

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

*На правах рукописи*

**Титова Екатерина Валерьевна**

**Действие митохондриально-направленных антиоксидантов на  
трансформированные фибробласты человека в культуре.**

1.5.22. Клеточная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Дугина Вера Борисовна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	5
2. ВВЕДЕНИЕ .....	6
2.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования .....	6
2.2. Цель исследования .....	9
2.3. Задачи исследования .....	9
2.4. Объект и предмет исследования .....	10
2.5. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования .....	10
2.6. Методология диссертационного исследования .....	12
2.7. Положения, выносимые на защиту .....	12
2.8. Апробация результатов .....	13
2.9. Публикации по теме исследования .....	13
2.10. Финансовая поддержка .....	13
2.11. Личный вклад автора в проведение исследования .....	13
3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
3.1. Характеристики трансформированных клеток .....	14
3.2. Организация актинового цитоскелета в клетке .....	21
3.2.1. Актин .....	21
3.2.2. Изоформы актина .....	26
3.2.3. Специфические для изоформ актина модификации N-концевого участка .....	28
3.2.4. Актин-связывающие белки, формирующие различные актиновые цитоскелетные системы клетки .....	30
3.2.5. Изоформы актина и неопластическая трансформация .....	34
3.3. Метаболизм и роль АФК в трансформированных клетках .....	35
3.3.1. Метаболическое перепрограммирование трансформированных клеток .....	35
3.3.2. Митохондрии трансформированных клеток .....	36
3.3.3. Биологическая роль АФК в клетке .....	36
3.3.4. АФК и клеточная трансформация .....	40
3.3.5. Антиоксиданты, адресованные в митохондрии .....	41
3.4. Основные регуляторы клеточного цикла .....	43
3.5. Киназы семейства Aurora и их роль в регуляции клеточного цикла .....	45
3.5.1. Общая характеристика киназ семейства Aurora .....	45
3.5.2. Роль Aurora B в регуляции клеточного деления .....	47
3.5.3. Aurora B при опухолевой трансформации .....	50
3.6. Заключение .....	50

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	51
4.1. Клеточные культуры и культивирование клеток .....	51
4.2. Экстракция и фиксация клеток .....	51
4.3. Анализ ростовых характеристик клеточных культур.....	52
4.4. Обогащение клеточной популяции митотическими клетками .....	52
4.5. Анализ параметров клеточного цикла .....	52
4.6. Измерение внутриклеточных АФК .....	53
4.7. Фазово-контрастная микроскопия живых клеток .....	53
4.8. Морфометрический анализ клеток .....	53
4.9. Морфометрический анализ фокальных контактов .....	54
4.10. Антиоксиданты и ингибиторы .....	54
4.11. Антитела .....	54
4.12. Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, микроскопия со структурированным освещением .....	55
4.13. Вестерн-блот анализ .....	56
4.14. Статистический анализ .....	57
5. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	58
5.1. Влияние МАО на морфологию нормальных и трансформированных фибробластов ..	58
5.1.1. Сравнительная характеристика культур нормальных SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов.....	58
5.1.2. Воздействие МАО на морфологию нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов .....	61
5.1.3. Оценка адресного действия МАО семейства SkQ .....	64
5.1.4. Влияние МАО на организацию актинового цитоскелета в нормальных фибробластах .....	65
5.1.5. Влияние МАО на организацию актинового цитоскелета в SV40-трансформированных фибробластах .....	68
5.1.6. Влияние МАО на организацию актиновых структур из цитоплазматических изоформ актина в SV40-трансформированных фибробластах человека .....	70
5.1.7. Влияние МАО на организацию актиновых структур из цитоплазматических изоформ актина в опухолевых фибробластах .....	74
5.1.8. Исследование влияния МАО на реорганизацию $\gamma$ -актиновой цитоскелетной системы в SV40-трансформированных фибробластах методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии .....	76

5.1.9. Влияние МАО на локализацию актин-связывающих белков в SV40-трансформированных фибробластах .....	79
5.1.10. Влияние МАО на систему фокальных контактов в SV40-трансформированных фибробластах .....	83
5.1.11. Влияние МАО на организацию $\alpha$ -гладкомышечного актина в SV40-трансформированных фибробластах .....	87
5.1.12. Влияние МАО на организацию немышечного миозина II в SV40-трансформированных фибробластах .....	90
5.2. Действие МАО на рост и динамику клеточного цикла SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов .....	92
5.2.1. Действие антиоксидантов на рост SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов в культуре .....	93
5.2.2. Выявление популяции больших многоядерных клеток в культурах SV40-трансформированных фибробластов после инкубации с МАО .....	96
5.2.3. Влияние МАО на динамику клеточного цикла опухолевых клеток .....	97
5.2.4. Влияние МАО на количество митозов и динамику митотического цикла в культуре клеток фибросаркомы HT1080 .....	100
5.2.5. Исследование механизмов действия МАО на изменение динамики клеточного цикла клеток культуры HT1080 .....	103
6. ОБСУЖДЕНИЕ .....	108
6.1. Влияние МАО на морфологию трансформированных фибробластов .....	108
6.2. Влияние МАО на динамику клеточного цикла вирус-трансформированных и опухолевых фибробластов .....	116
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	123
8. ВЫВОДЫ.....	125
9. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	126
9.1. Статьи .....	126
9.2. Тезисы докладов .....	126
10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	128

## 1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО - антиоксиданты

АФК - активные формы кислорода

мАО - антиоксиданты, адресованные в митохондрии

мАФК - митохондриальные активные формы кислорода

ФК – фокальные контакты

ЭМП - эпителиально-мезенхимальный переход

АВР - актин связывающие белки (actin binding proteins)

АРС - комплекс, способствующий анафазе (anaphase promoting complex)

СДК - циклин-зависимые киназы (cyclin-dependent kinases)

СРС - хромосомный пассажирский комплекс (chromosomal passenger complex)

INCENP - белок внутренней центромерной области (inner centromere protein)

НАС - N-ацетилцистеин (N-acetylcysteine)

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (MAP kinase, mitogen activated protein kinase)

РBS - фосфатно-буферный раствор (phosphate-buffered saline)

Rb - белок ретинобластомы (retinoblastoma protein)

## 2. ВВЕДЕНИЕ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Agarova L.S., Chernyak B.V., Domnina L.V., Dugina V.B., Efimenko A.Y., Fetisova E.K., Ivanova O.Y., Kalinina N.I., Khromova N.V., Kopnin B.P., Kopnin P.B., Korotetskaya M.V., Lichinitser M.R., Lukashev A.L., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Skulachev M.V., Shagieva G.S., Stepanova E.V., Titova E.V., Tkachuk V.A., Vasiliev J.M., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 3. Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. V. 73, № 12. – P. 1300-1316.

Titova, E., Shagieva, G., Ivanova, O., Domnina, L., Domninskaya, M., Strelkova, O., Khromova, N., Kopnin, P., Chernyak, B., Skulachev, V., and Dugina, V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth // *Cell Cycle*. – 2018. V. 17. – P. 1797-1811.

