

**НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского**

На правах рукописи

Лямзаев Константин Геннадьевич

**Митохондрии при окислительном стрессе в культуре клеток
HeLa.**

03.00.04- биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:	доктор биологических наук, профессор В.П. Скулачёв
Научный консультант:	кандидат биологических наук ведущий научный сотрудник Б.В. Черняк
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор В.Д. Самуилов доктор медицинских наук, профессор В.Г. Пинелис
Ведущая организация:	Институт биохимии А.Н. Баха

Защита состоится 26 марта 2007 г. в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета
Д.501.001.71 при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу:
119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, биологический факультет МГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.В. Медведева

АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ

В настоящее время термин «окислительный стресс» используется для обозначения широкой группы разнообразных взаимосвязанных явлений, включающих повышенную продукцию активных форм кислорода (АФК) и окислительное повреждение молекулярных компонентов клетки. Взаимоотношения между этими явлениями остаются не до конца выясненными, но, вероятно, большую роль при этом играет окислительное повреждение митохондрий, автокаталитически приводящее к усилению генерации ими АФК. Механизмы образования АФК митохондриями в условиях окислительного стресса до сих пор остаются неясными. Многочисленные данные, полученные в экспериментах с выделенными митохондриями и субмитохондриальными частицами, указывают на то, что главными супероксид-образующими компонентами дыхательной цепи являются NADH : убихиноноксидоредуктаза (комплекс I) и убихинон-цитохром с редуктаза (комплекс III). Не ясно, какой именно компонент комплекса I служит одноэлектронным донором для восстановления кислорода. Более того, в физиологических условиях в клетках поддерживается высокий уровень NADH, который может препятствовать образованию супероксида комплексом I. Вероятно, по этой причине эксперименты на культурах клеток дают противоречивые результаты о роли комплекса I в генерации АФК. Ингибирование активности комплекса I в культуре клеток может приводить как к увеличению, так и к снижению уровня АФК в зависимости от типа клеток и стимула вызывающего окислительный стресс. Подобная неоднозначность указывает на сложность механизмов генерации АФК митохондриями в физиологических условиях. Реакция клетки на окислительный стресс включает целый ряд защитных механизмов. Прежде всего, происходит активация и дополнительная экспрессия многочисленных антиоксидантных систем, часть из которых направлена на защиту митохондрий. Поврежденные митохондрии представляют значительную опасность для клетки и как источники АФК и как потребители NAD(P)H и АТФ, поэтому существуют механизмы служащие для уничтожения таких органелл. Наконец, в случае исчерпания всех возможностей защиты, в клетке может запускаться программа гибели (апоптоз), позволяющая избежать распространения стресса в окружающих тканях. Исследования в этой области представляют большой интерес в связи с тем, что окислительный стресс, сопровождающийся повреждением митохондрий, наблюдается при многих, серьезных патологиях, представляющих собой актуальную проблему для здравоохранения, в частности при инфарктах, инсультах, нейродегенеративных заболеваниях. Выяснение роли нарушения биоэнергетических функций митохондрий в индукции окислительного стресса, а также изучение механизмов защиты клетки от повышенной продукции АФК митохондриями позволит более эффективно бороться с этими заболеваниями.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель данной работы – исследование роли митохондрий в развитии окислительного стресса, а также клеточного ответа на стресс.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследование роли митохондрий в окислительном стрессе и апоптозе, вызванных пероксидом водорода.
2. Исследование механизмов передачи сигнала гибели от апоптозных клеток к соседним клеткам.
3. Изучение процесса избирательного уничтожения митохондрий в условиях, когда их биоэнергетические функции нарушены.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ

В работе проведено исследование влияния ингибиторов дыхательной цепи на гибель клеток HeLa и окислительный стресс вызванные пероксидом водорода. Показано, что пероксид водорода вызывает гибель клеток HeLa, причем ингибиторы дыхания значительно стимулируют как гибель клеток, так и продукцию в них АФК. Способность ингибиторов дыхания увеличивать продукцию АФК указывает на то, что именно дыхательная цепь митохондрий является основным продуцентом АФК при окислительном стрессе вызванном H_2O_2 . Важную роль митохондрий в образовании вторичных АФК подтвердили опыты с митохондриально направленным антиоксидантом МитоQ, который эффективно защищал от АФК образующихся при обработке клеток пероксидом водорода. Также было показано, что предварительная инкубация клеток с ингибитором флавиновых ферментов дифенилен йодониумом (DPI) подавляла генерацию АФК как в случае индукции окислительного стресса H_2O_2 , так и в случае комбинации H_2O_2 и ингибиторов дыхания. Таким образом, можно предположить, что АФК в нашей модели образуются с участием флавиновых компонентов комплекса I дыхательной цепи в ходе окисления NADH.

При индукции апоптоза в клетках HeLa обнаружено не случайное образование кластеров апоптозных клеток в монослойной культуре, что указывает на возможность передачи апоптозного сигнала между клетками. Для исследования этого явления разработана простая методика, в которой были исключены прямые межклеточные контакты. Клетки, в которых апоптоз был вызван фактором некроза опухолей (ФНО), или H_2O_2 , передавали клеткам-реципиентам апоптозный сигнал, который прерывался при добавлении каталазы в среду инкубации. Это доказывает, что сигнал о гибели передается с помощью пероксида водорода. Обработка клеток-индукторов или клеток-реципиентов митохондриально - направленным катионным антиоксидантом МитоQ

ингибировала передачу апоптозного сигнала. Предполагается, что образование АФК в митохондриях играет ключевую роль как в выработке апоптозного сигнала, так и в его восприятии. Вероятно, феномен передачи сигнала гибели соседним клеткам определяет увеличение зоны апоптозной гибели клеток вокруг пораженного участка ткани при инфарктах и инсультах, а так же деградацию некоторых органов в онтогенезе (т. наз. «органоптоз»).

В условиях массового повреждения митохондрий под действием разобщителей FCCP или ДНФ в сочетании с ингибиторами дыхательной цепи миксотиазолом или антимицином наблюдалась деградация митохондрий в клетках HeLa. При этом в течение 1-2 часов, митохондрии фрагментировались, далее через 24-48 часов фрагментированные митохондрии формировали кластеры в области ядра. Дальнейшая инкубация клеток в этих условиях приводила к гибели 50-70% популяции. Оставшиеся в живых клетки, морфологически практически не отличались от контрольных, но митохондрии в них претерпевали сильную деградации. Вероятно, фрагментированные митохондрии собираются в кластеры, которые далее окружаются мембраной и выбрасываются из клетки в межклеточное пространство по механизму экзоцитоза. Аутофагия, по-видимому, не играет ключевой роли в этом процессе. Можно предполагать, что наблюдаемая элиминация поврежденных митохондрий («митоптоз») является защитной реакцией клетки.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ

Исследование роли митохондрий в развитии окислительного стресса и апоптоза в последнее время приобретает все большее значение, что связано с участием этих процессов в развитии многих патологий человека, таких как инсульт, инфаркт, нейродегенеративные заболевания. Понимание роли митохондрий в механизмах продукции АФК поможет поиску новых средств борьбы с этими заболеваниями. Кроме того, новый феномен избирательного уничтожения митохондрий, описанный в этой работе, может помочь в понимании механизмов высокой устойчивости некоторых раковых опухолей к неблагоприятным условиям и к химиотерапии.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты работы были представлены на Международной конференции “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пуццино, 2003); на 29-м Конгрессе FEBS (Варшава, Польша, 2004); на 13-й европейской конференции биоэнергетиков “ЕВЕС” (Пиза, Италия, 2004); на международной конференции BioScience2004 (Глазго, Шотландия, 2004); на 12-ой Европейской конференции по апоптозу ECDO (Чанья, Греция, 2004); на научной школе «Свободные радикалы и заболевания: экспрессия генов, клеточный метаболизм и патофизиология» (Спецес, Греция, 2004); на 13-ой Европейской конференции по апоптозу ECDO (Будапешт, Венгрия, 2005); на 14-ой

европейской конференции биоэнергетиков “ЕВЕС” (Москва, Россия, 2006); на 14-ой Европейской конференция по апоптозу ECDO (Сардиния, Италия, 2006)

ПУБЛИКАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 7 статей и 13 тезисов.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертационная работа изложена на _____ страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы. В работе содержится _____ рисунка и _____ таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

В работе использовались линии клеток карциномы человека HeLa. Культуры клеток выращивали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (25 мМ), без пирувата, с добавлением гентамицина сульфата (0,08 мг/мл) в присутствии 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) в атмосфере 5% CO₂ при 37° С.

Клетки трансфецировали плазмидой Mito-EYFP кодирующей зелёный флуоресцентный белок медузы слитый с митохондриальным адресом 8 субъединицы цитохромоксидазы. Трансфекцию проводили по стандартному протоколу с помощью липофектамина 2000 (Invitrogen). Селекцию трансфецированных клеток проводили в среде DMEM содержащей 500 мкг/мл дженитоцина.

Регистрация дыхания клеток

Скорость потребления кислорода клетками HeLa измеряли полярографически, используя закрытый Pt-электрод Кларка, в ячейке объемом 0,5 мл при 37°C с постоянным перемешиванием. Для измерения дыхания в ячейку со средой DMEM с низким содержанием глюкозы (5,5 мМ), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, вносили суспензию клеток (5-7 x 10⁶ клеток/мл). Рассчитывали скорость дыхания клеток, принимая растворимость кислорода в среде измерения при 37°C равной 406 нг-атомам кислорода/мл и выражали в нг-атомах кислорода/мин на 10⁶ клеток.

Визуализация митохондрий, аутофагосом и цитоскелета.

Митохондрии в живых клетках окрашивали с помощью митотракера зелёного (*Molecular Probes*), специфического флуоресцентного красителя, окрашивающего митохондрии независимо от мембранного потенциала. Аутофагосомы выявляли с помощью монодансилкадаверина (0,05 мМ, 10 мин. при 37°C) (*Sigma*), лизосомы окрашивали с помощью лизотракера желтого (0,5 мМ, 15 мин. при 37°C) (*Molecular Probes*). Для окраски с помощью антител клетки фиксировали в 3,7% формальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере 15 мин. и пермеабилizировали с помощью 0,5% тритона X-100 10 мин. Далее клетки инкубировали с моноклональными антителами к

цитохрому *C* (*Pharminogene*), к I субъединице цитохромоксидазы (*Pharminogene*), тубулину (*Sigma*) или поликлональными антителами к белку Вах (*Pharminogene*). Затем после отмывки клетки окрашивали с помощью вторичных антител, конъюгированных с красителями Oregon green и Texas Red-X (*Pharminogene*). Для окрашивания актиновых филаментов использовали фаллоидин меченый TRITC (*Sigma*). Клетки на покровных стеклах заключали в среду Vectashield (*Vector, США*). Препараты анализировали с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии, используя конфокальные микроскопы Nikon Eclipse TE2000-U, LSM 510 (*Carl Zeiss*), а также флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M (*Carl Zeiss*)

Определение клеточной гибели

Для определения конденсации и фрагментации хроматина, происходящей в клетках при апоптозе, использовали флуоресцентный краситель Hoechst 33342 – (2'-[4-этоксифенил]-5-[4-метил-1-пиперазинил]-2, 5'-би-1Н-бензимидазол). Краситель в концентрации 1 мкг/мл добавляли в конце инкубации к живым или фиксированным клеткам на 25 минут. Фиксированные 3,7%-ным раствором формальдегида клетки промывали фосфатным буфером (PBS) и заключали в среду Vectashield. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа при длине волны возбуждающего света 365 нм.

