

На правах рукописи

Крицкая Кристина Андреевна

**Исследование динамики митохондриальной сети в
моделях клеточного стресса**

1.5.22. — Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Пушино 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Бережнов Алексей Валерьевич

Официальные оппоненты: **Плотников Егор Юрьевич**, доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, лаборатория структуры и функции митохондрий, заведующий лабораторией (г. Москва)

Дубинин Михаил Васильевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», кафедра биохимии, клеточной биологии и микробиологии, доцент кафедры (г. Йошкар-Ола)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится _____ 2024 года в _____ ч _____ мин на заседании диссертационного совета **24.1.232.01** (Д 002.285.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета 24.1.232.01
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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).

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 воздействии 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 pH 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 – омавелоксолон 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 современные 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 Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН). Все работы с животными и клеточными культурами были одобрены Комитетом по биоэтике ФИЦ ПНЦБИ РАН и проводились в соответствии с Законом №708н (23 августа 2010 г.) Минздрава РФ и с международно-правовыми нормами указанных 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 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 BT-474 имеют разную чувствительность к индукции апоптоза в зависимости от доли деполаризованных 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 митохондриальную функцию и защищают клетки в условиях стресса.

Степень достоверности полученных результатов. Научные положения и выводы, представленные в работе, опираются на теоретический анализ и экспериментальные данные. Предоставленные результаты подтверждены с использованием современных 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 прямом участии автора. Научные положения и выводы исследования основываются на данных, собранных автором через его непосредственное 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 квартиля **Q1** в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и международные базы данных (Scopus, Web of Science).

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).

Структура и объём диссертации. Диссертация имеет классическую структуру и включает введение, обзор литературы, методологическую часть, результаты, обсуждение и заключение. Диссертация изложена на 113 страницах, содержит 26 рисунков. Библиографический список содержит 214 источников литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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, мышинные фибробласты L929. **Методы исследования.** *Измерения продукции активных форм кислорода.* Для детекции активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме клетки инкубировали с флуоресцентным индикатором H_2DCFDA в концентрации 10 мкМ на протяжении 40 минут, после этого клетки промывали раствором Хэнкса. *Измерение потенциала митохондриальной мембраны.* Для оценки митохондриального мембранного потенциала применяли флуоресцентный краситель тетраметилродамин метиловый эфир (TMRM). *Выживаемость клеток.* Оценивали с использованием метода двойного окрашивания с 5 мкМ Hoechst 33342 и 20 мкМ Propidium Iodide в буфере Хэнкса в течение 45 мин при комнатной температуре. *Визуализация активации каспазы-3 при деполяризации митохондрий.* Клетки нагружали 25 нМ TMRM и 2 мкМ флуоресцентного субстрата каспазы-3 NucView-488 в растворе Хэнкса в течение 45 мин при комнатной температуре. Далее производили поэтапное добавление электрогенного ионофора кальция ферутина, опосредующего вход ионов Ca^{2+} митохондрии, до момента начала флуоресценции NucView-488, обозначающего активацию каспазы-3. После каждого шага добавления ферутина (5 мкМ), оставшиеся митохондриальная площадь подсчитывалась по флуоресценции TMRM с использованием плагина «Анализатор частиц» Fiji. *Измерение уровня колокализации митохондрий и лизосом.* Клетки обрабатывали флуоресцентными красителями: 0,3 мкМ MitoTracker Green и 0,1 мкМ LysoTracker Red., далее определяли процент колокализованных митохондрий и лизосом, используя макрос для количественной оценки митофагии в программе ImageJ (Berezhnov A.V. et al., 2016; Fedotova E.I. et al., 2022). *Измерение внутриклеточного pH.* Клетки загружали в течение 40 минут двухволновым флуоресцентным зондом 5 мкМ BCECF-AM, после чего трижды промывали раствором Хэнкса. Исследования проводились на многофункциональном планшетном ридере Spark10M. *Представление и анализ митохондриальной сети как графа.* Использовали язык программирования Python 3. Конфокальные изображения были загружены в среду разработки Jupyter Notebook при помощи библиотеки OpenCV в формате tif. Граф строился на основе найденных контуров, где узлы представляли собой центры контуров, а рёбра добавлялись между узлами, расстояние между которыми было меньше 50 пикселей. Для вычисления характеристик графа использовали библиотеку NetworkX. *Анализ экспрессии генов.* Экстракцию тотальной РНК из клеточных культур проводили с применением коммерческого набора для выделения РНК (Eurogen, Россия), следуя протоколу изготовителя. Относительный уровень экспрессии рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ или методом $2^{-\Delta\text{Ct}}$, где в качестве эталонного гена был взят ген GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) (Kozera, Rapacz, 2013). *Статистический анализ.* Статистический анализ проводился с использованием языка программирования R (пакета «dplyr») и OriginPro2018. 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка подхода для анализа морфологии митохондриальной сети в клетках млекопитающих

Митохондриальная сеть (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), расширение дыхания с помощью FCCP (Maro B., 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 мышинных фибробластов L929. Выбор морфологических параметров МС и характеристик графа МС осуществлялся на основе анализа главных компонент. Были выявлены наиболее значимые параметры, объясняющие большую часть варибельности данных при различных экспериментальных воздействиях. Далее проводился анализ корреляций между параметрами для исключения избыточных, сильно коррелирующих переменных.