### 2.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

В ходе процесса клеточной трансформации клетки человека приобретают ряд специфических характеристик, связанных с изменением внутриклеточных сигнальных путей, генетической нестабильностью, измененными пролиферативными и морфологическими характеристиками. Появление способности к неограниченной пролиферации, инвазии и метастазированию является важным условием опухолевой прогрессии (Hanahan and Weinberg, 2011). Усиление инвазивного потенциала сопровождается рядом морфологических изменений клеток, в основе которых лежит реорганизация актинового цитоскелета и уменьшение экспрессии молекул межклеточных адгезий. Образующиеся в результате этого мембранные структуры, богатые актином (ламеллиподии, филоподии, раффлы), являются важной морфологической характеристикой, обеспечивающей процесс метастазирования (Bravo-Cordero et al., 2012). Показано также, что патологические изменения морфологии и организации актинового цитоскелета вызывают нарушение внутриклеточных путей передачи сигналов, запуская процесс трансформации, в том числе, через регуляцию физических взаимодействий между плазматической мембраной и ядерной оболочкой, механическую модуляцию катионных каналов и сигнальных молекул (Yamaguchi et al., 2007; Khalil et al., 2022).

Актиновые микрофиламенты в тандеме с актин-связывающими белками (ABP, actin binding proteins) и молекулами миозина обеспечивают поддержание клеточной формы, адгезию, деление и цитокинез (Pollard et al., 2016). Актин в клетке представлен шестью паралогами (изоформами): четыре мышечных изоформы (преимущественно тканеспецифичных) и два немускульных (цитоплазматических) актина –  $\beta$  и  $\gamma$  (универсальны и экспрессируются во всех клетках). Как в нормальных, так и в трансформированных фибробластах цитоплазматические актины образуют две различные актиновые системы: кортикальная сеть из тонких филаментов, богатая  $\gamma$ -актином, и система параллельно ориентированных плотных  $\beta$ -актиновых пучков, формирующих

стресс-фибриллы и участвующих в натяжении и миграции клеток. Работа каждой системы обеспечивается активностью специфических актин-связывающих белков. Нарушение в пространственно-временной организации каждой из актиновых систем в ходе клеточной трансформации приводит к изменению морфологии, увеличению клеточной подвижности и дальнейшей опухолевой прогрессии (Dugina et al., 2022; Khromova et al., 2024).

Для трансформированных клеток характерен повышенный уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), вызывающий окислительный стресс. (Ganesh et al., 2022). Взаимодействие различных изоформ актина со специфическими АВР в условиях изменения окислительно-восстановительного статуса представляет большой научный интерес. Учитывая высокое цитоплазматическое содержание актина, данный белок является одной из важных мишеней АФК при окислительном стрессе. Показано, что АФК могут оказывать влияние на конформацию молекул актина и организацию актиновых филаментов и их взаимодействие с АВР (Фёдорова М.А. и др.; 2006, Perez et al., 2005; Rajan et al., 2023), однако механизм таких изменений при опухолевой трансформации изучен недостаточно. Поиск агентов, модифицирующих окислительно-восстановительный статус трансформированных клеток, и, как следствие, влияющих на организацию различных актиновых систем, является важным направлением фундаментальных и прикладных исследований.

Реорганизация различных паралогов актина при трансформации связана с нарушениями регуляции клеточного цикла опосредованно через взаимодействие различных изоформ актина с MAP-киназами и другими сигнальными молекулами (Dudina et al., 2015). Также одним из важных регуляторов клеточного деления выступает циклосома, или комплекс, способствующий анафазе (APC, anaphase promoting complex). APC контролирует митотический цикл в момент перехода клетки из метафазы в анафазу и отвечает за финальные события в митозе и цитокинезе, обеспечивая деградацию киназ семейства Aurora (Stewart et al., 2005; Littlepage et al., 2002). Патологическое изменение активности данных киназ способствует развитию и прогрессии опухолей, стимулируя аномальное клеточное деление и геномную нестабильность (Anand et al., 2003; González-Loyola et al., 2015; Borah et al., 2021). На данный момент активно изучается противоопухолевая активность ряда низкомолекулярных ингибиторов киназы Aurora B (Borah et al., 2021; Schecher et al., 2017). При этом влияние изменения окислительно-восстановительного статуса клеток в ходе процесса трансформации на активность киназ семейства Aurora изучено недостаточно для понимания того, могут ли они являться потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии, опосредованной антиоксидантами (АО).

Роль внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза в опухолевой прогрессии является спорной. Трансформированные клетки часто характеризуются повышенным уровнем АФК и нарушением окислительно-восстановительного потенциала по сравнению с нормальными (Fruehauf et al., 2007). Индукция АФК и ингибирование антиоксидантных систем является механизмом действия многих прооксидантных противоопухолевых веществ. Однако, было показано, что трансформированные клетки не только адаптируются к окислительному стрессу, но и зависят от высокого уровня АФК, поскольку данные молекулы активируют сигнальные пути, обеспечивающие подвижность, пролиферацию и выживаемость клеток (Kim et al., 2018; Luo et al., 2009). С другой стороны, АФК участвуют в противоопухолевой защите, контролируют процессы апоптоза и клеточного старения. Таким образом, перспективными молекулами для исследования противоопухолевой активности могут выступать как антиоксиданты, индуцирующие апоптоз опухолевых клеток при снижении АФК (Athreya et al., 2017), так и вещества, стимулирующие выработку АФК или ингибирующие антиоксидантные системы клетки (Trachootham et al., 2009; Bakalova et al., 2020).

В дыхательной цепи митохондрий продуцируется основная часть внутриклеточных АФК и окислительные повреждения накапливаются в митохондриях быстрее, чем в других органеллах (Pletushkina et al., 2006). Митохондриальные АФК (мАФК) играют важную роль в сигнальных каскадах, регулирующих пролиферацию, клеточную гибель, дифференцировку, миграцию, а также процесс опухолевой прогрессии. Вещества, адресованные в митохондрии, стали перспективными для противоопухолевой терапии (Sabharwal et al., 2014; Guzman et al., 2017)

Конъюгаты алкил-трифенилфосфониевого катиона (TRP<sup>+</sup>) и молекул, обладающих противоопухолевой активностью, хорошо зарекомендовали себя в более ранних исследованиях (Guzman et al., 2017). Показано, что подобные TRP<sup>+</sup> липофильные катионы накапливаются в митохондриях благодаря разнице потенциалов внешней и внутренней мембран и отрицательному заряду со стороны матрикса на внутренней мембране этих органелл. Величина данного потенциала в опухолевых клетках значительно выше по сравнению с нормальными. В результате этого, конъюгаты липофильных катионов имеют тенденцию к избирательному накоплению в митохондриях именно опухолевых клеток (Modica-Napolitano et al., 2001). Показано, что ряд конъюгатов TRP<sup>+</sup>, таких, как MitoQ и Mito-CP, эффективно подавляют пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и рост опухолевых ксенотрансплантатов *in vivo* (Rao et al., 2010; Starenki et al., 2013). Однако большинство из них демонстрирует данный эффект при использовании высоких концентраций и благодаря прооксидантному действию (Rao et al., 2010; Starenki et al.,

2013). Таким образом, механизмы действия малых доз конъюгатов TPP<sup>+</sup> с антиоксидантной активностью при клеточной трансформации представляют большой исследовательский интерес. Данные молекулы могут являться перспективными агентами, которые могут избирательно накапливаться в митохондриях опухолевых клеток, обладать противоопухолевой активностью, при этом, предположительно, оказывая минимальный эффект на здоровые клетки организма.