Для определения некроза к нефиксированным клеткам добавляли флуоресцентный краситель пропидий иодид (PI) в концентрации 2 мкг/мл. Процент апоптотных и некротных клеток определяли с помощью подсчета числа клеток с фрагментированным ядром и клеток, проницаемых для пропидий иодида, соответственно.

Электронная микроскопия

Для электронной микроскопии клетки фиксировали в 3% формальдегиде приготовленном на фосфатном буфере (pH 7,4) при 4°C в течении 2 часов, затем фиксировали 1% тетроксидом осмия в течении 1,5 часов. Далее препарат дегидратировали в этиловом спирте. Затем препарат заключали в Epon-812 и делали ультратонкие срезы с помощью ультрамикротомы. Срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу. Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа HU-11B (Hitachi, Япония)

Сканирующая электронная микроскопия

Клетки фиксировали 30 минут 2,5% глутаровым альдегидом приготовленном на среде Хенкса (pH 7,2) не содержащей ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , далее дополнительно фиксировали тетрахлоридом осмия в 0,1 % кокадилатном буфере (pH 7,3). Клетки дегидратировали с использованием ацетона и высушивались с помощью аппарата фирмы «Balzers». Далее на препараты напыляли смесь золота с палладием и проводили анализ с помощью сканирующего электронного микроскопа - Hitachi 405A, 15 kV.

Измерение продукции АФК и величины мембранного потенциала митохондрий в клетках HeLa

Для определения продукции активных форм кислорода (АФК) использовали флуоресцентные красители DCF-DA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат) или его аналог 5-(и-6)-хлорметил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат ацетиловый эфир (CM-H₂DCFDA) (Molecular Probes) в концентрации 4 μ M для измерения мембранного потенциала использовали тетраметилродамин (TMRM) в концентрации 200 нМ. Красители добавляли в среду культивирования клеток на 15 минут, затем клетки промывали и анализировали с помощью флуоресцентной или конфокальной микроскопии, а также с помощью проточного цитофлуориметра (Partec PAS-III).

Измерение концентрации пероксида водорода

Измерения содержания H₂O₂ в среде проводили флуориметрически (возбуждение при 530 нм, испускание при 590 нм), используя в качестве индикатора Amplex Red (Molecular Probes, США) и пероксидазу хрена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика клеток линий HeLa

В своей работе для исследования роли биоэнергетических функций митохондрий в апоптозе и окислительном стрессе мы выбрали быстрорастущую недифференцированную опухолевую линию HeLa, с высоким уровнем окислительного фосфорилирования и гликолиза. Было показано, что клетки HeLa обладают высокой устойчивостью, и не гибнут даже при длительной инкубации с митохондриальными ядами. Во избежание эффекта Крэбтри (торможения дыхания и окислительного фосфорилирования в присутствии субстрата гликолиза) скорости потребления кислорода клетками HeLa измеряли в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (5,5 мМ) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В этих условиях ингибитор F₀-субкомплекса H⁺-АТФазы олигомицин и ингибитор F₁-субкомплекса H⁺-АТФазы ауровертин эффективно подавляли дыхание клеток HeLa (**рис. 1**). Это говорит о высокой степени сопряженности дыхания клеток. Разобщитель карбонилцианид-трифторметоксифенилгидразон (FCCP) максимально стимулировал дыхание в концентрациях 0,1-0,2 мкМ, а в концентрациях свыше 2 μ M ингибировал дыхание (**рис. 1**). Разобщитель 2,4-динитрофенол (ДНФ) полностью разобщал окислительное фосфорилирование в довольно высоких концентрациях (0,1-0,2 мМ). Ингибиторы комплекса I дыхательной цепи ротенон и пирицидин, а так же ингибиторы

комплекса III миксотиазол и антимицин А практически полностью подавляли дыхание клеток (рис.1).

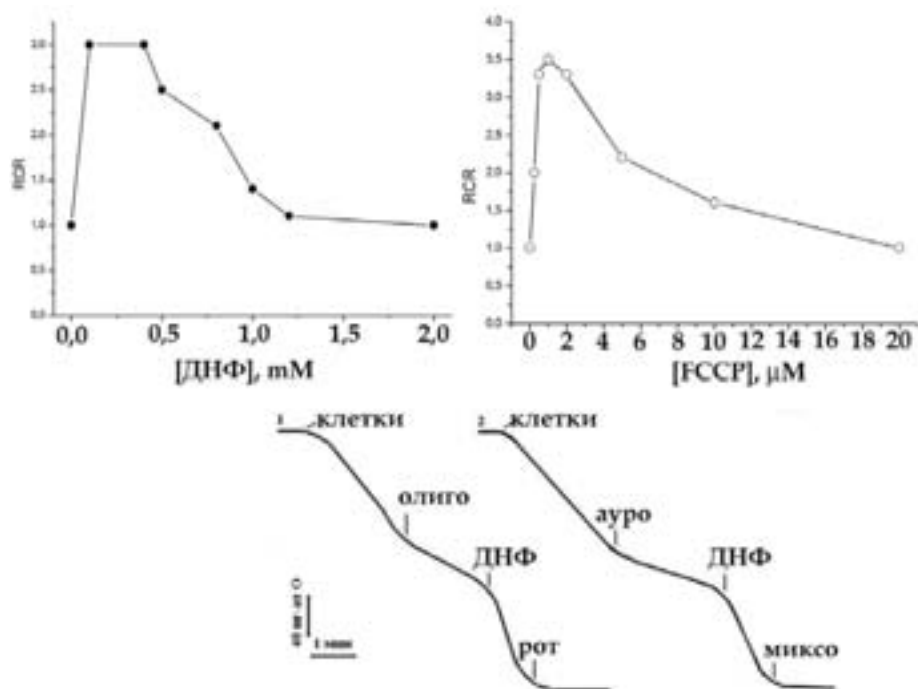


Рис. 1 Эффект митохондриальных ингибиторов на дыхание клеток HeLa. Добавки: **олиго** – олигомицин (5 мкг/мл); **ауро** – аувертин В (10 μM); **ДНФ** – 2,4-динитрофенол (0,1mM), **рот** – ротенон (2 μM); **миксо** – миксотиазол (2 μM). Концентрация клеток в пробе 5*10⁶ клеток/мл

ИНДУКЦИЯ ГИБЕЛИ КЛЕТОК НЕЛА ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА.

Окислительный стресс в клетках HeLa вызывали добавлением H₂O₂ в концентрациях 100 - 200 μM. Клетки HeLa культивировали при низкой плотности, при которой клетки образовывали небольшие не связанные между собою островки (конфлюэнтность 30-40%). Пероксид водорода вызывал гибель 20-30% клеток через 17 часов после добавления. Эффект пероксида водорода значительно усиливался, если клетки предварительно инкубировали с ингибиторами дыхания пирицидином или миксотиазолом (рис. 2).

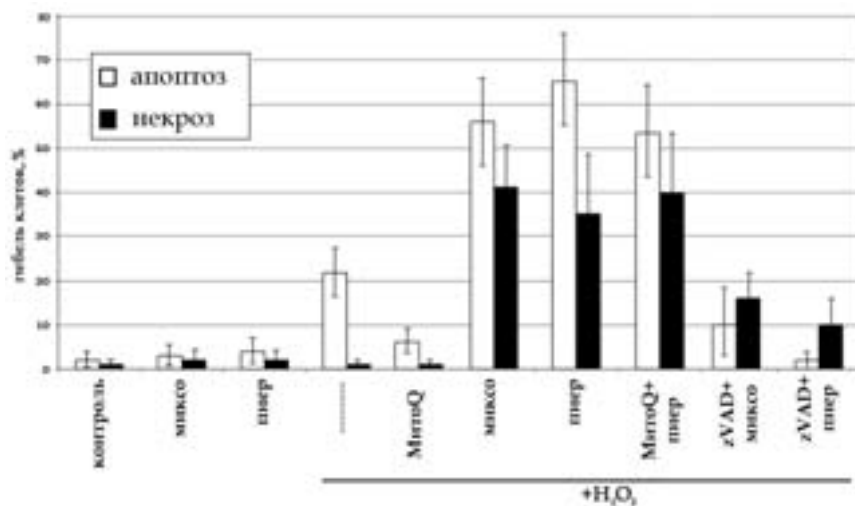


Рис. 2 Гибель клеток вызванная H₂O₂. Эффекты ингибиторов дыхательной цепи и МитоQ.. Апоптотическая и некротическая гибель измерялась через 17 часов после добавления H₂O₂. (100 μM). Пирицидин (2 μM), миксотиазол (2 μM) и zVADfmk (50 μM) добавляли за 1 час до H₂O₂. Клетки инкубировали с 20 нМ МитоQ в течение 7 дней, затем промывали и культивировали еще 24 ч. На графике представлены данные трёх независимых экспериментов.

Это позволило предположить, что окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода, стимулирует продукцию АФК в митохондриях, которая значительно усиливается при ингибировании дыхательной цепи.

Гибель клеток HeLa определяли по морфологии ядер после окраски Hoechst 33342, при этом апоптозными считали клетки с конденсированным и фрагментированным хроматином. При комбинации ингибиторов дыхания и H_2O_2 , наблюдалось появление большого количества клеток с нарушенной целостностью внешней мембраны (пропидий йодид положительные клетки), что является характерным признаком некроза (рис.2). Ингибитор каспаз zVAD-fmk предотвращал как апоптоз, так и некроз, вызванный комбинацией H_2O_2 и ингибиторов дыхания, т.е. некроз в наших условиях был каспаз–зависимым (рис. 2).

В клетках с интактной внешней мембраной наблюдалось перемещение белка BAX в митохондрии и последующий выход цитохрома C в цитоплазму, что указывает на апоптозный характер гибели.

Вероятно, при интенсивном окислительном стрессе, вызванном комбинацией H_2O_2 и ингибиторов дыхания, на поздних стадиях апоптоза, может нарушаться целостность плазматической мембраны.

Роль митохондрий в окислительном стрессе, вызванном H_2O_2 , проверяли с помощью митохондриально направленного антиоксиданта МитоQ. Это вещество состоит из хинонового остатка коэнзима Q, конъюгированного с катионом децилтрифенилфосфония, что позволяет ему электрофоретически накапливаться в митохондриях и эффективно восстанавливаться дыхательной цепью (рис. 3). Было показано, что предварительная инкубация клеток с МитоQ в концентрации

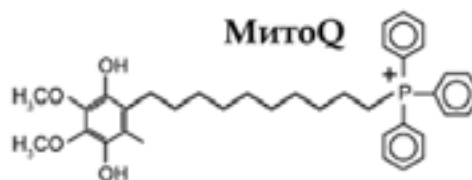


Рис. 3 Структура молекулы МитоQ.