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). Площадь МС (суммарная площадь флуоресценции TMRM в мкм²) значимо увеличивалась при воздействии Mdivi-1 (5 мкМ, 24 часа) – ингибитора Drp1, белка, опосредующего митохондриальное деление (Cui M. *et al.*, 2010), что указывает на разрастание сети в отсутствие деления. Напротив, в условиях голода площадь МС значимо 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, способствующие снижению площади МС. Как и ожидалось, соотношение индивидуальных митохондрий к сетевым значимо увеличивалось при воздействии разобщителя дыхания FCCP (5 мкМ в течение 1 часа), что свидетельствует о фрагментации МС. Наоборот, при голоде это соотношение значимо снижалось по сравнению с МС контрольных клеток, свидетельствуя о увеличении связности МС, что также согласуется с литературными данными (Li L., Chen Y., Gibson S.B., 2013; Rambold A.S. *et al.*, 2011). Другой важный параметр морфологии МС, такой как длина ветви в составе МС, 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. Принимая во внимания тот факт, что при этом при действии Mdivi-1 увеличивалось соотношение индивидуальных и сетевых митохондрий в сторону последних, можно сделать вывод, что ингибирование деления приводит к образованию более разветвленных сетей с более короткими митохондриями. Далее представлены выбранные нами характеристики преобразованной в граф МС: «плотность графа МС», «средний коэффициент кластеризации» и «среднюю длину пути в графе МС» (Рисунок 1).

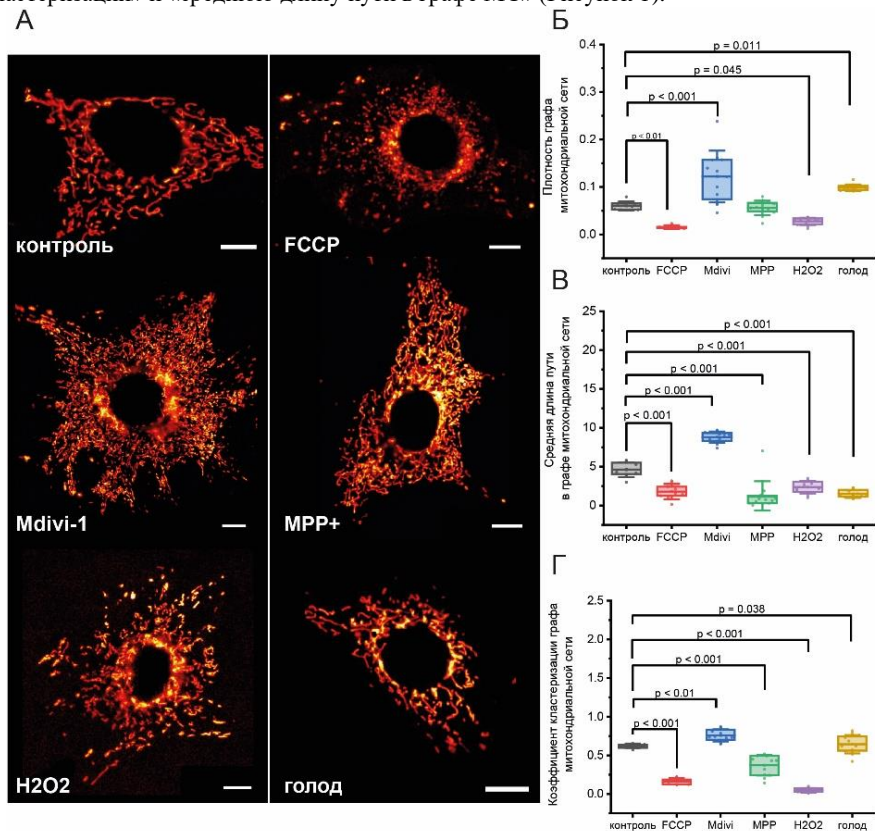


Рисунок 1. Изменение морфологических параметров и характеристик графа митохондриальной сети (МС) в фибробластах мыши L929 при различных воздействиях. А) Репрезентативные изображения фибробластов, окрашенных потенциал-чувствительным зондом TMRM: контрольных клеток, обработанных FCCP (5 мкМ, 1 час); Mdivi-1 (5 мкМ, 24 часа); MPP⁺ (500 мкМ, 24 часа); перекисью водорода – H₂O₂ (250 мкМ, 1 час); подвергшихся голоду (культуральная среда без сыворотки, 24 часа). Масштаб = 10 мкм. Анализ характеристик графа МС, полученного на основе автоматического анализа конфокальных изображений при соответствующих воздействиях Б) Плотность графа МС, В) Средняя длина пути в графе МС и Г) Коэффициент кластеризации графа 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 $p = 0,0083$).

Плотность графа MC – показатель, отражающий общее количество связей между узлами (митохондриями) в сети, значимо снижалась при воздействии FCCP и перекиси водорода, указывая на снижение связности в MC. В то же время голод и Mdivi-1 значимо увеличивали плотность графа MC, указывая на усиление связности MC (Рисунок 1Б). 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. Напротив, средний коэффициент кластеризации значимо снижился при воздействии FCCP, H₂O₂ и MPP⁺, что свидетельствует о разрушении локальной кооперации между митохондриями (Рисунок 1В). Средняя длина пути, отражающая количество шагов, необходимых для перехода от одного узла к другому, увеличивалась при этих воздействиях, указывая на разобщение и фрагментацию сети. При этом средняя длина пути снижалась в клетках, обработанных Mdivi-1 и после голода, что указывает на сокращение среднего расстояния между митохондриями (Рисунок 1Г). 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 болезни Паркинсона (БП), не были выявлены только лишь морфологическими методами анализа MC, тогда как анализ графа MC показал значительные различия после добавки MPP⁺ в течение 24 часов, подчеркивая важность комплексного анализа параметров MC для полного понимания изменений в этой структуре.