Ранее было показано, что антиоксидант, адресованный в митохондрии (мАО) SkQ1, представляющий собой конъюгат децил-TTP<sup>+</sup> с пластохиноном, имеет высокую антиоксидантную активность при использовании в малых концентрациях, подавляя пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* (Agarova et al., 2008; Shagieva et al., 2017) и ингибируя опухолевый рост *in vivo* (Titova et al., 2018). При этом механизмы действия мАО семейства SkQ, избирательно снижающих уровень мАФК, остаются недостаточно изученными на клеточном уровне. Остается открытым вопрос о влиянии изменения окислительно-восстановительного статуса клетки при воздействии мАО на пролиферацию и параметры клеточного цикла. До настоящего времени неизвестно, является ли уменьшение пролиферации трансформированных клеток при снижении уровня мАФК в присутствии мАО результатом ингибирования митотического цикла на какой-либо стадии, или же активацией апоптотической программы. Поэтому исследование пролиферативных свойств и динамики клеточного цикла в условиях инкубации с мАО является актуальной задачей.

## **2.2. Цель исследования**

Целью работы является исследование влияния антиоксидантов, адресованных в митохондрии, на морфологию и пролиферацию трансформированных фибробластов человека в культуре.

## **2.3. Задачи исследования**

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Исследовать изменение морфологии нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов в присутствии мАО.
2. Проанализировать влияние мАО на пространственную и структурную организацию  $\beta$  и  $\gamma$ -актиновых систем в нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластах.

3. Оценить влияние МАО на: организацию фокальных контактов (ФК), общее количество белка зрелых ФК винкулина, распределение  $\alpha$ -актинина-1, поддерживающего структуру стресс-фибрилл, в SV40-трансформированных фибробластах.

4. Исследовать влияние МАО на структурную организацию маркера миофибробластной дифференцировки  $\alpha$ -гладкомышечного актина и немышечного миозина II в SV40-трансформированных фибробластах.

5. Проанализировать влияние МАО на распределение белка p34 комплекса Arp2/3 в SV40-трансформированных фибробластах.

6. Оценить влияние МАО на пролиферацию и динамику клеточного цикла SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов.

#### **2.4. Объект и предмет исследования**

Объектом исследования данной диссертационной работы являются линии нормальных клеток человека мезенхимального происхождения: линия легочных фибробластов MRC5, первичная культура подкожных фибробластов человека HSCF (Human Subcutaneous Fibroblasts); трансформированные клональные производные фибробластов MRC5 – линии MRC5-V1 и MRC5-V2 (Huschtscha and Holliday, 1983); линия клеток фибросаркомы человека HT1080, культура эмбриональной рабдомиосаркомы человека RD (McAllister et al., 1969).

Предметом исследования являются морфология клеток; структурно-пространственная организация актинового цитоскелета,  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых цитоскелетных систем; структурно-пространственное распределение АВР (p-34,  $\alpha$ -актинина-1), маркера миофибробластной дифференцировки  $\alpha$ -гладкомышечного актина и немышечного миозина II; количественные характеристики белков ( $\alpha$ -гладкомышечного актина, винкулина, киназы фосфо-Aurora A, B, C и белка ретинобластомы фосфо-Rb); общее количество клеток в культуре, количество митотических и многоядерных клеток в культуре; параметры клеточного цикла; структурно-пространственное распределение киназы Aurora B.

#### **2.5. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования**

В ходе исследования проведен детальный анализ организации  $\gamma$ - и  $\beta$ -актиновых цитоскелетных систем с помощью современных методов визуализации - конфокальной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения со структурированным освещением и описаны их морфофункциональные отличия в нормальных и

трансформированных мезенхимальных клетках. Впервые показано изменение пространственно-структурной организации актинового цитоскелета, а также распределения актиновых изоформ (фенотипическая нормализация) в вирус-трансформированных клетках при снижении уровня МАО в присутствии МАО семейства SkQ. Наблюдаемая реорганизация актина сопровождается восстановлением системы  $\beta$ -актиновых пучков, содержащих маркеры миофибробластной дифференцировки, клетки при этом приобретают более нормальный фенотип. Данные литературы свидетельствуют о том, что уменьшение экспрессии  $\beta$ -актина при сохранении гомогенного распределения  $\gamma$ -актина можно считать характерным признаком опухолевой трансформации (Дугина и др., 2019). Таким образом, полученные данные о восстановлении системы  $\beta$ -актиновых пучков в трансформированных фибробластах в присутствии МАО позволяют рассматривать данные молекулы как потенциальные противоопухолевые агенты и дальнейшее исследование механизмов их действия является перспективной не только теоретической, но и практической задачей.

В данной работе впервые исследовано воздействие МАО группы SkQ на фокальные адгезии вирус-трансформированных клеток, показавшее увеличение размера ФК и появление популяции зрелых ФК, что указывает на нормализацию трансформированного фенотипа клеток. Данный эффект также сопровождался появлением актиновых пучков, богатых  $\alpha$ -гладкомышечным актином. Полученные данные говорят в пользу того, что снижение МАФК с помощью МАО вызывает ряд последовательных этапов модуляции трансформированных фибробластов в направлении миофибробластного фенотипа (Hinz et al., 2002).

Нарушения в прогрессии клеточного цикла являются одним из основных факторов опухолеобразования, что делает регуляторы пролиферации перспективными мишенями противоопухолевой терапии. В исследовании оценен вклад МАФК в регуляцию клеточного цикла трансформированных клеток. Впервые показано, что уменьшение уровня МАФК при воздействии МАО семейства SkQ подавляет рост вирус-трансформированных фибробластов, а также клеток фибросаркомы и рабдомиосаркомы в культуре. При этом данный эффект частично опосредован модуляцией белков APC, снижением уровня Aurora B и фосфорилированных форм киназ Aurora A/B/C.

Полученные экспериментальные данные позволили выдвинуть гипотезу о том, что МАФК играют важную роль в процессе клеточной трансформации, регулируя реорганизацию цитоплазматических изоформ актина и АВР, а также процесс клеточного деления опухолевых и вирус-трансформированных фибробластов с участием киназ семейства Aurora. Результаты данного исследования позволяют рассматривать МАО как

потенциальные средства противоопухолевой терапии, а дальнейшее изучение механизмов их действия – как важную научно-прикладную задачу. Проведенные в данной работе эксперименты внесли существенный вклад в разработку данного направления, использованные подходы соответствуют мировому уровню исследований.

## **2.6. Методология диссертационного исследования**

Данное исследование проведено с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, биохимии. При исследовании организации актиновых цитоскелетных систем, АВР и фокальных адгезий использовались: широкий спектр специфических антител к изоформам актина и соответствующим белкам, методы иммунофлуоресценции, лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения со структурированным освещением. Для количественной оценки содержания белков в клеточных культурах применялся метод белкового электрофореза и иммуноблоттинга. При исследовании количества клеток в культурах клетки выявляли с помощью фазово-контрастной микроскопии, для анализа динамики клеточного цикла применялась прижизненная цейтраферная видеомикроскопия, параметры клеточного цикла исследовались методом проточной цитофлуориметрии.