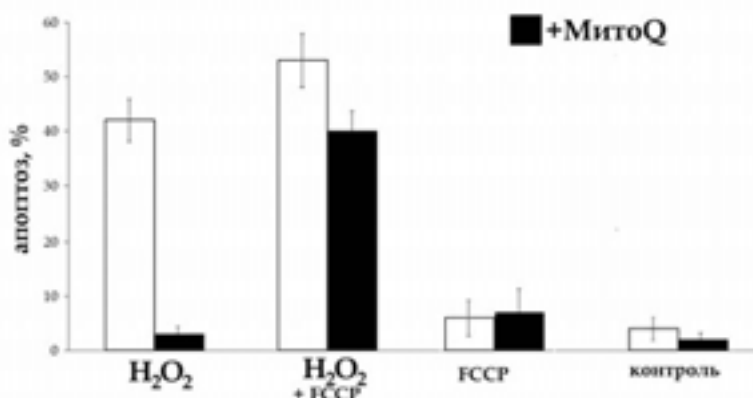


Рис. 4 Разобщитель FCCP предотвращает защитное действие МитоQ при апоптозе, вызванном H_2O_2 (100 μM). МитоQ (20 нМ) был добавлен как на рис.2 (черные столбики). FCCP (1 μM) был добавлен за 1 ч до МитоQ и присутствовал в течение 7 дней инкубации. Апоптоз измеряли через 24ч после добавления к клеткам H_2O_2

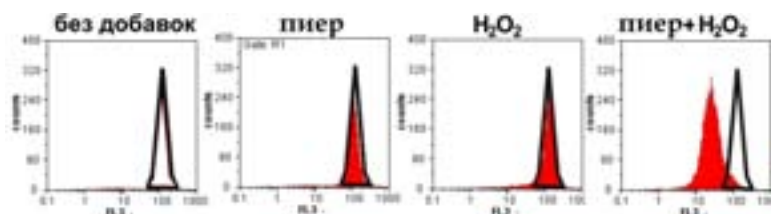


Рис 5 Комбинация H_2O_2 с ингибиторами дыхания вызывает падение мембранного потенциала митохондрий. Клетки HeLa инкубировали с H_2O_2 (100 μM , 45 мин) или/и пиерицидином (45 мин, 2 μM) и окрашивали тетрометилродамином (200 нМ, 15 мин), затем анализировали с помощью проточного цитофлуориметра .

20 нМ практически полностью подавляла апоптоз вызванный пероксидом водорода. Если инкубацию клеток с МитоQ проводили в присутствии разобщителя то защитный эффект МитоQ на апоптоз вызванный H_2O_2 , не проявлялся (**рис. 4**). При совместном действии H_2O_2 с ингибиторами дыхания пирицидином и миксотиазолом защитный эффект МитоQ также не проявлялся (**рис. 2**). Отсутствие защитного эффекта МитоQ в этом случае можно объяснить тем, что комбинация H_2O_2 с ингибиторами дыхания вызывает резкое падение мембранного потенциала, которое препятствует накоплению МитоQ в митохондриях и проявлению его защитных свойств (**рис. 5**). Кроме того, ингибиторы могут предотвращать восстановление МитоQ дыхательной цепью, а это необходимо для проявления его антиоксидантных свойств.

Таким образом, защитный эффект митохондриально направленного антиоксиданта МитоQ, а также способность ингибиторов дыхательной цепи пирицидина и миксотиазола усиливать гибель клеток, вызванную H_2O_2 , указывает на важную роль митохондриальных АФК в этом процессе. Далее мы исследовали механизм образования АФК митохондриями при окислительном стрессе.

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА СТИМУЛИРУЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ПРОДУКЦИЮ АФК

Было показано, что пероксид водорода, добавленный к клеткам, вызывает накопление в них АФК, которое измеряли с помощью флуоресцентного красителя CM-DCF-DA. Показано, что добавленный H_2O_2 разлагается в течение 15-20 минут (**рис. 6**), вероятно, вследствие высокой активности каталазы и других антиоксидантных ферментов в среде роста. С другой стороны, в наших экспериментах значительное накопление АФК в клетках наблюдалось через 45 минут после того как клетки были обработаны H_2O_2 (**рис. 7**), что указывает на активацию эндогенной продукции АФК добавленным пероксидом водорода. Продукция вторичных АФК значительно стимулировалась ингибиторами дыхания пирицидином и миксотиазолом (**рис. 7**). Сами по себе ни пирицидин ни миксотиазол в используемых концентрациях не вызывали значительного окислительного стресса.

Важную роль митохондрий в образовании вторичных АФК подтвердили опыты с митохондриально направленным антиоксидантом МитоQ, который эффективно предотвращал накопление АФК при обработке

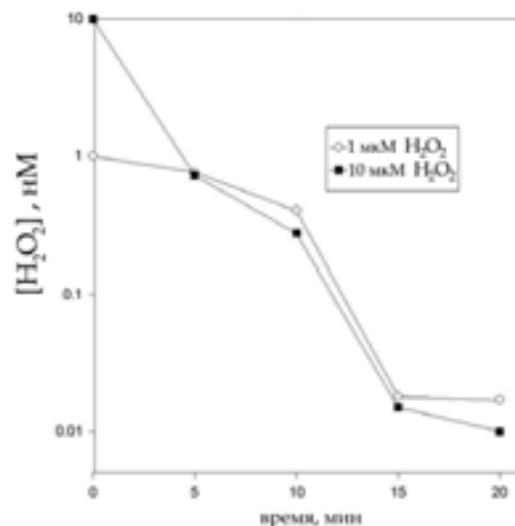


Рис. 6 Разложение H_2O_2 (1 μ M и 10 μ M) в присутствии клеток (2×10^5 кл/мл). Измерения содержания H_2O_2 в среде роста клеток проводили флуориметрически, используя в качестве индикатора Amplex Red и пероксидазу хрена. Данные получены совместно с М.Ю. Высоких.

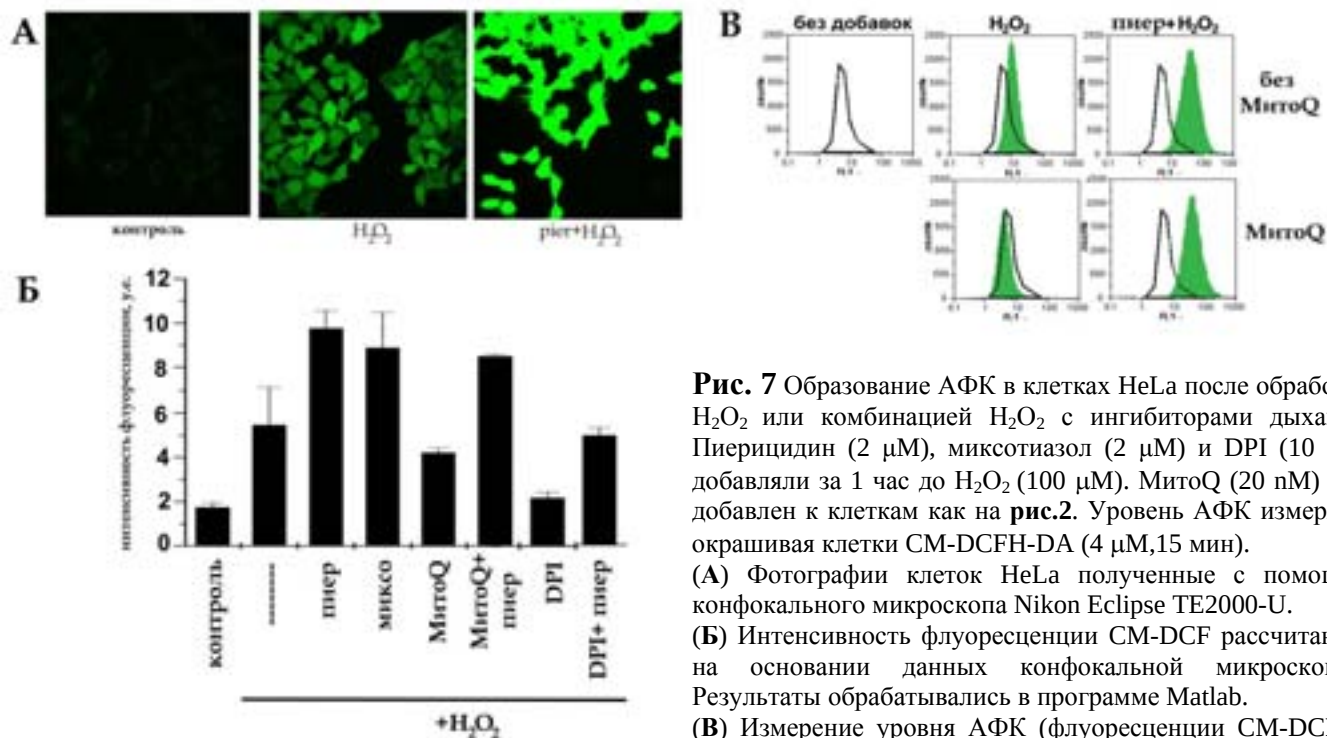


Рис. 7 Образование АФК в клетках HeLa после обработки H₂O₂ или комбинацией H₂O₂ с ингибиторами дыхания. Пирицидин (2 μM), миксотиазол (2 μM) и DPI (10 μM) добавляли за 1 час до H₂O₂ (100 μM). МитоQ (20 nM) был добавлен к клеткам как на **рис.2**. Уровень АФК измеряли, окрашивая клетки CM-DCFH-DA (4 μM, 15 мин). (А) Фотографии клеток HeLa полученные с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse TE2000-U. (Б) Интенсивность флуоресценции CM-DCF рассчитанная на основании данных конфокальной микроскопии. Результаты обрабатывались в программе Matlab. (В) Измерение уровня АФК (флуоресценции CM-DCF) в клетках с помощью проточного цитофлуориметра.

клеток пероксидом водорода (**рис. 7**). Эффект МитоQ не проявлялся при комбинированном воздействии H₂O₂ и ингибиторов дыхания, что, по-видимому, было связано с падением мембранного потенциала митохондрий (см. предыдущую главу).

Эффект ингибиторов дыхания указывает на то, что источником АФК в митохондриях клеток HeLa является комплекс I, причем одним из возможных мест генерации АФК является флавиновый компонент комплекса I. Для проверки этой возможности мы использовали дифенилен иодониум (DPI), который является эффективным ингибитором различных ферментов содержащих флавины. Показано, что предварительная инкубация клеток с DPI подавляла генерацию АФК как в случае индукции окислительного стресса H₂O₂, так и в случае комбинации H₂O₂ и ингибиторов дыхания (**рис. 7**). Эти результаты указывают на участие комплекса I дыхательной цепи в генерации АФК митохондриями при окислительном стрессе. Однако, следует иметь в виду, что как внешняя мембрана, так и матрикс митохондрий содержат высокоактивные флавиновые ферменты (к примеру, моноаминоксидазы и α-кетоглутаратдегидрогеназа, соответственно), потенциально способные реагировать с кислородом с образованием супероксид-радикала или пероксида водорода. В качестве восстановителя для этих ферментов может служить NAD(P)H, стационарная концентрация которого, определяется активностью комплекса I и трансдегидрогеназы. Учитывая, что ингибирование дыхания приводит к повышению уровня восстановленности NAD/NADH можно предположить, что в этих условиях ускоряется генерация АФК α-кетоглутаратдегидрогеназой или другим подобным ферментом. Так или иначе, активность

комплекса I может служить фактором, определяющим скорость образования АФК в митохондриях.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ АФК УЧАСТВУЮТ В ПЕРЕДАЧЕ АПОПТОЗНОГО СИГНАЛА МЕЖДУ КЛЕТКАМИ.