Таким образом, комплексный подход, сочетающий морфологические параметры и характеристики графа MC, позволяет глубже понять структурные изменения MC, что может быть критически важно для оценки действия патологических условий, а также новых 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 в модели кальциевой перегрузки

Митохондрии являются ключевыми регуляторами «судьбы» клетки (Кромер G., Reed J.C., 2000), однако до сих пор не было проведено количественного анализа того, какая потеря митондрий является критической и приводит к индукции апоптоза в различных типах клеток. В данной главе мы оценивали, при каком проценте деполаризованных митондрий (относительно общей площади MC), 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 митондрий из MC.

Для проверки этой гипотезы мы создали модель постепенной кальциевой перегрузки, поэтапно добавляя клеткам, окрашенным потенциал-чувствительным митохондриальном 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 (Puich 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. Ступенчатое добавление ферутина вызывает постепенную потерю митохондрий из МС в клетках нейрон-глиальной культуре (Рисунок 2А), фибробластах (Рисунок 2Б) и опухолевых клетках рака молочной железы ВТ-474 (Рисунок 2В).

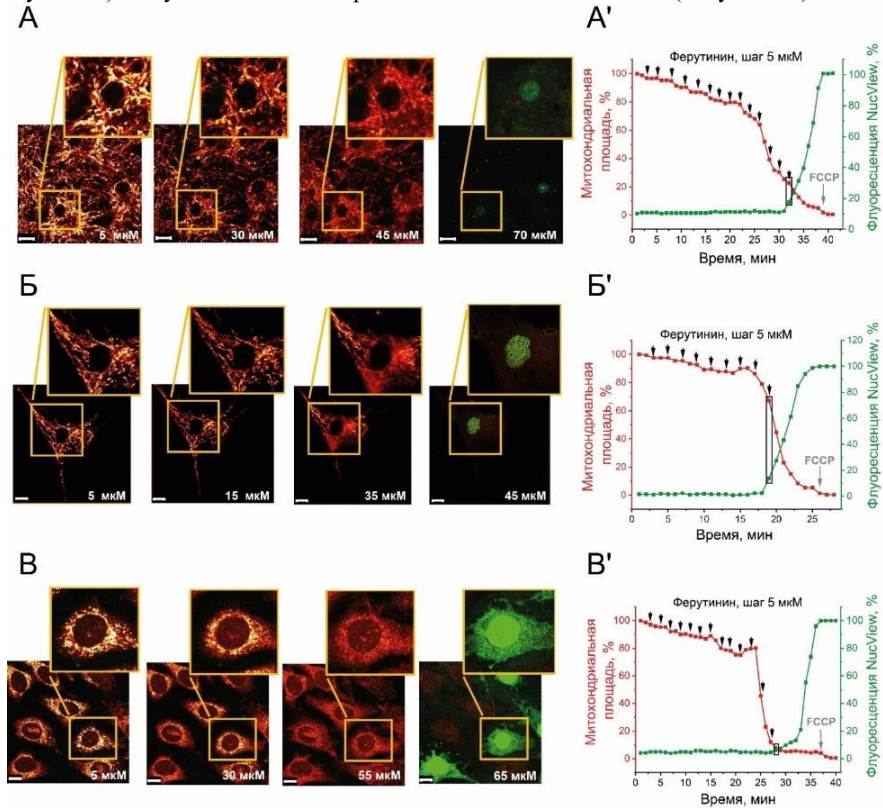


Рисунок 2. Активация каспазы-3 при потере критической доли митохондрий из общей митохондриальной сети в нейрон-глиальной культуре, фибробластах и опухолевых клетках ВТ-474. Микрофотографии, где красным псевдоцветом обозначены митохондрии (окраска TMRM), оставшиеся при добавлении соответствующей концентрации ферутина (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 ВТ-474. Репрезентативные графики изменения площади МС (в процентах от изначальной) и флуоресценции субстрата каспазы-3 NucView-488 (в процентах от начальной) и при постепенном добавлении ферутина во времени в А') нейрон-глиальной культуре, Б') фибробластах и В') опухолевых клетках.

Как видно из графиков (Рисунок 2А'-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 ферутина 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 2А'), фибробластах (Рисунок 2Б') и опухолевых клетках ВТ-474 (Рисунок 2В').

