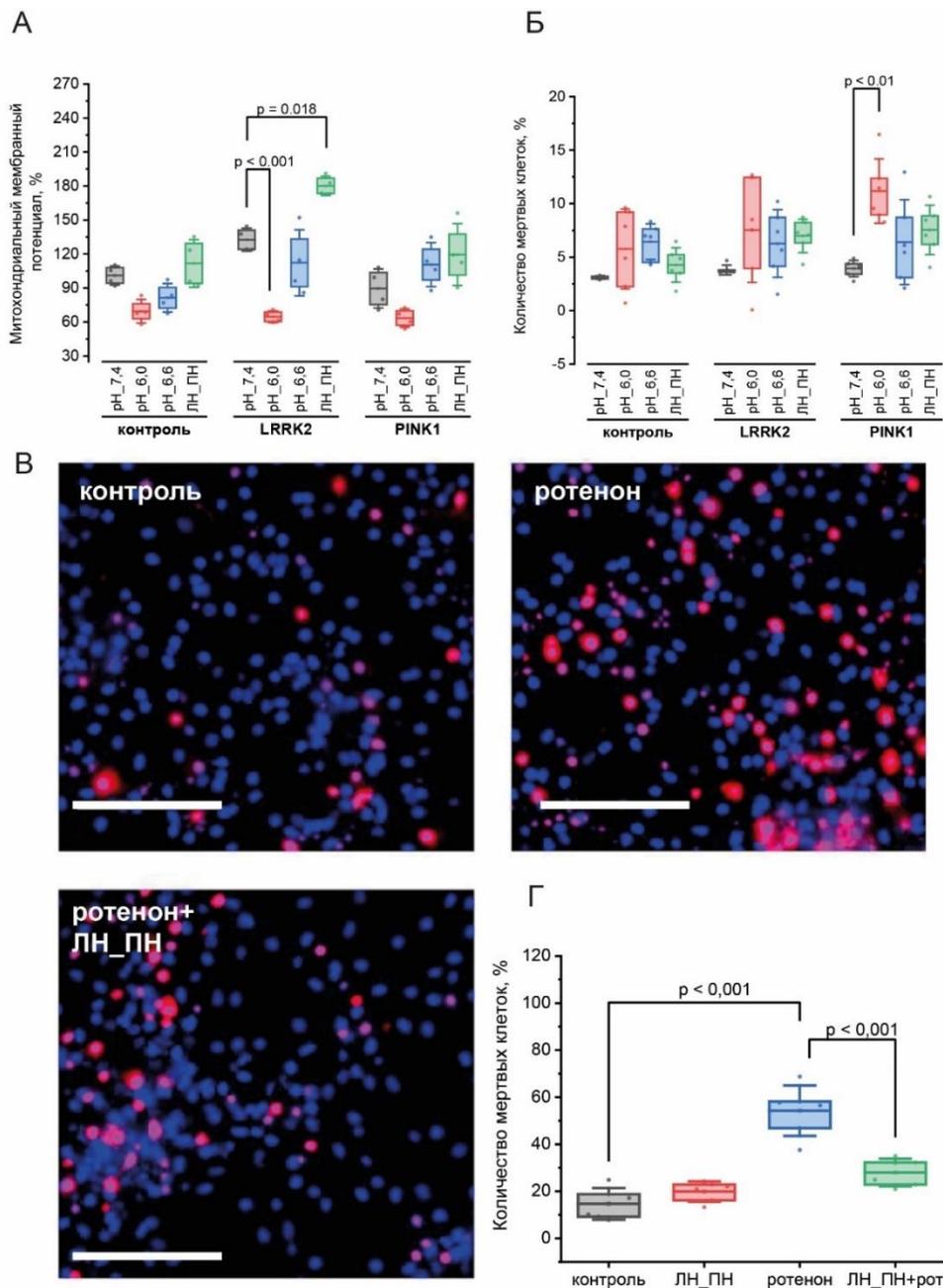


Рисунок 20. Действие закисления на мембранный потенциал и выживаемость клеток в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, связанных с развитием наследственной формы болезни Паркинсона и в токсической модели болезни Паркинсона. А) Митохондриальный мембранный потенциал в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 после краткосрочного закисления, опосредованного заменой внеклеточной среды на 30 минут с pH 6,0 и 6,6 соответственно и добавкой лактата (ЛН, 10 мМ) и пирувата (ПН, 10 мМ) натрия на 24 часа, выраженный в процентах от изначального уровня. Б) Количество мертвых клеток в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 после краткосрочного закисления, опосредованного заменой внеклеточной среды на 30 минут с pH 6,0 и 6,6 соответственно и добавкой лактата (ЛН, 10 мМ) и пирувата (ЛП, 10 мМ) натрия на 24 часа, выраженное в процентах от изначального. В) Конфокальные микрофотографии нейрон-глиальной культуры, ядра клеток которой окрашены Hoechst 33342 (синий псевдоцвет) и Propidium Iodide (PI) (красный псевдоцвет): контрольная культура, после добавки 5 мкМ ротенона (24 часа) и после 24-часовой предварительной

инкубации ротеноном и добавкой лактата и пирувата натрия. Г) Процент некротических клеток (проницаемых для PI) в нейрон-глиальной культуре после инкубации с 5 мкМ ротенона (24 часа), добавки лактата (ЛН, 10 мМ) и пирувата (ПН, 10 мМ) натрия и после 24-часовой предварительной инкубации ротеноном и добавки лактата и пирувата натрия. $n=6$ независимых экспериментов. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и пост-хок теста Тьюки, ($p < 0,05$)

Было обнаружено, что кратковременное закисление с рН 6,0 приводило к значимому снижению уровня митохондриального мембранного потенциала в клетках с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 (Рисунок 20А). Напротив, добавка лактата и пирувата натрия на 24 часа увеличивала уровень митохондриального мембранного потенциала в этих фибробластах (Рисунок 20А). При действии рН 6,0 в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 увеличивалось количество мертвых клеток, достигая 10% (Рисунок 20Б). Для других воздействий не было обнаружено значимого влияния при снижении рН среды, так и при инкубации клеток с лактатом и пируватом натрия (Рисунок 20Б).

Ротенон, ингибитор митохондриального комплекса I, широко применяется для создания токсической клеточной модели БП (Pan-Montojo F. *et al.*, 2010), поэтому мы использовали этот токсин в клетках нейрон-глиальной культуры с целью выявления защитного эффекта лактата и пирувата натрия против некротической гибели клеток. Нами было обнаружено снижение некротической гибели клеток после инкубации с лактатом и пируватом натрия после стресса, индуцированного ротеноном (Рисунок 20Г), что дополнительно свидетельствовало о защитном действии лактата и пирувата натрия в условиях стресса.

Подводя итог, нами было исследовано действие краткосрочного закисления, опосредованного заменой внеклеточной среды на 30 минут с рН 6,0 и 6,6 соответственно, а также добавкой лактата (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия на 24 часа на динамику МС в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1. Было установлено, что как прямое закисление, так и добавка лактата и пирувата натрия схожим образом изменяют морфологию МС, что подтверждается данными микроскопии. Это наталкивает на мысль о похожих механизмах действия лактата и пирувата натрия и прямого закисления, однако стоит отметить, что даже краткосрочное снижение рН среды до рН 6,0 приводило к увеличению количества некротических клеток в случае фибробластов с мутацией гена белка PINK1, тогда как смесь лактата и пирувата натрия не влияла на выживаемость мутантных фибробластов. Напротив, в условиях ротенон-индуцированной токсичности, добавка лактата и пирувата натрия снижала некротическую гибель клеток нейрон-глиальной культуры.

3.5. Влияние рекомбинантного HSP70 и его С-концевого фрагмента на индукцию митофагии и выживаемость в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 и клеток в токсической модели болезни Паркинсона

Нарушение динамики МС приводит к развитию клеточного стресса, являющегося одним из факторов прогрессирования нейродегенеративных заболеваний, к которым относятся наследственная и спорадическая формы БП. Так, аберрантная митофагия, вызванная мутациями, характерными для наследственной БП, приводит к митохондриальной дисфункции и, как следствие, окислительному стрессу и повреждению белков, выполняющих жизненно важные функции в клетке (Gandhi S., Abramov A.Y., 2012). Белок теплового шока 70 (HSP70) известен в качестве шаперона, участвующего в ответе на клеточный стресс и обеспечивающего защиту клеток путем восстановления поврежденных белковых структур, а также предотвращения их агрегации. Кроме того, HSP70 играет сигнальную роль в шаперон-опосредованной аутофагии (СМА), способствуя удалению поврежденных белков и органелл. Эти свойства делают HSP70 потенциальным кандидатом для терапии нейродегенеративных заболеваний, направленной на уменьшение клеточного стресса и улучшение митохондриальной функции (Turturici G., Sconzo G., Geraci F., 2011).

В этой части работы мы стремились узнать, как влияет экзогенно добавленный рекомбинантный HSP70 и его С-концевой фрагмент (С_HSP70) на динамику МС в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, а также в токсической модели БП – нейрон-глиальной культуре крысы, обработанной ротеноном. Как мы показали в предыдущей главе, в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1 происходит увеличение скорости АФК-продукции, характерное и для нейронов с БП (Рисунок 16), что может свидетельствовать о наличии окислительного стресса в этих клетках. Предварительно была исследована возможность рекомбинантного HSP70 и С_HSP70 проникать внутрь клетки и накапливаться в цитоплазме. Так, было установлено, что максимальная цитоплазматическая концентрация рекомбинантного HSP70 обнаруживается после 2 часов инкубации с исследуемыми клетками (Vinokurov A.Y. et al., 2024).

Уровень митофагии оценивали по степени колокализации митохондрий и лизосом, как было описано ранее. После 24 ч инкубации с С_HSP70 мы обнаружили значительно более высокий уровень митофагии в первичной нейрон-глиальной культуре крысы (Рисунок 21А-А').

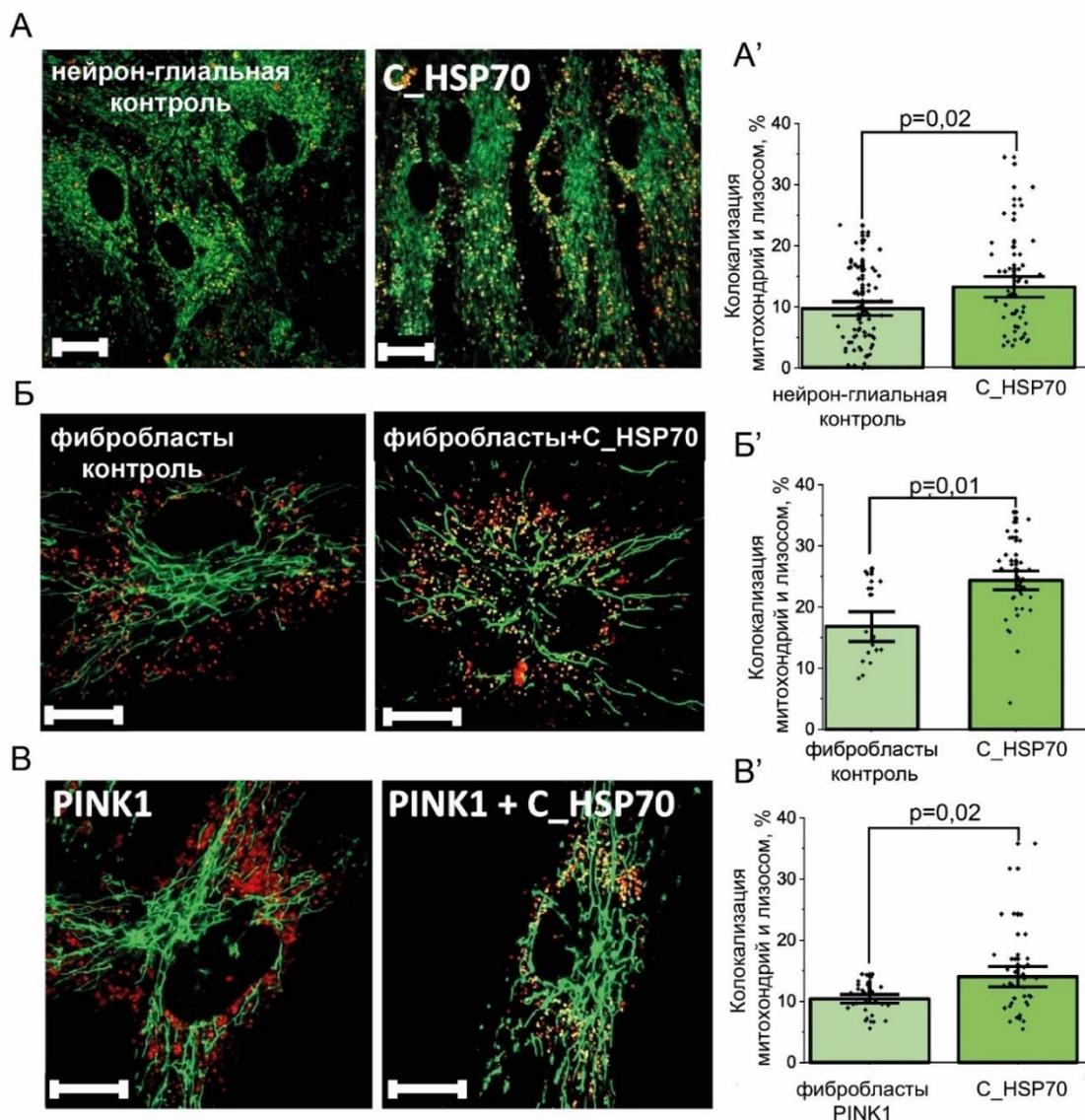


Рисунок 21. Изменение уровня колокализации митохондрий и лизосом при добавлении С-концевого фрагмента шаперона HSP70 (C_HSP70) в клетках нейрон-глиальной культуры, контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1. А) Конфокальные изображения клеток нейрон-глиальной культуры, Б) контрольных фибробластов, В) фибробластов с мутацией гена белка PINK1, окрашенных флуоресцентным зондом, специфичным к митохондриям (MitoTracker Green) и лизосомам (LisoTracker Red) в контрольных условиях и после добавления C_HSP70 на 24 часа. А') Уровень колокализации митохондрий и лизосом (в процентах) в клетках нейрон-глиальной культуры Б') контрольных фибробластах В') фибробластов с мутацией гена белка PINK1 без каких-либо добавок и после 24-часовой инкубации с C_HSP70. Масштаб – 10 мкм. Статистическую значимость клеточных линий до и после добавки C_HSP70 определяли с использованием парного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$).

Коэффициенты колокализации митохондрий и лизосом составили $9,6 \pm 0,8\%$ в клетках нейрон-глиальной культуры в контрольных условиях и $13,2 \pm 1,1\%$ после 24 часов инкубации с C_HSP70.

Следует отметить, что С_HSP70 увеличивал колокализацию митохондрий и лизосом не только в клетках нейрон-глиальной культуры и контрольных фибробластах (Рисунок 21ББ'), но в фибробластах с мутацией гена, связанной с нарушением митофагии и приводящей к развитию наследственной формы БП (Xiao B. et al., 2017). Так, уровень колокализации в этих фибробластах становился в 1,6 раз выше по сравнению с необработанными клетками (Рисунок 21БВ').

Далее мы исследовали, как влияет рекомбинантный С_HSP70 и его С-концевой фрагмент на такой важный параметр клетки, как уровень митохондриального мембранного потенциала в клетках нейрон-глиальной культуры, контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRKK2. Было обнаружено, что 1 час инкубации клеток с С_HSP70 индуцировал значительное увеличение митохондриального мембранного потенциала по сравнению с необработанными контрольными клетками в нейрон-глиальной культуре. Интересно, что аналогичные данные были получены после 12 и 24 часов инкубации с С_HSP70 (Рисунок 22АА').

При этом обработка контрольных фибробластов полным HSP70 индуцировала зеркальное снижение митохондриального мембранного потенциала в первые 2 часа инкубации с последующим восстановлением этого показателя через 4 часа инкубации с HSP70 (Рисунок 22Б). Напротив, фибробласты с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2 продемонстрировали значительное увеличение митохондриального мембранного потенциала после 24 часов инкубации с HSP70 (Рисунок 22ВГ).