Полученные в ходе исследования данные были обработаны с помощью специализированного программного обеспечения MetaMorph, Beckman Coulter CXP, Adobe Photoshop, LSM, Image J - для обработки и анализа изображений, измерения размеров (длина ФК, площадь, занимаемая клетками на субстрате), измерения интенсивности флуоресценции и интенсивности экспрессии белков. Для оценки статистической значимости различий между контрольными и экспериментальными данными применялись непараметрический двусторонний U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента. Эксперименты выполнены в трёх – пяти повторах с хорошей воспроизводимостью.

## **2.7. Положения, выносимые на защиту**

**Положение 1:** для неопластически трансформированных мезенхимальных клеток характерно нарушение организации актиновых филаментов,  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых цитоскелетных систем и распределения АВР. Снижение уровня мАФК при воздействии мАО приводит к фенотипической нормализации таких клеток и восстановлению системы  $\beta$ -актиновых пучков, увеличению размера ФК и появлению зрелых ФК.

**Положение 2:** снижение уровня мАФК в присутствии мАО в культуре опухолевых фибробластов приводит к ингибированию пролиферации, изменению динамики клеточного цикла и индукции апоптоза.

## **2.8. Апробация результатов**

Результаты исследования были представлены и обсуждены на 7 российских и международных конференциях и симпозиумах.

## **2.9. Публикации по теме исследования**

По материалам исследования опубликовано 5 научно-исследовательских работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М. В. Ломоносова по специальности и отрасли наук. Список публикаций представлен в разделе 9.

## **2.10. Финансовая поддержка**

Работа была выполнена в рамках гостемы «Изучение внутри- и межклеточных взаимодействий методами молекулярной и клеточной биологии, физиологии, математики и биоинформатики».

## **2.11. Личный вклад автора в проведение исследования**

Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в анализе литературы по теме, формулировании задач работы, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

### 3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Титова Е.В., Шагиева Г.С., Дугина В.Б., Копнин П.Б. Роль киназы AURORA B в нормальных и опухолевых клетках // Биохимия. – 2023 – Т. 88. - № 12. – С. 2435 – 2445.

#### 3.1. Характеристики трансформированных клеток

Биология опухолей представляет собой сложную систему из множества различных типов клеток, которые взаимодействуют между собой. Непосредственно опухолевые клетки в ходе многоступенчатого процесса трансформации приобретают ряд специфических характеристик, связанных с изменением внутриклеточных сигнальных путей, генетической нестабильностью, измененными пролиферативными и морфологическими характеристиками. Ханахан и Вейнберг выделили основные отличительные признаки процесса трансформации клеток и канцерогенеза как основу для понимания и описания широкого разнообразия всех неопластических новообразований (Hanahan and Weinberg, 2011):

1. Способность опухолевых клеток поддерживать неограниченную пролиферацию.

Нормальные ткани тщательно контролируют продукцию факторов клеточного роста, отвечающих за вступление и прохождение клеток по клеточному циклу, а также регулирующих увеличение размера клеток. Такой контроль обеспечивает регуляцию количества клеток и поддерживает нормальную архитектуру и функцию ткани. Нарушение данных сигнальных путей в опухолевых клетках часто влияет и на другие биологические свойства клетки, такие как выживаемость и энергетический метаболизм (подробнее рассмотрено в разделе 3.3.1.)

Трансформированные клетки приобретают способность поддерживать пролиферативную сигнализацию несколькими альтернативными способами. Так, они могут сами вырабатывать факторы роста - лиганды, в ответ на появление которых экспрессируются соответствующие рецепторы, что приводит к аутокринной пролиферативной стимуляции. В качестве альтернативы, опухолевые клетки могут посылать сигналы для стимуляции нормальных клеток в опухоль-ассоциированной строме, которые в ответ снабжают их различными факторами роста (Cheng et al., 2008; Bhowmick et al., 2004). Сигнальные пути также могут быть изменены путем увеличения количества рецепторов, экспонируемых на поверхности клеточной мембраны, что делает трансформированные клетки гиперчувствительными к факторам роста. Аналогичный

эффект наблюдается в результате лиганд-независимого ответа рецепторов при структурных изменениях в рецепторных молекулах.

Механизмы обратной связи обеспечивают гомеостаз в потоке многочисленных внутриклеточных сигналов. Различные дефекты в механизмах обратной регуляции могут приводить к усилению пролиферации. Так, онкогенные эффекты Ras не являются результатом гиперактивации его нисходящих сигналов. Напротив, онкогенная мутация, затрагивающая гены *ras*, приводит к снижению активности Ras ГТФаз и работает как внутриклеточный механизм отрицательной обратной связи. Аналогичным образом действует фосфатаза P<sup>19</sup>EN, противодействующая PI3-киназам путем деградации их продукта PIP<sub>3</sub>. Мутации, подавляющие функцию PTEN, усиливают PI3K-сигнализацию и способствуют опухолеобразованию (Jiang and Liu, 2009).

Стоит отметить, что чрезмерная активация пролиферативных сигнальных путей может запускать процесс старения. Так, усиление сигналинга от онкобелков RAF, RAS, MYC может вызывать ответные реакции клеток - индукцию клеточного старения, апоптоза (Collado and Serrano, 2010; Lowe et al., 2004). Клетки с характеристиками, указывающими на процесс старения (увеличенная цитоплазма, отсутствие маркеров пролиферации, усиленная экспрессия β-галактозидазы), преобладают в некоторых опухолях (Mooi and Peerer, 2006). Этот эффект, по-видимому, отражает внутренние механизмы клеточной защиты, направленные на уничтожение клеток с чрезмерной активацией сигналов определенных типов. Соответственно, относительная интенсивность онкогенной сигнализации в трансформированных клетках может представлять собой компромисс между максимальной митогенной стимуляцией и избеганием антипролиферативных защитных механизмов. Альтернативно, некоторые трансформированные клетки могут адаптироваться к высокому уровню онкогенных сигналов путем ингибирования сигналинга, запускающего старение или апоптоз.

Контактное торможение оказывает ингибирующее действие на процесс пролиферации. Известно, что межклеточное взаимодействие в плотном монослое нормальных клеток в двумерной культуре подавляет пролиферацию. Данный эффект контактного торможения утрачен в различных типах опухолевых клеток. Один из механизмов связан с продуктом гена *NF2*. Он долгое время считался супрессором опухолей, поскольку его потеря вызывает одну из форм нейрофиброматоза человека. Процесс контактного торможения обеспечивает белок мерлин, цитоплазматический продукт гена *NF2*. Он взаимодействует с адгезионными молекулами на поверхности клеток (например, с E-кадгеринном) и присоединяется к трансмембранным рецепторным

тирозинкиназам (например, рецепторам EGF). При этом мерлин усиливает межклеточные контакты, опосредованные E-кадгеринами (Curto et al., 2007; Okada et al., 2005).

В другом механизме контактного торможения важную роль играет белок LKB1, отвечающий за организацию и целостность эпителия. LKB1 может блокировать митогенный эффект онкогена *Myc* в случае его активации. Снижение экспрессии LKB1 приводит к нарушению эпителиальной ткани и клетки становятся восприимчивы к трансформации, вызванной активацией гена *Myc* (Partanen et al., 2009; Hezel and Bardeesy, 2008).

Неограниченная пролиферация опухолевых клеток также может быть опосредована нарушением TGF- $\beta$ -сигнальных путей. В ходе процесса трансформации клетки приобретают ряд механизмов уклонения от антипролиферативного эффекта TGF- $\beta$  (Ikushima and Miyazono, 2010; Massagué et al., 2023). На поздних стадиях развития многих опухолей цитостатические сигналы TGF- $\beta$  сменяются на сигналы, активирующие эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). В ходе этой клеточной программы клетки приобретают свойства, характерные для высокодифференцированной злокачественной опухоли.

