

Ожован Сильвия Михайловна

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ДЕЙСТВИЕ РАЗОБЩИТЕЛЕЙ.
УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА КЛЕТКАХ

Saccharomyces cerevisiae И *Podospora anserina*

Специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им.
М.В. Ломоносова.

Научные руководители	кандидат биологических наук, Ф.Ф. Северин доктор биологических наук, профессор, Л.Е. Бакеева
Официальные оппоненты	доктор биологических наук, профессор Р.А. Звягильская , Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН доктор биологических наук, профессор Т.С. Калебина , МГУ им М.В. Ломоносова
Ведущая организация	Научно - исследовательский институт экспериментальной кардиологии ФГУ РКНПК Минздравсоцразвития России

Защита состоится 22 марта 2011 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.52 при Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119899, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, Биологический факультет МГУ, аудитория 359.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «_____» _____ 2011 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Митохондрии обеспечивают интеграцию многочисленных процессов энергетического обмена, кроме того активно участвуют в генерации активных форм кислорода (АФК) и в каскаде запрограммированной клеточной смерти. На сегодняшний день доказана корреляция между избытком выработки митохондриальных АФК и процессом старения. В настоящее время показано, что митохондриально-направленные антиоксиданты (в т.ч. и SkQ) являются эффективными протекторами клеток и их органелл в условиях окислительного стресса и старения (Anisimov, 2008). Протекторный эффект отчасти зависит от разобщающего действия. Ультраструктурные изменения митохондрий при старении изучены в меньшей степени, чем функциональные. Весьма немногочисленны работы, характеризующие корреляцию митохондриальных структурных параметров с энергетическим режимом митохондрий в этих условиях. Поэтому исследования ультраструктуры митохондрий в условиях окислительного стресса являются чрезвычайно актуальными.

Цель и задачи работы. Цель настоящей работы - изучение влияния окислительного стресса и разобщителей на ультраструктуру митохондрий в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Podospora anserina*.

Были поставлены следующие задачи:

- Исследовать особенности ультраструктуры митохондрий *Saccharomyces cerevisiae* при действии амиодарона.
- Изучить действие разобщителей FCCP и C12TPP (додецилтрифенилфосфоний) на ультраструктуру митохондрий *Saccharomyces cerevisiae* при одновременной инкубации с амиодароном.

- Изучить защитный эффект митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₃ (метилпластохинон додецилтрифенилфосфоний) на клетки *Saccharomyces cerevisiae* при действии амиодарона.
- Изучить влияние больших концентраций проникающего катиона C12TPP, а также его производных C12R19 (додецил родамин 19), C12RB (додецил родамин В) на ультраструктуру *Saccharomyces cerevisiae*.
- Изучение ультраструктуры митохондрий *Podospora anserina* при действии митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₁ (пластохинон додецилтрифенилфосфоний) при старении.

Научная новизна. Впервые обнаружена и исследована неописанная ранее в литературе ультраструктура клеток *Saccharomyces cerevisiae* при окислительном стрессе и апоптозе, вызванных амиодароном. Результаты, электронно-микроскопического изучения клеток *Saccharomyces cerevisiae*, доказали на ультраструктурном уровне, что разобшитель FCCP и мягкие разобшители C12TPP и SkQ₃ являются эффективными агентами в борьбе с окислительным стрессом, вызванным амиодароном. Кроме того, впервые показано, что проникающие в митохондрии катионы (мягкие разобшители) такие, как C12TPP, а также его производное C12RB в высоких (микромольных) концентрациях приводят к значительным изменениям в ультраструктуре митохондриального аппарата *Saccharomyces cerevisiae*: набухание матрикса митохондрий, увеличение размера органелл, деградация крист. Эти изменения напрямую связаны с накоплением этих веществ в митохондриях и генерацией АФК в клетке.

Впервые на ультраструктурном уровне показано, что SkQ₁ является эффективным геропротектором, так как более чем в 2,4 раза увеличивает продолжительность жизни *P. anserina*, при этом замедляя развитие характерных для старения изменений ультраструктуры клеток.

Практическая ценность работы. Результаты работы углубляют существующие представления об ультраструктурной организации клеток *Saccharomyces cerevisiae*, а также *Podospora anserina* при развитии окислительного стресса. Мягкие разобщители и митохондриально-направленные антиоксиданты являются потенциальными терапевтическими агентами, поэтому при разработке лекарств на их основе необходимо всестороннее, в том числе и ультраструктурное, изучение их действия. Результаты исследования могут быть использованы в курсах лекций и практикумах по клеточной биологии, цитологии, биоэнергетике и молекулярной биологии.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на Международной Конференции Ломоносов (Москва, 2007, 2008), Международной Конференции «Рецепция и Внутриклеточная Сигнализация» (Пушино, 2007), Российской Конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2008), IV съезде Российского Общества Биохимиков и Молекулярных Биологов (Новосибирск, 2008), 6-ой Международной встрече, посвященной апоптозу дрожжей (Бельгия, 2008), 19-ом Международном конгрессе по геронтологии и гериатрии (Франция, 2009); а также на открытом семинаре отдела биоэнергетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ 8 июля 2010 года. Кроме того, различные результаты работы регулярно представлялись на других семинарах отдела биоэнергетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ с 2008 года.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 127 страницах, включает 180 иллюстраций, 199 ссылок.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. В работе использованы штаммы дрожжей *S. cerevisiae*: W303 (mat a, дикий тип) и изогенный ему *usp2Δ* (*usp2::TRP1*). Клетки выращены до логарифмической ($\sim 2 \cdot 10^6$ клеток/мл) или до стационарной фазы роста ($\sim 10^8$ клеток/мл) в среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу (2%) или раффинозу (2%) согласно протоколу (Sherman F., 2002.). Культивирование мицелия *P. anserina* осуществляли в поверхностной культуре на чашках Петри на среде M2 при температуре 26°C в 10-ти повторах. Посевы проводили молодым (4 дня роста) мицелием *P. anserina*, полученным из одной гаплоидной споры. Культивировали мицелий в течение 3 дней, затем пересеивали мицелий на новую чашку Петри. Имплантант брали с края колонии, как показано на схеме.