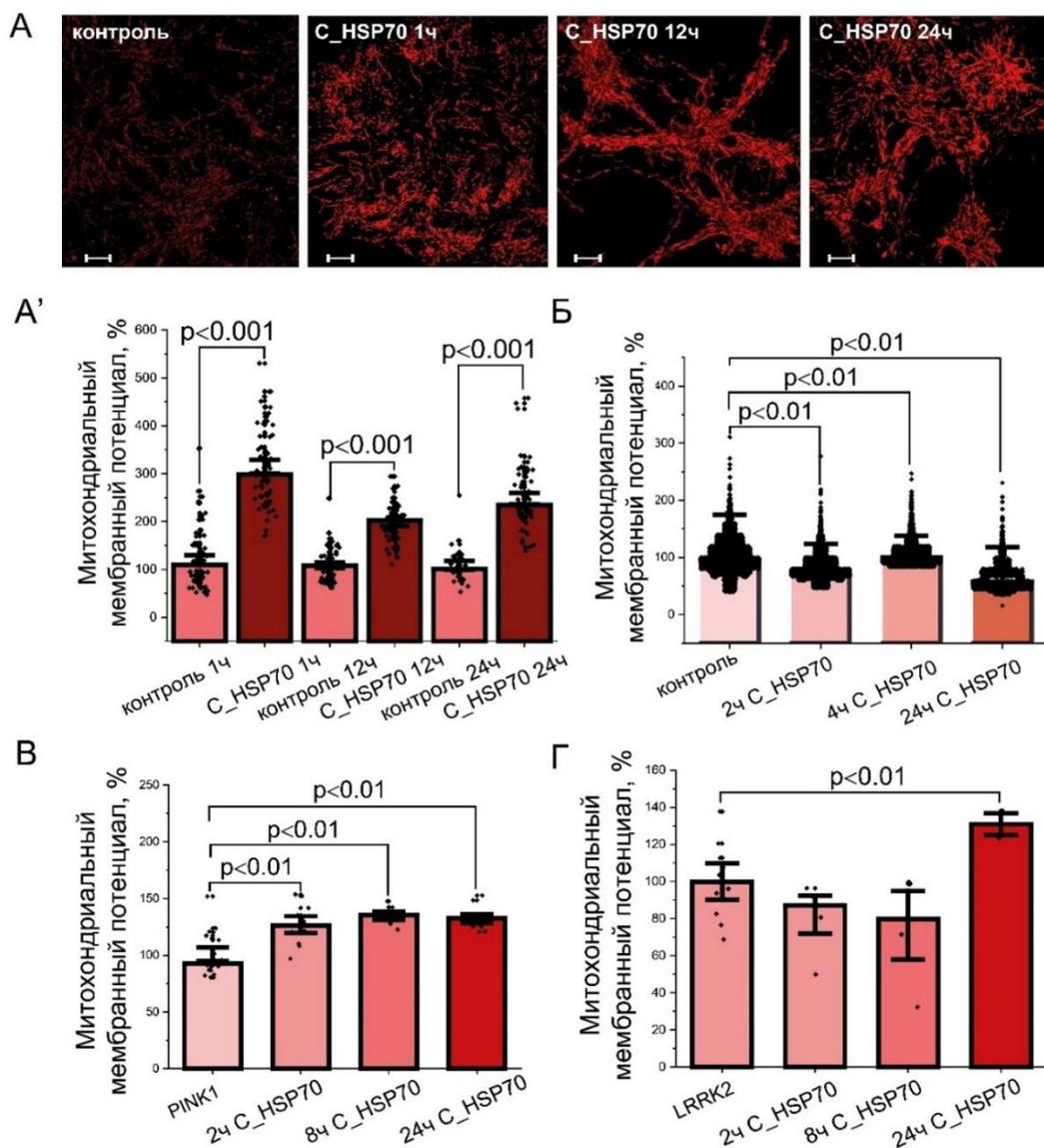


Рисунок 22. Влияние рекомбинантного белка теплового шока HSP70 (HSP70) и его С-концевого фрагмента (C_HSP70) на уровень митохондриального мембранного потенциала в клетках нейрон-глиальной культуры и фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2, связанными с развитием наследственной формы болезни Паркинсона. А) Конфокальные изображения клеток нейрон-глиальной культуры, окрашенных потенциал-чувствительным зондом TMRM (красный псевдоцвет) и А') уровень митохондриального мембранного потенциала в клетках нейрон-глиальной культуры без воздействия и после добавления HSP70 на 1 час, 12 часов и 24 часа в процентах от контроля без воздействия и окрашенных TMRM на 1 час, 12 часов и 24 часа. Статистическую значимость до и после добавки C_HSP70 определяли с использованием парного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$); Б) Уровень митохондриального мембранного потенциала в клетках контрольных фибробластов без воздействия и после добавления HSP70 на 2 часа, 4 часа и 24 часа в процентах от контрольных клеток без обработки HSP70; В) Уровень митохондриального мембранного потенциала Г) в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 и В) в фибробластах с мутацией гена белка LRRK2 без воздействия и после добавления HSP70 на 2 часа, 8 часов и 24 часа в процентах от соответствующих мутантных культур фибробластов без обработки HSP70. Масштаб– 10 мкм. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,0167$).

Далее мы оценивали влияние HSP70 и C_HSP70 на выживаемость клеток в условиях стресса. В токсической модели БП – инкубация с 5 мкМ ротенона с нейрон-глиальной культурой приводила к повышению количества клеток, проницаемых для Propidium Iodide (PI) до $55 \pm 1,8\%$ (Рисунок 23АБ), что указывает на увеличение некроза в этой культуре клеток по сравнению с контрольной культурой без ротенона (в которой $24,7 \pm 1,5\%$ некротических клеток). Предварительная инкубация клеток с C_HSP70 значительно снизила процент некротических клеток до $41,4 \pm 8\%$ в модели нейротоксичности, индуцированной ротеноном.

Помимо количества некротических клеток, мы также оценивали уровень апоптоза в клетках нейрон-глиальной культуры при действии ротенона и C_HSP70. Оценка апоптоза происходила на основе морфологических особенностей ядер клеток и с анализом активности каспазы-3 с применением NucView-488, как было описано ранее (Рисунок 12). Так, в контрольной нейрон-глиальной культуре $9,3 \pm 0,5\%$ клеток имели фрагментированные ядра, характерные для поздних стадий апоптоза. В модели нейротоксичности, индуцированной ротеноном, процент клеток, демонстрирующих поздние стадии апоптоза, был значимо выше и составлял $15,9 \pm 0,6\%$. Предварительная инкубация с C_HSP70 (24 часа) до воздействия ротеноном уменьшала количество клеток с признаками фрагментации ядра до $6,1 \pm 0,4\%$, что было значимо ниже по сравнению с нейрон-глиальной культурой, обработанной только ротеноном. Что касается ранних стадий апоптоза, после воздействия 5 мкМ ротенона в течение 6 часов ядра $40,4 \pm 5\%$ клеток нейрон-глиальной культуры демонстрировали увеличение флуоресценции NucView-488, указывающей на активность каспазы-3 (Рисунок 23Г). Предварительная инкубация нейрон-глиальной культуры с HSP70 (24 часа) также значимо снизила процент клеток (до $21,6 \pm 1,4\%$) в условиях ротенон-индуцированной токсичности, в ядрах которых присутствовала флуоресценция NucView-488.

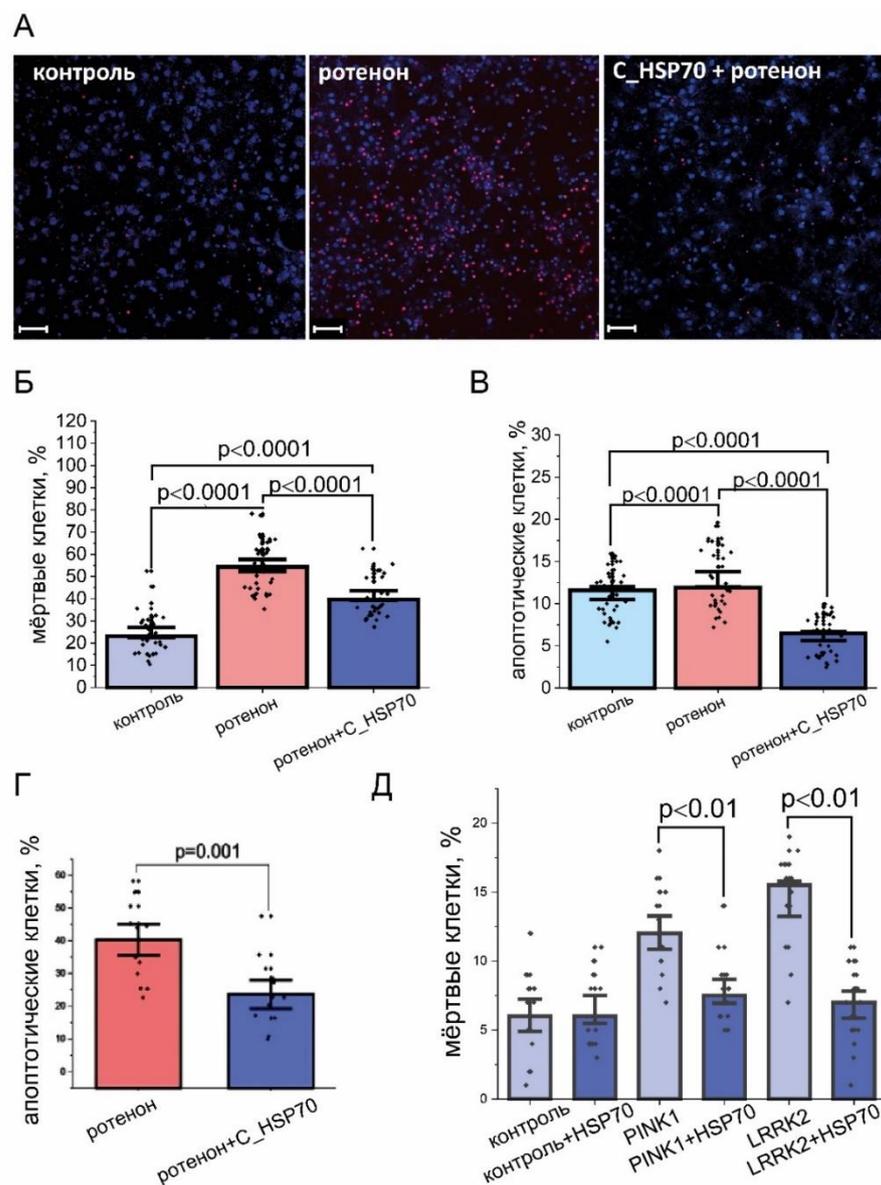


Рисунок 23. Влияние рекомбинантного белка теплового шока HSP70 (HSP70) и его С-концевого фрагмента (C_HSP70) на жизнеспособность в клетках нейрон-глиальной культуры крысы в условиях нейротоксичности с ротеноном и в фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2, связанными с развитием наследственной формы болезни Паркинсона. А) Конфокальные микрофотографии нейрон-глиальной культуры, ядра клеток которой окрашены Hoechst 33342 (синий псевдоцвет) и Propidium Iodide (PI) (красный псевдоцвет): контрольная культура, после добавки 5 мкМ ротенона (24 часа) и после 24-часовой предварительной инкубации с C_HSP70 и ротеноном. Б) Процент некротических клеток (проницаемых для PI) в нейрон-глиальной культуре и В) процент клеток, демонстрирующих поздние стадии апоптоза (с фрагментированными ядрами) после инкубации с 5 мкМ ротенона (24 часа) и после 24-часовой предварительной инкубации с C_HSP70 и ротеноном. Г) Процент клеток, демонстрирующих активацию каспазы-3 (в ядрах наблюдается флуоресценция NucView-488) и ранние стадии апоптоза после добавки 5 мкМ ротенона (6 часов) и после 24-часовой предварительной инкубации с C_HSP70 и последующей добавки 5 мкМ ротенона в течении 6 часов. Д) Процент некротических клеток (проницаемых для PI) в фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2 до и после 24-часовой инкубации с HSP70. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и пост-хок теста Тьюки, ($p < 0,05$).

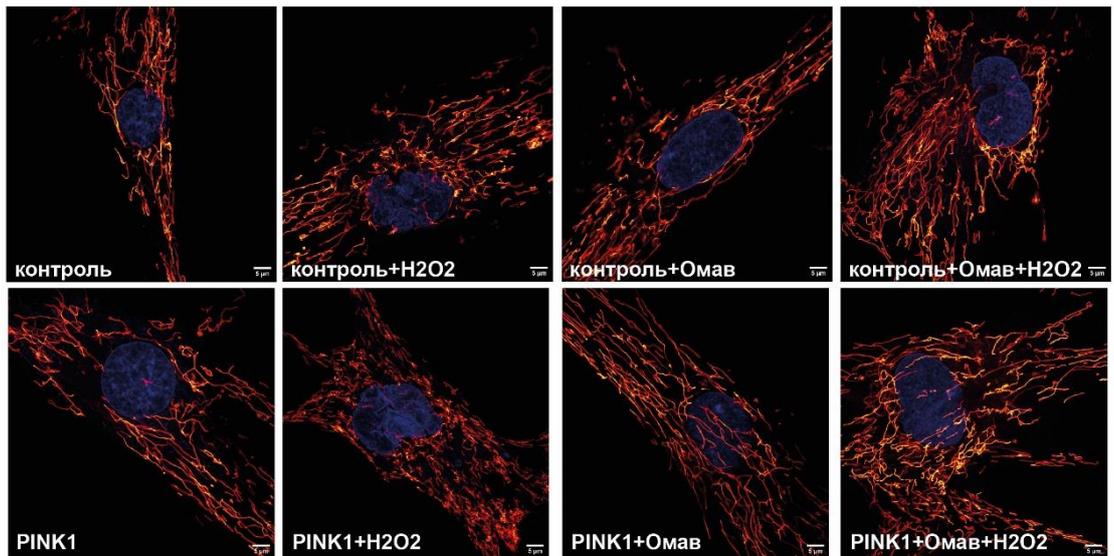
Как видно из рисунка 23Д, в случае фибробластов инкубация контрольных клеток с полным HSP70 значимо не изменила процентное содержание клеток, проницаемых для PI (6,1±0,8% по сравнению с 6,5±0,7% после 24 часов инкубации HSP70). Однако HSP70 значительно снизил процент некротических клеток в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 (с 12,1±0,8% до 7,8±0,6% после 24 часов инкубации HSP70) и мутацией гена белка LRRK2 (14,5±0,9% против 6,8±0,7% после 24-часовой инкубации с HSP70), указывая на то, что HSP70 защищает от гибели мутантные фибробласты (Рисунок 23Д).

Таким образом, в данном разделе мы показали, что рекомбинантный белок теплового шока 70 и его С-концевой фрагмент увеличивают уровень митофагии, повышает уровень митохондриального мембранного потенциала и обладает защитным эффектом в токсической модели БП – нейрон-глиальной культуре с нейротоксином ротеноном, а также в фибробластах с мутациями, связанными с наследственной БП.

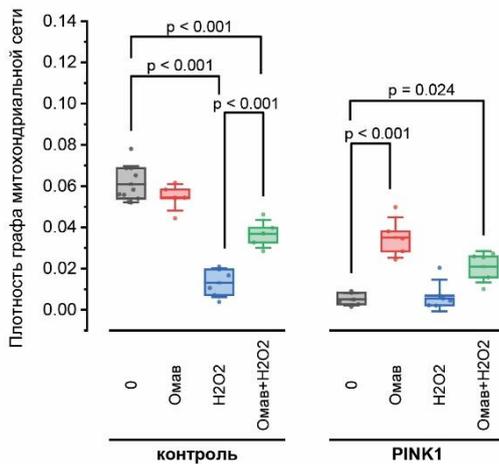
3.6. Действие активатора Nrf2 пути омавелоксолон на динамику митохондриальной сети в условиях окислительного стресса

Известно, что одной из причин нарушения динамики МС является окислительный стресс, и, в свою очередь, дисбаланс процессов деления/слияния митохондрий и митофагии может приводить к еще большему развитию окислительного стресса (Dasuri K., Zhang L., Keller J.N., 2013). Многообещающий подход для разрыва этой обратной положительной связи – воздействие на внутренние защитные пути клетки, например, через активацию фактора транскрипции Nrf2, ответственного за синтез ряда антиоксидантных ферментов (Calkins M.J. et al., 2005). Такой препарат как омавелоксолон является перспективным активатором Nrf2 пути, показавшим свою безопасность и эффективность при широком спектре патологий и в настоящий момент участвующий в клиническом исследовании терапии атаксии Фридрейха (Abeti R. et al., 2018). Стоит отметить, что отдельные исследования показывают, что омавелоксолон, как и, возможно, другие активаторы Nrf2, могут обладать защитным эффектом не только непосредственно воздействуя на Nrf2 путь, но и через влияние на динамику МС клетки (Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y., 2015), однако убедительных доказательств на этот счет до сих пор нет. В настоящей главе мы исследовали действие омавелоксолон на морфологию МС и уровень митофагии в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1 в нормальных условиях и условиях стресса, индуцированного перекисью водорода.