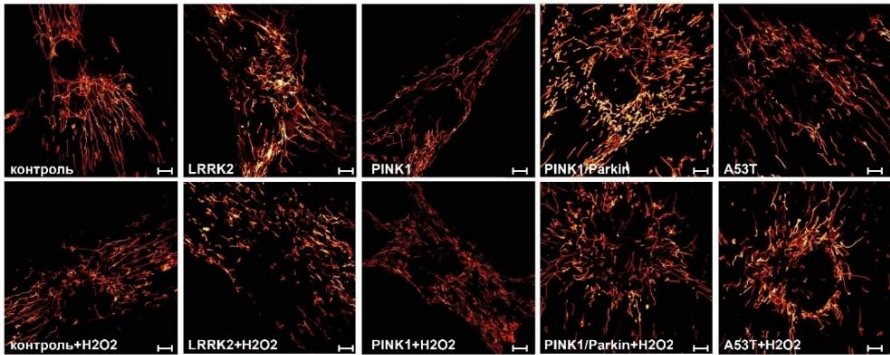
Было обнаружено, наиболее чувствительными к апоптотическим стимулам являются фибробласты кожи человека, у которых индукция апоптоза наблюдалась при потере всего 30-40% площади митохондрий из МС, тогда как клетки нейрон-глиальной оказались менее чувствительными, и индукция апоптоза у них происходила при потере более 80-90% площади МС. Клетки ВТ-474 показали чувствительность 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. Для активации каспазы-3 в фибробластах также необходима наименьшая концентрация ферутина по сравнению с клетками нейрон-глиальной культуры и клетками ВТ-474.

Мы также оценили, связана ли обнаруженная зависимость с различием в экспрессии мРНК генов, кодирующих про- и анти-апоптотические белки в исследуемых клетках. Действительно, 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 нейрон-глиальной культуре, тогда как наименьшее соотношение представлено в клетках ВТ-474, что также может объяснить 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 анти-апоптотических генов в этих культурах.

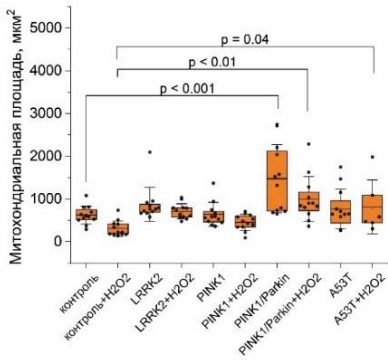
3.3. Изменение морфологии митохондриальной сети в фибробластах с мутациями, связанными с наследственной болезнью Паркинсона

В этой части работы мы стремились оценить, как влияют мутации, связанные с наследственной формой БП на морфологию МС в нормальных условиях и в условиях окислительного 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 A53T 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. Площадь МС (Рисунок 3Б) во всех фибробластах, за исключением фибробластов PINK1/Parkin, существенно не отличалась от контрольных фибробластов. Площадь МС фибробластов PINK1/Parkin была в 2,3 раза больше, чем в контроле, и составила 1474 ± 793 $\mu\text{км}^2$. 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).

A



Б



В

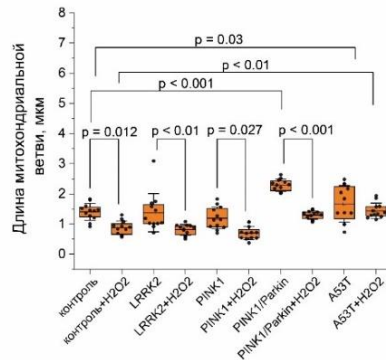


Рисунок 3. Морфология митохондриальной сети в фибробластах, несущих мутации, связанные с наследственной болезнью Паркинсона. А) Репрезентативные микрофотографии фибробластов, окрашенных TMRM и полученные с помощью конфокальной микроскопии сверх разрешения (масштаб – 10 мкм). Б) Площадь митохондриального следа, измеренная в нормальных условиях и после стресса с перекисью водорода H₂O₂ (150 мкМ в течение 1 часа). В) Длина митохондриальной ветви в МС в нормальных условиях и после H₂O₂-индуцированного стресса (150 мкМ в течение 1 ч). n = 12 клеток в 3 независимых экспериментах. 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).

После этого мы исследовали длину митохондрий в составе МС (Рисунок 3В). Длина митохондриальной ветви в МС является важным параметром, показывающим адаптацию клетки, например, к недостатку субстрата или стрессу (Wai T., Langer T., 2016).

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.

Далее мы оценили длину отдельных митохондрий в мутантных и контрольных фибробластах. В клетках с мутацией гена белка PINK1 она оказалась существенно ниже в 2,3 раза, чем в контрольных клетках. 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, 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).

Далее мы исследовали связность МС фибробластов, 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, что может говорить о нарушении деления митохондрий.

Помимо оценки морфологии МС мы проанализировали другие жизненно-важные показатели клетки, такие как скорость митохондриальной и цитозольной АФК-продукции. Скорость митохондриальной АФК-продукции была измерена по временной кинетике зонда MitoTracker Red CM-H2XROS (флуоресцентных производных после окисления). Поскольку мы не обнаружили значимых различий в этом показателе в нормальных условиях, мы предположили, что экзогенный стресс показать различия для мутантных и контрольных фибробластов. После добавления перекиси водорода (50 мкМ, в течение 1 ч) происходило 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%. После, с использованием временной кинетики флуоресценции DCF (химически восстановленная и ацетилированная форма 2',7'-дихлорфлуоресцеина H₂DCFDA) была оценена скорость цитозольной АФК-продукции. Значительное увеличение скорости цитозольной АФК-продукции было обнаружено почти для всех мутантных фибробластов: PINK1 – в 1,9 раза, PINK1/Parkin – в 1,8 раза и у фибробластов A53T в 1,9 раза 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 и токсической модели болезни Паркинсона

Нарушение митохондриальной динамики и системы контроля качества митохондрий является одной из причин развития БП. Ранее 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, а также клетки нейрон-глиальной культуры в токсической модели БП.