Изучая апоптоз, вызванный пероксидом водорода, мы обратили внимание на то, что апоптозные клетки распределяются в монослойной культуре клеток не случайным образом, а формируют кластеры из близкорасположенных клеток. Это указывает на наличие сигнала,

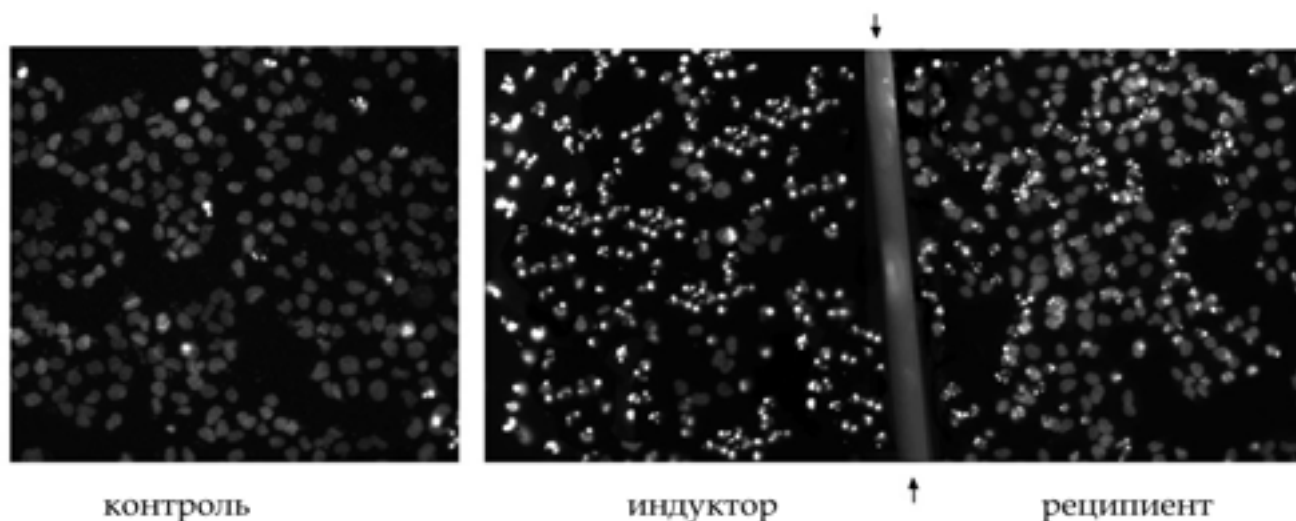


Рис. 8 Передача сигнала апоптоза от клеток, обработанных ФНО, к intactным клеткам. Клетки на стекле-индукторе обрабатывали ФНО (10 нг/мл) и эметинем (1 мМ) в течение 3 ч. Затем стекло промывали и помещали рядом со стеклом, на котором росли клетки-реципиенты на 17 ч. Апоптозные клетки выявляли по изменению морфологии ядер (конденсация и фрагментация хроматина) после окраски Hoechst 33342. Стрелками показана область контакта двух стекол.

передающегося от погибающих клеток к соседним клеткам и способного вызывать их гибель. Для проверки гипотезы о передаче сигнала гибели апоптозными клетками была разработана методика, в которой были исключены прямые межклеточные контакты. Клетки-индукторы и клетки-реципиенты растили на двух разных стеклах в разных чашках (рис. 8). Далее одно из стекол обрабатывали агентом, индуцирующим апоптоз, и после инкубации и промывки помещали рядом с другим стеклом в общую чашку Петри.

В первой части работы апоптоз клеток-индукторов вызывали, добавляя H_2O_2 в среду роста. После промывки клетки-индукторы совмещали с клетками-реципиентами в среде, содержавшей ингибитор каталазы, аминотриазол. В этих условиях после 18 ч совместной инкубации наблюдался значительный апоптоз в клетках-реципиентах (рис. 9). Добавление 20 нМ митохондриально направленного антиоксиданта МитоQ к клеткам-реципиентам, а также в процессе совместной инкубации предотвращало передачу сигнала апоптоза, не влияя на гибель клеток-индукторов. Поскольку, как было показано выше, МитоQ предотвращает апоптоз

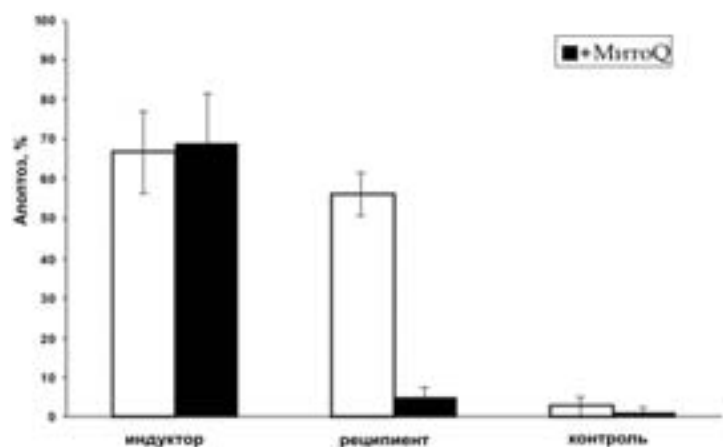


Рис. 9 Передача сигнала апоптоза от клеток, обработанных H_2O_2 . Клетки HeLa обрабатывали 50 μM H_2O_2 3 раза с интервалом в 1 ч и промывали. Клетки-реципиенты совмещали с клетками-индукторами на 8 ч. В среде присутствовал аминотриазол (7 мМ). МитоQ (20 нМ) был добавлен к клеткам-реципиентам за 1 ч до совмещения стекол и затем присутствовал в течение 18 ч совместной инкубации (черные столбики).

вызванный H_2O_2 , эти данные указывают на то, что именно H_2O_2 является сигнальной молекулой в этой модели.

Далее мы использовали другой индуктор клеточной гибели - фактор некроза опухоли (ФНО). На **рисунке 10** показаны результаты опыта, в котором клетки-индукторы инкубировали 3ч с ФНО в комбинации с ингибитором синтеза белка, эметином (необходимым для предотвращения экспрессии антиапоптозных белков при ФНО-зависимой активации фактора транскрипции NF- κB), промывали, помещали рядом с клетками-реципиентами и продолжали инкубацию в течение 17ч. Что бы исключить возможный эффект перераспределения молекул ФНО между стеклами, совместную инкубацию проводили в присутствии моноклональных антител к ФНО (**рис. 10**). Антитела не препятствовали гибели клеток-реципиентов, что позволяет исключить возможность передачи сигнала между стеклами с помощью ФНО.

Предположение об участии перекиси водорода в передаче апоптозного сигнала было подтверждено в опытах с каталазой. Добавление в среду инкубации этого фермента, специфически разлагающего H_2O_2 , эффективно подавляло апоптоз клеток на стекле-реципиенте (**рис. 10**) и при этом не влияло на апоптоз клеток на стекле-индукторе. При повышении концентрации каталазы

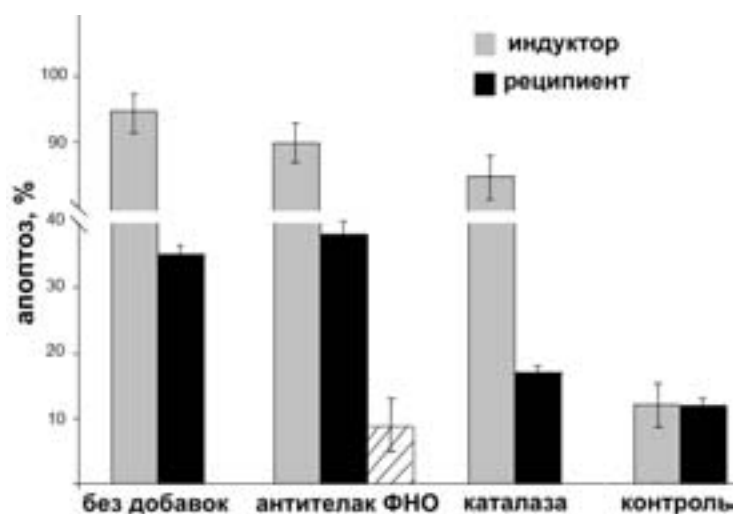


Рис. 10 Передача сигнала апоптоза от клеток, обработанных ФНО, к интактным клеткам. Моноклональные антитела к ФНО (700 нг/мл) были добавлены одновременно с ФНО (штрихованный столбик) или после совмещения стекол. Каталаза (2500 Е/мл) была добавлена в среду инкубации при совмещении стекол. Клетки обрабатывали ФНО как описано на **рис. 8**.

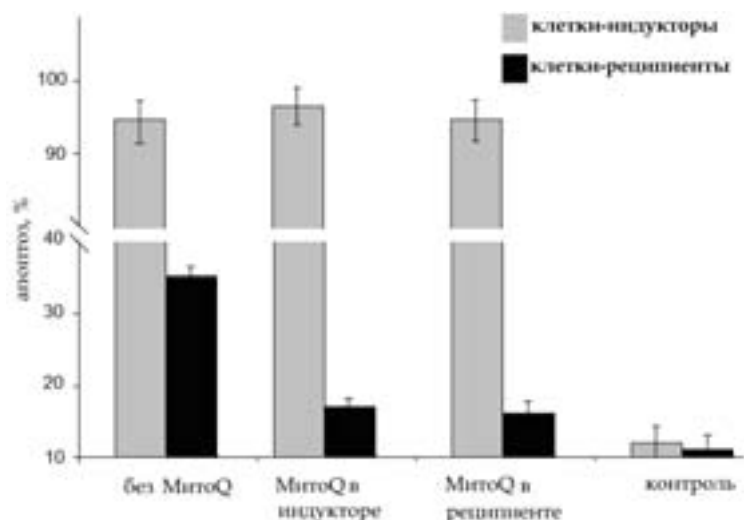


Рис. 11 Передача сигнала апоптоза от клеток, обработанных ФНО, к intactным клеткам. Клетки обрабатывали как на **рис. 8**. Клетки (индукторные или реципиентные) инкубировали с МитоQ как описано на **рис. 2**. Апоптоз определяли через 24 ч после совмещения стекол.

наблюдалось небольшое (не более чем в 2 раза) снижение апоптоза на стекле-индукторе.

Для проверки возможной роли митохондрий в продукции H_2O_2 при передаче апоптозного сигнала был использован антиоксидант МитоQ. В эксперименте, представленном на **рисунке 11**, клетки на стекле-индукторе или на стекле-реципиенте были преинкубированы 20 нМ МитоQ. Показано, что передача сигнала апоптоза была подавлена, как при преинкубации с МитоQ индуктора так и реципиента. В то же время, МитоQ практически не влиял на развитие ФНО - зависимого апоптоза на стекле индукторе.