А



Б



В

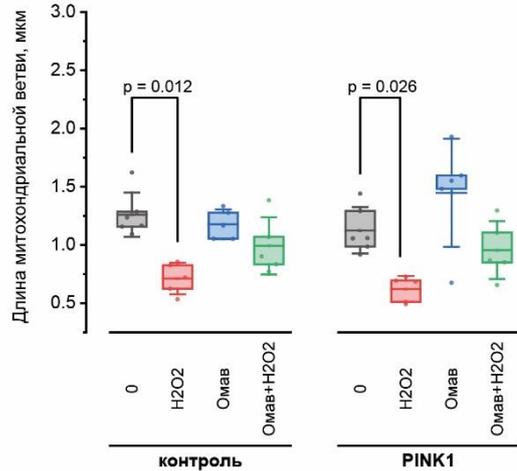


Рисунок 24. Действие активатора пути Nrf2 омавелоксолон на динамику митохондриальной сети (МС) в условиях окислительного стресса в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1, связанной с развитием болезни Паркинсона. А) Конфокальные изображения контрольных фибробластов и фибробластов с мутацией PINK1: в нормальных условиях, в условиях стресса (инкубации с 150 мкМ H₂O₂ в течении 1,5 часов); при инкубации с омавелоксолонем (50 нМ, 24 часа) и совместном действии сначала омавелоксолонем (24 часа) и после стресса, индуцированного H₂O₂ (150 мкМ, 1,5 часа), окрашенных потенциал-чувствительным митохондриальным зондом TMRM (красный псевдоцвет) и Hoechst 3342, окрашивающим ядро клетки (синий псевдоцвет). Б) Плотность графа МС и В) длина митохондриальной ветви в составе МС в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1: в условиях без обработок («0»), в условиях стресса (инкубации с 150 мкМ H₂O₂ в течении 1,5 часов); при инкубации с омавелоксолонем (50 нМ, 24 часа) и совместном действии сначала омавелоксолонем (24 часа) и после стресса, индуцированного перекисью водорода H₂O₂ (150 мкМ, 1,5 часа). Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Поправка Бонферрони использовалась для корректировки уровня значимости для множественных сравнений (скорректированное значение $p = 0,0167$)

Связность МС в исследуемых клетках была определена на основе анализа плотности графа МС в контрольных фибробластах и фибробластах PINK1 (Рисунок 24А), как было описано нами в первой главе настоящего раздела. На рисунке 24Б представлены данные по плотности графа для контрольных и мутантных фибробластов. Из графика видно, что изначальная плотность графа МС в клетках PINK1 ниже, чем в контрольных фибробластах (Рисунок 24Б). При воздействии перекиси водорода плотность МС в контрольных клетках значительно снижается, тогда как в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 плотность МС остается на стабильно низком уровне (Рисунок 24Б). Интересно, что действие омавелоксолонa (50 нМ, 24 часа) не влияет на плотность графа МС в контрольных клетках, но значимо увеличивает этот параметр в мутантных фибробластах (Рисунок 24Б). В условиях окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 , и предварительной добавки омавелоксолонa плотность МС уменьшалась в меньшей степени в контрольных фибробластах, а в фибробластах PINK1 этот параметр оставался даже выше, чем в этих фибробластах без каких-либо воздействий (Рисунок 24Б).

Мы также исследовали изменения длины митохондрий в составе МС клеток при воздействии H_2O_2 , омавелоксолонa (50 нМ, 24 часа) в обычных условиях и в условиях стресса, индуцированного перекисью водорода. При добавлении перекиси водорода длина митохондрий в МС значимо снижается как в контрольных клетках, так и в клетках с мутацией гена белка PINK1 (Рисунок 24В), что может указывать на активацию процесса деления митохондрий в ответ на стресс, вызванный H_2O_2 . Добавка омавелоксолонa сама по себе не оказывает значимого влияния на длину митохондрий в МС ни в контрольных клетках, ни в фибробластах PINK1 (Рисунок 24В). Однако стоит отметить, что при предварительной инкубации клеток с омавелоксолоном и последующем воздействии H_2O_2 длина митохондрий в составе МС не снижается так значительно в контрольных и мутантных фибробластах (по сравнению с воздействием только перекиси водорода H_2O_2) (Рисунок 24В).

Мы также исследовали влияние омавелоксолонa на уровень митофагии (Рисунок 25АБ), а также потенциальный защитный эффект этого вещества на контрольные и мутантные фибробласты в условиях стресса (Рисунок 25В), индуцированного H_2O_2 .

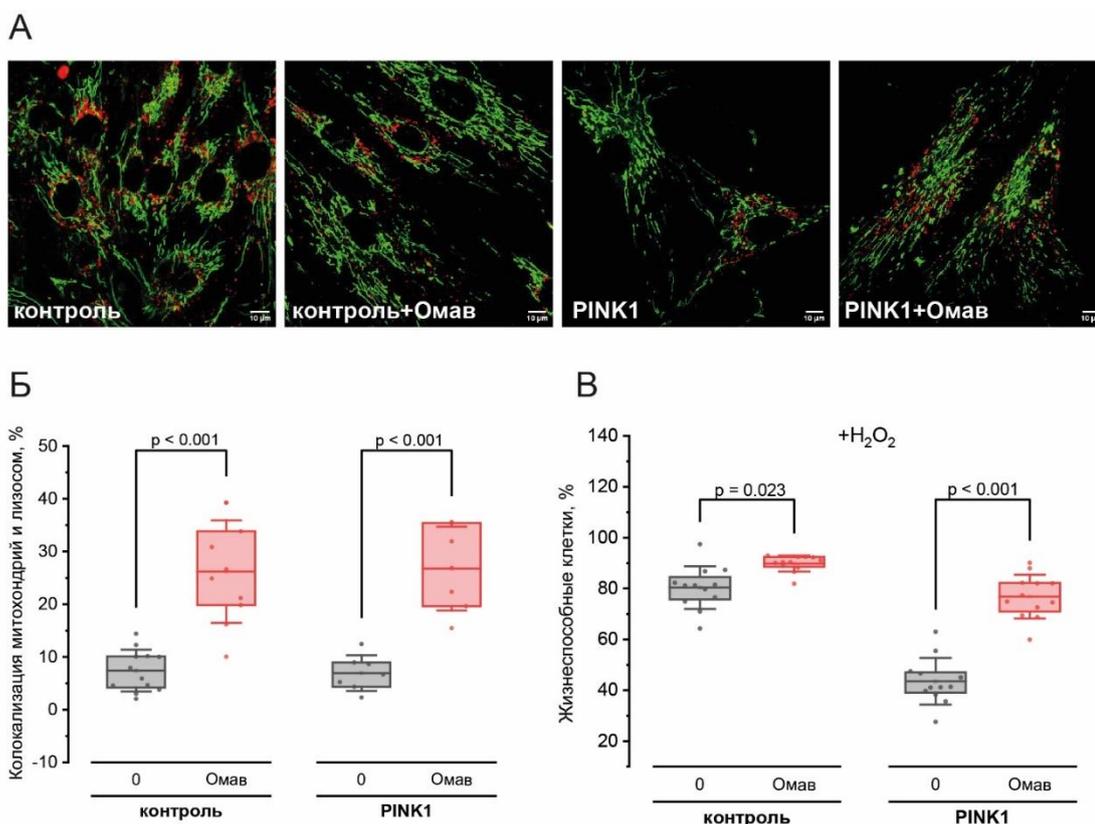


Рисунок 25. Действие омавелоксолонa на митoфагию в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1 в нормальных условиях и на жизнеспособность этих клеток при действии окислительного стресса. А) Конфокальные изображения контрольных фибробластов и фибробластов с мутацией гена белка PINK1, окрашенных флуоресцентным зондом, специфичным к митохондриям (MitoTracker Green) и лизосомам (LisoTracker Red) без обработки и после инкубации с 50 нМ омавелоксолонa в течение 24 часов. Б) Процент колокализации митохондрий и лизосом в фибробластах без обработки и после инкубации с 50 нМ омавелоксолонa в течение 24 часов. В) Количество жизнеспособных клеток в процентах от начального уровня при окислительном стрессе, индуцированном добавлением 150 мкМ H₂O₂ в течение 1,5 часов и предварительной инкубации с омавелоксолонoм (50 нМ, 24 часа) и последующей добавкой перекиси водорода. Статистическую значимость для клеточных линий до и после добавки омавелоксолонa определяли с использованием парного t-критерия Стьюдента (значение $p < 0,05$).

Важно подчеркнуть, что в нормальных условиях уровень митoфагии значимо не отличается у контрольных фибробластов и с мутацией гена белка PINK1, что, вероятно, связано с активацией альтернативного пути митoфагии в этих клетках (Рисунок 19), хотя в фибробластах PINK1 есть тенденция к снижению колокализации митохондрий и лизосом. Инкубация клеток с 50 нМ омавелоксолонa в течение 24 часов увеличивает уровень митoфагии как в контрольных клетках, так и в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 (в 3,6 и 3,1 раза соответственно) (Рисунок 25Б).

В условиях стресса, индуцированного добавлением H_2O_2 (150 мкМ, 1,5 часа), количество жизнеспособных клеток значительно уменьшается в культуре фибробластов PINK1 (до $43,5 \pm 9,1\%$) и в культуре контрольных фибробластов (до $80,3 \pm 8,3\%$) по сравнению с изначальным количеством (Рисунок 25В). Предварительная инкубация фибробластов с 50 нМ омавелоксолон в течение 24 часов увеличивала процент жизнеспособных клеток в условиях стресса как в контрольной культуре (до $89,8 \pm 3,1\%$), так и в культуре мутантных фибробластов (до $76,8 \pm 8,6\%$) (Рисунок 25В).

Таким образом, омавелоксолон проявляет защитное действие, поддерживая целостность МС и активируя митофагию в контрольных и мутантных фибробластах. В условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, омавелоксолон способствует поддержанию структуры МС, повышая плотность МС и длину митохондрий, а также улучшает жизнеспособность клеток. Важно отметить, что этот эффект выражен как в контрольных фибробластах, так и в фибробластах с мутацией гена белка PINK1.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МС клетки поддается постоянному ремоделированию под действием внутренних и внешних факторов. Динамика МС, которая включает процессы деления, слияния, транспорта митохондрий, митохондриального биогенеза и митофагии, необходима для поддержания функционального состояния митохондрий в целом (Bertholet A.M. et al., 2016; Chan D.C., 2012; Wai T., Langer T., 2016). Сдвиг баланса в одну из сторон отражается на морфологии МС, что возможно использовать в качестве маркера для оценки состояния клетки. Именно поэтому морфология МС в норме и при патологии в настоящее время является объектом пристального внимания исследователей, в том числе, в свете разработки терапевтических стратегий для коррекции динамики МС.

Однако на наш взгляд, простая оценка параметров МС, таких как «длина митохондрий», «количество связей в МС», «количество митохондрий» и т.д. зачастую не отражает картины изменений МС, потому что не учитывает локальные взаимодействия в сетях МС и, кроме того, различные стрессы, как правило, приводят к одновременным двунаправленным изменениям динамики МС, что дополнительно затрудняет количественную оценку морфологии МС. В связи с этим нашей первостепенной целью, представленной в первой главе диссертации, была разработка и экспериментальное установление применимости подхода для количественной оценки морфологии МС при различных воздействиях в клетках млекопитающих. Разработанный подход основан на автоматическом анализе конфокальных изображений клетки с использованием вновь созданного программного обеспечения и включает характеристики графа МС и морфологические параметры.

Анализ МС на основе графа – относительно новое направление, позволяющее получить более детальную информацию о морфологии МС. Несмотря на то что ранее был проведен анализ графа МС в дрожжевых клетках (Harwig M.C. et al., 2018; Viana M.P. et al., 2020), до сих пор не было предложено конкретных количественных параметров для оценки морфологии МС в клетках млекопитающих на примере различных патологических воздействий. В настоящей работе мы отобрали три характеристики графа: «плотность графа МС», «средний кратчайший путь», «средний коэффициент кластеризации» и три морфологических параметра: «площадь МС», «длина ветви», «соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий», что позволяет с большей воспроизводимостью описать изменения морфологии МС, происходящие при различных патологических

воздействиях. Стоит еще отдельно отметить, что среди морфологических параметров анализа МС мы также предложили новый – соотношение индивидуальных митохондрий к сетевым, а не просто абсолютное количество в этих группах, что позволило добиться уменьшения дисперсии этого показателя.

Валидация подхода осуществлялась на примере воздействий, которые, исходя из литературных данных, приводят к сдвигу баланса динамики МС в сторону увеличения деления митохондрий: действие перекиси водорода (Zhou L. *et al.*, 2010), разобщение дыхания с помощью FCCP (Maro B., Marty M.C., Bornens M., 1982), ингибирование дыхания с MPP⁺ (Liu Y.J. *et al.*, 2020), так и напротив – в сторону увеличения слияния митохондрий в МС: голодание с культуральной средой без питательной сыворотки (Rambold A.S. *et al.*, 2011), блокирование митохондриального деления с помощью Mdivi-1 (Ruiz A., Alberdi E., Matute C., 2018).

Полученные данные о морфологии МС с использованием подхода адекватно отражали изменения при воздействиях, влияющих на сдвиг баланса динамики МС. При этом важно отметить, что использование только морфологических параметров МС не позволило обнаружить изменения при инкубации клеток с ингибитором I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий MPP⁺, хотя «средний коэффициент кластеризации» (характеристика, которая показывает, насколько «тесно» кооперируют митохондрии в составе отдельной МС) показал значимое снижение по сравнению с контрольными клетками без MPP⁺, что соотносится с литературными данными, в которых показана роль этого вещества в усилении митохондриального деления и фрагментации МС (Liu L. *et al.*, 2012; Verma M. *et al.*, 2020). При этом у подхода все еще существуют некоторые ограничения: как было описано в разделе «Материалы и методы», граф МС по своей природе является псевдографом (Lewis G.R., Marshall W.F., 2023), что усложняет обработку с помощью существующих алгоритмов, написанных для простых графов. Кроме того, автоматический анализ изображений в подходе применим не для всех типов клеток.

Отдельно стоит сказать о причине выбора основного объекта исследований настоящей работы – фибробластах. Выбор этого объекта обусловлен несколькими причинами, во-первых, МС фибробластов образует единую ретикулярную структуру, состоящую из протяженных по всему объему клетки митохондрий, а не из отдельных компартментов, как в случае, например, кардиомиоцитов, где митохондрии образуют ретикулум, состоящий из расположенных «голова к голове» митохондрий, соединенных межмитохондриальными соединениями (Twig G. *et al.*, 2006; Zorov D.V. *et al.*, 2019; Abramicheva P.A. *et al.*, 2023). Во-вторых, фибробласты являются плоскими распластанными клетками, что удобно для исследований с помощью флуоресцентной

микроскопии, а также последующей обработке данных. В-третьих, в отличие от других тканей и клеток, фибробласты наиболее доступны для получения материала от доноров с какими-либо патологиями и для создания клеточной культуры, но при этом изучение их в качестве объекта может помочь в понимании механизмов митохондриальной дисфункции, например, связанной с мутациями, ассоциированными с наследственной формой БП без дополнительных генетических манипуляций.

Так, в главе «Изменение морфологии митохондриальной сети в фибробластах с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона», где мы изучаем морфологию МС от пациентов с установленной БП, были обнаружены значимые изменения в МС по сравнению с фибробластами от здоровых доноров. Две линии фибробластов, изученные в этой главе, содержат мутации в генах белков PINK1 и Parkin, связанных с процессом митофагии (Quinn P.M.J. *et al.*, 2020), а другая – мутацию в богатой лейцином повторной киназе 2 (LRRK2), белке, участвующем в аутофагии (Flinkman D. *et al.*, 2023). Еще одна линия фибробластов содержала точечную мутацию A53T гена, кодирующего альфа-синуклеин, агрегаты которого обнаруживаются в мозге больных БП (Marvian A.T. *et al.*, 2019). В качестве контроля были использованы фибробласты условно здоровых доноров, сопоставимых по возрасту с больными БП, между которыми в большинстве случаев не было значимых различий и которые были представлены в объединенном виде. Однако стоит отметить ограничения этого исследования, которые связаны с количеством пациентов с мутациями, а также индивидуальной изменчивостью морфологии МС.

Морфология МС может быть следствием адаптации клеток к условиям, поэтому помимо морфологии МС в фибробластах нами также была оценена реакция МС на стресс, а также скорость продукции цитозольных и митохондриальных АФК. В качестве модели стресса использовалась добавка перекиси водорода, поскольку известно, что она вызывает АФК-зависимую продукцию АФК, и в ряде случаев (Zorov D.V., Juhaszova M., Sollott S.J., 2006) добавка перекиси водорода действительно помогла выявить различия в параметрах морфологии МС, отсутствующие в нормальных условиях.

Известно, что с возрастом митохондрии подвергаются фрагментации и теряют площадь, занимаемую в клетке (Trigo D. *et al.*, 2023), что также может быть связано с развитием нейродегенерации (Hung C.H.-L. *et al.*, 2018). Однако в настоящем исследовании значительное изменение площади МС было обнаружено только для фибробластов с мутацией генов белков PINK1/Parkin, что, напротив, привело к увеличению этого показателя (Рисунок 14Б), вероятно, по нескольким синергетическим причинам. Во-первых, как было показано ранее, белки PINK1 и Parkin участвуют в регуляции активности Drp1 через фосфорилирование (увеличивая его активность) (Yang Y. *et al.*, 2008) и

активности митофузинов через убиквитинирование (ингибируя их активность) (Gegg M.E. *et al.*, 2010). Соответственно, при aberrантной функции белков PINK1 и Parkin с одной стороны нарушается процесс деления митохондрий, а с другой стороны не подавляется процесс слияния. Кроме того, поскольку PINK1 и Parkin являются ключевыми регуляторами митофагии, опосредованной PINK1/Parkin (Quinn P.M.J. *et al.*, 2020), их aberrантная функция может привести к снижению эффективности деградации митохондрий, что может способствовать их накоплению в клетке и увеличению площади МС. Интересно, что при воздействии стресса действительно наблюдалось уменьшение площади МС контрольных и мутантных фибробластов, однако в фибробластах PINK1/Parkin оставалась наибольшей даже после добавки перекиси водорода.