## 2. Инактивация генов-супрессоров клеточного деления.

В дополнение к способности поддерживать сигналы, стимулирующие клеточный рост, трансформированным клеткам необходимо преодолевать механизмы, которые в норме ограничивают пролиферацию клеток с помощью генов-супрессоров опухолей. Многие из таких генов были открыты благодаря их инактивации в опухолевых клетках. Один из классических генов-супрессоров *RB* кодирует белок ретинобластомы Rb (retinoblastoma protein), другой, ген *TP53* - кодирует белок P53. Они являются ключевыми компонентами в двух взаимодополняющих друг друга сигнальных цепочках, которые определяют, будет ли в клетке запущена пролиферация или же программы старения и апоптоза. Белок Rb в ответ на различные, преимущественно внеклеточные, сигналы влияет на то, пройдет ли клетка цикл роста и деления (Burkhardt and Sage, 2008). Таким образом, в трансформированных клетках с дефектами в *RB* сигнальной цепочке, отсутствует точка контроля прогрессии клеточного цикла, что вызывает неограниченную пролиферацию. *TP53* получает сигналы от рецепторов, активирующихся в ответ на различные внутриклеточные аномалии. Если при повреждении генома уровень глюкозы или АФК оказываются чрезмерными, *TP53* может остановить дальнейшую прогрессию клеточного цикла, пока внутриклеточные условия не нормализуются. Если же патологические изменения в клетке оказываются необратимыми, *TP53* может запустить программу апоптоза.

### 3. Нарушение регуляции гибели клеток и immortalization.

Одним из основных естественных барьеров на пути процесса опухолеобразования является запрограммированная клеточная гибель путем апоптоза (Adams and Cory, 2007). Этот механизм запускается при нарушении внутриклеточного сигналинга в ответ на повышение уровня онкогенов и повреждении ДНК в связи с гиперпролиферацией клеток. Показано, что в клетках злокачественных опухолей, резистентных к терапии, уровень апоптоза снижается (Adams and Cory, 2007). Описывают три фазы апоптоза: сигнальную, эффекторную и фазу деградации. Регуляторы апоптоза включают в себя внеклеточные (например, Fas-опосредованные) и внутриклеточные (митохондриальный путь апоптоза) сигнальные каскады. Молекулярными маркерами первого являются иницирующие каспазы: 8 и 10. Маркерами митохондриального пути являются белки p53, p21, p16, играющие важную роль в ответе на повреждение ДНК и клеточном старении, а иницирующей является каспаза-9. При этом в роли эффекторной каспазы как при внешнем, так и при собственном пути апоптоза выступает каспаза-3 (Elmore, 2007). В результате процесса апоптоза клетка постепенно распадается на апоптотические тельца и поглощается как соседними клетками, так и специализированными фагоцитирующими клетками. В самом общем виде процесс апоптоза контролируется про- и антиапоптотическими регуляторными белками семейства Bcl-2 (B-cell Leukemia/Lymphoma 2) (Adams and Cory, 2007). Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1 являются ингибиторами апоптоза. Они преимущественно связываются с двумя проапоптотическими белками Bax (Bcl2 Associated X Protein) и Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer), встроенными в мембрану митохондрий, подавляя их активность. При активации Bax и Bak нарушается целостность внешней митохондриальной мембраны, что приводит к высвобождению проапоптотических сигнальных белков, таких как цитохром c. Он активирует ряд каспаз, что приводит к многочисленным апоптотическим изменениям благодаря их протеолитической активности. Bax и Bak содержат BH3-домены, отвечающие за взаимодействие с антиапоптотическими Bcl-2-подобными белками (Adams and Cory, 2007; Willis and Adams, 2005).

К наиболее заметным аномалиям, запускающим апоптоз в трансформированных клетках, относятся повреждения ДНК. Данный механизм функционирует через опухолевый супрессор p53 (Junttila and Evan, 2009). Он вызывает остановку клеточного цикла как фактор транскрипции ингибиторов циклин-зависимых киназ – белков p16 и p27. Также p53 индуцирует апоптоз, повышая уровень экспрессии белков, содержащих BH3-домен – Noxa (NADPH oxidase activator) и Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), при значительном увеличении количества разрывов ДНК, хромосомных аномалий. С

другой стороны, недостаточное количество таких факторов как интерлейкин-3 (для лимфоцитов) или инсулиноподобный фактор роста 1/2, Igf1/2 (для эпителиальных клеток) может вызывать апоптоз через ВНЗ-содержащий белок BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death). Гиперактивность онкопротеинов, таких как Мус, также приводит к запуску программируемой клеточной гибели (Junttila and Evan, 2009). Трансформированные клетки имеют ряд механизмов, позволяющих ограничить процесс апоптоза или избежать его. Наиболее распространенными являются инактивация опухолевого супрессора *TP53*, увеличение экспрессии антиапоптотических регуляторов (Bcl-2, Bcl-xL) или факторов роста (Igf1/2), снижение экспрессии проапоптотических факторов (Bax, BIM, Puma). Таким образом, запрограммированная клеточная гибель является одним из основных барьеров клеточной трансформации и опухолеобразования.

#### 4. Репликативное бессмертие.

В отличие от большинства нормальных клеток, которые способны пройти лишь ограниченное число последовательных циклов деления, опухолевые клетки обладают неограниченным репликативным потенциалом. В нормальных клетках существует два механизма, препятствующих неограниченной пролиферации – старение и клеточная гибель. Соответственно, когда клетки размножаются в культуре, повторяющиеся циклы деления приводят к индукции старения. Клетки, которым удалось обойти этот механизм, претерпевают кризис, в результате которого подавляющее большинство из них погибает. Часть клеток переживает кризис и приобретает неограниченный репликативный потенциал. Этот переход называется иммортализацией (способность клеток пролиферировать в культуре без признаков старения или кризиса).

Теломеры, защищающие концы хромосом, играют центральную роль в способности клеток к неограниченному делению (Blasco, 2005; Shay and Wright, 2000). Теломеры, состоящие из множества tandemных гексануклеотидных повторов, непрерывно укорачиваются в процессе делений нормальных клеток. В конечном итоге теломеры теряют способность защищать концы хромосомных ДНК от слияния между собой. В результате такого взаимодействия образуются нестабильные дицентрические хромосомы, что приводит к нарушению кариотипа и угрозе жизнеспособности клеток. Соответственно, длина теломерной ДНК в клетке определяет, через сколько циклов делений может пройти клетка, прежде чем теломеры утратят свою защитную функцию, что приведет к критическому состоянию клетки.