Измерения уровня H_2O_2 в среде инкубации показали его заметное повышение через 1-4,5 ч после совмещения стекол (**рис. 12 А**). Это повышение наблюдалось несмотря на высокую скорость разложения H_2O_2 в присутствии клеток (**рис. 6**). Уровень H_2O_2 , измеренный в среде после

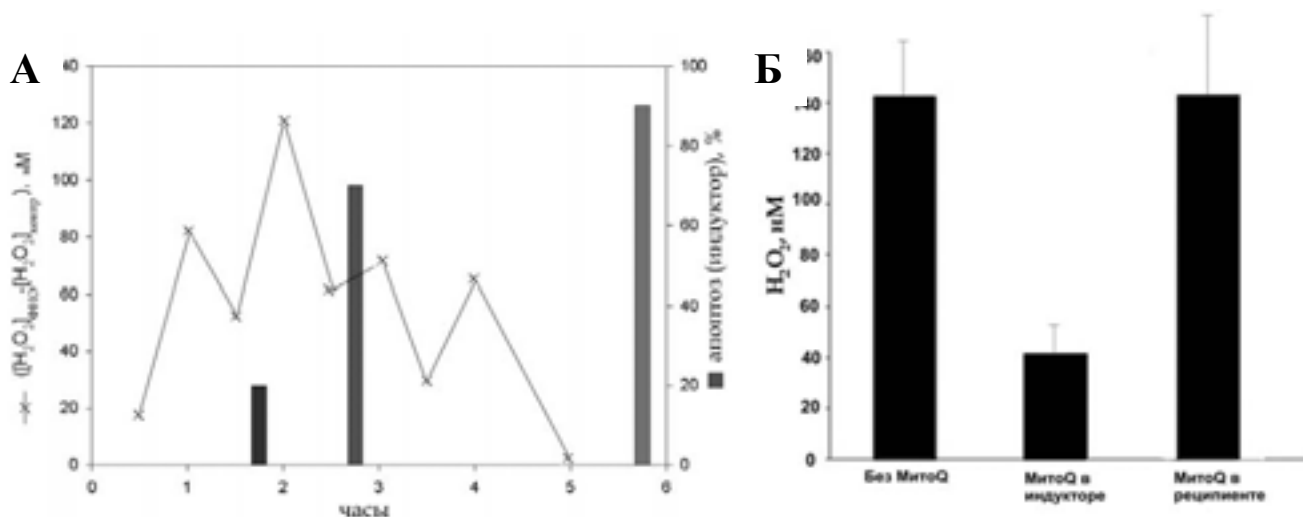


Рис. 12 (А) Концентрация H_2O_2 в среде (за вычетом уровня H_2O_2 в контроле) и содержание апоптозных клеток на стекле с клетками-индукторами (черные колонки) при различных сроках совместной инкубации. **(Б)** Концентрация H_2O_2 в среде роста клеток инкубированных с МитоQ как описано на **рис.2**. Клетки обрабатывали ФНО как на **рис. 8**. Измерения содержания H_2O_2 в среде проводили флуориметрически используя в качестве индикатора Amplex Red и пероксидазу хрена. Данные получены совместно с М.Ю. Высоких.

24 ч совместной инкубации клеток индукторов и реципиентов, был значительно ниже в том случае, если индукторные клетки были обработаны МитоQ. Если же обработке подвергались лишь реципиентные клетки, то уровень H_2O_2 практически не отличался от контрольного (**рис. 12 Б**). Полученные данные позволяют предполагать, что основным фактором передачи сигнала о гибели между клетками является H_2O_2 , которая генерируется с участием митохондрий. Проникая в клетку, H_2O_2 вызывает накопление активных форм кислорода (АФК) при участии митохондрий и эти «вторичные» АФК, в свою очередь, инициируют апоптоз (**рис. 13**).

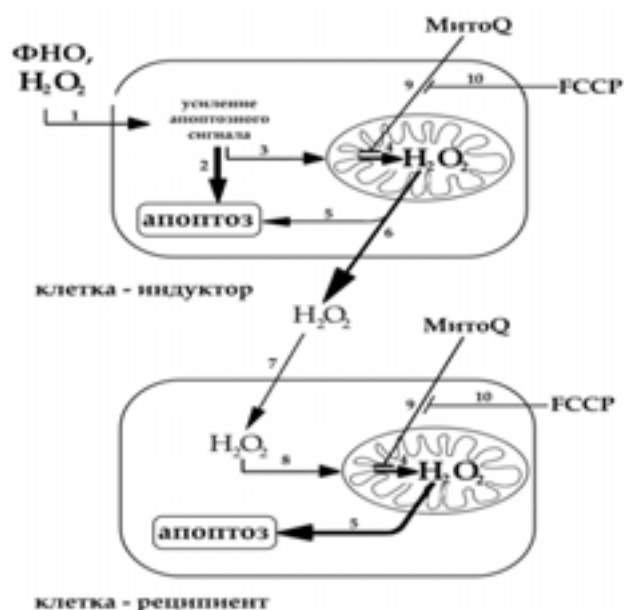


Рис. 13 Схема, иллюстрирующая пути генерации H_2O_2 и ее участия в передаче и восприятии апоптозного сигнала. Предполагается, что в процессе апоптоза (вызванного, например, ФНО или H_2O_2) в клетках-индукторах (**стадии 1-3**) происходит генерация H_2O_2 внутри митохондрий (**стадия 4**). В цитозоле клетки H_2O_2 усиливает апоптозные процессы (**стадия 5**), а, выйдя во внеклеточную среду (**стадия 6**) атакует клетку-реципиент (**стадия 7**). В клетке-реципиенте H_2O_2 проникает в митохондрии (**стадия 8**) и стимулирует в них продукцию H_2O_2 (процесс, аналогичный **стадии 4**), что приводит к развитию апоптоза (аналогично **стадии 5**). МитоQ ингибирует продукцию H_2O_2 в митохондриях (**стадия 9**). Разобщитель окислительного фосфорилирования FCSР предотвращает накопление МитоQ в митохондриях и его защитное действие (**стадия 10**).

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ВЫЗЫВАЕТ ДРОБЛЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РЕТИКУЛУМА.

Слияние митохондрий в единую сеть позволяет использовать её в качестве внутриклеточного электрического кабеля, передающего энергию в виде мембранного потенциала с периферии клетки, где уровень кислорода, необходимого для дыхания, относительно высок, к центральной части клетки, где потребность в окислительных метаболитах и АТФ особенно

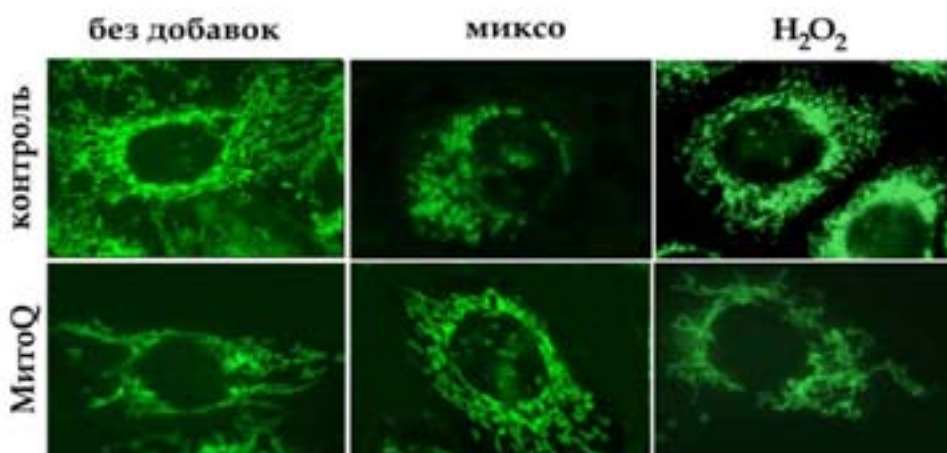


Рис. 14 Фрагментация митохондриального ретикулума клеток HeLa под действием миксотиазола (2 μ M, 17 часов) и H_2O_2 (50 μ M, 5 часов). Защитный эффект МитоQ (клетки обрабатывали МитоQ как на **рис. 2**). Митохондрии визуализированы методом трансфекции плазмидой кодирующей зелёный флуоресцентный белок слитый с митохондриальным адресом 8 субъединицы цитохромоксидазы (Mito-EYFP).

высока. Митохондриальная сеть является динамической структурой, чувствительной к различным воздействиям.

Было показано, что фрагментация митохондриального ретикулума под действием H_2O_2 наступает через 4-5 часов после воздействия (рис. 14). Эта фрагментация значительно усиливается, если клетки одновременно с H_2O_2 обработать ингибиторами дыхания миксотиазолом или пирицидином (рис. 15). Сами по себе пирицидин и миксотиазол также вызывали фрагментацию митохондрий, но значительно более слабую: фрагментация наблюдалась лишь через 15-17 часов после добавки ингибиторов. Эти данные согласуются с результатами, полученными при измерении уровня окислительного стресса, вызываемого действием H_2O_2 , миксотиазола, пирицидина или комбинацией H_2O_2 с пирицидином или миксотиазолом.

Предположение о том, что фрагментация митохондриального ретикулума зависит от продукции АФК митохондриями, было проверено с помощью митохондриально направленного антиоксиданта МитоQ. Длительная инкубация клеток HeLa с 20 нМ МитоQ предотвращала фрагментацию митохондрий как под действием ингибиторов дыхательной цепи миксотиазола и пирицидина (не показано) так и под действием H_2O_2 (рис. 15).

Полученные результаты позволяют предположить, что фрагментация митохондрий, вызванная как ингибиторами дыхания, так и H_2O_2 опосредована повышением уровня АФК генерируемых дыхательной цепью митохондрий. Чем выше уровень генерации АФК митохондриями, тем более интенсивно идет процесс их фрагментации.