Изменение длины сетевых митохондрий может происходить как из-за увеличения слияния, так и вследствие нарушения процесса деления. Увеличение длины митохондрий, например, может быть вызвано потребностью в усилении производства АТФ (Fiorenza M. *et al.*, 2018). С другой стороны, показано, что окислительный стресс способствует активации митохондриального деления через посттрансляционные модификации и увеличение экспрессии генов, кодирующих белки Drp1 и Fis1, что может привести к уменьшению длины митохондрий (Cid-Castro C., Morán J., 2021). В нашем исследовании мы обнаружили увеличение средней длины митохондриальных ветвей в клетках PINK1/Parkin и A53T (Рисунок 14В). Поскольку белки Mfn1 и Mfn2 участвуют в процессе слияния митохондрий и являются субстратами для убиквитинирования Parkin (Nakamura K. *et al.*, 2011), неудивительно, что нарушение функции Parkin приводит к увеличению длины митохондрий за счет интенсивного слияния. Интересно, что хотя ранее было показано, что экспрессия альфа-синуклеина с точечной мутацией A53T в клетках млекопитающих приводит к фрагментации митохондрий (Sarraf S.A. *et al.*, 2013), мы обнаружили противоположный эффект. Кроме того, стресс, индуцированный перекисью водорода, привел к значительному уменьшению длины митохондрий во всех изученных клетках, за исключением фибробластов с мутацией A53T. Важно подчеркнуть, что альфа-синуклеин экспрессируется не только в нейронах, но и в фибробластах (Hoerken H.-H. *et al.*, 2008), и его мутантная форма A53T обладает большей способностью к формированию патологических агрегатов (Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T., 1998). Поскольку ряд предыдущих исследований показал, что альфа-синуклеин и его мутантная форма могут взаимодействовать с основными белками деления (Drp1, Fis1), блокируя их функцию (Portz P., Lee M.K., 2021), а также с белками цитоскелета, нарушая процесс деления митохондрий (Ordóñez D.G., Lee M.K., Feany M.B., 2018), мы полагаем, что увеличение длины митохондрий в фибробластах с мутацией A53T в нормальных и стрессовых условиях

может быть связано с нарушением деления митохондрий под влиянием мутантной формы альфа-синуклеина.

Связность МС также может изменяться при патологии и в ответ на физиологические условия, например, при голодании (Rambold A.S. *et al.*, 2011). Как было показано в первой главе диссертации, о локальной связности МС можно судить исходя из среднего коэффициента кластеризации графа МС. Так, мы показали, что в нормальных условиях связность в МС не отличается среди контрольных клеток и фибробластов LRRK2 и A53T, однако средний коэффициент кластеризации графа МС в фибробластах PINK1 ниже, чем в контроле, а в клетках с мутацией генов белков PINK1/Parkin наоборот этот параметр выше, чем в контрольных фибробластах. При добавлении перекиси водорода в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка LRRK2 происходит понижение среднего коэффициента кластеризации графа МС, что говорит о снижении локальной кооперации среди митохондрий, тогда как в клетках PINK1 он остается на таком же низком уровне, как в этих фибробластах без действия стресса. Интересно, что в мутантных фибробластах PINK1/Parkin и A53T коэффициент кластеризации графа МС остается на стабильно высоком уровне даже в условиях стресса, что также подтверждает идею о нарушении деления митохондрий в этих клетках. Альтернативное объяснение заключается в возможном нарушении в этих клетках аппарата деления митохондрий, так как процесс деления требует скоординированной работы ГТФазы, разделяющей внутреннюю и наружную мембраны митохондрий. Когда разделяется только внутренняя мембрана, митохондрии могут оставаться связанными с остальной частью МС в единой внешней мембране (Gao S., Hu J., 2021; Liu X., Hajnóczky G., 2011).

Хотя считается, что окислительный стресс при БП характерен только для нейронов головного мозга, мы обнаружили увеличение скорости продукции цитозольных АФК почти во всех фибробластах с мутациями (Рисунок 16Б). Несмотря на то, что мы не можем оценить вклад какой-либо конкретной формы АФК, использование митохондриально-ориентированных зондов позволяет измерить, являются ли митохондрии источником перепроизводства АФК в фибробластах с мутациями. Поскольку в нормальных условиях не удалось выявить различий в продукции митохондриальных АФК между контрольными клетками и фибробластами с мутациями, мы применили модель со стрессом, индуцированным перекисью водорода (Рисунок 16А). После добавления перекиси водорода было выявлено значительное увеличение продукции митохондриальных АФК в мутантных фибробластах PINK1 и клетках с мутацией в гене, кодирующем альфа-синуклеин, что также может свидетельствовать о дисфункции митохондрий в этих клетках

(Angelova P.R., Abramov A.Y., 2018). Интересно также отметить, что мы не обнаружили увеличения продукции митохондриальных АФК в мутантных фибробластах PINK1/Parkin.

Таким образом, наши результаты показывают, что мутации в генах, связанных с динамикой МС и альфа-синуклеином, приводят к значительным изменениям в морфологии МС, что может быть важным фактором в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Мы также выдвинули контринтуитивное предположение о том, что двойная мутация генов белков PINK1/Parkin и характерные изменения морфологии МС (увеличение длины митохондрий и площади МС, среднего коэффициента кластеризации) в этих фибробластах синергетически привели к улучшению митохондриальной функции за счет снижения деления митохондрий. Интересно отметить, что пациент, от которого была получена эта линия фибробластов, был наибольшего возраста, и, возможно, компенсаторные механизмы, приводящие к снижению деления МС, сыграли роль в более позднем начале БП. Так, например, для защиты клеток от фрагментации МС при травме, ишемии и т.д. считается перспективным подход по снижению деления митохондрий, например, с использованием ингибитора Drp1 – Mdivi-1 (Cui M. *et al.*, 2010; Kim D.I. *et al.*, 2016).

Напротив, при мутации гена, кодирующего белок PINK1, снижалась длина митохондрии в составе МС и связность МС, а при добавке перекиси водорода соотношение сторон митохондрий этих мутантных фибробластов приближалось к 1, что соответствует шарообразным органеллам. Эти данные согласуются с исследованиями, в которых на животных моделях показано, что aberrantная функция PINK1 приводит к фрагментации МС (Cui M. *et al.*, 2010). Также, как было показано в других главах диссертации, у этих фибробластов увеличена чувствительность к стрессу, что позволило нам использовать данную культуру клеток в качестве модели для исследования терапевтических воздействий, влияющих на динамику МС.

Митохондрии и динамика МС неразрывно связаны с определением «судьбы» клетки – гибели или выживания (Kroemer G., Reed J.C., 2000). В ряде работ показано, что при различных патологиях, включая нейродегенерацию, сердечно-сосудистые заболевания, диабет и т.д., центральным регулятором клеточной гибели выступает пора переходной проницаемости митохондрий (mPTP) (Baev A.Y. *et al.*, 2024; Boyman L. *et al.*, 2019; Briston T. *et al.*, 2019; Ludtmann M. *et al.*, 2017). Так, необратимое открытие mPTP приводит к резкой потере потенциала митохондриальной мембраны, набуханию митохондрий и высвобождению проапоптотических факторов (Boyman L. *et al.*, 2019). Однако не все митохондрии в клетке могут индуцировать переход митохондриальной мембраны и не все открытия mPTP связаны с гибелью клеток (Briston T. *et al.*, 2019; Hurst S., Hoek J., Sheu S.-S., 2017). Определение количественной степени mPTP-зависимой митохондриальной

деполяризации, необходимой для активации апоптоза клеток, важно для понимания механизмов передачи сигналов, управляющих выживанием клеток и их гибелью. В то время как нейроны имеют высокие биоэнергетические потребности и находятся в постмитотическом состоянии, что делает их уязвимыми для митохондриальной дисфункции, раковые клетки «уклоняются» от апоптоза, чтобы поддерживать постоянный рост. При нейродегенеративных состояниях стратегии, направленные на восстановление функции митохондрий, могут спасти нейроны, находящиеся на грани апоптоза. Напротив, химиотерапия, которая увеличивает уязвимость митохондрий, может помочь заставить устойчивые раковые клетки подвергнуться апоптозу (Briston T. *et al.*, 2019; Wang C., Youle R.J., 2009).

Именно поэтому в главе «Митохондриальная сеть и апоптоз: критическая потеря митохондриальной сети, необходимая для индукции апоптоза в разных типах клеток» мы проводили количественную оценку критической доли необратимо mPTP-зависимо деполяризованных митохондрий, необходимых для активации апоптоза в клетках нейрон-глиальной культуры, фибробластах кожи и опухолевых клетках. Было обнаружено, что в различных типах клеток этот параметр варьирует, что помогает понять устойчивость одних клеток и восприимчивость других при патологиях. Для оценки индукции mPTP мы использовали пошаговое добавление электрогенного кальциевого ионофора феррутина, который вызывает перегрузку митохондрий этим ионом. После каждого шага добавки феррутина измерялась площадь МС до того момента, как в ядрах клеток не возрасла флуоресценция субстрата каспазы-3 (NucView488), указывая на активацию этого апоптотического фермента (Рисунок 12).

Таким образом, в то время как клетки нейрон-глиальной культуры оставались стабильными до ~80-90% потери площади МС, фибробласты демонстрировали активацию каспазы-3 только при ~35% деполяризации МС (Рисунок 13А). Примечательно, что раковые клетки ВТ-474 претерпели потерю более 90% митохондрий до запуска каспазы-3, однако для этого потребовалась меньшая концентрация феррутина (Рисунок 13А-Б). Таким образом, мы обнаружили, что в клетках, где активация апоптоза является важным физиологическим этапом в механизме регенерации ткани – фибробластах кожи, активация каспазы-3 индуцируется гораздо меньшим процентом митохондрий с открытием mPTP по сравнению с клетками, где апоптоз связан с патологическим процессом, как в постмитотических нейронах.

Разница в mPTP-зависимых порогах апоптоза для изученных клеток может быть обусловлена молекулярной вариабельностью регуляции перехода проницаемости митохондриальной мембраны. Ранние исследования показали большую устойчивость

изолированных нейронов митохондрий к стимулам, вызывающим открытие mPTP, по сравнению с митохондриями печени, из-за ультраструктурных особенностей митохондрий (Berman S.B., Watkins S.C., Hastings T.G., 2000). Например, экспрессия про- и антиапоптотических факторов также может способствовать не только чувствительности клетки к патологическим сигналам, но и напрямую влиять на проницаемость митохондриальной мембраны (Singh R., Letai A., Sarosiek K., 2019). Вах и Bcl-2 являются ключевыми медиаторами апоптоза, действующими на внутренний митохондриальный путь запрограммированной гибели клеток. Проапоптотический белок Вах олигомеризуется на внешней митохондриальной мембране, обеспечивая проницаемость ее целостности и способствуя высвобождению цитохрома с и других ферментов смерти, которые активируют разрушение клеток. Напротив, антиапоптотический Bcl-2 защищает жизнеспособность клеток, сохраняя целостность митохондрий и предотвращая выход цитохрома с (Giorgi C. *et al.*, 2012). Относительные уровни экспрессии и баланс между этими факторами играют ключевую роль, регулируя инициацию апоптоза (Singh R., Letai A., Sarosiek K., 2019). Следовательно, более высокая экспрессия порообразующего проапоптотического Вах и более низкие уровни антиапоптотического Bcl-2 в фибробластах по сравнению с нейрон-глиальной культурой, вероятно, стимулируют их митохондрии к изменениям проницаемости (Рисунок 13В). Так и в нашей работе было установлено, что в фибробластах кожи наибольшее соотношение экспрессии мРНК белков Вах/Bcl-2 по сравнению с клетками нейрон-глиальной культуры и опухолевыми клетками, что может также объяснять различную чувствительность митохондрий к перегрузке кальцием (Рисунок 13В). Важно отметить, что для исследования мы использовали зрелую нейрон-глиальную культуру с сформированной сетью. Предыдущие исследования показали, что растущие нейроны имеют высокую экспрессию Вах и низкую экспрессию Bcl-2, что делает их более уязвимыми к апоптотическим стимулам, тогда как зрелые нейроны демонстрируют снижение экспрессии Вах (Hollville E., Romero S.E., Deshmukh M., 2019).

Таким образом, нами показаны различия в пороге чувствительности к индукции апоптоза в клетках нейрон-глиальной культуры, фибробластах кожи и опухолевых клетках, зависящие от площади деполяризованных митохондрий, что может помочь в понимании гибели и выживании клеток при различных патологиях, связанных, в частности, с кальциевой перегрузкой. Кроме того, в этой главе нами предложен новый подход для изучения активации mPTP в динамике, что можно использовать для проверки действия защитных веществ, влияющих на митохондриальную функцию и динамику МС.

В условиях повышенного окислительного стресса, характерного для многих патологий, особенно важно исследовать потенциал фармакологических агентов, способных

модулировать динамику МС и клеточные защитные механизмы. Так, для поддержания функционального состояния митохондрий в условиях окислительного стресса клетке необходимо вовремя сегрегировать токсичные поврежденные митохондрии от остальной МС посредством машинерии деления митохондрий и удалять их в процессе контролируемой деградации – митофагии. Безопасные способы активации митофагии в настоящее время привлекают особое внимание исследователей из-за возможного защитного эффекта при различных патологиях (Georgakopoulos N.D. *et al.*, 2017; Masaldan S., Callegari S., Dewson G., 2022). Хотя механизмы митофагии и аутофагии хорошо изучены, регуляция этих процессов в физиологии и патологии известна в меньшей степени. Недавно наша лаборатория показала, что активация митофагии и аутофагии может быть вызвана закислением цитозоля, достигнутого с помощью экзогенной добавки лактата и пирувата натрия (Fedotova E.I. *et al.*, 2022; Komilova N.R. *et al.*, 2022). Так, было обнаружено, что миллимолярные концентрации пирувата и лактата натрия вызывают снижение pH в цитозоле и индуцируют митофагию и аутофагию, защищая клетки в токсической (с нейротоксином MPP⁺) клеточной модели БП (Fedotova E.I. *et al.*, 2022; Komilova N.R. *et al.*, 2022). Однако оставался вопрос о ключевом механизме такого влияния лактата и пирувата натрия: реализуется ли он посредством закисления цитозоля, или субстратный эффект этих соединений важен в большей степени?

Для того чтобы ответить на этот вопрос, в главе «Оценка действия кратковременного закисления и добавки лактата и пирувата натрия на динамику митохондриальной сети в фибробластах с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2» нами было исследовано действие лактата и пирувата натрия в сравнении с прямым закислением, вызванным кратковременной заменой внеклеточной среды в моделях фибробластов, несущих мутации в белках, участвующих в аутофагии (LRRK2) и митофагии (PINK1). Один из ключевых выводов настоящего исследования заключается в том, что кратковременное внеклеточное закисление, опосредуемое снижением pH инкубационной среды, схожим образом с действием лактата и пирувата натрия, изменяет динамику МС и индуцирует митофагию, но в первом случае это может быть токсично и приводить к гибели клетки.

В частности, нами было показано, что при снижении pH до 6,0 и 6,6, а также добавке лактата и пирувата натрия в МС контрольных и мутантных фибробластах снижается связность МС и уменьшается соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий (Рисунок 18). Кроме того, прямое закисление и добавка лактата и пирувата натрия приводит к повышению уровня колокализации митохондрий и лизосом в контрольных и мутантных фибробластах (Рисунок 19Б). Несмотря на схожесть эффектов во влиянии на МС, даже кратковременное изменение внеклеточного pH до 6,0 способствует снижению

митохондриального мембранного потенциала и увеличению количества некротических клеток в культуре мутантных по PINK1 фибробластов (Рисунок 20). Напротив, добавка лактата и пирувата натрия значимо увеличивала митохондриальный мембранный потенциал в LRRK2 фибробластах (Рисунок 20). Не исключено, что рН-стресс в случае снижения рН до 6,0 активировал митофагию за счет деполяризации митохондриальной мембраны, что может приводить к гибели клетки. Таким образом, внешние схожие эффекты в случае добавки лактата и пирувата натрия могут обладать защитным действием, а при прямом закислении оказываться токсичными. Стоит отметить, что изменения внутриклеточного рН наблюдаются при голодании (Oriji R. *et al.*, 2009) и ишемии (Owens L.M. *et al.*, 1996), и эти процессы также активируют митофагию (Marino M.L. *et al.*, 2012). Кроме того, в исследованиях показана возможность снижения рН крови за счет создания гиперкапнии посредством вдыхания CO₂ и гипоксии (Du J. *et al.*, 2017; Magnotta V.A. *et al.*, 2012). Так, в недавней работе было показано защитное действие гиперкапнии в мышечной модели БП с ротеиноном, механизм которого тоже, возможно, реализуется за счет активации митофагии (Nadeev A.D. *et al.*, 2022). Помимо этого, одним из механизмов защитного ишемического preconditionирования, возможно, является снижение рН и изменение динамики МС (Zhao H., 2009).

В наших экспериментах добавка лактата или пирувата, вероятно, приводила к активации митофагии за счет различных механизмов в контрольных и мутантных фибробластах. В настоящее время известны два пути митофагии: зависимый от PINK1/Parkin и независимый от PINK1/Parkin (альтернативный, рецептор-опосредованный) (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018). Интересно, что в фибробластах PINK1 изначально была увеличена экспрессия мРНК генов белков, связанных с рецептор-опосредованной митофагией (Рисунок 19В), что, возможно, связано с компенсаторной функцией альтернативного пути, как и ранее было показано при PINK1-связанных мутациях у пациентов с БП (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018). При добавке лактата и пирувата натрия в контрольных фибробластах и мутантных фибробластах LRRK2 повышался уровень экспрессии мРНК гена белка PINK1, но этого не происходило в случае PINK1-мутантных фибробластов, в которых, напротив, увеличивались уровни экспрессии мРНК генов белков Vnir3 и Nix, связанных с рецептор-опосредованной митофагией (Рисунок 19В).