Обработка клеток веществами, влияющими на уровень АФК. Клетки *S. cerevisiae* инкубировали в жидкой среде содержащей глицерин (2%), MES (25 мМ, рН 5.5) в течение 2-5 мин. Перед началом эксперимента концентрацию клеток штаммов W303 и *usp2Δ* устанавливали равной $5 \cdot 10^7$. Затем добавляли амиодарон до конечной концентрации 40 мкМ или 50 мкМ. Время инкубации с амиодароном было соответственно 2 мин., 5 мин., 10 мин. и 20 мин. Исследование действия амиодарона также проводили в опытах совместно с FCCP и C12TPP. Инкубация клеток дикого типа с амиодароном происходила в течение 10-15 мин. Концентрация реагентов была: амиодарон – 40 мкМ, FCCP – 50 нМ и C12TPP – 50 нМ.

При исследовании действия SkQ₃ на ультраструктуру клеток *S. cerevisiae* SkQ₃ добавляли до конечной концентрации 200 нМ. Опыты проводили как на клетках логарифмической, так и стационарной фазы роста. В опытах с SkQ₃ и амиодароном, клетки *S. cerevisiae* дикого типа выращивали до стационарной фазы роста, амиодарон добавляли до конечной концентрации 40 мкМ, предварительно инкубировав клетки с SkQ₃ (50 нМ).

Инкубация с C12TRP (10мкМ) проводили также в течение 10-15 мин. Отдельно проводилась одновременная инкубация клеток *S. cerevisiae*: в пробы с C12TRP (10мкМ) добавляли либо α -токоферол (50мкМ), либо FCCP (2мкМ). Кроме того были произведены контрольные инкубации с α -токоферолом в той же концентрации (50 мкМ), а также с FCCP (2мкМ). При исследовании действия индукторов АФК – менадиона и перекиси инкубация проводилась в течение 10-15 мин. с перекисью (300мкМ), а также с менадионом (5мкМ). Инкубацию с C12RB (10мкМ), C12R19 (10мкМ) проводили в течение 5-10 мин. Клетки *S. cerevisiae* в данном случае выращивали до поздней логарифмической фазы.

При изучении влияния SkQ₁ на ультраструктуру клеток *P. anserina* концентрация SkQ₁ достигала 400нМ. Необходимое количество антиоксиданта добавляли в среду культивирования в заданной концентрации на 11-е сут роста и культивировали мицелий в течение 3 дней, затем пересеивали мицелий на новую чашку Петри со средой, содержащей то же количество антиоксиданта.

Световая микроскопия. Клетки W303 выращивали до стационарной фазы роста, как указано выше, и инкубировали в среде, содержавшей глицерин (2%), MES (25 мМ, рН 5,5) и флуоресцентный зонд JC-1, в течение 15 мин (концентрация клеток $5 \cdot 10^7$ /мл). Затем добавляли амиодарон до конечной концентрации 40 мкМ. Эксперименты с точечным повреждением митохондрий дрожжей лазером проводили с использованием установки, описанной в работе (Madeo et al., 2004).

Клетки, выращенные до экспоненциальной фазы роста на среде, содержавшей в качестве источника углерода глюкозу, окрашивали смесью Mitotracker Green и Mitotracker Orange («Invitrogen», США). Фрагментацию митохондрий и клеточную смерть индуцировали 40 мкМ амиодароном. Для окраски клеток W303 комбинацией флуоресцентного зонда тетраметилродамин + GFP они были трансформированы плазмидой pYX223

(Westermann, Neupert, 2000). Эта плаزمида содержит белок GFP с митохондриальным адресом. Клетки выращивали до поздней стационарной фазы роста на агаризованной среде, содержащей раффинозу (2%) и галактозу (2%). Собранные клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 2 мкМ тетраметилродамина.