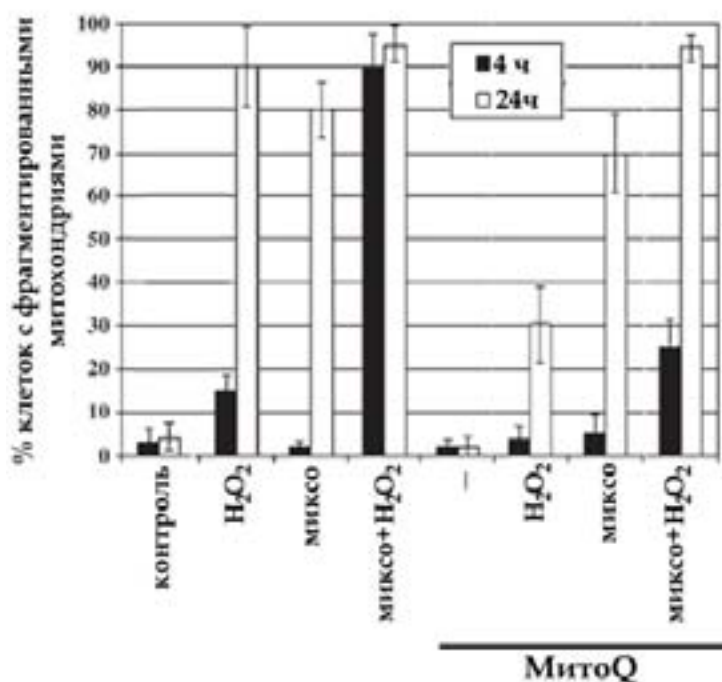


Рис. 15 Миксотиазол усиливает дробление митохондриального ретикулума вызванное H_2O_2 . Защитное действие 20 нМ МитоQ. Клетки HeLa инкубировались с миксотиазолом (Мухо, 2 μ M) или H_2O_2 (50 μ M) в течение 4 часов (черные столбики) или 24 часов (белые столбики). Клетки обрабатывали МитоQ как на рис.2 Представлены результаты трёх независимых экспериментов.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ВЫЗВАННЫЙ ПОВРЕЖДЕНИЕМ МИТОХОНДРИЙ, ПРИВОДИТ К ИХ ДЕГРАДАЦИИ

Фрагментация митохондрий при окислительном стрессе, вероятно, является самым ранним

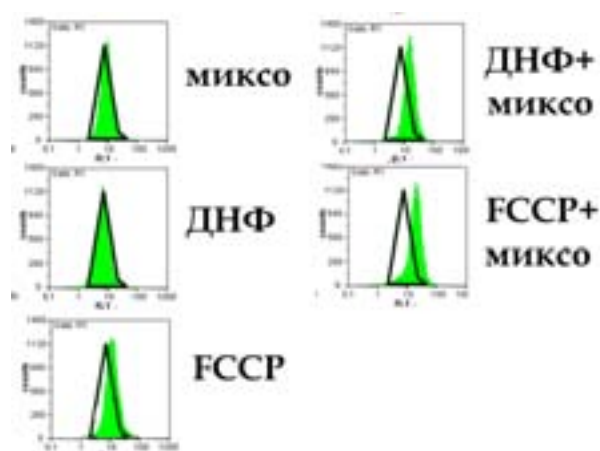


Рис. 16 Разобщители окислительного фосфорилирования усиливают окислительный стресс в клетках HeLa. Клетки обрабатывали миксотиазолом (2 μ M), ДНФ (0,4 мМ), FCCP (10 μ M) в течение 1 часа, затем промывали, инкубировали с DCF-DA (4 μ M, 15 минут) и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра.

фосфорилирования ДНФ или FCCP, то это приводило к усилению окислительного стресса в клетках (рис. 16), ускорению фрагментации митохондрий, их кластеризации и деградации

этапом программы направленной на защиту клетки от митохондрий с поврежденными функциями и служит для предотвращения повреждения всех митохондрий слитых в единую сеть. Окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода или ингибиторами дыхательной цепи, приводил к обратимой фрагментации митохондрий. Даже длительная инкубация в этих условиях не вызывала дальнейших изменений морфологии митохондрий. Отмывка клеток от ингибиторов дыхания или H_2O_2 приводила к восстановлению митохондриальной сети через 17-24 ч. Если усилить повреждение митохондрий, вызванное ингибиторами дыхания, с помощью разобщителей окислительного

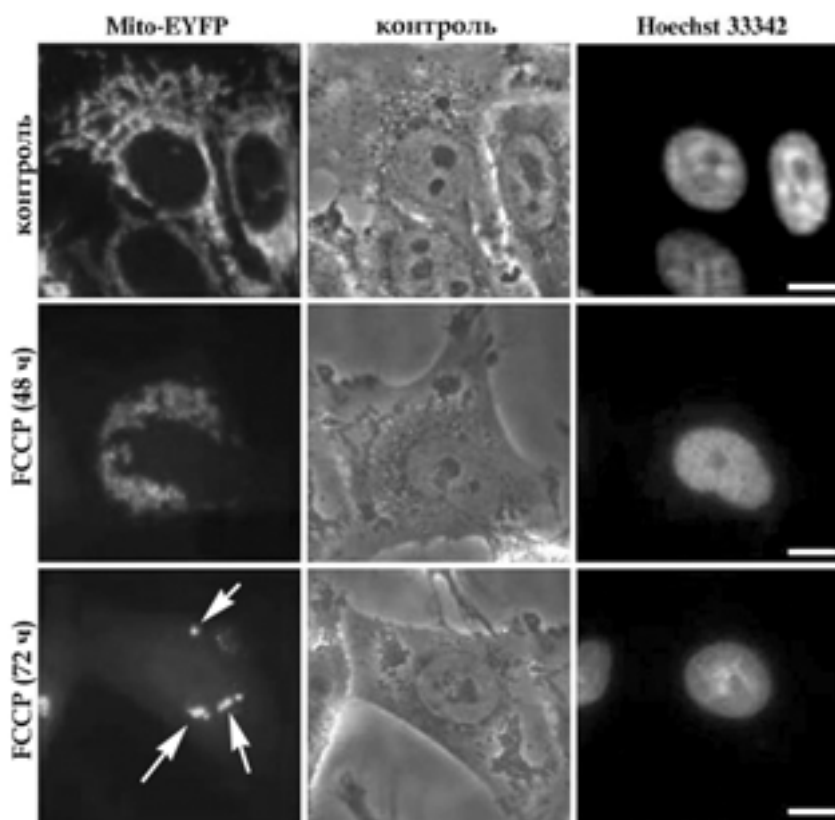


Рис. 17 Изменение морфологии митохондриального ретикулума при длительной инкубации с FCCP (10 μ M) Митохондрии в клетках HeLa были визуализированы, используя плазмиду Mito-EYFP. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342. Стрелками указаны кластеры митохондрий. Масштаб 15 мкм.

(рис.17). Стимуляция разобщителями деградации митохондрий указывает на то, что для запуска механизма деградации необходимо не только повреждение дыхательной цепи митохондрий, но и снижение их мембранного потенциала. Сами по себе разобщители также могут вызывать деградацию митохондрий, но их комбинация с ингибиторами дыхания значительно ускоряют этот процесс. ДНФ оказался менее эффективен в качестве индуктора окислительного стресса и деградации митохондрий, по сравнению с FCCP. Вероятно, это связано с тем, что в используемой концентрации FCCP уже начинает ингибировать дыхание клеток HeLa.

Инкубация клеток в течение 48-72 часов с ингибиторами дыхательной цепи в сочетании с разобщителями приводила к гибели 50-70% клеток. Оставшиеся в живых клетки, морфологически практически не отличались от контрольных, имели нормальную структуру ядра и не проявляли признаков апоптоза (таких как переселение белка BAX из цитозоля в митохондрии и выход цитохрома C в цитозоль) (рис. 18). Митохондрии в клетках окрашивали разными способами: антителами к цитохромоксидазе (внутренняя мембрана митохондрий), к цитохрому C (белку локализованному в межмембранном пространстве), красителем митотракером зелёным, избирательно окрашивающим митохондрии независимо от мембранного потенциала; клетки также трансфецировали плазмидой кодирующей зелёный флуоресцентный белок, слитый с митохондриальным адресом восьмой субъединицы цитохромоксидазы (Mito-EYFP). Во всех случаях кластеры митохондрий в клетках обработанных разобщителями и ингибиторами дыхательной цепи были отлично видны.

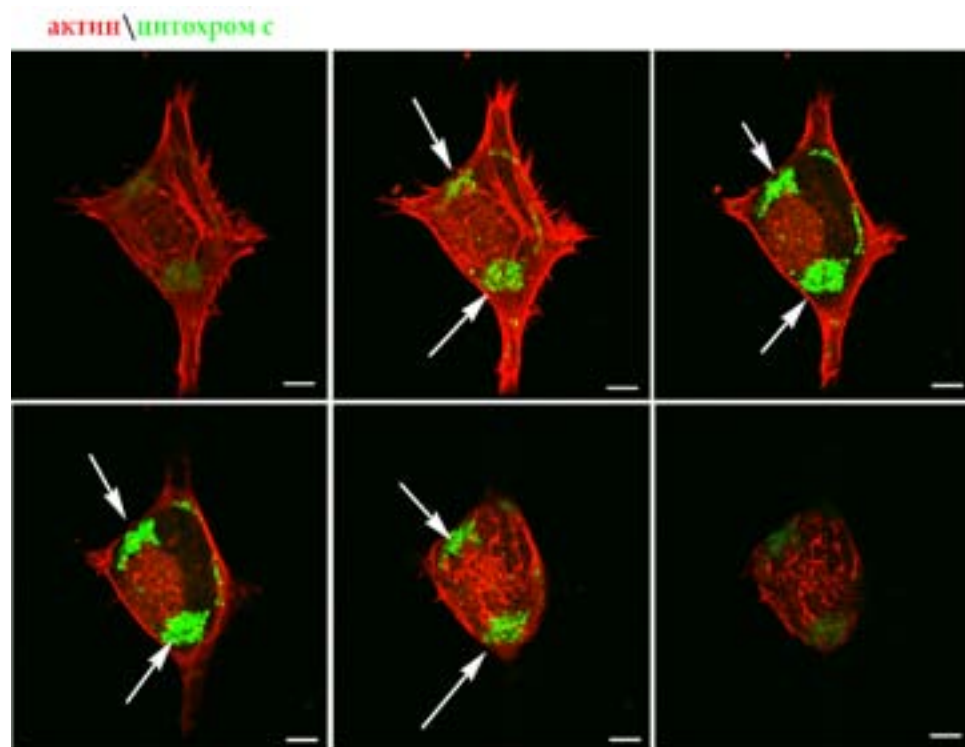


Рис. 18 Структура актиновых филаментов и локализация митохондрий в клетках HeLa в процессе митоптоза. Клетки обрабатывали FCCP (10 μ M) в течение 96 ч, затем отмывали и культивировали 48 ч в среде без ингибиторов. Фотографии получены, используя конфокальный микроскоп LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). Оптические срезы расположены последовательно, начиная от подложки и заканчивая верхом клетки. Стрелками указаны кластеры митохондрий расположенные вокруг ядра. Срезы сделаны через каждые 10 мкм. Масштаб 15 мкм.

На **рисунке 18** показана серия оптических срезов клетки HeLa окрашенной на актин с помощью фаллоидина, меченного TRITC (красный), а также антителами к цитохрому C (зеленый). Видно, что структура актинового цитоскелета остается нормальной даже через 96 часов инкубации с митохондриальными ядами, в условиях, когда митохондрии в клетке сильно

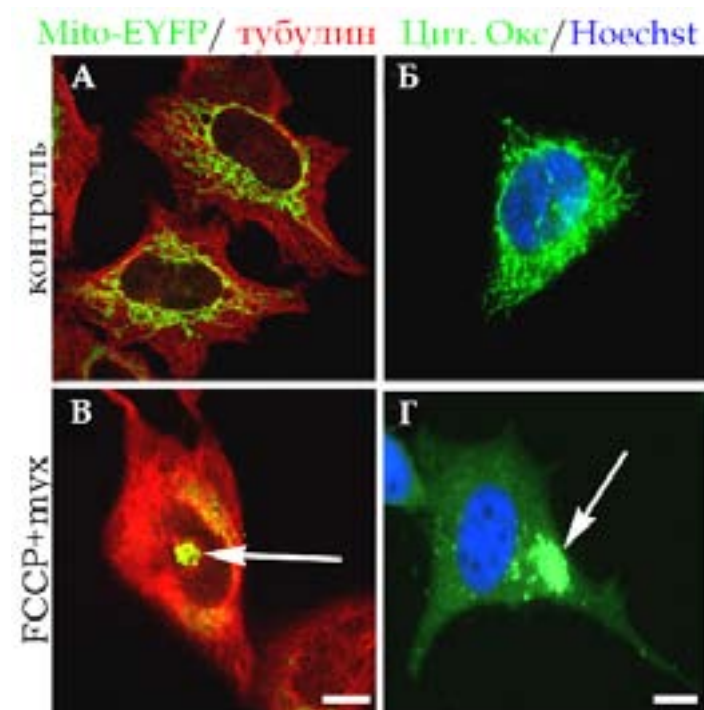


Рис. 19 Структура митохондрий и системы микротрубочек после длительной инкубации с FCCP и миксотиазолом. Митохондрии визуализированы с помощью плазмиды Mito-EYFP (А,В) или антител к цитохромоксидазе (Б,Г). Микротрубочки окрашены антителами к тубулину. Ядра окрашены Hoechst 33342. Клетки инкубировались 96 часов в присутствии 10 μ M FCCP и 2 μ M миксотиазола (В,Г) или без добавок (А,Б). Стрелками указаны кластеры митохондрий. Масштаб 15 мкм.