Интересно отметить, что, как полагают, одним из механизмов, способствующим активации митофагии и повышению устойчивости раковых клеток, является как раз накопление лактата и локальное снижение рН опухолевого микроокружения (E. L., Swerdlow R.H., 2016; Marino M.L. *et al.*, 2012). Кроме того, концентрация лактата в

организме значительно увеличивается во время физических упражнений, что также способствует улучшению митохондриальной функции, и эти концентрации сопоставимы с теми, которые активировали аутофагию и митофагию в наших экспериментах (Messias L.H.D. *et al.*, 2017). Исследования показывают, что пируват обладает нейропротекторными свойствами при различных патологических состояниях, включая эпилепсию и БП (Gandhi S., Abramov A.Y., 2012; Kovacs S. *et al.*, 2012). С одной стороны, этот эффект может быть обусловлен способностью пирувата служить дополнительным субстратом для митохондриального комплекса I, а с другой – его влиянием на процессы митофагии. Нарушение функции комплекса I является характерной чертой многих нейродегенеративных заболеваний, в том числе БП (Abramov A.Y., Angelova P.R., 2019).

Недавние исследования на моделях ишемии продемонстрировали, что лактат способствует снижению внутриклеточной концентрации кальция, уменьшению некротической гибели нейронов и астроцитов, а также оказывает противовоспалительное действие (Vabenko V.A. и *et al.*, 2024). Кроме того, было установлено, что лактат и пируват натрия защищают клетки от окислительного стресса и токсического воздействия белковых агрегатов путем активации транскрипционного фактора Nrf2, который регулирует экспрессию генов антиоксидантной защиты (Tauffenberger A. *et al.*, 2019). Интересно отметить, что процесс митофагии также зависит от активации Nrf2 сигнального пути, что предполагает возможную взаимосвязь между внутриклеточным закислением, активацией Nrf2 и индукцией митофагии и аутофагии (Georgakopoulos N.D. *et al.*, 2017). Таким образом, лактат и пируват, являясь естественными метаболитами, могут играть ключевую роль в регуляции процессов митофагии и аутофагии. Это открывает новые перспективы для разработки терапевтических подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний, в частности БП, путем активации этих защитных механизмов через модуляцию внутриклеточного pH и взаимодействие с сигнальным путем Nrf2.

Говоря об активации Nrf2, одним из перспективных веществ в этом контексте является омавелоксолон – электрофильный ингибитор Keap1, вызывающий транслокацию Nrf2 в ядро (Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y., 2015; Madsen K.L. *et al.*, 2020). Дело в том, что регуляция Nrf2-зависимого пути происходит путем Keap1-Cul3-зависимого убиквитинирования: в нормальных физиологических условиях Nrf2 обладает высокой скоростью деградации (период полураспада около 20-30 минут). В отсутствие окислительного стресса или воспаления Nrf2 находится в цитоплазме, связанный с белками Keap1 и Cul3, которые участвуют в его деградации путем убиквитинирования. Длительное воздействие окислительного стресса приводит к повреждению цистеиновых остатков Keap1 и Cul3, которые уже не могут выполнять убиквитинирование Nrf2. Nrf2

накапливается в цитоплазме и отправляется в ядро, где вызывает экспрессию генов, ответственных за синтез генов антиоксидантного ответа (Robledinos-Antón N. *et al.*, 2019). Существуют некоторые косвенные факты, связывающие Nrf2 и БП: так, активность Nrf2 снижается с возрастом, а возраст, как известно, является одним из факторов риска БП. Помимо этого, в дофаминергических нейронах черной субстанции Nrf2 находится в цитозоле, тогда как у пациентов с БП, сопоставимых по возрасту, большая часть Nrf2 локализована в ядре, что наводит на мысль о компенсаторной активации Nrf2 (Cuadrado A., 2016; Esteras N., Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y., 2016).

Так, в главе «Действие активатора Nrf2 пути омавелоксолон на динамику митохондриальной сети в условиях окислительного стресса» диссертации мы изучали действие омавелоксолон на динамику МС, уровень митофагии, а также эффект этого вещества на выживаемость клеток в условиях окислительного стресса в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена, кодирующего белок PINK1. Связность МС была определена на основе преобразования МС в граф и определения его плотности. Стоит отметить, что в нормальных условиях в мутантных фибробластах плотность графа была ниже, чем в контрольных клетках, что может указывать на изначально нарушенную динамику МС. При воздействии перекиси водорода плотность графа МС в обоих типах культур значительно снижалась, свидетельствуя об активации деления митохондрий под действием окислительного стресса. Интересно, что воздействие самого омавелоксолон не влияло на плотность графа МС в контрольных клетках, но значительно увеличивало этот параметр в клетках PINK1. Это говорит о том, что омавелоксолон способен улучшать связность митохондриальной сети в условиях, когда она изначально нарушена. В условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂, добавление омавелоксолон помогало поддерживать более высокую плотность МС как в контрольных фибробластах, так и в фибробластах PINK1. Аналогичный эффект омавелоксолон был обнаружен и в случае длины митохондрий в составе МС в условиях стресса.

Мы также исследовали способность омавелоксолон активировать митофагию в нормальных условиях и влияние этого вещества на жизнеспособность клеток в условиях стресса. В нормальных условиях инкубация клеток с 50 нМ омавелоксолон увеличивала митофагию как в контрольных клетках, так и в фибробластах с мутацией гена белка PINK1. Мутантная культура по сравнению с контрольными фибробластами более чувствительна к стрессу, вызванному перекисью водорода. Предварительная инкубация фибробластов с омавелоксолон в течение 24 часов увеличивала процент жизнеспособных клеток в условиях стресса как в контрольной культуре, так и в культуре фибробластов с мутацией гена белка PINK1.

Таким образом, омавелоксолон проявляет защитное действие, поддерживая динамику МС и активируя митофагию. В нормальных условиях омавелоксолон усиливает митофагию, что способствует улучшению клеточной функции и удалению поврежденных митохондрий. В условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, омавелоксолон способствует поддержанию структуры МС, повышая плотность и предотвращая фрагментацию МС, а также улучшает жизнеспособность клеток. Важно отметить, что этот эффект выражен как в контрольных фибробластах, так и в фибробластах с мутацией гена белка PINK1, что подчеркивает потенциал омавелоксолон в качестве терапевтического средства для защиты клеток, особенно в контексте нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушением динамики МС.

Помимо активаторов Nrf2 пути, еще одной перспективной группой белковых молекул, участвующих в защите от клеточного стресса, являются белки теплового шока. Белки этой группы состоят из N-домена (40 кДа), обладающего способностью связывать нуклеотиды, и C-домена (25 кДа), связывающего различные субстраты. Некоторые белки из группы белков теплового шока являются конститутивными, такие как HSC70, тогда как экспрессия других, таких как HSP70, может значительно активироваться при стрессе (Kim H.P., Morse D., Choi A.M.K., 2006; Moon I.S. *et al.*, 2001). В частности, клетки головного мозга характеризуются высоким содержанием HSC70 и низким уровнем HSP70 (Turturici G., Sconzo G., Geraci F., 2011). Повышение HSP70 было показано в результате повреждения периферических нервных клеток при действии бета-амилоида в первичных нейрон-глиальных культурах (Magrané J. *et al.*, 2004) и в модели фокальной ишемии головного мозга, что показывает важность HSP70 при ответе на стресс (Kim H.P., Morse D., Choi A.M.K., 2006). Воздействие шаперонов, в том числе HSP70, на белки-предшественники патологических комплексов, характерных для болезни Альцгеймера и БП, является перспективной стратегией для терапии этих патологий (Lazarev V.F. *et al.*, 2023). Так, фармакологическая индукция HSP70 с помощью малой молекулы – производного индолилазина – предотвращала образование агрегатов бета-амилоида, потерю нейронов гиппокампа и развитие нарушений памяти в трансгенной модели болезни Альцгеймера (Lazarev V.F. *et al.*, 2022).

Немаловажно, что HSP70 обладает способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер в чистом виде или в составе специальных конструкций, что позволяет использовать экзогенную форму этого шаперона в качестве потенциального терапевтического агента (Ekimova I.V. *et al.*, 2010; Escobedo I. *et al.*, 2007; Shevtsov M.A. *et al.*, 2014). Помимо этого, для рекомбинантного HSP70, в котором были произведены замены для улучшения его стабильности, показана способность эффективно проникать через

плазматическую мембрану и распределяться в цитозоле и органеллах (Vinokurov A.Y. *et al.*, 2024).

В главе «Влияние рекомбинантного HSP70 и его С-концевого фрагмента на индукцию митофагии и выживаемость в фибробластах с мутациями LRRK2 и PINK1 и токсической модели болезни Паркинсона» мы исследовали действие экзогенного рекомбинантного HSP70 (HSP70) и его С-концевого фрагмента (С_HSP70) на митохондриальный мембранный потенциал, способность активировать митофагию и защищать фибробласты с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2, связанных с наследственной формой БП, а также в токсической модели БП – клетках нейрон-глиальной культуры с ротеноном. В наших экспериментах показано, что экзогенный HSP70, как и С_HSP70, способен увеличивать митохондриальный мембранный потенциал в нейронах, астроцитах и фибробластах аналогично тому, как эндогенный белок улучшает энергетический обмен (Rodriguez Y.A. *et al.*, 2021). Увеличение митохондриального мембранного потенциала до уровня контрольных фибробластов при действии экзогенного HSP70 в клетках с мутациями генов белков PINK1 и LRRK2 свидетельствует о восстановлении нормальной митохондриальной функции у этих клеток.

Помимо этого, нами показана способность С_HSP70 индуцировать митофагию, как в клетках нейрон-глиальной культуры, так и в фибробластах с мутациями. Повышение уровня митофагии при добавке HSP70 способствует удалению поврежденных митохондрий, что улучшает общий митохондриальный гомеостаз и снижает уровень окислительного стресса. Как уже было сказано выше, при спорадических и наследственных формах БП наблюдается дефицит работы I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий (Abramov A.Y., Angelova P.R., 2019). Нами также обнаружен защитный эффект инкубации клеток с HSP70 в токсической модели БП с нейротоксином ротеноном, являющимся ингибитором I комплекса (Pan-Montojo F. *et al.*, 2010), что может быть обусловлено активацией митофагии и улучшением митохондриальной функции в этих клетках.

Таким образом, наши данные подтверждают значимость HSP70 в регуляции митохондриальной функции и защиты клеток при патологиях, вызванных нарушением динамики МС. Учитывая его способность проникать в клетки, активировать митофагию и улучшать митохондриальную функцию, HSP70 представляет собой перспективное средство для терапевтического вмешательства в заболеваниях, связанных с митохондриальными дисфункциями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты, с одной стороны, позволяют судить об изменении морфологии МС при различных патологических состояниях, включая БП, а с другой стороны, оценить возможность коррекции динамики МС для улучшения митохондриальной функции. На рисунке 26 представлена схема, объединяющая результаты диссертации и литературные данные.

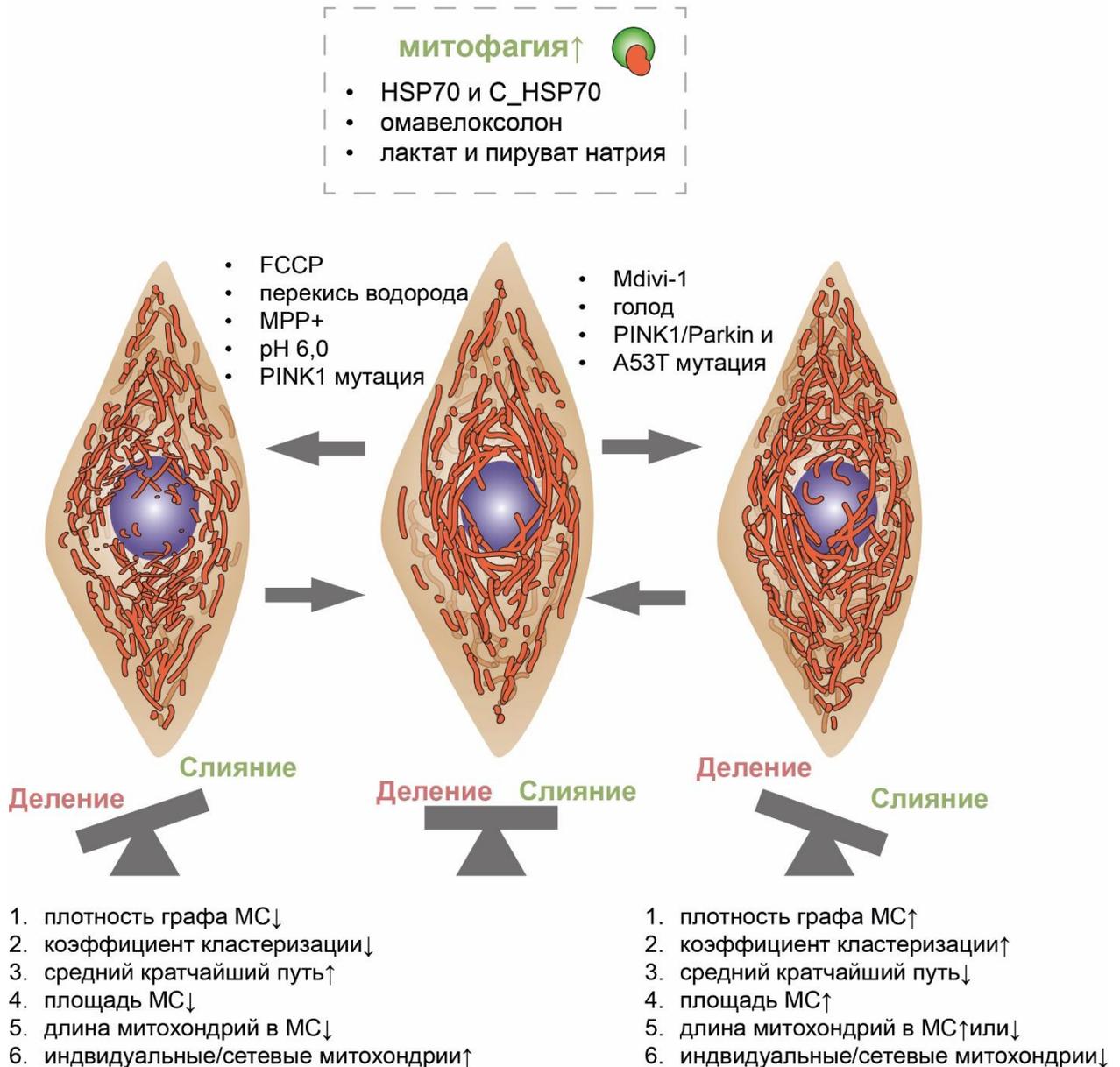


Рисунок 26. Общая схема, составленная на основании данных диссертации и иллюстрирующая изменения динамики митохондриальной сети при патологических состояниях и воздействии различных защитных агентов.

Физиологическое состояние митохондриальной сети предполагает баланс процессов слияния и деления митохондрий. В условиях клеточного стресса и при развитии патологии происходит сдвиг баланса в сторону деления или слияния митохондрий. О сдвиге баланса можно судить по морфологическим параметрам и характеристикам графа митохондриальной сети. В частности, наши данные показали, что усиление митохондриального деления и разобщение митохондриальной сети происходит при наличии мутации в гене, кодирующем белок PINK1, связанный с наследственной болезнью Паркинсона, при кратковременном снижении pH внеклеточной среды до 6,0; действии нейротоксина MPP⁺, что отражается в снижении плотности графа митохондриальной сети, уменьшении среднего коэффициента кластеризации, увеличении среднего кратчайшего пути, и по изменению морфологических параметров, таких как: длина митохондрий в сетях, количество связей в митохондриальной сети и соотношении индивидуальных и сетевых митохондрий. Напротив, наши результаты показали, что при наличии двойной мутации генов белков PINK1/Parkin, точечной A53T мутации в гене, кодирующим альфа-синуклеин, действии ингибитора Dgp1 – Mdivi-1 и голодании происходит сдвиг баланса в сторону слияния митохондрий, что выражается в увеличении плотности графа митохондриальной сети, увеличении среднего коэффициента кластеризации, уменьшении среднего кратчайшего пути, при этом длина митохондрий в сетях может как снижаться, так и увеличиваться (из-за образования более разветвленных митохондрий). Кроме этого, нами показана способность рекомбинантного белка теплового шока 70 (HSP70) и его C-концевого фрагмента (C_HSP70), активатора Nrf2 пути – омавелоксолон, а также лактата и пирувата натрия индуцировать митофагию и увеличивать выживаемость клеток в условиях стресса.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный подход для количественной оценки морфологии митохондриальной сети в клетках млекопитающих, основанный на автоматическом анализе конфокальных изображений и представляющий собой комбинацию характеристик графа митохондриальной сети («плотность графа», «средний коэффициент кластеризации графа» и «средний кратчайший путь в графе») и морфологических параметров («площадь митохондриальной сети», «длина ветви», «соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий») наиболее полно отражает изменения в морфологии митохондриальной сети при действии различных видов клеточного стресса, а также в клетках, несущих мутации, ассоциированные с болезнью Паркинсона.

2. В фибробластах пациентов с наследственной формой болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в генах, кодирующих белки PINK1, Parkin, LRRK2 и альфа-синуклеин, наблюдаются различные паттерны изменения морфологии митохондриальной сети в нормальных условиях при действии окислительного стресса, что связано с нарушением процессов деления/слияния митохондрий, а также увеличением продукции АФК в этих клетках.

3. Критическая доля деполяризованных митохондрий, необходимая для индукции апоптоза при кальциевой перегрузке, варьирует в зависимости от типа клеток: фибробласты наиболее чувствительны, в то время как клетки нейрон-глиальной культуры наиболее устойчивы. Эти различия соотносятся с экспрессией про- и анти-апоптотических генов.