Фиксация клеток для электронно-микроскопического исследования. Для электронной микроскопии использовали протокол, описанный ранее (Yang et al., 2006). Клетки дикого типа и мутантные *Δusp2* были взяты в объеме 900 мкл и 1000 мкл соответственно. Затем пробы центрифугировали (5 мин, 4 тыс. g) и отмывали в PBS (pH=7.2). Пробы суспензии клеток дикого типа и мутанта *Δusp2*, кроме контрольных, перед фиксацией инкубировали с определенным реагентом (см. п.2). Первоначально фиксацию клеток проводили 2 % глутаральдегидом и 1мМ CaCl₂ на натриевом какодилатном буфере (pH=7.2) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки отмывали от глутаральдегида в холодном буфере три раза. Ферментативный гидролиз клеточной стенки проводили в буфере (50мМ Tris-HCl, pH=7.5; 5мМ MgCl₂; 1.4М сорбитол; 0.5% β-меркаптоэтанол), в который добавляли 15 мкл зимолиазы (20 мг/мл, Sigma). Реакцию проводили в течение 10 мин при 30°C. Далее, клетки отмывали 4 раза по 5 мин 0,1М в натриевом какодилатном буфере. Вторичную фиксацию проводили в 1% тетроксиде осмия и 1% ферроцианиде калия, растворенных в дистиллированной воде (инкубация два раза по 5 мин при 4°C). Отмывали три раза в 0.1М натриевом какодилатном буфере и один раз в дистиллированной воде. Пробы инкубировали в 1% уранил ацетате 90 мин при комнатной температуре, отмывали 4 раза по 5 мин. в дистиллированной воде. Дегидратацию проводили в 50%, 75%, 85% и 96% спиртах при 4°C.

Для электронно-микроскопического исследования были взяты колонии мицелия *P. anserina* в возрасте 6, 18, 25 дней, выращенные на обычной M2 среде, а также мицелий возраста 6, 18, 25, 46, 61 день, выращенный на среде с добавлением антиоксиданта (400нМ SkQ₁) из периферической зоны роста.

Кусочки мицелия фиксировали вместе с агаром 2,5%-глутаральдегидом на фосфатном буфере, рН=7.4 в течение 2.5ч, с последующей дофиксацией 2% OsO₄ 2ч. Дегидратацию проводили в серии спиртов возрастающей концентрации (50-96%). Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Ультратонкие срезы приготавливали на ультрамикротоме фирмы Leica Ultracut UCT, окрашивали свинцом (Reynolds, 1963). Полученные препараты исследовали в электронном микроскопе HU-12В (Hitachi, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1.1. Ультраструктура клеток *S. cerevisiae* дикого типа и мутанта *Δusp2* при действии амиодарона. Известно, что амиодарон запускает в клетках программу самоубийства в клетках *S. cerevisiae*, сопровождаемую генерацией АФК; в то же время делеция гена *usp2* повышает устойчивость к амиодарону (Pozniakovsky et al., 2005; Knorre et al., 2008). Результаты наших исследований показали, что амиодарон (40мкМ, инкубация 10 мин.) вызывает резкие изменения ультраструктуры клеток *S. cerevisiae*, в том числе фрагментацию матрикса митохондрий мутантного штамма *Δusp2* (Рис.1).

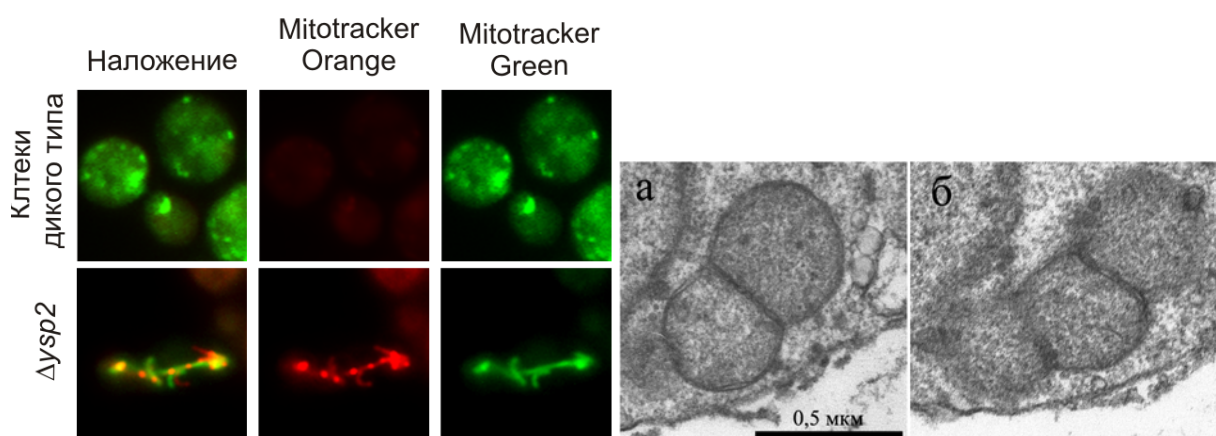


Рис. 1. Слева. Клетки *S. cerevisiae*, обработанные амиодароном, окрашенные митотрекером зеленым и митотрекером оранжевым. Митохондрии *Δusp2* содержат компартменты с разным уровнем мембранного потенциала. Справа. Участок клетки *Δusp2*, последовательные срезы. Инкубация (10 мин.) с амиодароном (50мкМ). Под единой внешней митохондриальной мембраной располагаются несколько митопластов.

Полученные результаты позволяли предположить, что обнаруженный нами замедленный (относительно фрагментации матрикса) распад наружной мембраны митохондрий в клетках штамма *Dusp2* лежит в основе его повышенной устойчивости к амиодарону.

1.2. Исследование ультраструктуры клеток дрожжей *S. cerevisiae* при фосфолипидозе, вызванном амиодароном.