Для начала мы хотели создать модель кратковременного закисления в исследуемых клетках. Внутриклеточный pH был измерен с использованием ратиометрического зонда BCECF-AM. 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. Как показывают эксперименты, такое непродолжительное снижение внеклеточного pH закономерно снижает внутриклеточный pH. 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. Таким образом, в фибробластах с мутациями наблюдались схожие закономерности при изменении внеклеточного и зависимо от этого внутриклеточного pH.

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 в МС), колокализация митохондрий и лизосом при снижении внеклеточного pH на 30 минут до значений 6,6 и 6,0 и инкубации клеток с 20 мМ лактата и пирувата натрия в течении 24 часов. Несмотря на изменение pH среды, длина митохондрий в сетях оставалась стабильной у всех исследуемых культур фибробластов. Напротив, среднее количество связей при закислении (прямо и с помощью лактата и пирувата натрия) уменьшалось: в контрольных клетках 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. 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. Кроме того, результаты показали, что в клетках PINK1 изначально увеличенное количество индивидуальных митохондрий снижалось после обработки лактатом и пируватом натрия до уровня, сопоставимого с контрольными фибробластами.

Помимо морфологии МС, нами была оценена степень колокализации митохондрий и лизосом при прямом закислении и действии лактата и пирувата натрия (Рисунок 4). Кратковременное внеклеточное закисление значительно увеличивает колокализацию митохондрий и лизосом по сравнению с базальными уровнями в контрольных фибробластах, а также в мутантных по LRRK2 и PINK1. Интересно, что при более высоком pH, равном 6,6, увеличение колокализации было еще более выраженным во всех исследуемых культурах (Рисунок 4Б). Инкубация 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 4Б).

Затем мы оценили влияние добавки лактата и пирувата натрия в течение 24 часов на уровне 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, Vnlp3 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, Vnlp3, Nix, Fundc1, а также аутофагии: Atg7, Ulk1 и Gabarap. В мутантных фибробластах LRRK2 также наблюдались повышенные уровни мРНК белков Ndp52, Gabarap, Vnlp3 и Nix, что указывает на индукцию митофагии в мутантных линиях фибробластов, вероятно, посредством альтернативного пути, опосредованного Vnlp3/Nix (Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N., 2018), связанного со стрессом и гипоксическими состояниями (Рисунок 4В). После обработки лактатом и пируватом натрия контрольные фибробласты демонстрировали повышенную экспрессию генов белков PINK1, Arip1, P62, Optn, Ndp52 и Beclin1 по сравнению с необработанными контрольными клетками (Рисунок 4В). В фибробластах LRRK2 добавка лактата и пирувата натрия приводила к увеличению экспрессии генов белков Arip1, Optn, Ndp52 и Ulk1, в то время как у мутантов PINK1 индуцировались гены белков Arip1, P62, Optn, Lc3, Ulk1 и Beclin1 (Рисунок 4В). 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.