4. Рекомбинантный белок теплового шока 70 и его С-концевого фрагмент, омавелоксолон, а также лактат и пируват натрия влияют на динамику митохондриальной сети, защищая клетки в условиях стресса: рекомбинантный белок теплового шока 70 и его С-концевого фрагмент индуцируют митофагию, увеличивают уровень митохондриального мембранного потенциала и снижают некротическую и апоптотическую гибели в токсической модели болезни Паркинсона, а также в клетках с мутациями, ассоциированными с болезнью Паркинсона; омавелоксолон поддерживает связность митохондриальной сети и улучшает жизнеспособность клеток в условиях стресса; добавка лактата и пирувата изменяет морфологию митохондриальной сети и экспрессию генов, связанных с митохондриальной динамикой, индуцирует митофагию, а также повышает выживаемость клеток в токсической модели болезни Паркинсона и клетках с мутациями, ассоциированными с нарушением динамики митохондриальной сети и болезнью Паркинсона.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода;
- БП – болезнь Паркинсона;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- A53T – мутация в гене, кодирующем альфа-синуклеин и клетки, несущие такую мутацию;
- ВЕСЕФ АМ – 2,7-бис-(2-карбоксиэтил)-5-(и-6)-карбоксифлуоресцеин, ацетоксиметиловый эфир;
- Dgp1 – связанный с динамином белок 1;
- FCCP – карбонилцианид-р-трифлуорометоксифенилгидразон;
- H₂DCFDA – 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат;
- HSP70, C_HSP70 – белок теплового шока 70 и его С-концевой фрагмент;
- МС – митохондриальная сеть;
- Mfn1/Mfn2 – белки митофузины, кодируемые генами *MFN*;
- MPP⁺ – 1-метил-4-фенилпиридиний/1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин;
- mPTP – пора переходной проницаемости митохондрий;
- NAD⁺/NADH – никотинамидадениндинуклеотид окисленный/восстановленный;
- LLRK2 – лейцин-богатая киназа 2;
- NADPH – никотинамиддинуклеотид фосфат восстановленный;
- Nrf2 – фактор-2, связанный с эритроидным ядерным фактором;
- PINK1 – PTEN-индуцируемая киназа 1, кодируемая геном PINK1 (*PARK6*), и клетки с мутацией в этом гене;
- SNCA (*PARK1*) – ген, кодирующий альфа-синуклеин;
- TMRM – тетраметилродамин метиловый эфир;
- Opa1 – белок оптической атрофии 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A novel algorithm identifies stress-induced alterations in mitochondrial connectivity and inner membrane structure from confocal images / M. Ouellet, G. Guillebaud, V. Gervais et al. // *PLOS Computational Biology*. – 2017. – Т. 13. – № 6. – С. e1005612.
2. A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. / M. Spinazzi, S. Cazzola, M. Bortolozzi et al. // *Human molecular genetics*. – 2008. – Т. 17. – № 21. – С. 3291-3302.
3. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity / X. Qi, N. Qvit, Y.-C. Su, D. Mochly-Rosen // *Journal of Cell Science*. – 2013. – Т. 126. – № 3. – С. 789-802.
4. A reaction-diffusion model of ROS-induced ROS release in a mitochondrial network. / L. Zhou, M. A. Aon, T. Almas et al. // *PLoS computational biology*. – 2010. – Т. 6. – № 1. – С. e1000657-e1000657.
5. A reciprocal relationship between reactive oxygen species and mitochondrial dynamics in neurodegeneration / C. H.-L. Hung, S. S.-Y. Cheng, Y.-T. Cheung et al. // *Redox Biology*. – 2018. – Т. 14. – С. 7-19.
6. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture / A. J. Valente, L. A. Maddalena, E. L. Robb et al. // *Acta Histochemica*. – 2017. – Т. 119. – № 3. – С. 315-326.
7. A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30 / W. Yue, Z. Chen, H. Liu et al. // *Cell Research*. – 2014. – Т. 24. – № 4. – С. 482-496.
8. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites / W. Ji, A. L. Hatch, R. A. Merrill et al. // *eLife*. – 2015. – Т. 4. – С. e11553-e11553.
9. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development / N. Robledinos-Antón, R. Fernández-Ginés, G. Manda, A. Cuadrado // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2019. – Т. 2019. – С. 9372182-9372182.
10. Alterations in Mitochondrial Morphology and Quality Control in Primary Mouse Lung Microvascular Endothelial Cells and Human Dermal Fibroblasts under Hyperglycemic Conditions / N. V. Belosludtseva, D. A. Serov, V. S. Starinets et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т. 24. – № 15.
11. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α / S. Jäger, C. Handschin, J. St.-Pierre, B. M. Spiegelman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Т. 104. – № 29. – С. 12017-12022.
12. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress / E. Q. Toyama, S. Herzig, J. Courchet et al. // *Science*. – 2016. – Т. 351. – № 6270. – С. 275-281.
13. Angelova, P. R. Alpha-synuclein and beta-amyloid - different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration. / P. R. Angelova,

- A. Y. Abramov // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2017. – T. 483. – № 4. – C. 1110-1115.
14. Angelova, P. R. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration / P. R. Angelova, A. Y. Abramov // *FEBS Letters*. – 2018. – T. 592. – № 5. – C. 692-702.
15. Arismendi-Morillo, G. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer / G. Arismendi-Morillo // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2009. – T. 41. – № 10. – C. 2062-2068.
16. Autophagy Is a Protective Mechanism for Human Melanoma Cells under Acidic Stress* / M. L. Marino, P. Pellegrini, G. Di Lernia et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – T. 287. – № 36. – C. 30664-30676.
17. A β -Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis / D. I. Kim, K. H. Lee, A. A. Gabr et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2016. – T. 1863. – № 11. – C. 2820-2834.
18. Bakeeva, L. E. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle / L. E. Bakeeva, Yu. S. Chentsov, V. P. Skulachev // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1978. – T. 501. – № 3. – C. 349-369.
19. Balancing mitochondrial dynamics via increasing mitochondrial fusion attenuates infarct size and left ventricular dysfunction in rats with cardiac ischemia/reperfusion injury / C. Manechote, S. Palee, S. Kerdphoo et al. // *Clinical Science*. – 2019. – T. 133. – № 3. – C. 497-513.
20. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation / T. Murakawa, O. Yamaguchi, A. Hashimoto et al. // *Nature Communications*. – 2015. – T. 6. – № 1. – C. 7527-7527.
21. Behbahan, I. S. A Protocol for Measurement of Intracellular pH. T. 4 / I. S. Behbahan, M. A. Mcbrian, S. K. Kurdistani. – 2014.
22. Berman, S. B. Quantitative Biochemical and Ultrastructural Comparison of Mitochondrial Permeability Transition in Isolated Brain and Liver Mitochondria: Evidence for Reduced Sensitivity of Brain Mitochondria / S. B. Berman, S. C. Watkins, T. G. Hastings // *Experimental Neurology*. – 2000. – T. 164. – № 2. – C. 415-425.
23. Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism / M. N. Quinsay, Y. Lee, S. Rikka et al. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2010. – T. 48. – № 6. – C. 1146-1156.
24. Broekemeier, K. M. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria / K. M. Broekemeier, M. E. Dempsey, D. R. Pfeiffer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – T. 264. – № 14. – C. 7826-7830.
25. CaM kinase I α -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology / X.-J. Han, Y.-F. Lu, S.-A. Li et al. // *Journal of Cell Biology*. – 2008. – T. 182. – № 3. – C. 573-585.

26. CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation / S. Xu, P. Wang, H. Zhang et al. // *Nature Communications*. – 2016. – T. 7. – № 1. – C. 13189-13189.
27. Cell-Permeable HSP70 Protects Neurons and Astrocytes Against Cell Death in the Rotenone-Induced and Familial Models of Parkinson's Disease / A. Y. Vinokurov, A. A. Palalov, K. A. Kritskaya et al. // *Molecular Neurobiology*. – 2024.
28. Chan, D. C. Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health / D. C. Chan // *Annual Review of Genetics*. – 2012. – T. 46. – № 1. – C. 265-287.
29. Chapter 9 - Visualization of mitochondrial membrane potential in mammalian cells / N. Esteras, M. J. W. Adjubo-Hermans, A. Y. Abramov, W. J. H. Koopman // *Methods in Cell Biology* / L. A. Pon, E. A. Schon ред. – Academic Press, 2020. – T. 155. – C. 221-245.
30. Chemical Inhibition of the Mitochondrial Division Dynamin Reveals Its Role in Bax/Bak-Dependent Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization / A. Cassidy-Stone, J. E. Chipuk, E. Ingberman et al. // *Developmental Cell*. – 2008. – T. 14. – № 2. – C. 193-204.
31. Chen, W. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets / W. Chen, H. Zhao, Y. Li // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – T. 8. – № 1. – C. 333-333.
32. Chronic treatment with the complex I inhibitor MPP⁺ depletes endogenous PTEN-induced kinase 1 (PINK1) via up-regulation of Bcl-2-associated athanogene 6 (BAG6) / M. Verma, J. Zhu, K. Z. Q. Wang, C. T. Chu // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – T. 295. – № 23. – C. 7865-7876.
33. Cid-Castro, C. Differential ROS-Mediated Phosphorylation of Drp1 in Mitochondrial Fragmentation Induced by Distinct Cell Death Conditions in Cerebellar Granule Neurons / C. Cid-Castro, J. Morán // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2021. – T. 2021. – C. 8832863-8832863.
34. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. / F. M. Lopes, R. Schröder, M. L. C. J. da Frota et al. // *Brain research*. – 2010. – T. 1337. – C. 85-94.
35. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. / T. Ahmad, K. Aggarwal, B. Pattnaik et al. // *Cell death & disease*. – 2013. – T. 4. – № 1. – C. e461-e461.
36. Conway, K. A. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease / K. A. Conway, J. D. Harper, P. T. Lansbury // *Nature Medicine*. – 1998. – T. 4. – № 11. – C. 1318-1320.
37. Correlation of Ischemia-Induced Extracellular and Intracellular Ion Changes to Cell-to-Cell Electrical Uncoupling in Isolated Blood-Perfused Rabbit Hearts / L. M. Owens, T. A. Fralix, E. Murphy et al. // *Circulation*. – 1996. – T. 94. – № 1. – C. 10-13.
38. Cribbs, J. T. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death / J. T. Cribbs, S. Strack // *EMBO reports*. – 2007. – T. 8. – № 10. – C. 939-944.

39. Cuadrado, A. NRF2 in neurodegenerative diseases / A. Cuadrado // *Current Opinion in Toxicology*. – 2016. – T. 1. – C. 46-53.
40. Dasuri, K. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis / K. Dasuri, L. Zhang, J. N. Keller // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – T. 62. – C. 170-185.
41. Decreasing mitochondrial fission alleviates hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease / C. A. Galloway, H. Lee, P. S. Brookes, Y. Yoon // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2014. – T. 307. – № 6. – C. G632-G641.
42. Defective mitochondrial DNA homeostasis in the substantia nigra in Parkinson disease / C. Dölle, I. Flønes, G. S. Nido et al. // *Nature Communications*. – 2016. – T. 7. – № 1. – C. 13548-13548.
43. Detecting activity-evoked pH changes in human brain / V. A. Magnotta, H.-Y. Heo, B. J. Dlouhy et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – T. 109. – № 21. – C. 8270-8273.
44. DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells / H. Cen, F. Mao, I. Aronchik et al. // *The FASEB Journal*. – 2008. – T. 22. – № 7. – C. 2243-2252.
45. Dietary Restriction and AMPK Increase Lifespan via Mitochondrial Network and Peroxisome Remodeling / H. J. Weir, P. Yao, F. K. Huynh et al. // *Cell Metabolism*. – 2017. – T. 26. – № 6. – C. 884-896.e5.
46. Differential mitochondrial roles for α -synuclein in DRP1-dependent fission and PINK1/Parkin-mediated oxidation / T. J. Krzystek, R. Banerjee, L. Thurston et al. // *Cell Death & Disease*. – 2021. – T. 12. – № 9. – C. 796-796.
47. Dinkova-Kostova, A. T. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function / A. T. Dinkova-Kostova, A. Y. Abramov // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – T. 88. – № Part B. – C. 179-188.
48. Direct Membrane Association Drives Mitochondrial Fission by the Parkinson Disease-associated Protein α -Synuclein *♦ / K. Nakamura, V. M. Nemani, F. Azarbal et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T. 286. – № 23. – C. 20710-20726.
49. Direct Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Oligomeric Alpha-Synuclein Causes Toxicity in PD / M. Ludtmann, P. Angelova, M.-L. Choi et al. // *Biophysical Journal*. – 2017. – T. 112. – № 3, Supplement 1. – C. 440a-440a.
50. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH- pathways / C. Duan, L. Kuang, X. Xiang et al. // *Cell Death & Disease*. – 2020. – T. 11. – № 4. – C. 251-251.
51. Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events / L. Boyman, A. K. Coleman, G. Zhao et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – T. 666. – C. 31-39.
52. Dynamin-related protein inhibitor downregulates reactive oxygen species levels to indirectly suppress high glucose-induced hyperproliferation of vascular smooth muscle cells / A.

- Maimaitijiang, X. Zhuang, X. Jiang, Y. Li // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2016. – T. 471. – № 4. – C. 474-478.
53. Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin / E. Macia, M. Ehrlich, R. Massol et al. // *Developmental Cell*. – 2006. – T. 10. – № 6. – C. 839-850.
54. E., L. Lactate's effect on human neuroblastoma cell bioenergetic fluxes / L. E., R. H. Swerdlow // *Biochemical Pharmacology*. – 2016. – T. 99. – C. 88-100.
55. Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? / V. Del Dotto, M. Fogazza, V. Carelli et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2018. – T. 1859. – № 4. – C. 263-269.
56. Erk2 Phosphorylation of Drp1 Promotes Mitochondrial Fission and MAPK-Driven Tumor Growth / J. A. Kashatus, A. Nascimento, L. J. Myers et al. // *Molecular Cell*. – 2015. – T. 57. – № 3. – C. 537-551.
57. Esteras, N. Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: A focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function / N. Esteras, A. T. Dinkova-Kostova, A. Y. Abramov // *Biological Chemistry*. – 2016. – T. 397. – № 5. – C. 383-400.
58. Evidence for a role of Hsp70 in the neuroprotection induced by heat shock pre-treatment against 3,4-methylenedioxymethamphetamine toxicity in rat brain / I. Escobedo, I. Peraile, L. Orío et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2007. – T. 101. – № 5. – C. 1272-1283.
59. Exercise Increases Mitochondrial PGC-1 α Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis * / A. Safdar, J. P. Little, A. J. Stokl et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T. 286. – № 12. – C. 10605-10617.
60. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures / I. V. Ekimova, L. E. Nitsinskaya, I. V. Romanova et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2010. – T. 115. – № 4. – C. 1035-1044.
61. Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis / A. Pyakurel, C. Savoia, D. Hess, L. Scorrano // *Molecular Cell*. – 2015. – T. 58. – № 2. – C. 244-254.
62. Ferutinin Induces Membrane Depolarization, Permeability Transition Pore Formation, and Respiration Uncoupling in Isolated Rat Liver Mitochondria by Stimulation of Ca²⁺-Permeability / T. Ilyich, O. Charishnikova, S. Sekowski et al. // *The Journal of Membrane Biology*. – 2018. – T. 251. – № 4. – C. 563-572.
63. Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling / A. B. Fisher // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – T. 617. – C. 68-83.
64. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy / G. Twig, A. Elorza, A. J. A. Molina et al. // *The EMBO Journal*. – 2008. – T. 27. – № 2. – C. 433-446.
65. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission / F. Kraus, K. Roy, T. J. Pucadyil, M. T. Ryan // *Nature*. – 2021. – T. 590. – № 7844. – C. 57-66.
66. FUNDC2 promotes liver tumorigenesis by inhibiting MFN1-mediated mitochondrial fusion / S. Li, S. Han, Q. Zhang et al. // *Nature Communications*. – 2022. – T. 13. – № 1. – C. 3486-3486.