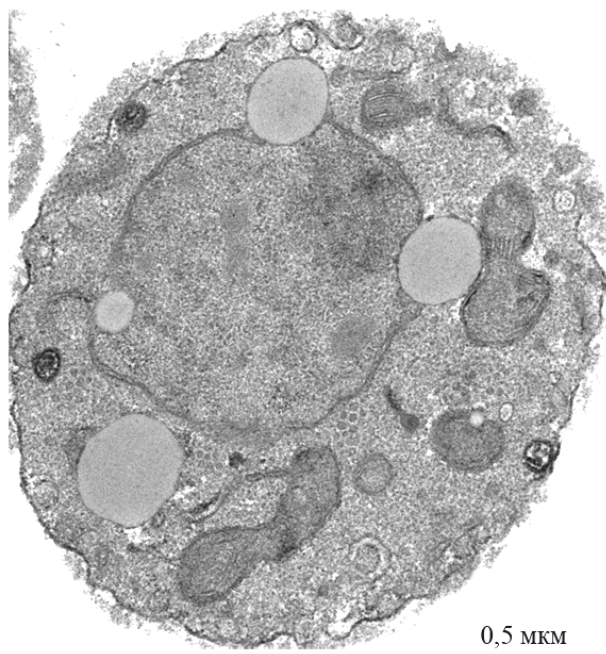


Рис. 2. Ультраструктура клеток *S. cerevisiae*. Дикий тип. Кратковременная (1-2 мин) инкубация с амиодароном (40 мкМ). Можно видеть образование тройного комплекса – ядро-ЛВ-митохондрия. Ядерная мембрана образует расширения в местах контактирования с ЛВ.

При кратковременной инкубации (1-2 мин) с амиодароном (40 мкМ) был обнаружен выраженный эффект одновременного взаимодействия липидных включений (ЛВ) с ядром и митохондриями клетки — образовании тройного комплекса (Рис.2). Возможным объяснением такой перестройки пространственной организации клетки является процесс фосфолипидоза, запускаемый амиодароном и приводящий к нарушению естественного метаболизма фосфолипидов.

1.3. Исследование эффектов FCCP и C12TPP на ультраструктуру клеток *S. cerevisiae* при одновременной инкубации с амиодароном.

При одновременной инкубации клеток *S. cerevisiae* дикого типа с амиодароном (40 мкМ) и разобщителем FCCP (50 нМ) мы обнаружили резкие изменения ультраструктуры митохондрий. Митохондрии были собраны в характерные кластеры, образованные плотно прилегающими митохондриями. Менялась ультраструктура и самих митохондрий - в центре митохондрий имелись зоны близкого расположения или даже слипания, ограничивающих митохондрию мембран, в результате чего митохондрии приобретали гантелевидную форму.

При совместной инкубации с амиодароном (40мкМ) и С12ТРР (50нМ) митохондрии располагались отдельными группами, резких изменений ультраструктуры митохондрий не происходило, наблюдались лишь локальные просветления матрикса митохондрий. Таким образом, FCCP и С12ТРР предотвращали действие амиодарона, однако ультраструктура клеток не соответствовала норме.

1.4. Защитное действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₃ при действии амиодарона в клетках *S. cerevisiae*.

Проведенные эксперименты показали, что SkQ₃ (50нМ) не вызывал резких изменений ультраструктуры митохондрий *S. cerevisiae*. При добавление амиодарона (40мкМ) к клеткам, предварительно инкубированным с SkQ₃ (50нМ), не происходило изменений ультраструктуры митохондрий, вызываемых амиодароном (40мкМ), однако, ультраструктура клеток не соответствовала норме. Митохондрии располагались группами, матрикс митохондрий был просветлен.

1.5. Влияние высоких концентраций митохондриально-направленного катиона С12ТРР на ультраструктуру клеток *S. cerevisiae*.

Нами был исследован патофизиологический эффект С12ТРР на клетки *S. cerevisiae*. Наши исследования показали, что в небольших (наномолярных) концентрациях С12ТРР, являясь мягким разобщителем, не оказывает негативного действия на митохондрии и клетки в целом. Основной эффект на ультраструктуру клеток дрожжей оказала инкубация с С12ТРР (10мкМ). Мы обнаружили появление гигантских электронно-прозрачных митохондрий, практически лишенных крист, разделенных на отсеки выраженными септами (Рис.3). Совместная инкубация С12ТРР (10мкМ) и FCCP (2мкМ), а также С12ТРР (10мкМ) с α -токоферолом (50нМ) частично нивелировала этот эффект. Однако, совместная инкубация с С12ТРР и FCCP оказывала отрицательное действие на рост колоний клеток в отличие от С12ТРР и α -токоферола (Рис.3). Полученные нами данные подтверждают рабочую

гипотезу, согласно которой высокие (микромольные) концентрации этого вещества могут быть токсичны для клеток.