аутофагия участвует в селективной деградации митохондрий в клетках претерпевающих апоптоз, а также в случае фотодинамического повреждения митохондрий. В наших экспериментах было показано, что инкубация клеток с FCCP и антимицином вызывает накопление как лизосом, так и аутофагосом. Несмотря на повышение общего уровня аутофагии в клетке, мы не обнаружили колокализацию митохондриального материала с аутофагосомами. Кроме того, на электронных микрофотографиях клеток HeLa, подвергнутых действию разобщителей и ингибиторов дыхания, также не было обнаружено аутофагии митохондрий.

На рисунках (20 А-Ж) показаны ультратонкие срезы клеток HeLa обработанных ДНФ и антимицином. Рис 20 А иллюстрирует нормальное распределение митохондрий в контрольных клетках HeLa. После 3 дней обработки ДНФ и антимицином клетки теряют свои митохондрии, на рисунке 20 Б показан типичный срез клетки, в котором митохондрии не обнаруживаются.

деградированы. Тубулиновый цитоскелет также не нарушается (рис. 19). Эксперименты показали, что ингибирование актинового цитоскелета (с помощью цитохалазина) не оказывает влияния на кластеризацию митохондрий, а разрушение тубулинового цитоскелета (с помощью коллемеида) даже ускоряет этот процесс. Таким образом, механизм кластеризации митохондрий, по-видимому, отличается от сборки «аггросом», состоящих из непереваренных продуктов протеасомной деградации, в которой цитоскелет принимает активное участие.

Одним из возможных механизмов селективной деградации митохондрий может быть аутофагия. Известно, что с помощью этого механизма происходит регуляция количества и качества клеточных органелл. В ряде случаев было показано, что

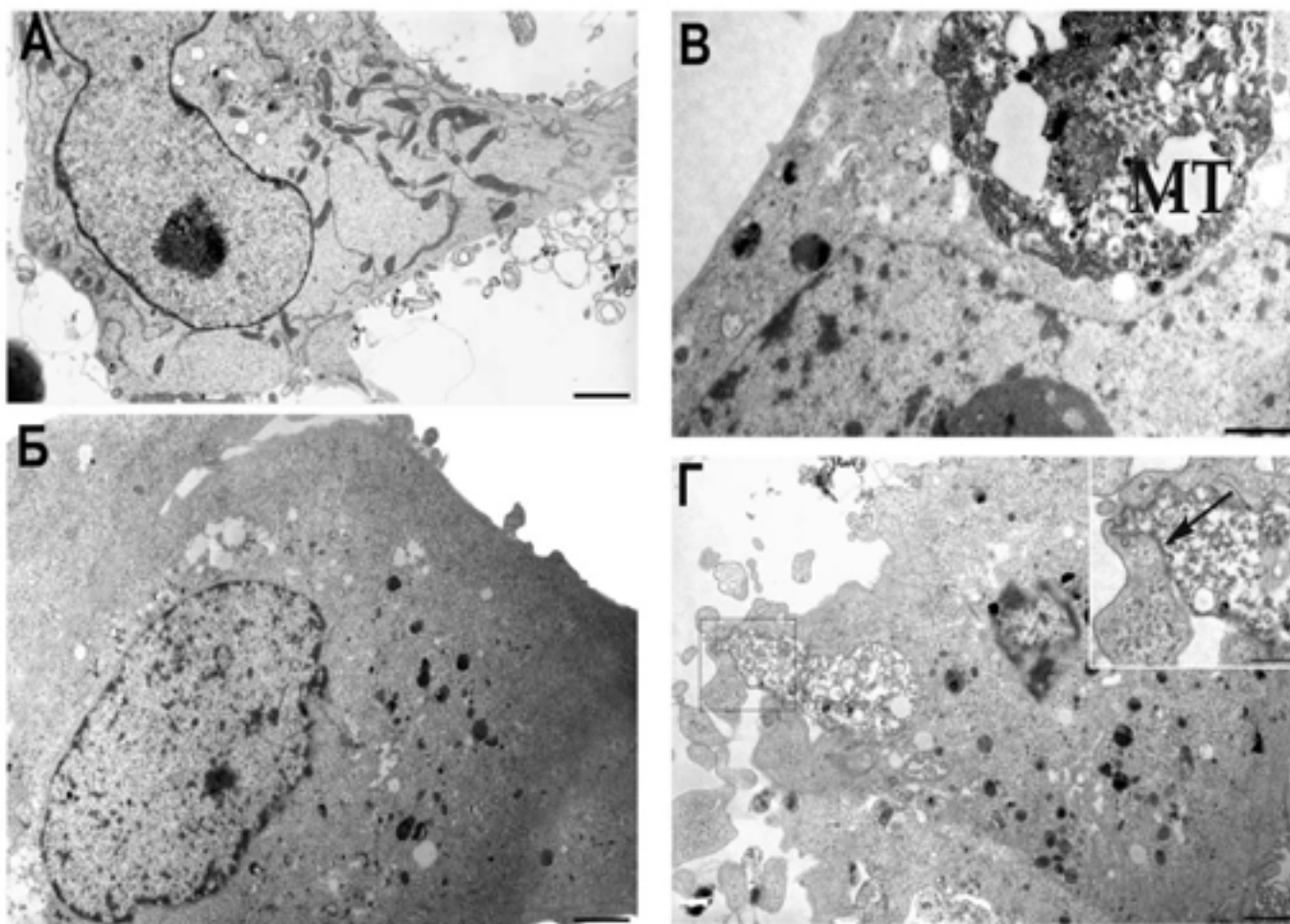


Рис. 20 Фотографии, полученные с помощью электронной микроскопии. Контрольные клетки (А) и клетки обработанные 3 дня ДНФ (0,4 mM) и 2 μM антимицина А (Б) или 2 μM миксотиазола (В, Г).

Митоптотическое тельце (МТ) располагается рядом с ядром (В) не контактируя с внешней клеточной мембраной. На рисунке Г стрелкой показан плотный контакт мембраны митоптотического тела с плазматической мембраной клетки. Масштаб 1 μm (А,Б), 0,5 μm (В-Е) и 0,2 μm для вырезанной секции рисунка Г. Фотографии получены совместно с В.Б. Сапруновой и Л.Е. Бакеевой.

С другой стороны, в ряде случаев в районе ядра видны образования окруженные мембраной и наполненные сферическими везикулами диаметром 50-200 нм, а также другим электронно-плотным материалом (рис. 20 В). В.П. Скулачевым подобное образование было названо митоптотическим тельцем. Когда митоптотическое тельце контактирует с внешней средой, плотность его содержимого резко снижается (рис. 20 Г).

На рисунке 20 Г видно, что содержимое митоптотического тельца отделено от внешней среды одной мембраной, причем в некоторых местах виден плотный контакт мембраны митоптотического тельца с внешней клеточной мембраной. В других случаях данный контакт отсутствует, и митоптотическое тельце выглядит как большая экзосома окружённая одной мембраной. Мембрана митоптотического тельца довольно нестабильна и при контакте с внешней средой может разрушаться, в этом случае её содержимое свободно выходит в среду.

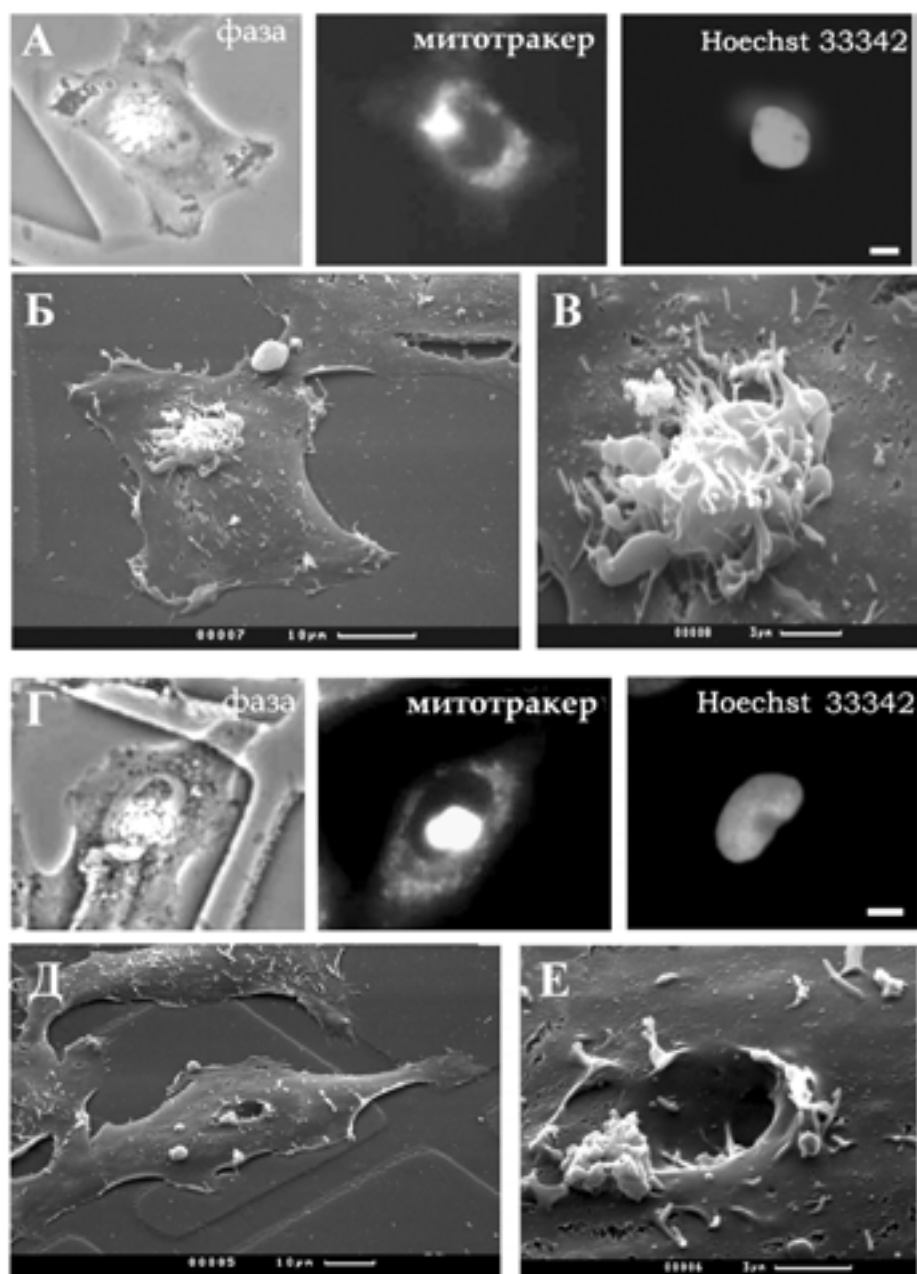


Рис. 21 Фазовый контраст, флуоресцентная микроскопия и сканирующая электронная микроскопия клеток обработанных в течении 96 ч ДНФ (0,4 mM) и антимицином (2 μM). Митоптическое тельце ярко окрашено митотракером зелёным и отчетливо видно на фазовом контрасте (А,Г). (А-В) Клетка с митоптическим тельцем на поверхности (В) структура митоптического тельца при большем увеличении (Г-Е) В эксперименте проведённом в тех же условиях на клетке виден «кратер», оставшийся после того как митоптозное тело отделилось в процессе фиксации препарата. Структура «кратера» при большей увеличении (Е). Масштаб 15 мкм (А,Г) , 10 мкм (Б,Д), 3 мкм (В,Е)