67. Gandhi, S. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration / S. Gandhi, A. Y. Abramov // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. – T. 2012.
68. Gao, S. Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out / S. Gao, J. Hu // *Trends in Cell Biology*. – 2021. – T. 31. – № 1. – C. 62-74.
69. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? / B. Halliwell // *Journal of Neurochemistry*. – 2006. – T. 97. – № 6. – C. 1634-1658.
70. Hartmann, J. Relations between intracellular Ca²⁺ stores and store-operated Ca²⁺ entry in primary cultured human glioblastoma cells / J. Hartmann, A. Verkhratsky // *The Journal of Physiology*. – 1998. – T. 513. – № 2. – C. 411-424.
71. Heat Shock Protein 70 Participates in the Neuroprotective Response to Intracellularly Expressed β -Amyloid in Neurons / J. Magrané, R. C. Smith, K. Walsh, H. W. Querfurth // *The Journal of Neuroscience*. – 2004. – T. 24. – № 7. – C. 1700-1700.
72. Hoitzing, H. What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research / H. Hoitzing, I. G. Johnston, N. S. Jones // *BioEssays*. – 2015. – T. 37. – № 6. – C. 687-700.
73. Hollville, E. Apoptotic cell death regulation in neurons / E. Hollville, S. E. Romero, M. Deshmukh // *The FEBS Journal*. – 2019. – T. 286. – № 17. – C. 3276-3298.
74. Huang, P. Control of Mitochondrial Morphology Through Differential Interactions of Mitochondrial Fusion and Fission Proteins / P. Huang, C. A. Galloway, Y. Yoon // *PLOS ONE*. – 2011. – T. 6. – № 5. – C. e20655.
75. Huang, X. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Mitochondria: An Intimate Connection / X. Huang, L. Zhao, R. Peng // *Biomolecules*. – 2023. – T. 13. – № 1.
76. Hurst, S. Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore / S. Hurst, J. Hoek, S.-S. Sheu // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2017. – T. 49. – № 1. – C. 27-47.
77. In vitro models of synucleinopathies: informing on molecular mechanisms and protective strategies / A. T. Marvian, D. J. Koss, F. Aliakbari et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2019. – T. 150. – № 5. – C. 535-565.
78. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth / R. Orij, J. Postmus, A. T. Beek et al. // *Microbiology*. – 2009. – T. 155. – № 1. – C. 268-278.
79. Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders / A. Y. Abramov, A. V. Berezhnov, E. I. Fedotova et al. // *Biochemical Society Transactions*. – 2017. – T. 45. – № 4. – C. 1025-1033.
80. Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: Protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin / E. Y. Plotnikov, A. K. Vasileva, A. A. Arkhangelskaya et al. // *FEBS Letters*. – 2008. – T. 582. – № 20. – C. 3117-3124.
81. Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy / A. V. Berezhnov, M. P. M. Soutar, E. I. Fedotova et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – T. 291. – № 16. – C. 8701-8708.

82. Ionophoretic properties of ferutinin / M. V. Zamaraeva, A. I. Hagelgans, A. Y. Abramov et al. // *Cell Calcium*. – 1997. – T. 22. – № 4. – C. 235-241.
83. Iwata, R. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis / R. Iwata, P. Casimir, P. Vanderhaeghen // *Science*. – 2020. – T. 369. – № 6505. – C. 858-862.
84. Jia, W. Anti-Oxidant and Pro-Oxidant Effects of Peroxiredoxin 6: A Potential Target in Respiratory Diseases / W. Jia, C. Dong, B. Li // *Cells*. – 2023. – T. 12. – № 1.
85. Kim, H. P. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies / H. P. Kim, D. Morse, A. M. K. Choi // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2006. – T. 10. – № 5. – C. 759-769.
86. Kolac, U. K. Chemical inhibition of mitochondrial fission improves insulin signaling and subdues hyperglycemia induced stress in placental trophoblast cells / U. K. Kolac, G. Donmez Yalcin, A. Yalcin // *Molecular Biology Reports*. – 2023. – T. 50. – № 1. – C. 493-506.
87. Kozera, B. Reference genes in real-time PCR / B. Kozera, M. Rapacz // *Journal of Applied Genetics*. – 2013. – T. 54. – № 4. – C. 391-406.
88. Kritskaya, K. A. Impaired Mitochondrial Network Morphology and Reactive Oxygen Species Production in Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients / K. A. Kritskaya, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov // *Biomedicines*. – 2024. – T. 12. – № 2.
89. Kroemer, G. Mitochondrial control of cell death / G. Kroemer, J. C. Reed // *Nature Medicine*. – 2000. – T. 6. – № 5. – C. 513-519.
90. Lactate and Pyruvate Activate Autophagy and Mitophagy that Protect Cells in Toxic Model of Parkinson's Disease / E. I. Fedotova, L. P. Dolgacheva, A. Y. Abramov, A. V. Berezhnov // *Molecular Neurobiology*. – 2022. – T. 59. – № 1. – C. 177-190.
91. Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling / A. Tauffenberger, H. Fiumelli, S. Almustafa, P. J. Magistretti // *Cell Death & Disease*. – 2019. – T. 10. – № 9. – C. 653-653.
92. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization / S. A. Sarraf, M. Raman, V. Guarani-Pereira et al. // *Nature*. – 2013. – T. 496. – № 7445. – C. 372-376.
93. Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): A review and update / D. B. Zorov, I. A. Vorobjev, V. A. Popkov et al. // *Cells*. – 2019. – T. 8. – № 2.
94. Lewis, G. R. Mitochondrial networks through the lens of mathematics / G. R. Lewis, W. F. Marshall // *Physical Biology*. – 2023. – T. 20. – № 5.
95. Li, L. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation / L. Li, Y. Chen, S. B. Gibson // *Cellular Signalling*. – 2013. – T. 25. – № 1. – C. 50-65.
96. Liu, X. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. / X. Liu, G. Hajnóczky // *Cell death and differentiation*. – 2011. – T. 18. – № 10. – C. 1561-1572.
97. Ludtmann, M. H. R. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease / M. H. R. Ludtmann, A. Y. Abramov // *Neuroscience Letters*. – 2018. – T. 663. – C. 86-90.

98. Lysosomal acidification dysfunction in microglia: an emerging pathogenic mechanism of neuroinflammation and neurodegeneration / J. D. Quick, C. Silva, J. H. Wong et al. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2023. – T. 20. – № 1. – C. 185-185.
99. MARF and Opa1 Control Mitochondrial and Cardiac Function in Drosophila / G. W. Dorn, C. F. Clark, W. H. Eschenbacher et al. // *Circulation Research*. – 2011. – T. 108. – № 1. – C. 12-17.
100. Maro, B. In vivo and in vitro effects of the mitochondrial uncoupler FCCP on microtubules. / B. Maro, M. C. Marty, M. Bornens // *The EMBO Journal*. – 1982. – T. 1. – № 11. – C. 1347-1352.
101. Martinou, J.-C. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics / J.-C. Martinou, R. J. Youle // *Developmental Cell*. – 2011. – T. 21. – № 1. – C. 92-101.
102. Masaldan, S. Therapeutic targeting of mitophagy in Parkinson's disease / S. Masaldan, S. Callegari, G. Dewson // *Biochemical Society Transactions*. – 2022. – T. 50. – № 2. – C. 783-797.
103. MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion Injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy Inhibition / L. Guan, Z. Che, X. Meng et al. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2019. – T. 23. – № 11. – C. 7830-7843.
104. Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. / A. Y. Abramov, T. K. Smulders-Srinivasan, D. M. Kirby et al. // *Brain : a journal of neurology*. – 2010. – T. 133. – № Pt 3. – C. 797-807.
105. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways / Y. Zhang, Y. Wang, J. Xu et al. // *Journal of Pineal Research*. – 2019. – T. 66. – № 2. – C. e12542-e12542.
106. Metabolic stress-dependent regulation of the mitochondrial biogenic molecular response to high-intensity exercise in human skeletal muscle / M. Fiorenza, T. P. Gunnarsson, M. Hostrup et al. // *The Journal of Physiology*. – 2018. – T. 596. – № 14. – C. 2823-2840.
107. Metabolically induced intracellular pH changes activate mitophagy, autophagy, and cell protection in familial forms of Parkinson's disease / N. R. Komilova, P. R. Angelova, A. V. Berezhnov et al. // *The FEBS Journal*. – 2022. – T. 289. – № 3. – C. 699-711.
108. Methods for imaging mammalian mitochondrial morphology: A prospective on MitoGraph / M. C. Harwig, M. P. Viana, J. M. Egner et al. // *Analytical Biochemistry*. – 2018. – T. 552. – C. 81-99.
109. MFN1 deacetylation activates adaptive mitochondrial fusion and protects metabolically challenged mitochondria / J.-Y. Lee, M. Kapur, M. Li et al. // *Journal of Cell Science*. – 2014. – T. 127. – № 22. – C. 4954-4963.
110. Mice with Targeted Mutation of Peroxiredoxin 6 Develop Normally but Are Susceptible to Oxidative Stress * / X. Wang, S. A. Phelan, K. Forsman-Semb et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278. – № 27. – C. 25179-25190.
111. Misgeld, T. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture / T. Misgeld, T. L. Schwarz // *Neuron*. – 2017. – T. 96. – № 3. – C. 651-666.

112. Mitochondria dysfunction and impaired response to oxidative stress promotes proteostasis disruption in aged human cells / D. Trigo, A. Nadais, A. Carvalho et al. // *Mitochondrion*. – 2023. – T. 69. – C. 1-9.
113. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration / A. Federico, E. Cardaioli, P. Da Pozzo et al. // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2012. – T. 322. – № 1. – C. 254-262.
114. Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes / Y. Lee, H.-Y. Lee, R. A. Hanna, Å. B. Gustafsson // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2011. – T. 301. – № 5. – C. H1924-H1931.
115. Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy / A. M. Vincent, J. L. Edwards, L. L. McLean et al. // *Acta Neuropathologica*. – 2010. – T. 120. – № 4. – C. 477-489.
116. Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis / C. Giorgi, F. Baldassari, A. Bononi et al. // *Cell Calcium*. – 2012. – T. 52. – № 1. – C. 36-43.
117. Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage / Y. Kageyama, Z. Zhang, R. Roda et al. // *Journal of Cell Biology*. – 2012. – T. 197. – № 4. – C. 535-551.
118. Mitochondrial division inhibitor-1 is neuroprotective in the A53T- α -synuclein rat model of Parkinson's disease / S. Bido, F. N. Soria, R. Z. Fan et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – № 1. – C. 7495-7495.
119. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging / G. C. Kujoth, A. Hiona, T. D. Pugh et al. // *Science*. – 2005. – T. 309. – № 5733. – C. 481-484.
120. Mitochondrial Dynamics and Parkinson's Disease: Focus on Parkin / K.-L. Lim, X.-H. Ng, L. G.-Y. Grace, T.-P. Yao // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – T. 16. – № 9. – C. 935-949.
121. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells / J. Zhao, J. Zhang, M. Yu et al. // *Oncogene*. – 2013. – T. 32. – № 40. – C. 4814-4824.
122. Mitochondrial dysfunction, mitophagy, and role of dynamin-related protein 1 in Alzheimer's disease / V. K. Medala, B. Gollapelli, S. Dewanjee et al. // *Journal of Neuroscience Research*. – 2021. – T. 99. – № 4. – C. 1120-1135.
123. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease / Y. J. Liu, R. L. McIntyre, G. E. Janssens, R. H. Houtkooper // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2020. – T. 186. – C. 111212-111212.
124. Mitochondrial Fission and Fusion Dynamics Generate Efficient, Robust, and Evenly Distributed Network Topologies in Budding Yeast Cells / M. P. Viana, A. I. Brown, I. A. Mueller et al. // *Cell Systems*. – 2020. – T. 10. – № 3. – C. 287-297.e5.
125. Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle / H.-F. Jheng, P.-J. Tsai, S.-M. Guo et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2012. – T. 32. – № 2. – C. 309-319.
126. Mitochondrial Fusion Is Increased by the Nuclear Coactivator PGC-1 β / M. Liesa, B. Borda-d'Água, G. Medina-Gómez et al. // *PLOS ONE*. – 2008. – T. 3. – № 10. – C. e3613.

127. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity / A. M. Bertholet, T. Delerue, A. M. Millet et al. // *Neurobiology of Disease*. – 2016. – T. 90. – C. 3-19.
128. Mitochondrial heterogeneity in diseases / L. Chen, M. Zhou, H. Li et al. // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – T. 8. – № 1. – C. 311-311.
129. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells / L. Liu, D. Feng, G. Chen et al. // *Nature Cell Biology*. – 2012. – T. 14. – № 2. – C. 177-185.
130. Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets / T. Briston, D. L. Selwood, G. Szabadkai, M. R. Duchon // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2019. – T. 40. – № 1. – C. 50-70.
131. Mitochondrial Permeability Transition, Cell Death and Neurodegeneration / A. Y. Baev, A. Y. Vinokurov, E. V. Potapova et al. // *Cells*. – 2024. – T. 13. – № 7.
132. Mitochondrial respiratory dysfunction in familial parkinsonism associated with PINK1 mutation. / C. Piccoli, A. Sardanelli, R. Scrima et al. // *Neurochemical research*. – 2008. – T. 33. – № 12. – C. 2565-2574.
133. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy / M. E. Gegg, J. M. Cooper, K.-Y. Chau et al. // *Human Molecular Genetics*. – 2010. – T. 19. – № 24. – C. 4861-4870.
134. Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism: A NOVEL REGULATORY MECHANISM ALTERED IN OBESITY * / D. Bach, S. Pich, F. X. Soriano et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278. – № 19. – C. 17190-17197.
135. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development / H. Chen, S. A. Detmer, A. J. Ewald et al. // *Journal of Cell Biology*. – 2003. – T. 160. – № 2. – C. 189-200.
136. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner / M. Frank, S. Duvezin-Caubet, S. Koob et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2012. – T. 1823. – № 12. – C. 2297-2310.
137. Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: Identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate / S. Ducommun, M. Deak, D. Sumpton et al. // *Cellular Signalling*. – 2015. – T. 27. – № 5. – C. 978-988.
138. mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer / K. G. de la Cruz López, M. E. Toledo Guzmán, E. O. Sánchez, A. García Carrancá // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – T. 9.
139. Neurotherapeutic activity of the recombinant heat shock protein Hsp70 in a model of focal cerebral ischemia in rats / M. A. Shevtsov, B. P. Nikolaev, L. Y. Yakovleva et al. // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2014. – T. 8. – C. 639-650.

140. New therapeutics to modulate mitochondrial dynamics and mitophagy in cardiac diseases / M. H. Disatnik, S. Hwang, J. C. B. Ferreira, D. Mochly-Rosen // *Journal of Molecular Medicine*. – 2015. – T. 93. – № 3. – C. 279-287.
141. Novologue Therapy Requires Heat Shock Protein 70 and Thioredoxin-Interacting Protein to Improve Mitochondrial Bioenergetics and Decrease Mitophagy in Diabetic Sensory Neurons / Y. A. Rodriguez, S. Kaur, E. Nolte et al. // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2021. – T. 12. – № 16. – C. 3049-3059.
142. «One Small Step for Mouse»: High CO₂ Inhalation as a New Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease / A. D. Nadeev, K. A. Kritskaya, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov // *Biomedicines*. – 2022. – T. 10. – № 11.
143. Ordonez, D. G. α -synuclein Induces Mitochondrial Dysfunction through Spectrin and the Actin Cytoskeleton / D. G. Ordonez, M. K. Lee, M. B. Feany // *Neuron*. – 2018. – T. 97. – № 1. – C. 108-124.e6.
144. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. / J. N. Guzman, J. Sanchez-Padilla, D. Wokosin et al. // *Nature*. – 2010. – T. 468. – № 7324. – C. 696-700.
145. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases / E. Niedzielska, I. Smaga, M. Gawlik et al. // *Molecular Neurobiology*. – 2016. – T. 53. – № 6. – C. 4094-4125.
146. Palikaras, K. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology / K. Palikaras, E. Lionaki, N. Tavernarakis // *Nature Cell Biology*. – 2018. – T. 20. – № 9. – C. 1013-1022.
147. Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression / H.-H. Hoepken, S. Gispert, M. Azizov et al. // *Experimental Neurology*. – 2008. – T. 212. – № 2. – C. 307-313.
148. Peroxiredoxin 6 Is a Crucial Factor in the Initial Step of Mitochondrial Clearance and Is Upstream of the PINK1-Parkin Pathway / S. Ma, X. Zhang, L. Zheng et al. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2015. – T. 24. – № 9. – C. 486-501.
149. Peroxiredoxin 6 Modulates Insulin Secretion and Beta Cell Death via a Mitochondrial Dynamic Network / F. Pacifici, D. Della-Morte, B. Capuani et al. // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – T. 13.
150. Perturbations in Mitochondrial Dynamics Induced by Human Mutant PINK1 Can Be Rescued by the Mitochondrial Division Inhibitor mdivi-1 * / M. Cui, X. Tang, W. V. Christian et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – T. 285. – № 15. – C. 11740-11752.
151. Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins / V. V. Rogov, H. Suzuki, M. Marinković et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – № 1. – C. 1131-1131.
152. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery / Y. Yang, Y. Ouyang, L. Yang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105. – № 19. – C. 7070-7075.
153. PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death / S. Gandhi, A. Wood-Kaczmar, Z. Yao et al. // *Molecular Cell*. – 2009. – T. 33. – № 5. – C. 627-638.

154. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation / P. M. J. Quinn, P. I. Moreira, A. F. Ambrósio, C. H. Alves // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2020. – T. 8. – № 1. – C. 189-189.
155. Portz, P. Changes in Drp1 Function and Mitochondrial Morphology Are Associated with the α -Synuclein Pathology in a Transgenic Mouse Model of Parkinson's Disease / P. Portz, M. K. Lee // *Cells*. – 2021. – T. 10. – № 4.
156. Presence of both Constitutive and Inducible Forms of Heat Shock Protein 70 in the Cerebral Cortex and Hippocampal Synapses / I. S. Moon, I. S. Park, L. T. Schenker et al. // *Cerebral Cortex*. – 2001. – T. 11. – № 3. – C. 238-248.
157. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice / F. Pan-Montojo, O. Anichtchik, Y. Dening et al. // *PLoS ONE*. – 2010. – T. 5. – № 1.
158. Prolonged seizure activity impairs mitochondrial bioenergetics and induces cell death / S. Kovac, A.-M. Domijan, M. C. Walker, A. Y. Abramov // *Journal of Cell Science*. – 2012. – T. 125. – № 7. – C. 1796-1806.
159. Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription / M. J. Calkins, R. J. Jakel, D. A. Johnson et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – T. 102. – № 1. – C. 244-249.
160. Punicalagin Protects Against Diabetic Cardiomyopathy by Promoting Opa1-Mediated Mitochondrial Fusion via Regulating PTP1B-Stat3 Pathway / F. Fu, C. Liu, R. Shi et al. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2021. – T. 35. – № 8. – C. 618-641.
161. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer / M. Oparka, J. Walczak, D. Malinska et al. // *Methods*. – 2016. – T. 109. – C. 3-11.
162. Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway-dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin. / B. Xiao, J.-Y. Goh, L. Xiao et al. // *The Journal of biological chemistry*. – 2017. – T. 292. – № 40. – C. 16697-16708.
163. Reddy, P. H. Increased mitochondrial fission and neuronal dysfunction in Huntington's disease: implications for molecular inhibitors of excessive mitochondrial fission / P. H. Reddy // *Drug Discovery Today*. – 2014. – T. 19. – № 7. – C. 951-955.
164. Regulators of proteostasis are translationally repressed in fibroblasts from patients with sporadic and LRRK2-G2019S Parkinson's disease / D. Flinkman, Y. Hong, J. Gnjatovic et al. // *npj Parkinson's Disease*. – 2023. – T. 9. – № 1. – C. 20-20.
165. Reversible Keap1 inhibitors are preferential pharmacological tools to modulate cellular mitophagy / N. D. Georgakopoulos, M. Frison, M. S. Alvarez et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – № 1. – C. 10303-10303.
166. Rho, J. M. How does the ketogenic diet induce anti-seizure effects? / J. M. Rho // *Neuroscience Letters*. – 2017. – T. 637. – C. 4-10.
167. Role of Glutathione Peroxidases and Peroxiredoxins in Free Radical-Induced Pathologies / M. G. Sharapov, S. V. Gudkov, V. Z. Lankin, V. I. Novoselov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021a. – T. 86. – № 11. – C. 1418-1433.

168. Roles of Autophagy in Oxidative Stress / H. R. Yun, Y. H. Jo, J. Kim et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21. – № 9.
169. Ruiz, A. Mitochondrial division inhibitor 1 (Mdivi-1) protects neurons against excitotoxicity through the modulation of mitochondrial function and intracellular Ca²⁺ signaling / A. Ruiz, E. Alberdi, C. Matute // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2018. – T. 11.
170. Safety and efficacy of omaveloxolone in patients with mitochondrial myopathy / K. L. Madsen, A. E. Buch, B. H. Cohen et al. // *Neurology*. – 2020. – T. 94. – № 7. – C. e687-e698.
171. Sharapov, M. G. Peroxiredoxin 1 - Multifunctional antioxidant enzyme, protects from oxidative damages and increases the survival rate of mice exposed to total body irradiation / M. G. Sharapov, S. V. Gudkov // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2021. – T. 697. – C. 108671-108671.
172. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2020. – T. 21. – № 7. – C. 363-383.
173. Singh, R. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins / R. Singh, A. Letai, K. Sarosiek // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – T. 20. – № 3. – C. 175-193.
174. Sivitz, W. I. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities / W. I. Sivitz, M. A. Yorek // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2009. – T. 12. – № 4. – C. 537-577.
175. Small-molecule inhibitors of cyclophilin D as potential therapeutics in mitochondria-related diseases / A. Haleckova, O. Benek, L. Zemanová et al. // *Medicinal Research Reviews*. – 2022. – T. 42. – № 5. – C. 1822-1855.
176. Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis / G. P. Leboucher, Y. C. Tsai, M. Yang et al. // *Molecular Cell*. – 2012. – T. 47. – № 4. – C. 547-557.
177. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle / C. Figueroa-Romero, J. A. Iñiguez-Lluhí, J. Stadler et al. // *The FASEB Journal*. – 2009. – T. 23. – № 11. – C. 3917-3927.
178. Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP / G. Twig, S. A. Graf, J. D. Wikstrom et al. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2006. – T. 291. – № 1. – C. C176-C184.
179. The Causal Role of Mitochondrial Dynamics in Regulating Insulin Resistance in Diabetes: Link through Mitochondrial Reactive Oxygen Species / H.-Y. Lin, S.-W. Weng, Y.-H. Chang et al. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2018. – T. 2018. – № 1. – C. 7514383-7514383.
180. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases / Q. Song, B. Meng, H. Xu, Z. Mao // *Translational Neurodegeneration*. – 2020. – T. 9. – № 1. – C. 17-17.
181. The Lactate Minimum Test: Concept, Methodological Aspects and Insights for Future Investigations in Human and Animal Models / L. H. D. Messias, C. A. Gobatto, W. R. Beck, F. B. Manchado-Gobatto // *Frontiers in Physiology*. – 2017. – T. 8.

182. The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger is essential for Ca²⁺ homeostasis and viability / T. S. Luongo, J. P. Lambert, P. Gross et al. // *Nature*. – 2017. – T. 545. – № 7652. – C. 93-97.
183. The Role of Phospholipase Activity of Peroxiredoxin 6 in Its Transmembrane Transport and Protective Properties / M. G. Sharapov, R. G. Goncharov, S. B. Parfenyuk et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – T. 23. – № 23.
184. The role of TLR4/NF-κB signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6 / M. G. Sharapov, O. V. Glushkova, S. B. Parfenyuk et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2021b. – T. 702. – C. 108830-108830.
185. The Study of Overexpression of Peroxiredoxin-2 Reduces MPP⁺-Induced Toxicity in the Cell Model of Parkinson's Disease / M. Liu, S. Zuo, X. Guo et al. // *Neurochemical Research*. – 2023. – T. 48. – № 7. – C. 2129-2137.
186. Tools and techniques to measure mitophagy using fluorescence microscopy / N. J. Dolman, K. M. Chambers, B. Mandavilli et al. // *Autophagy*. – 2013. – T. 9. – № 11. – C. 1653-1662.
187. Transient acidosis while retrieving a fear-related memory enhances its lability / J. Du, M. P. Price, R. J. Taugher et al. // *eLife*. – 2017. – T. 6. – C. e22564-e22564.
188. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation / A. S. Rambold, B. Kostelecky, N. Elia, J. Lippincott-Schwartz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – T. 108. – № 25. – C. 10190-10195.
189. Turturici, G. Hsp70 and Its Molecular Role in Nervous System Diseases / G. Turturici, G. Sconzo, F. Geraci // *Biochemistry Research International*. – 2011. – T. 2011. – № 1. – C. 618127-618127.
190. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy / W. Wu, W. Tian, Z. Hu et al. // *EMBO reports*. – 2014. – T. 15. – № 5. – C. 566-575.
191. Vorobjev, I. A. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum / I. A. Vorobjev, D. B. Zorov // *FEBS Letters*. – 1983. – T. 163. – № 2. – C. 311-314.
192. Wai, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation / T. Wai, T. Langer // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2016. – T. 27. – № 2. – C. 105-117.
193. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer / D. C. Wallace // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – T. 12. – № 10. – C. 685-698.
194. Wang, C. The Role of Mitochondria in Apoptosis / C. Wang, R. J. Youle // *Annual Review of Genetics*. – 2009. – T. 43. – № 1. – C. 95-118.
195. Weston, S. A. Calcein: A novel marker for lymphocytes which enter lymph nodes / S. A. Weston, C. R. Parish // *Cytometry*. – 1992. – T. 13. – № 7. – C. 739-749.
196. Whitley, B. N. Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target / B. N. Whitley, E. A. Engelhart, S. Hoppins // *Mitochondrion*. – 2019. – T. 49. – C. 269-283.
197. Youle, R. J. Mitochondrial fission, fusion, and stress / R. J. Youle, A. M. van der Bliek // *Science (New York, N.Y.)*. – 2012. – T. 337. – № 6098. – C. 1062-1065.

198. Zamzami, N. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens / N. Zamzami, G. Kroemer // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – T. 2. – № 1. – C. 67-71.
199. Zhao, H. Ischemic Postconditioning as a Novel Avenue to Protect against Brain Injury after Stroke / H. Zhao // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2009. – T. 29. – № 5. – C. 873-885.
200. Zheng, Y.-R. Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: Implications for central nervous system disorders. / Y.-R. Zheng, X.-N. Zhang, Z. Chen // *CNS neuroscience & therapeutics*. – 2019. – T. 25. – № 7. – C. 876-886.
201. Zorov, D. B. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. / D. B. Zorov, M. Juhaszova, S. J. Sollott // *Biochimica et biophysica acta*. – 2006. – T. 1757. – № 5-6. – C. 509-517.
202. Abramov, A. Y. Cellular mechanisms of complex I-associated pathology / A. Y. Abramov, P. R. Angelova // *Biochemical Society Transactions*. – 2019. – Vol. 47. – № 6. – P. 1963-1969.
203. Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies / A. Verkhratsky, A. Butt, B. Li et al. // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8. – Astrocytes in human central nervous system diseases. – № 1. – P. 396.
204. Autophagy, molecular chaperones, and unfolded protein response as promoters of tumor recurrence / B. Alhasan, M. Mikeladze, I. Guzhova, B. Margulis // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2023. – Vol. 42. – № 1. – P. 217-254.
205. Indolylazine Derivative Induces Chaperone Expression in Aged Neural Cells and Prevents the Progression of Alzheimer's Disease / V. F. Lazarev, E. A. Dutsheva, E. R. Mikhaylova et al. // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 24. – P. 8950.
206. Mitochondrial malfunction and atrophy of astrocytes in the aged human cerebral cortex / A. Popov, N. Brazhe, K. Morozova et al. // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 8380.
207. Mitochondrial Network: Electric Cable and More / P. A. Abramicheva, N. V. Andrianova, V. A. Babenko et al. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2023. – Vol. 88. – № 10. – P. 1596-1607.
208. Modern optical approaches in redox biology: Genetically encoded sensors and Raman spectroscopy / A. I. Kostyuk, D. D. Rapota, K. I. Morozova et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2024. – Vol. 217. – Modern optical approaches in redox biology. – P. 68-115.
209. Novel Nrf2-inducer prevents mitochondrial defects and oxidative stress in friedreich's ataxia models / R. Abeti, A. Baccaro, N. Esteras, P. Giunti // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2018. – Vol. 12. – № July. – P. 1-10.
210. Posttranslational modifications of mitochondrial fission and fusion proteins in cardiac physiology and pathophysiology / S. M. Adaniya, J. O-Uchi, M. W. Cypress et al. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2019. – Vol. 316. – № 5. – P. C583-C604.
211. Protein Interactome of Amyloid- β as a Therapeutic Target / V. F. Lazarev, E. A. Dutsheva, I. E. Kanunikov et al. // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16. – № 2. – P. 312.
212. Rahman, M. H. Mitochondrial Dynamics and Bioenergetic Alteration During Inflammatory Activation of Astrocytes / M. H. Rahman, K. Suk // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2020. – Vol. 12. – P. 614410.

213. Redox differences between rat neonatal and adult cardiomyocytes under hypoxia / A. D. Ivanova, D. A. Kotova, Y. V. Khramova et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2024. – Vol. 211. – P. 145-157.

214. Verkhatsky, A. Decline and fall of aging astrocytes: the human perspective / A. Verkhatsky, A. Semyanov // *Neural Regeneration Research*. – 2025. – Vol. 20. – Decline and fall of aging astrocytes. – № 6. – P. 1713-1714.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. **К.А. Kritskaya**, E.I. Fedotova, A.V. Berezhnov, Impaired Mitochondrial Network Morphology and Reactive Oxygen Species Production in Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients. *Biomedicines* (2024); 12(2):282, doi: 10.3390/biomedicines12020282, **Q1**

2. A.Y. Vinokurov, A.A. Palalov, **К.А. Kritskaya**, et al. Cell-Permeable HSP70 Protects Neurons and Astrocytes Against Cell Death in the Rotenone-Induced and Familial Models of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* (2024), doi: 10.1007/s12035-024-04077-9, **Q1**

3. "One Small Step for Mouse": High CO₂ Inhalation as a New Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease / A. D. Nadeev, **К. А. Kritskaya**, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, No. 11. – P. 2832. – DOI 10.3390/biomedicines10112832, **Q1**

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

1. Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона / А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. Д. Надеев // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 106. – EDN MTRVYR.

2. Защитные эффекты закисления внутриклеточной среды в MPP⁺-индуцированной клеточной модели болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. Д. Надеев, А. В. Бережнов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 166. – EDN IOEUIO.

3. Активаторы митофагии как потенциальные нейропротекторы при болезни Паркинсона / А. Д. Надеев, Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 224. – EDN SFWJQX.
4. Крицкая, К. А. Внутриклеточное закисление активирует митофагию и модулирует митохондриальную динамику в моделях болезни Паркинсона / К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Биология - наука XXI века : Сборник тезисов 27-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием, Пущино, 22–25 апреля 2024 года. – Пущино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", 2024. – С. 42. – EDN XAFIQK.
5. Нарушения митохондриальной динамики при нейродегенерации / А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. Д. Надеев // Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов Всероссийской конференции, Орёл, 16–17 ноября 2023 года. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2023. – С. 11. – EDN FLJQVK.
6. Изучение митохондриальной сети при болезни Паркинсона / **К. А. Крицкая**, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов Всероссийской конференции, Орёл, 16–17 ноября 2023 года. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2023. – С. 17. – EDN SRGGDW.
7. Оценка клеточных нарушений в моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов // Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов Всероссийской конференции, Орёл, 16–17 ноября 2023 года. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2023. – С. 30. – EDN HQIQHL.
8. Вспышки мембранного потенциала митохондрий при стрессе в фибробластах с мутацией, связанной с болезнью Паркинсона / **К. А. Крицкая**, Е. И. Федотова, Д. П. Ларюшкин, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : сборник статей, Пущино, 22–26 мая 2023 года. – Пущино: Федеральное государственное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", 2023. – С. 345-347. – EDN REYHJH.
9. Федотова, Е. И. Защитное влияние закисления внутриклеточной среды в токсических клеточных моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов // VII Съезд биофизиков России: Сборник научных трудов. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. Том 2. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 173-174. – EDN SKEDEL.

10. Митохондриальная мегапора (mPTP) и процесс клеточной гибели / **К. А. Крицкая**, О. А. Стельмашук, А. В. Бережнов, А. Ю. Абрамов // VII Съезд биофизиков России: Сборник научных трудов. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. Том 2. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 222. – EDN YEWJBL.
11. Нейропротекторный потенциал закисления внутриклеточной среды в токсической модели болезни Паркинсона / А. Д. Надеев, **К. А. Крицкая**, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // VII Съезд биофизиков России: Сборник научных трудов. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. Том 2. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 229. – EDN NCIETV.
12. Федотова, Е. И. Нарушения в культуре фибробластов с мутациями, связанными с развитием болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : Сборник статей Международной конференции, Пушкино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 595-600. – EDN JWFUBL.
13. Федотова, Е. И. Влияние закисления внутриклеточной среды в токсической клеточной модели болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : Сборник статей Международной конференции, Пушкино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 600-607. – EDN IXMFHD.
14. Пилотное исследование: анализ митохондриальной сети при помощи топологического анализа данных / **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, Д. П. Ларюшкин // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : Сборник статей Международной конференции, Пушкино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 709-712. – EDN ANVPRC.
15. Kritskaya, K. A. Cellular disorders in fibroblasts carrying mutations associated with Parkinson's disease / K. A. Kritskaya, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov // Biophysical Reviews. – 2023. – Vol. 15, No. 5. – P. 1753. – EDN PMSVIX.
16. Mitochondrial pore (mPTP) and cell death / K. A. Kritskaya, O. A. Stelmashchuk, A. V. Berezhnov, A. Y. Abramov // Biophysical Reviews. – 2023. – Vol. 15, No. 5. – P. 1793-1794. – DOI 10.1007/s12551-023-01150-w. – EDN PWCNEP.
17. Fedotova, E. I. Protective effect of intracellular acidification in toxic cellular models of Parkinson's disease / E. I. Fedotova, K. A. Kritskaya, A. V. Berezhnov // Biophysical Reviews. – 2023. – Vol. 15, No. 5. – P. 1808-1809. – DOI 10.1007/s12551-023-01150-w. – EDN TBKKAN.

18. Закисление внутриклеточной среды активирует митофагию и защищает клетки мозга в токсических и наследственных моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, Н. Р. Комилова, А. Д. Надеев [и et al.] // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы, Казань, 14–17 сентября 2021 года. – Казань: Издательство ФИЦ КазНЦ РАН, 2021. – С. 120-121. – EDN ZEZVMY.
19. Изменения морфологии митохондриального ретикулума в фибробластах пациентов с наследственными формами болезни Паркинсона / **К. А. Крицкая**, Д. П. Ларюшкин, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. Том 1. – Пушино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 333-337. – EDN VOWBCA.
20. Изменения кальций-буферной емкости митохондрий в клеточных моделях болезни Паркинсона / **К. А. Крицкая**, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. Том 1. – Пушино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 337-340. – EDN XHZZGT.
21. Источники продукции АФК и защитное действие активатора Nrf2 в фибробластах человека с мутациями, приводящими к развитию болезни Паркинсона / **К. А. Крицкая**, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Пушино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 530-534. – EDN TNSPTT.
22. Нейропротекторное действие лактата и пирувата в токсических клеточных моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, **К. А. Крицкая**, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, Серпухов, 20–24 мая 2019 года / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. Том 1. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2019. – С. 104-110. – EDN DSANIW.