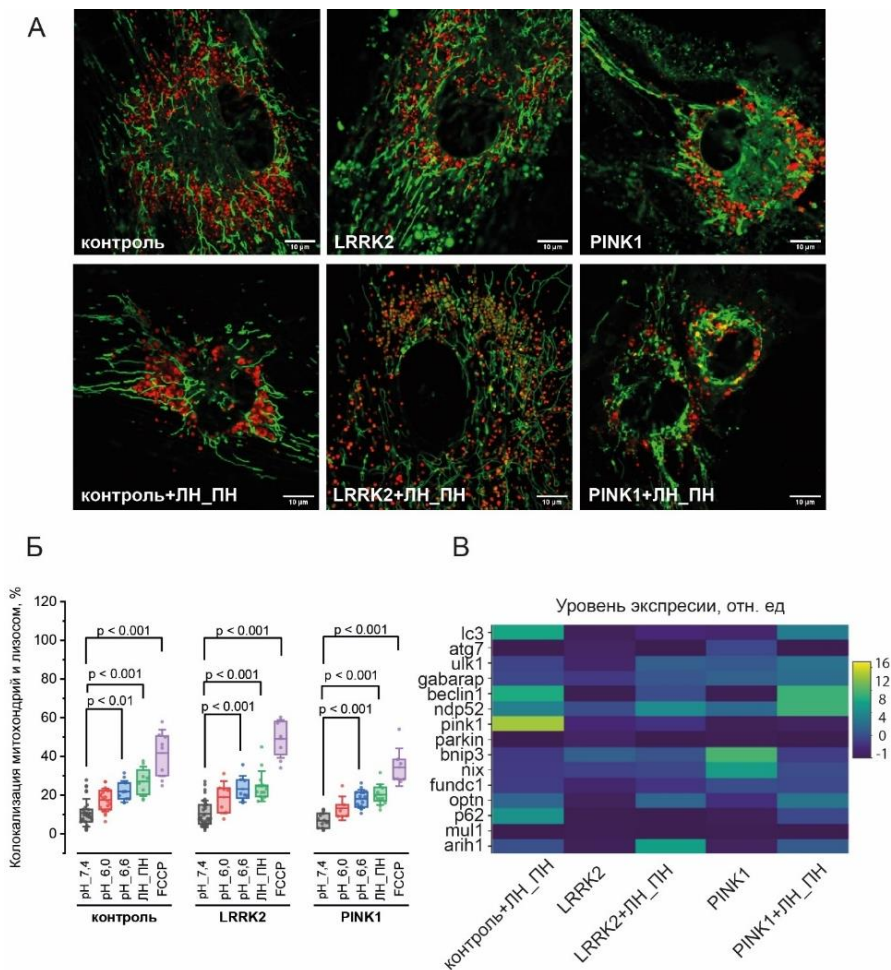


Рисунок 4. Влияние закисления и добавки лактата натрия (ЛН) и пирувата натрия (ПН) на митохондриальную функцию в фибробластах с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, связанных с развитием наследственной формы болезни Паркинсона. А) Конфокальные изображения контрольных фибробластов и фибробластов с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1, окрашенных флуоресцентным зондом, специфичным к митохондриям (MitoTracker Green) и лизосомам (LizTracker Red) без обработки и после добавки лактата натрия (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия 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 pH 6,0 и 6,6 соответственно и добавкой лактата натрия (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 $p = 0,0125$); 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 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 $p < 0,05$).

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. Было обнаружено, что кратковременное закисление с pH 6,0 приводило к значимому снижению уровня митохондриального мембранного потенциала в клетках с мутациями генов белков LRRK2 и PINK1. Напротив, добавка лактата и пирувата натрия на 24 часа повышала этот показатель в мутантных фибробластах. Стоит отметить, что при действии pH 6,0 в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 увеличивалось количество мертвых клеток, достигая 10%.

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, что дополнительно свидетельствовало о защитном действии лактата и пирувата натрия в условиях стресса.

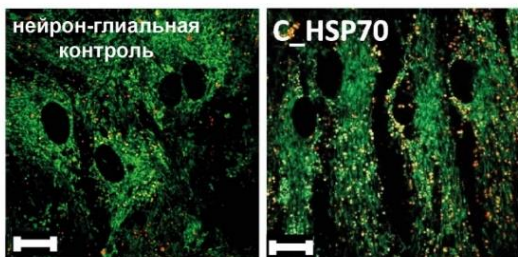
Подводя итог, нами было исследовано действие краткосрочного закисления, опосредованного заменой внеклеточной среды на 30 минут с pH 6,0 и 6,6 соответственно, а также добавкой лактата (10 мМ) и пирувата (10 мМ) натрия на 24 часа на динамику МС в контрольных фибробластах и фибробластах с мутациями генов 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 pH среды до pH 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

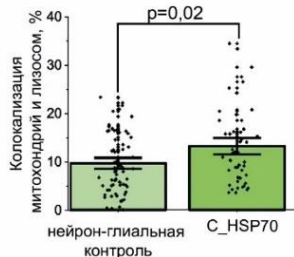
Нарушение динамики МС приводит к развитию клеточного стресса, являющегося одним из факторов прогрессирования нейродегенеративных заболеваний, к которым относятся наследственная и спорадическая формы БП. Так, аберрантная митофагия,

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).

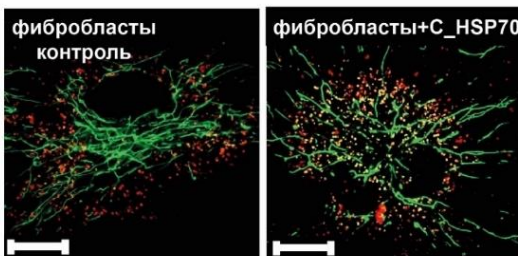
А



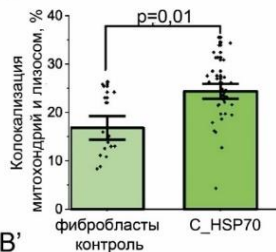
А'



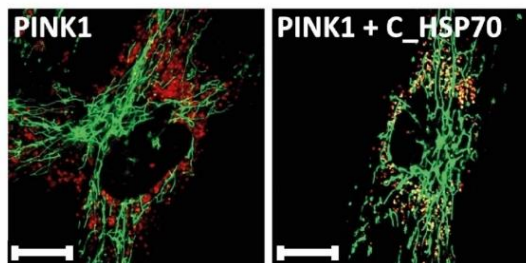
Б



Б'



В



В'

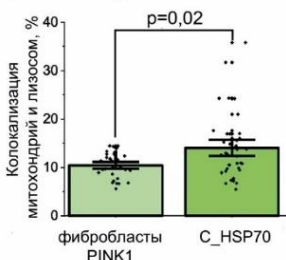


Рисунок 5. Изменение уровня колокализации митохондрий и лизосом при добавлении С-концевого фрагмента шаперона HSP70 (C_HSP70) в клетках нейрон-глиальной культуры, контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1. А) Конфокальные изображения клеток нейрон-глиальной культуры, Б) контрольных фибробластов, В) фибробластов с мутацией гена белка PINK1, окрашенных флуоресцентным зондом, специфичным к митохондриям (MitoTracker Green) и лизосомам (LizoTracker 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 $p < 0,05$).

Уровень митофагии оценивали по степени колокализации митохондрий и лизосом как было описано ранее. После 24 ч инкубации с C_HSP70 мы обнаружили более высокий уровень митофагии в первичной нейрон-глиальной культуре крысы (Рисунок 5А-А'). 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 C_HSP70 увеличивал колокализацию митохондрий и лизосом не только в клетках нейрон-глиальной культуры и контрольных фибробластах, 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 5ВВ').