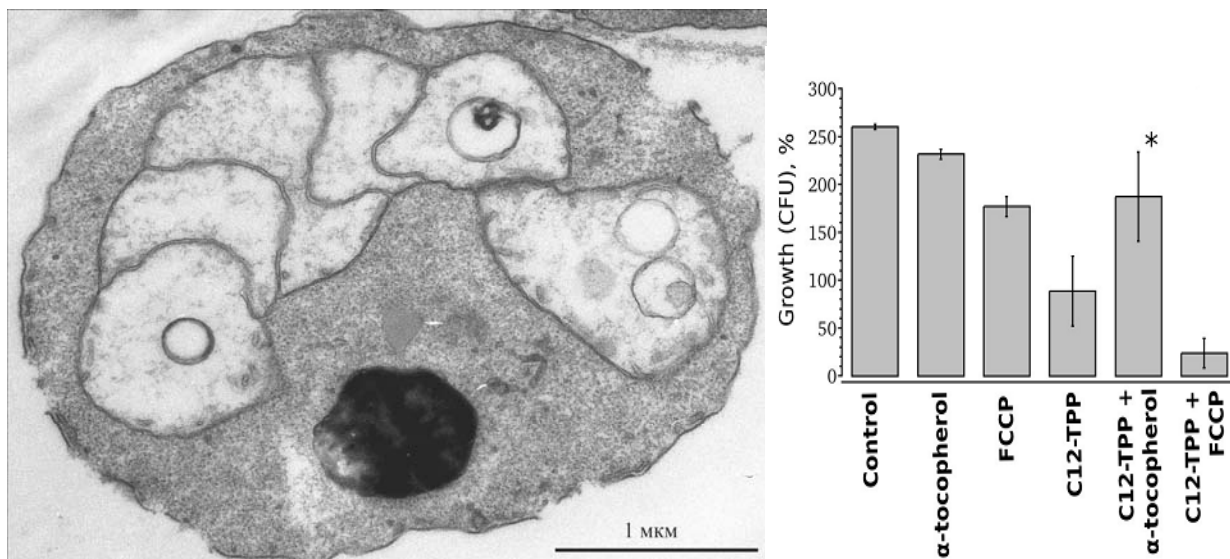


Рис. 3. Слева. Клетка дикого типа *S. cerevisiae*. Инкубация с C12TPP (10мкМ). Митохондрия клетки сильно набухла. Матрикс электронно-светлый, поделен на отдельные отсеки септами. Справа. График выживаемости клеток (% выросших колоний) после инкубации с различными реагентами.

1.6. Действие мягких разобщителей C12RB и C12R19, на ультраструктуру клеток *S. cerevisiae*. Нами было исследовано действие родаминовых производных C12TPP, а именно: C12RB (10мкМ), C12R19 (10мкМ) на ультраструктуру клеток *S. cerevisiae* дикого типа. Катионные разобщители дыхания и окислительного фосфорилирования C12TPP, C12RB снижают мембранный потенциал, катализируя перенос свободных жирных кислот через мембрану (Severin et al., 2010). Важно отметить, что C12TPP и C12RB всегда находятся в заряженном (катионном) состоянии. C12R19, будучи очень похож по хим. формуле на C12RB, может депротонироваться и переходить в электронейтральное состояние. Было обнаружено, что инкубация клеток с C12R19 приводит к незначительным изменениям (небольшое набухание митохондрий). Напротив, инкубация с C12RB вызывает значительные изменения формы и увеличения размеров митохондрий (Рис.4,5).



Рис. 4. Слева. График выживаемости клеток *S. cerevisiae* после инкубации с проникающими катионами C12RB (10 мкМ) и C12R19 (10 мкМ). Справа. Таблица количественной оценки изменений ультраструктуры митохондрий *S. cerevisiae* при инкубации с: C12RB (10 мкМ), C12R19 (10 мкМ).