Теломераза, специализированная ДНК-полимераза, добавляет сегменты теломерных повторов к концам теломерной ДНК. Ее практически нет в неиммортализованных клетках, но значителен уровень экспрессии в подавляющем

большинстве (90%) спонтанно иммортализованных клеток, включая опухолевые клетки человека. В последних наличие теломеразной активности коррелирует с устойчивостью к процессу старения и апоптозу, а ее снижение влечет за собой укорачивание теломер и активацию одного из этих процессов. Эти две программы, ограничивающие пролиферацию - старение и программируемая клеточная гибель – являются важнейшими противоопухолевыми защитными механизмами, которые в норме препятствуют появлению и росту клонов неопластически трансформированных клеток. Иммортализация отдельных клеток, образующих опухоли, объясняется их способностью поддерживать достаточную длину теломерной ДНК. Благодаря этому процессы старения и апоптоза не запускаются, что чаще всего достигается путем повышения экспрессии теломеразы. Таким образом, укорочение теломер является фактором, определяющим ограниченный репликативный потенциал нормальных клеток, который должен быть преодолен в ходе процесса неопластической трансформации.

Стоит также отметить двоякую роль теломер в процессе опухолеобразования, выявленную при сравнительном анализе предопухолевых и злокачественных образований в молочной железе человека (Raynaud et al., 2010). Менее злокачественные поражения не экспрессировали значительный уровень теломеразы, имели укороченные теломеры и неклональные хромосомные aberrации. В отличие от них, злокачественные карциномы демонстрировали высокое содержание теломеразы, более длинные теломеры и накапливали клональные aberrантные кариотипы. Последние, по-видимому, были приобретены в результате разрушения теломерных участков, и до появления вновь теломеразной активности. Описанное вначале снижение активности теломеразы в менее злокачественных клетках необходимо, предположительно, для накопления мутаций, способствующих развитию опухоли. Последующая же активация теломеразы стабилизирует мутантный геном и наделяет его неограниченным репликативным потенциалом, необходимым для роста опухоли.

##### 5. Индуцирование ангиогенеза.

Неопластически трансформированным клеткам, как и нормальным тканям, необходимо питание в виде питательных веществ, кислорода, а также удаление продуктов метаболизма и углекислого газа. В условиях организма в ходе опухолевой прогрессии для этих целей злокачественные клетки активируют механизм ангиогенеза, синтезируя ряд сигнальных молекул (Hanahan and Folkman, 1996). К регуляторам этого процесса относятся такие сигнальные белки как сосудистый эндотелиальный фактор роста-А (VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A) и тромбоспондин 1 (TSP-1, thrombospondin-1). Ген VEGF-A кодирует лиганды, которые участвуют в индукции роста новых сосудов.

VEGF сигналинг осуществляется через три рецепторные тирозинкиназы (VEGFR-1-3), при этом экспрессия гена VEGF может повышаться как в условиях гипоксии, так и в присутствии онкогенов (Ferrara et al., 2009). TSP-1 выступает основным ингибитором ангиогенеза, связываясь с трансмембранными рецепторами эндотелиальных клеток и противодействует проангиогенным сигналам (Kazerounian et al., 2008).

#### б. Активация инвазии и метастазирование.

Процессы, лежащие в основе инвазии и метастазирования, в значительной степени связаны с изменением формы клеток и их контактами с внеклеточным матриксом. Так, наиболее характерные изменения для клеток карциномы – это потеря E-кадгерина, ключевой молекулы клеточной адгезии. Повышенная экспрессия E-кадгерина является антагонистом инвазии и метастазирования, в то время как снижение его экспрессии, как известно, усиливает соответствующие изменения фенотипа (Berx and van Roy, 2009). И наоборот, молекулы адгезии, обычно связанные с миграцией клеток во время эмбриогенеза и воспаления, часто повышаются. Например, N-кадгерин, который обычно экспрессируется в мигрирующих нейронах и мезенхимальных клетках во время органогенеза, повышается во многих инвазирующих клетках карциномы (Cavallaro and Christofori, 2004).

Для эпителиальных клеток ведущую роль в процессе метастазирования играет ЭМП, в результате которого клетки приобретают способность инвазировать в окружающие ткани, противостоять апоптозу и мигрировать (Klymkowsky and Savagner, 2009; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Yilmaz and Christofori, 2009). Процесс ЭМП обеспечивается активностью транскрипционных факторов, включая Snail, Slug, Twist и Zeb1/2, повышенная экспрессия которых в различных комбинациях отмечена в ряде злокачественных опухолей (Micalizzi et al., 2010; Taube et al., 2010; Schmalhofer et al., 2009; Yang and Weinberg, 2008). Их активность приводит к нарушению межклеточных контактов, изменению морфологии клеток с полигональной (эпителиальной) на веретенообразную (фибробластоподобную) и экспрессии разрушающих внеклеточный матрикс ферментов, усилению подвижности (Peinado et al., 2004).

В поддержании клеточной архитектуры опухолевой клетки, ее миграции, адгезии и инвазии активно участвуют компоненты цитоскелетных систем. Ведущую роль в этих процессах играет реорганизация актинового цитоскелета и связанная с ней пространственно-временная координация сигнальных путей белков, регулирующих полимеризацию актина, и АВР (Blanchoin et al., 2014; Pollard and Cooper, 2009). При неопластической трансформации активируются различные молекулярные механизмы, приводящие к реорганизации актинового цитоскелета, миграции клеток и

метастазированию из первичной опухоли (Yamaguchi and Condeelis, 2007). Формирование богатых актином мембранных структур (ламеллиподий, филоподий, инвадоподий, раффлов) является ключевой особенностью опухолевых клеток, которая позволяет им распространяться и формировать колонии в других органах (Bravo-Cordero et al., 2012).

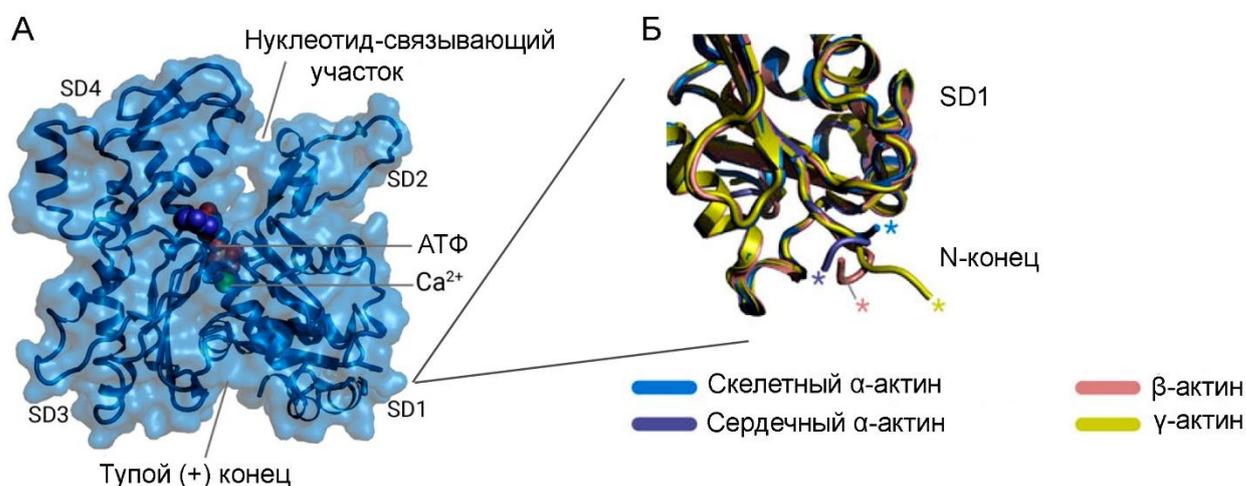
## **3.2. Организация актинового цитоскелета в клетке**