Далее мы исследовали, как влияет рекомбинантный C_HSP70 и его С-концевой фрагмент на такие 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 C_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 C_HSP70.

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 до $55 \pm 1,8\%$, что указывает на увеличение некроза в этой культуре клеток по сравнению с контрольной культурой без ротенона. Предварительная инкубация клеток с C_HSP70 значительно снизила процент некротических клеток в модели нейротоксичности, индуцированной ротеноном до $41,4 \pm 8\%$. Помимо количества некротических клеток, мы также оценивали уровень апоптоза в клетках нейрон-глиальной культуры при действии ротенона и C_HSP70. В модели нейротоксичности, индуцированной ротеноном, процент клеток, демонстрирующих поздние стадии апоптоза, был значимо выше. 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 нейрон-глиальной культурой, обработанной только ротеноном. Что касается ранних стадий апоптоза – после воздействия 5 мкМ ротенона течение 6 часов ядра $40,4 \pm 5\%$ клеток нейрон-глиальной культуры демонстрировали увеличение флуоресценции NucView-488, указывающей на активность каспазы-3. Предварительная инкубация нейрон-глиальной культуры с HSP70 (24 часа) также значимо снизила процент клеток, в ядрах которых присутствовала флуоресценция NucView-488. (до $21,6 \pm 1,4\%$) в условиях ротенон-индуцированной токсичности,

Таким образом, в данном разделе мы показали, что рекомбинантный белок теплового шока 70 и его С-концевой фрагмент увеличивает 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 омавелоксолона на динамику митохондриальной сети в условиях окислительного стресса

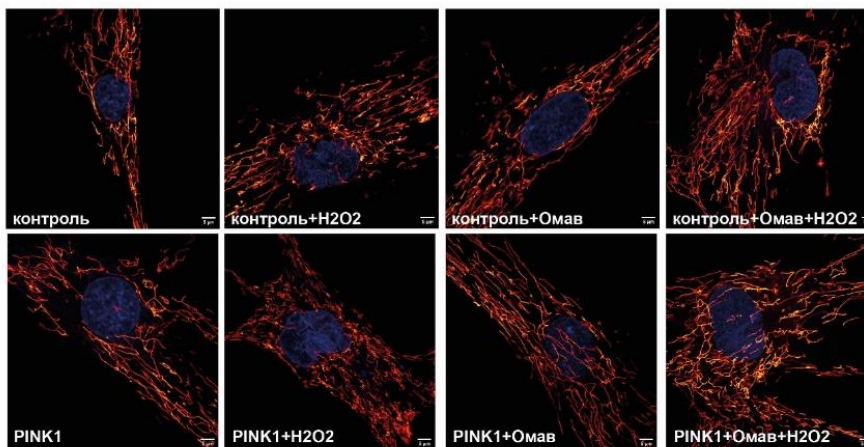
Известно, что одной из причин нарушения динамики МС является окислительный стресс, и, в свою очередь, дисбаланс процессов деления/слияния митохондрий и митофагии может приводить к еще большему развитию окислительного стресса (Dasuri K., Zhang L., Keller J.N., 2013). Многообещающий подход для разрыва 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 омавелоксолона 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.

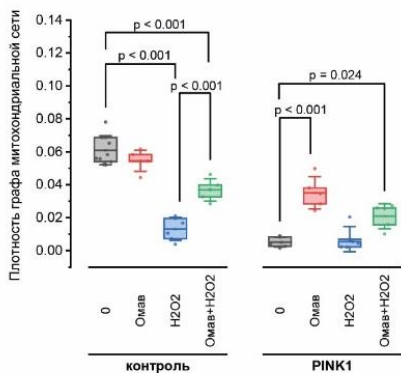
На рисунке 6Б представлены данные по плотности графа для контрольных и мутантных фибробластов. Из графика видно, что изначальная плотность графа МС в клетках PINK1 ниже, чем в контрольных фибробластах (Рисунок 6Б). При воздействии перекиси водорода плотность МС в контрольных клетках значительно снижается, тогда как в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 плотность МС остается на стабильно низком уровне (Рисунок 6Б). Интересно, что действие омавелоксолона (50 нМ, 24 часа) не влияет на плотность графа МС в контрольных клетках, но значимо увеличивает этот параметр в мутантных фибробластах. В условиях окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 , и предварительной добавки омавелоксолона, 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 6Б).

При добавлении перекиси водорода длина митохондрий в МС значимо снижается как в контрольных клетках, так и в клетках с мутацией гена белка PINK1 (Рисунок 6В), что может указывать на активацию процесса деления митохондрий в ответ на стресс, вызванный H_2O_2 . Добавка омавелоксолона сама по себе не оказывает значимого влияния на длину митохондрий в МС ни в контрольных клетках, ни в фибробластах PINK1 (Рисунок 6В). Однако стоит отметить, что при предварительной инкубации клеток с 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 6В).