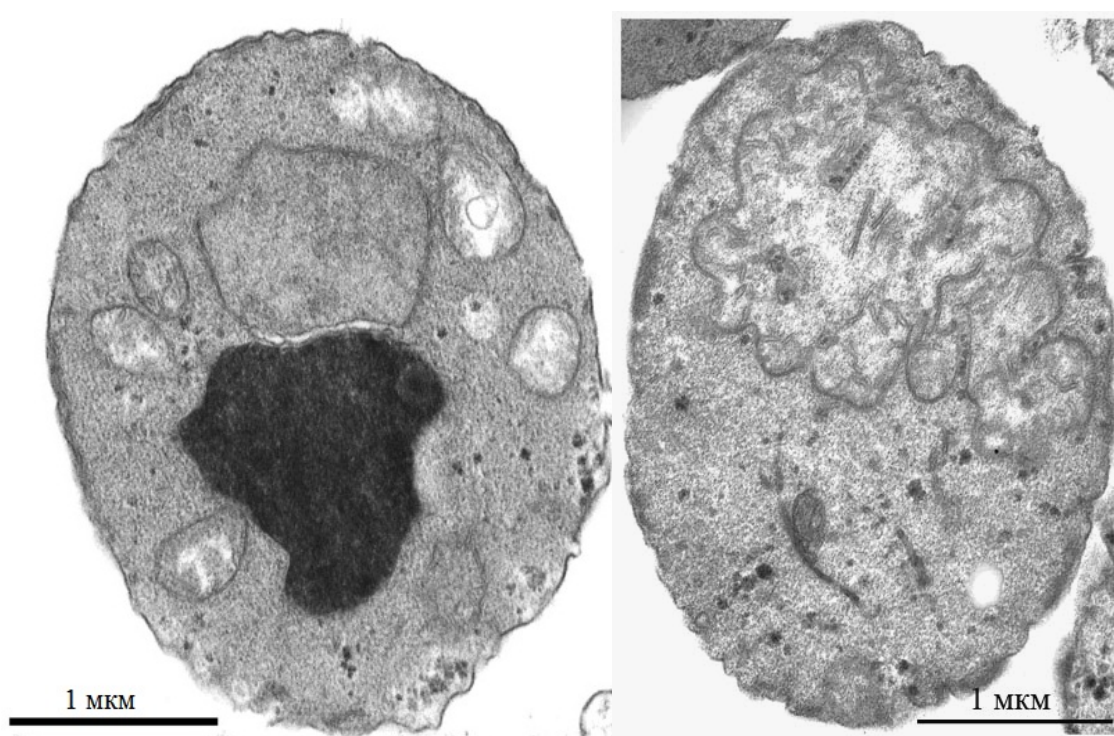


Рис. 5. Слева. Клетка дикого типа *S. cerevisiae*. Инкубация с C12R19 (10 мкМ). В клетке присутствуют слегка набухшие митохондрии. Справа. Клетка дикого типа *S. cerevisiae*. Инкубация с C12RB (10 мкМ). Типичная ультраструктурная перестройка митохондрий после инкубации с C12RB: складчатая внешняя мембрана, увеличение размеров и обводнение матрикса митохондрий.

2.1. Влияние митохондриально-направленного катиона SkQ₁ на продолжительность жизни нитчатого гриба *P. anserina*. Проведенные эксперименты показали, что контрольные клетки погибают на 25 день культивирования, что четко прослеживается полученными ультраструктурными данными (Рис.6). В то же время, клетки, выращенные

на среде с антиоксидантом SkQ₁, проявляли характерные признаки старения только лишь к 61 дню.

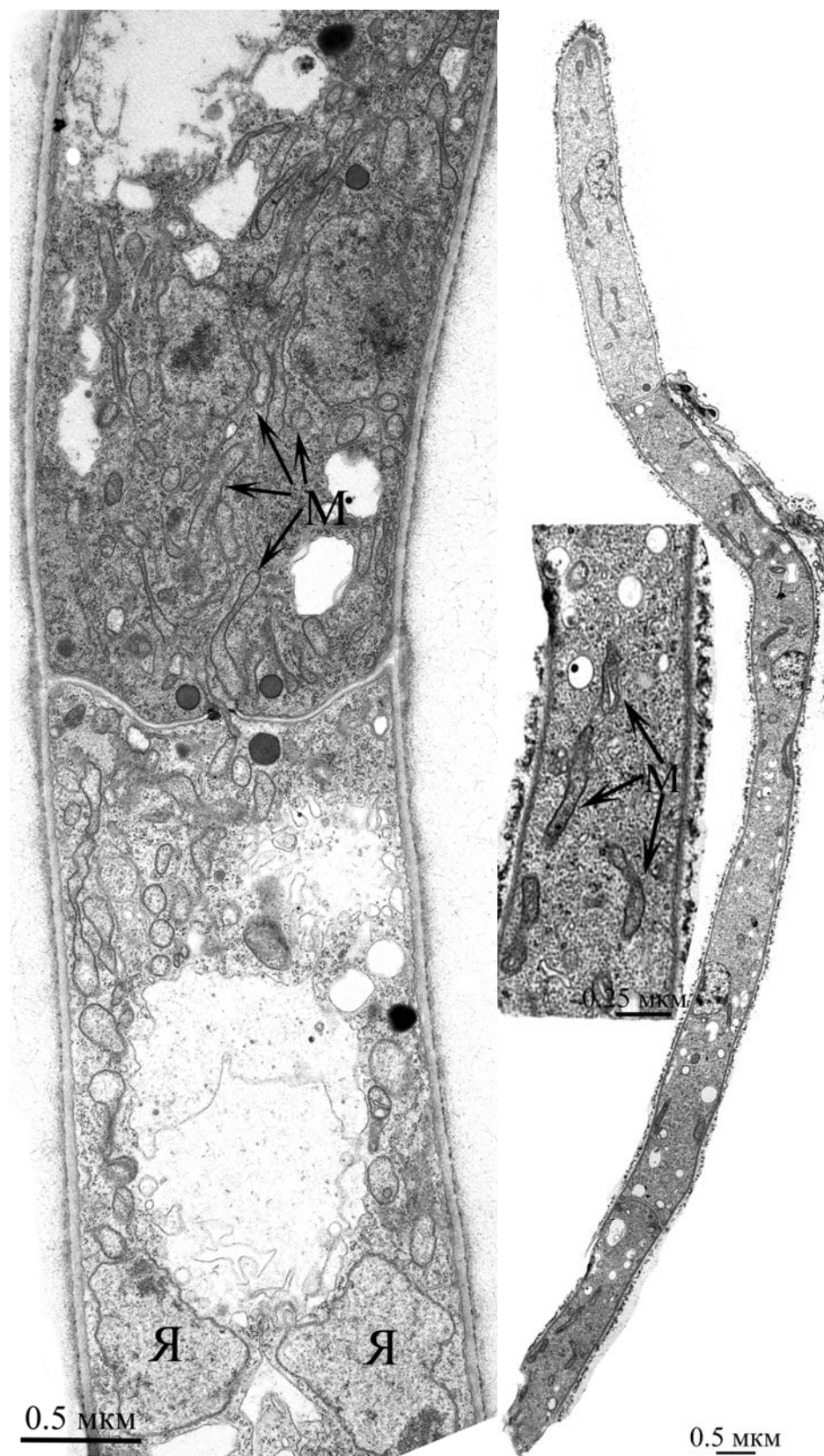


Рис. 6. Слева. Электронно-микроскопическая фотография участка гифы *Podospora anserina*, дикий тип. 25-й день роста мицелия. Видны электронно-светлые митохондрии, заполняющие большую часть цитоплазмы; целостность септ нарушена.