### **3.2.1. Актин**

Актин – фундаментальный структурный компонент цитоскелета, один из самых распространенных и высококонсервативных белков клеток эукариот (Pollard et al., 2016; Svitkina et al., 2018). К актиновой цитоскелетной системе млекопитающих относятся шесть идентифицированных изоформ актина, более 400 АВП и порядка 2500 актин-ассоциированных белков (Meenakshi et al., 2023). Данные белки регулируют полимеризацию и деполимеризацию актина, а также формирование функционально различных структур (микрофиламенты и стресс-фибриллы, кортикальная и ламеллярная сети) (Reumann et al., 2016; Schaks et al., 2019; Clarke et al., 2021). Кроме того, актин взаимодействует с молекулярными моторами суперсемейства миозинов, отвечающих за движение и транспорт вдоль актиновых микрофиламентов (Sellers et al., 2000). Публикации последних лет указывают на то, что несмотря на высокую структурную и функциональную консервативность, изоформы актина формируют различные цитоскелетные системы, которые выполняют различные функции и взаимодействуют с определенными АВП (Arora et al., 2023; Mactaggart et al., 2021). Динамическая реорганизация актинового цитоскелета играет одну из ведущих ролей в прогрессии и метастазировании опухолей.

Актин в клетке существует в виде мономерных субъединиц (глобулярный G-актин) и в форме полимера - фибриллярного F-актина, формирующего пучки микрофиламентов и другие актиновые структуры. Каждый пул составляет примерно 50% от общего количества актина в клетке (Dominguez et al., 2011). Мономерный актин представляет собой сферическую молекулу массой 42 кДа (Рис. 1, А). Она образована полипептидом, образующим две доли молекулы, соединенные линкерным участком. Каждая доля содержит два субдомена (SD1, SD2 и SD3, SD4) (Kabsch et al., 1990). Глубокая щель между субдоменами SD2 и SD4, разделяющая молекулу на две части, имеет участки связывания АТФ или АДФ, двухвалентных ионов металлов, как правило  $Ca^{2+}$  или  $Mg^{2+}$ . Обычно в сайте связывания находится АТФ или АДФ-Pi, т.к. их сродство к Mg-G-актину больше, чем у АДФ; связь с Ca-G-актином у всех нуклеотидов слабее (De La Cruz et al., 1995).  $Mg^{2+}$  - основной катион определяющий, насколько сильно или слабо нуклеотид

связан с молекулой актина (Estes et al., 1992). Полость между доменами SD1 и SD3 опосредует продольные взаимодействия между мономерами актина внутри микрофиламента (Oda et al., 2009), является участком связывания АВР и молекул миозина (Dominguez et al., 2004).



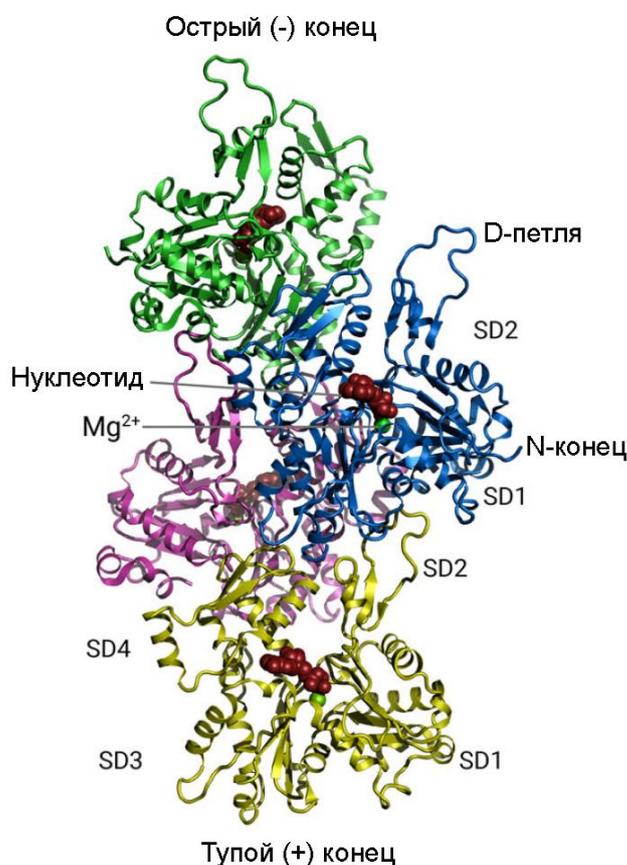
**Рисунок 1.** Структура молекулы G-актина (Heissler, 2025).

А – трехмерная структура G-актина (*PDB ID: 1ATN*). В центре молекулы расположена полость, где находится участок связывания нуклеотида и ионов металлов (показаны молекула АТФ и катион Ca<sup>2+</sup>); SD1-SD4 – общепринятые обозначения субдоменов; полость между субдоменами SD3 и SD1, соответствующая (+) концу филамента;

Б – трехмерная структура субдомена SD1. Показано наложение мономерных структур изоформ актина: скелетного α-актина (*PDB ID: 8DMX*, синий), кардиального или сердечного α-актина (*PDB ID: 8DMY*, фиолетовый), β-актина (*PDB ID: 8DNI*, красный) и γ-актина (*PDB ID: 8DNF*, желтый). Различное положение N-концевых участков отмечено звездочкой (\*).

В результате полимеризации актина образуются полярные микрофиламенты. Структурно этот процесс сопровождается существенным уплощением актинового мономера (Oda et al., 2009). Микрофиламент актина имеет диаметр 8 нМ и структуру правосторонней спирали с шагом 37,5 нМ и выступающими N-концевыми остатками (Рис. 2). SD2 и SD4 субдомены молекулы актина находятся на остром (-) конце, а SD1 и SD3 субдомены на тупом (+) конце. Концы актинового филамента биохимически и структурно различны (Carman et al., 2023). Мономеры актина в составе фибриллы имеют ассиметричную структуру и ассоциируют друг с другом со смещением. Структура нативной молекулы G-актина отличается от молекулы актина в составе филамента. Так,

D-петля, расположенная в верхней части субдомена SD2 (который опосредует взаимодействие с ДНКазой I), неупорядочена в нативном состоянии и имеет структурированную конформацию в филаментной форме (Graceffa and Dominguez, 2003; Oda et al., 2009).



**Рисунок 2. Структура фибриллы F-актина (PDB ID: 3G37).** Представлен фрагмент фибриллы из четырех молекул актина. Обозначены N-концевые участки мономеров актина, молекулы нуклеотида и катионы  $Mg^{2+}$ ; субдомены SD1-SD4, D-петля, тупой (+) конец и острый (-) конец филамента;

Процесс полимеризации актина включает два основных этапа:

- в ходе первого этапа образуется «затравка». При этом два мономера связываются в димер, который имеет большую тенденцию к диссоциации, чем к присоединению новых молекул актина. Далее образуется более стабильный триплет (или олигомер), который является затравкой для последующей полимеризации. В этом состоянии филамент имеет большую тенденцию к присоединению мономеров, чем к диссоциации (Wegner et al., 1975; Cooper et al., 1983).

- в ходе второго этапа, элонгации, мономеры актина быстро присоединяются к филаменту с обоих его концов. (Murphy et al., 1988). К факторам, способствующим полимеризации, относятся большая ионная сила (концентрация  $KCl > 50$  мМ), нейтральная или слабо кислая среда, высокая концентрация  $Ca^{2+}$  и особенно  $Mg^{2+}$ , повышенная температура (Grazi et al., 1985).