В другой серии экспериментов проводились наблюдения за одной и той же клеткой, используя флуоресцентную и электронную микроскопию. Митохондрии в клетках, обработанных ДНФ в комбинации с антимицином, окрашивались митотракером зеленым, находили клетку с митоптическим телом и далее фиксировали её для электронной микроскопии. Электронная микроскопия показала наличие в зоне, ярко окрашиваемой митотракером зеленым, большого количества сферических мембранных везикул иногда имеющих электронно-плотные включения и везикулы маленького диаметра. Это позволило заключить, что митоптическое тельце заполнено митохондриальным материалом. Подобные же структуры окрашиваются антителами к цитохрому С, к цитохромоксидазе и к порину (белку внешней мембраны митохондрий), а следовательно все компартменты митохондрий, по-видимому, входят в состав митоптического тельца.

Результаты экспериментов с использованием фазового контраста, флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии для наблюдения за одной и той же клеткой показаны на

рисунке 20. Сканирование клетки с митоптотическим телом показало, что митоптотическое тело имеет крайне неровную, бугристую поверхность и сильно выпячивается из клетки (**рис. 20 В**). В другом эксперименте, показанном на рисунке **20 Г-Е** в процессе фиксации препарата большая часть митоптотического тела была потеряна, а на его месте видна большая выемка на внешней поверхности клетки (**рис. 20Г**). Полученные результаты указывают на то, что в клетках HeLa в условиях, когда биоэнергетические функции митохондрий нарушены, реализуется эффективный способ защиты клетки, связанный с выбрасыванием поврежденных митохондрий в межклеточное пространство.

В последней серии экспериментов мы исследовали, что случится с клетками, которые избавились от своих митохондрий, в среде роста без ингибиторов дыхания и разобщителей. После четырехдневной инкубации с ингибиторами в выживших клетках практически не обнаруживалось митохондриального материала и лишь изредка наблюдались мелкие плотные кластеры митохондрий. После двухнедельной инкубации в среде, не содержащей ингибиторов, клетки полностью восстанавливают структуру митохондриального ретикулума. Вероятно, несмотря на массовый митоптоз, индуцированный митохондриальными ядами, в клетке может оставаться небольшой «неприкосновенный» запас митохондрий, благодаря которому клетка может восстановить свои митохондрии.

ВЫВОДЫ

- 1) В условиях окислительного стресса, вызванного H_2O_2 , в клетках происходит генерация АФК в митохондриях. Основным источником АФК, вероятно, является флавиновый компонент комплекса I дыхательной цепи. Митохондриальная продукция АФК вызывает апоптотическую гибель клеток.
- 2) Апоптоз, вызванный ФНО или H_2O_2 , сопровождается образованием H_2O_2 при участии митохондрий. Выход H_2O_2 в среду служит сигналом, вызывающим гибель соседних клеток. Основной мишенью для H_2O_2 в этих клетках также служат митохондрии.
- 3) Ингибиторы дыхания и H_2O_2 , стимулируют фрагментацию митохондриального ретикулума. Фрагментация митохондрий опосредована повышением уровня АФК, генерируемых дыхательной цепью и может быть обратима.
- 4) Митохондриально-направленный антиоксидант МитоQ, предотвращает накопление АФК, фрагментацию митохондрий и гибель клеток при окислительном стрессе.
- 5) Повышенная продукция АФК митохондриями в сочетании с падением мембранного потенциала вызывает фрагментацию, кластеризацию и деградацию митохондрий (т. н. митоптоз). Основным механизмом митоптоза в этих условиях является выбрасывание митохондрий из клетки, вероятно, путём экзоцитоза. Предполагается, что митоптоз является

механизмом защиты клеток от окислительного стресса и гидролиза АТФ, вызванного нарушением биоэнергетических функций митохондрий.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

- 1) Pletjushkina O.Y., Lyamzaev K.G., Popova E.N., Nepryakhina O.K., Ivanova O.Y., Domnina L.V., Chernyak B.V., Skulachev V.P. «*Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum*». **Biochim Biophys Acta.**, **2006**;1757, 518-24.
- 2) Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W., Skulachev V.P. «*Production of reactive oxygen species in mitochondria of hela cells under oxidative stress*» **Biochim Biophys Acta.**, **2006**;1757, 525-34.
- 3) Плетюшкина О.Ю., Фетисова О.Ю., Лямзаев К.Г., Иванова О.Ю., Домнина Л.В., Високих М.Ю., Пустовидко А.В., Алексеевский А.В., Алексеевский Д.А., Васильев Ю.М., Марфи М.П., Черняк Б.В., Скулачев В.П. «*Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке*» **Биохимия**, **2006**, 71, №2, 75-82.
- 4) Pletjushkina O.Y., Fetisova E.K., Lyamzaev K.G., Ivanova O.Y., Domnina L.V., Vyssokikh M.Y., Pustovidko A.V., Vasiliev J.M., Murphy M.P., Chernyak B.V., Skulachev V.P. «*Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion*» **Cell Death Differ.**, **2005**, 12, 1442-4.
- 5) Черняк Б.В., Плетюшкина О.Ю., Изюмов Д.С., Лямзаев К.Г., Аветисян А.В. «*Биоэнергетика и смерть*», **Биохимия**, **2005**, 70, №2, 294-301.
- 6) Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Y., Saprunova V.B., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Skulachev V.P. «*Selective elimination of mitochondria from living cells induced by inhibitors of bioenergetic functions*» **Biochem. Soc. Trans.**, **2004**, 32, 1070-1
- 7) Lyamzaev K.G., Izyumov D.S., Avetisyan A.V., Yang F., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V. «*Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis*» **Acta Biochim Pol.**, **2004**, 51, 553-62.
- 8) Изюмов Д.С., Лямзаев К.Г., Аветисян А.В., Плетюшкина О.Ю., Черняк Б.В. «*Индукция апоптоза митохондриальными ингибиторами*» Международная конференция “Рецепция и внутриклеточная сигнализация”, ПУЩИНО, 16-18 июня, **2003**, стр165.
- 9) Pletjushkina O.Yu., Lyamzaev K.G., Izyumov D.S., Bakeeva L.E., Saprunova L.V., Chernyak B.V., Skulachev V.P. «*Selective elimination of mitochondria (“mitoptosis”) induced by the inhibitors of respiration and uncouplers*». 29th Meeting of the Federation of the European Biochemical Societies, WARSAW, POLAND, 26 June – 1 July. , **2004**, p.56
- 10) Pletjushkina O. Yu, Lyamzaev K. G., Saprunova V. B., Bakeeva L. E., Fuyu Y., Chernyak B. V., Skulachev V. P. «*Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis*». 29th Meeting of the Federation of the European Biochemical Societies. WARSAW, POLAND, 29 June-1 July., **2004**, p. 136
- 11) Chernyak B.V., Izyumov D.S., Avetisyan A.V., Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P. «*Inhibitors of mitochondrial bioenergetics in studies on structure of mitochondria in the cell, oxidative stress and apoptosis*» 13th European Bioenergetics Conference August 21-26, PISA, ITALY, **2004**, 2D,p.5
- 12) Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Y., Saprunova V.B. Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Skulachev V.P. «*Selective elimination of mitochondria from living cell induced by inhibitors of bioenergetic functions*» BioScience2004 – from molecules to organisms, SECC, GLASGOW, UK 18-22 July, **2004**, p.186
- 13) Skulachev V.P., Fetisova E.K., Pletjushkina O.Yu., Lyamzaev K.G., Ivanova O.Yu., Domnina L.V., Vyssokikh M.Yu., Pustovidko A.V., Alexeevsky A.A., Alexeevsky D.A., Vasiliev J.M., Murphy M.P., Chernyak B.V. «*Hydrogen peroxide, a long-distance apoptotic signal*» 12th Euroconference on Apoptosis. CHANIA, GREECE, September 17-20, **2004**, p. 156

- 14) Lyamzaev K.G., Domnina L.V., Ivanova O.Yu., Skulachev I.V. Chernyak B.V., Pletjushkina O.Yu. «*Fragmentation of mitochondrial network could be induced by reactive oxygen species produced by respiratory chain*» 13th Euroconference on Apoptosis, BUDAPEST, HUNGARY, 1-4 October, 2005
- 15) Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Yu. «*Mitochondria are involved in development of oxidative stress*» 14th Euroconference on Apoptosis, CHIA, SARDINIA, Italy 29-September-4 October, 2006
- 16) Pletjushkina O.Yu., Lyamzaev K.G., Popova E., Nepryakhina O., Ivanova O.Yu., Domnina L.V., Chernyak B.V. «*Reactive oxygen species affects structural and functional unity of mitochondrial network*» 14th Euroconference on Apoptosis, CHIA, SARDINIA, Italy 29-September-4 October, 2006
- 17) Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Yu., Chernyak B.V. «*Selective elimination of mitochondria in HeLa cells during prolong treatment with mitochondrial inhibitors*» 14th European Bioenergetics Conference, MOSCOW, RUSSIA, July 22-27, 2006, p.521
- 18) Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Yu., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W., Skulachev V.P. «*Production of reactive oxygen species in mitochondria of Hela cells under oxidative stress*» 14th European Bioenergetics Conference, MOSCOW, RUSSIA, July 22-27, 2006, p.118
- 19) Pletjushkina O.Yu., Lyamzaev K.G., Popova E., Nepryakhina O., Ivanova O.Yu., Domnina L.V., Chernyak B.V. «*Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum*» 14th European Bioenergetics Conference, MOSCOW, RUSSIA, July 22-27, 2006, p.126
- 20) Nepryakhina O., Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Yu., Skulachev I.V., Domnina L.V., Ivanova O.Yu., Chernyak B.V. «*Intramitochondrial reactive oxygen species are important for dynamics of mitochondrial reticulum in living cells*» 14th European Bioenergetics Conference, MOSCOW, RUSSIA, July 22-27, 2006, p.526