Справа. Клетки *Podospora anserina*, дикий тип, выращенной на среде с добавлением SkQ₁. (400нМ) 46-й день роста мицелия. Общий вид мицелия. Митохондрии гифы *Podospora anserina* показаны на большем увеличении.

Таким образом, было показано, что при введении в среду культивирования митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₁ (400нМ) происходило увеличение продолжительности жизни более чем в 2,4 раза мицелия гаплоидных штаммов дикого типа *P. anserina*.

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Ультраструктурные исследования на клетках *S. cerevisiae*

Исследование септирования митохондрий клеток *Saccharomyces cerevisiae* при обработке амиодароном. Наши данные показали, что амиодарон драматически изменяет ультраструктуру митохондрий клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Тот факт, что делеция гена *usp2* снижает степень патологических изменений митохондрий и в то же время увеличивает выживание клеток, является доводом в пользу того, что митохондрии является ключевым интермедиатом токсичности амиодарона. Мы предполагаем, что число отдельных митопластов, ограниченных единой наружной мембраной, является фактором, определяющим устойчивость митохондрии к набуханию (Рис.1). Таким образом, разделяя внутреннюю мембрану на независимые фрагменты, клетка могла бы уменьшать максимальный объем набухшего матрикса и, таким образом, предотвращать разрыв наружной мембраны. Очевидно, что это защитный ответ клетки, направлен на предотвращение ее возможной гибели.

Амиодарон и липидные включения. Помимо этого, был обнаружен выраженный эффект одновременного взаимодействия ЛВ с ядром и митохондриями клетки — образование тройного комплекса под действием амиодарона. Согласно литературным данным, амиодарон приводит к развитию фосфолипидоза — накоплению и нарушению естественного метаболизма фосфолипидов (Gaigg et al., 1995; Achleitner et al., 1999; Perktold et al., 2007). Возможная роль такого объединения — активная миграция

липидов между органеллами в условиях фосфолипидоза, возникающего при действии амиодарона.

Влияние проникающих катионов и АФК на ультраструктуру митохондрий. Полученные нами данные позволяют предложить модель взаимосвязи АФК и ультраструктуры митохондрий (Рис.7). Резкие изменения в ультраструктуре митохондрий, вызванные накоплением C12TRP в матриксе митохондрий, приводят к генерации АФК. Эти АФК вызывают дальнейшее набухание матрикса. Модель подтверждается частичным ингибированием набухания, под действием α -токоферола.

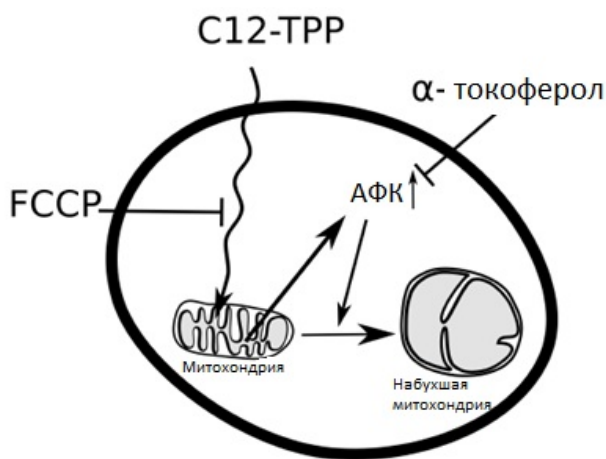


Рис. 7. Предположительная схема действия больших концентраций проникающего иона C12TRP на митохондрии.

Мы предполагаем, что существует сенсор митохондриального объема, который приводит к образованию АФК в цитоплазме в ответ на митохондриальный стресс. В случаях сильного набухания чрезмерное образование АФК может вызвать повреждение митохондрий и таким образом дополнительно стимулировать набухание.

2. Ультраструктурные исследования на клетках *P. anserina*

Полученные данные показывают, что при действии SkQ₁ выраженные структурные изменения претерпевает митохондриальный аппарат клеток *P. anserina*. Так, контрольные клетки *P. anserina* погибают уже на 25 день культивирования, что четко прослеживается и на ультраструктурном уровне. Для стареющих клеток характерны заметные изменения на ультраструктурном уровне: увеличение количества мелких митохондрий, вакуолизация цитоплазмы, появление ламеллярных тел (мотков мембран), а

также нарушение целостности септ в гифах (Рис.6). В то же время, клетки, выращенные на среде с антиоксидантом SkQ₁, проявляют характерные признаки старения только лишь к 61 дню. Начиная уже с 6 дня культивирования, мы наблюдаем картину стабилизации хондриома мицелия *P. anserina*. Специфический характер этих изменений свидетельствует в пользу предположений о ведущей роли окислительного стресса в процессе репликативного старения мицелия *P. anserina*.

Ранее не было обнаружено соединения, способного надолго отложить или отменить процесс старения у *P. anserina*. Наши исследования показали, что применение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₁ более чем в 2,4 раза увеличивает продолжительность жизни вегетативного мицелия *P. anserina*, при этом сохраняя нативность ультраструктуры клеток: мы не выявили разрушений или деградационных изменений ультраструктуры клеток. Наоборот, нами была обнаружена значительная, неизвестная в литературе для *P. anserina* перестройка ультраструктуры клеток.