A



Б



В

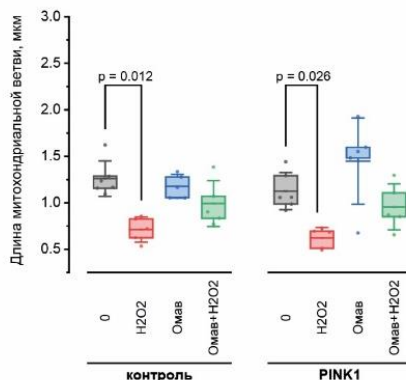


Рисунок 6. Действие активатора пути Nrf2 омавелоксолон на динамику митохондриальной сети (МС) в условиях окислительного стресса в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией гена белка PINK1, связанной с развитием болезни Паркинсона. А) Конфокальные изображения контрольных фибробластов и фибробластов 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; при инкубации с омавелоксолонем и совместном действии сначала омавелоксолонем и после стресса, индуцированного перекисью водорода H₂O₂. 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 $p = 0,0167$)

Мы также исследовали влияние омавелоксолон на уровень митофагии, а также потенциальный защитный эффект этого вещества на контрольные и мутантные фибробласты в условиях стресса, индуцированного H_2O_2 . Инкубация клеток с 50 нМ омавелоксолон в течении 24 часов увеличивает уровень митофагии как в контрольных клетках, так и в фибробластах с мутацией гена белка PINK1 (в 3,6 и 3,1 раза соответственно). 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. Предварительная инкубация фибробластов с 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 $76,8 \pm 8,6\%$).

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, настоящая работа представляет собой комплексное исследование динамики митохондриальной сети. Полученные данные, с одной стороны, позволяют судить об изменении морфологических параметров митохондриальной сети при различных состояниях, включая клеточный стресс, мутации, связанные с болезнью Паркинсона, а с другой – оценить потенциал различных агентов для защиты клеток в условиях стресса через изменение динамики митохондриальной сети. На рисунке 8 представлена схема, объединяющая результаты диссертации и литературные данные.

Физиологическое состояние предполагает баланс процессов слияния и деления митохондрий. При развитии патологии и клеточном стрессе происходит сдвиг баланса в сторону деления или слияния митохондрий. О сдвиге баланса наиболее полно можно судить по морфологическим параметрам (длина митохондрий в сетях, количество связей в митохондриальной сети и соотношении индивидуальных и сетевых митохондрий) 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, связанной 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.

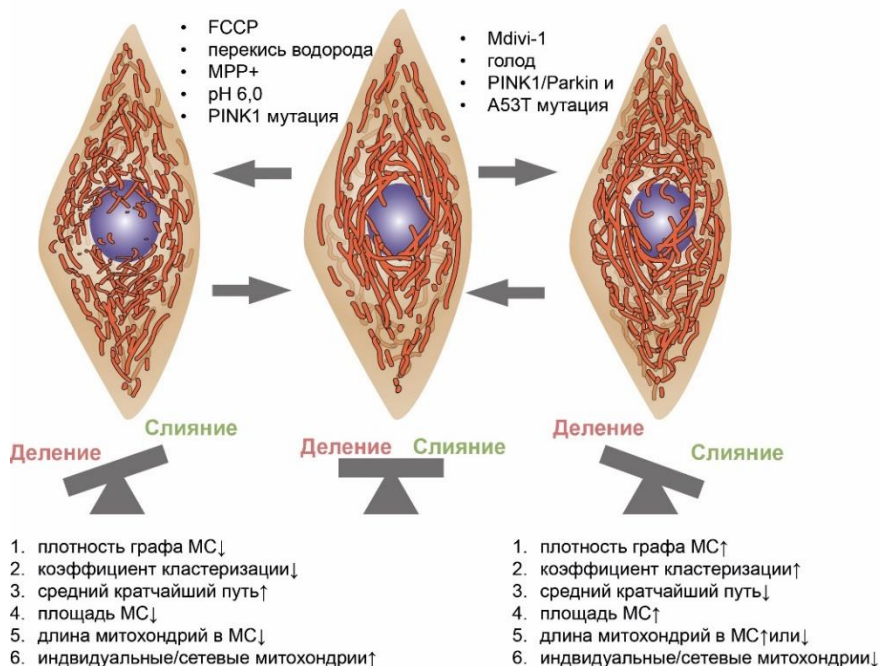


Рисунок 8. Схема, составленная на основании данных диссертации, иллюстрирующая изменения динамики митохондриальной сети при различных стрессорных воздействиях, мутациях, связанных с болезнью Паркинсона, а также влиянии защитных агентов.

Напротив, наши результаты показали, что при наличии двойной мутации генов белков PINK1/Parkin, точечной A53T мутации в гене, кодирующем альфа-синуклеин, действии ингибитора Drg1 – 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 С-концевого фрагмента (C_HSP70), активатора Nrf2 пути – омавелоксолон, а также лактата и пирувата натрия индуцировать митофагию и увеличивать выживаемость клеток в условиях окислительного стресса и моделях болезни Паркинсона.

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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **К.А. Критская**, 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. Критская**, 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. Критская**, 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. Mitochondrial pore (mPTP) and cell death / **К. А. Критская**, 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.

2. **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.* – С. 42.

3. 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, Пущино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 709-712.*

4. 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.*

5. 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.*

6. 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.*

7. 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.*

8. 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.*

9. 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.*

10. 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, 22–26 мая 2023 года. – Пушино, 2023. – С. 345-347.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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, Пушино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 595-600.

15. 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, Пушино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 600-607.

16. 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, Пушино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 709-712.

17. **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.

18. 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.

19. 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 др.] // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы, Казань, 14–17 сентября 2021 года. – Казань: Издательство ФИЦ КазНЦ РАН, 2021. – С. 120-121

20. 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, 2021. – С. 333-337.

21. 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, 2021. – С. 337-340.

22. 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, 2021. – С. 530-534.

23. 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.