ВЫВОДЫ

1. Амиодарон вызывает набухание митохондрий и септирование их матрикса в клетках *S. cerevisiae*. Степень септирования коррелирует с устойчивостью клеток к амиодарону.
2. Амиодарон вызывает взаимодействие липидных включений с ядром и митохондриями в клетках *S. cerevisiae*.
3. Мягкий разобщик C12TPP эффективнее обычного (FCCP) в предотвращении патологических изменений ультраструктуры митохондрий, вызванных амиодароном в клетках *S. cerevisiae*.

4. Антиоксидант SkQ₃ предотвращает изменения как общей организации клеток, так и ультраструктуры митохондрий, вызываемые амиодароном, в клетках *S. cerevisiae*.

5. Высокие концентрации проникающего катиона C12TPP вызывают драматическое набухание митохондрий в клетках *S. cerevisiae*. Это набухание предотвращается разобщением митохондрий.

6. Перманентно заряженный проникающий катион C12RB в высоких концентрациях вызывает необычные изменения ультраструктуры митохондрий в клетках *S. cerevisiae*. Близкий по формуле депротонируемый проникающий катион C12R19 таких изменений не вызывает.

7. Обнаружена значительная, перестройка ультраструктуры клеток *P. anserina* при старении мицелия. SkQ₁ более чем в 2,4 раза увеличивает продолжительность жизни *P. anserina*, при этом сохраняя нативность ультраструктуры клеток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ожован С.М. Ультраструктура *S. cerevisiae* в условиях окислительного стресса // Тезисы Международной Конференции Ломоносов, г. Москва, 2007, с. 212.
2. Кнорре Д.А., Ожован С.М., Сапрунова В.Б., Соколов С.С., Северин Ф.Ф. Фрагментация митохондрий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием амиодарона // Международная Конференция «Рецепция и Внутриклеточная Сигнализация», г. Пущино, 2007, *Сборник статей*, С. 178.
3. Ожован С.М., Кнорре Д.А., Северин Ф.Ф., Бакеева Л.Е. Действие амиодарона-индуктора программируемой клеточной гибели на ультраструктуру клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Тезисы Российской Конференции по электронной микроскопии, г. Черногоровка, 2008, с. 304.
4. Кнорре Д.А., Бочарова Н.А., Ожован С.М., Соколов С.С., Северин Ф.Ф. Характер распределения нуклеотидов в митохондриях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в условиях стресса // IV съезд Российского Общества Биохимиков и Молекулярных Биологов, г. Новосибирск, 2008, с.332.
5. Ожован С.М. Состояние ультраструктуры клеток *Saccharomyces cerevisiae* при действии амиодарона // Тезисы Международной Конференции Ломоносов, г. Москва, 2008, с. 178.
6. Кнорре Д.А., Ожован С.М., Сапрунова В.Б., Соколов С.С., Бакеева Л.Е., Северин Ф.Ф. Фрагментация матрикса митохондрий как механизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Биохимия*, 2008, 73 (11), с. 1561 – 1568.

7. Knorre D.A., Saprunova V.B., Sokolov S.S., Ojovan S.M., Bakeeva L.E., Severin F.F. De-synchronization of inner and outer mitochondria dynamics as a protection mechanism against cell death in yeast // 6th International Meeting on Yeast Apoptosis. Belgium, Leuven, 2008, p. 14.
8. Ожован С.М., Bakeeva Л.Е., Штайер О.В., Камзолкина О.В., Высоких М.Ю. Действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₁ на процесс старения *Podospora anserina* // Международная Конференция «Рецепция и Внутриклеточная Сигнализация», г. Пушкино, *Сборник статей*, 2009, т.2, с. 528-532.
9. Ojovan S.M., Kamzolkina O.V., Shtaeer O.V., Vyssokikh M.Yu. Effect of mitochondria targeted antioxidants on ageing of *Podospora anserina*. Ultrastructural study // XIXth IAGG Congress, *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, France, Paris, 2009, vol. 13 (1), p. 383.
10. Ожован С.М., Кнорре Д.А., Северин Ф.Ф., Bakeeva Л.Е. Действие амиодарона на ультраструктуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Цитология*, г. Санкт-Петербург, 2009, 51 (11), с. 911-916.
11. Ожован С.М., Bakeeva Л.Е., Штаер О.В., Камзолкина О.В., Высоких М.Ю. Действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ₁ на процесс старения *Podospora anserina* // *Биологические мембраны*, 2010, 27 (1), с. 46–51.
12. Ojovan S.M., Knorre D.A., Markova O.V., Smirnova E.A., Bakeeva L.E., Severin F.F. Dodecyl triphenylphosphonium induces ROS-dependent swelling of yeast mitochondria in vivo // *Jornal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2011, в печати.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АФК - активные формы кислорода

ЛВ - липидные включения

C12R19 - додецил родамин 19

C12RB - додецил родамин В

C12TRP – додецилтрифенилфосфоний

FCCP – карбонил цианид р-(трифторметокси)фенилгидразон

SkQ₁ - пластохинон додецилтрифенилфосфоний

SkQ₃ - метилпластохинон додецилтрифенилфосфоний