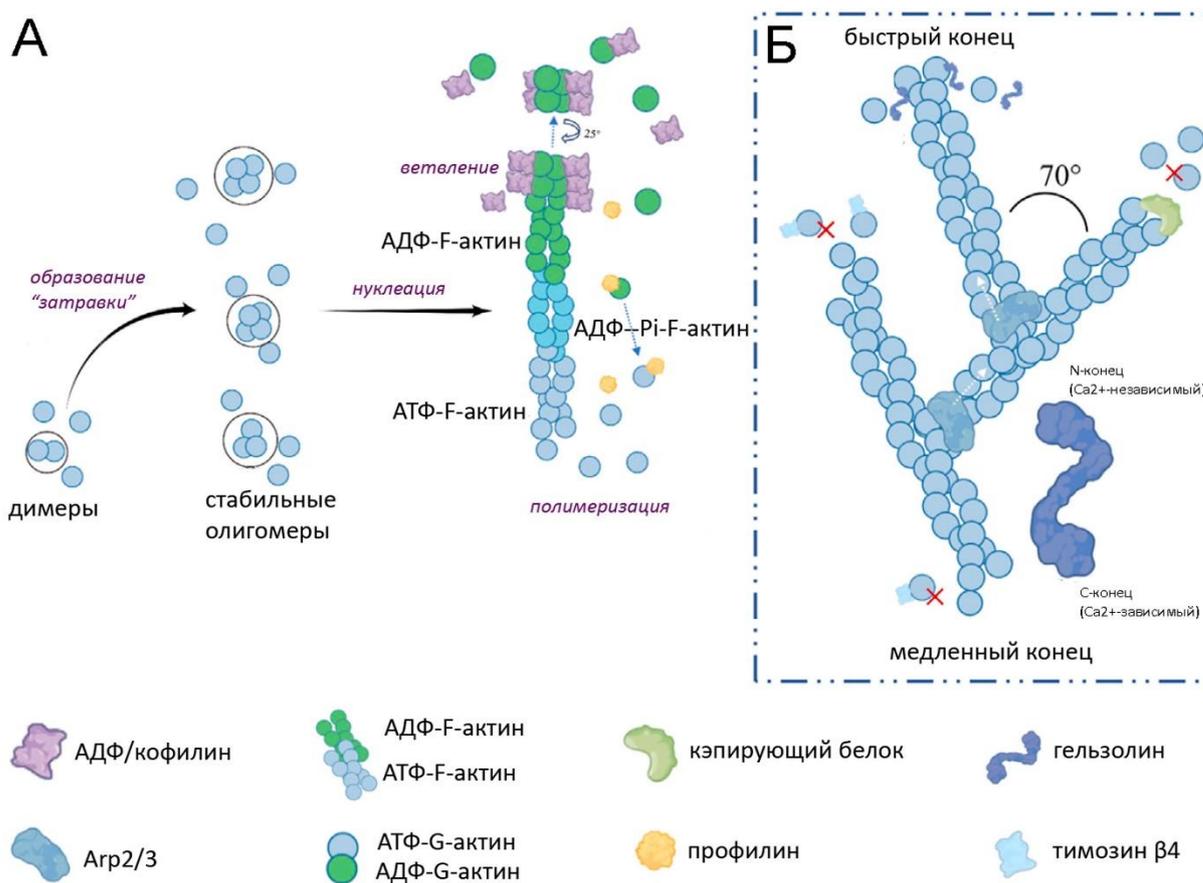
Актиновые микрофиламенты - это динамичные структуры: мономеры из цитоплазматического пула постоянно присоединяются к концам нити или отделяются от

них. Контакты между соседними мономерами актина обеспечиваются за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Процесс элонгации филамента состоит из процессов ассоциации и диссоциации G-актина. Полимеризация актина *in vitro*, может происходить на обоих концах микрофиламента, но с разной скоростью (зависит от взаимной ориентации мономеров актина). На так называемом остром или медленном (-) конце присоединение новых молекул актина затруднено. На тупом или быстром (+) конце полимеризация идет быстрее. Здесь преимущественно идет процесс удлинения нити, а не разборки. Таким образом, микрофиламенты актина обладают структурной и функциональной полярностью.

Динамический оборот актиновых филаментов контролирует клеточную подвижность у эукариот, и связан с изменениями связи F-актина с нуклеотидами. Строительным материалом для удлинения микрофиламентов является мономер актина, содержащий в своем составе молекулу АТФ и катион  $Ca^{2+}$  (условие, необходимое для сохранения актина в неполимеризованной форме). Таким образом, на плюс-конце нити располагаются в основном мономеры актина, содержащие АТФ и  $Ca^{2+}$ . После встраивания в состав микрофиламента актин быстро гидролизует АТФ, поэтому часть мономеров в составе полимера содержат АДФ и неорганический фосфат (Blanchoin et al., 2002). После длительного пребывания в составе филамента такие мономеры приобретают способность медленно высвобождать неорганический фосфат из своей центральной щели, при этом катион  $Ca^{2+}$  сменяется на  $Mg^{2+}$  (Carlier et al., 1986). Как следствие, мономеры, находящиеся на (-) конце микрофиламента, содержат только АДФ. Мономеры актина, содержащие АТФ, прочнее взаимодействуют друг с другом, чем мономеры, содержащие АДФ – поэтому на (+) конце полимеризация идет быстрее (Winder et al., 2005) (Рис. 3).

Таким образом, актиновые филаменты эукариот преимущественно полимеризуются на своем тупом (+) конце и преимущественно деполимеризуются на (-) конце в ходе постоянного динамического процесса удлинения/укорочения, называемого тредмиллингом (от англ. treadmilling) (Carlier et al., 2017). При этом постоянная текущая длина микрофиламента в клетке исключительно велика и составляет около 10 мкм (Ott et al., 1993). Структурные особенности обоих концов микрофиламента актина в ходе процесса сборки и старения были недавно выявлены с помощью криоэлектронной микроскопии (Chou et al., 2023). Остается не до конца ясным, как F-актин гидролизует АТФ и затем претерпевает тонкие конформационные перестройки, которые в конечном итоге приводят к деполимеризации филамента под действием АВР. Криоэлектронно-микроскопический анализ структуры F-актина показал, что полимеризация актина вызывает перемещение молекул воды в нуклеотид-связывающем кармане, активируя одну

из них для нуклеофильной атаки АТФ. Небольшие изменения в нуклеотид-связывающем кармане после гидролиза АТФ и высвобождения неорганического фосфата воспринимаются соответствующей аминокислотой, усиливаются и передаются на периферию филамента. Кроме того, различия в положении молекул воды в нуклеотид-связывающем кармане объясняют, почему  $\text{Ca}^{2+}$ -актин демонстрирует более медленную скорость полимеризации, чем  $\text{Mg}^{2+}$ -актин (Oosterheert et al., 2022).



**Рисунок 3.** Динамика актиновых микрофиламентов в клетке (Bai, 2023).

А – Полимеризация и деполимеризация актина с участием АВР, где АТФ-содержащий G-актин встраивается в микрофиламент (АТФ-F-актин), а АТФ-F-актин спонтанно диссоциирует на АДФ-Pi-F-актин. Затем он превращается в АДФ-F-актин и финально деполимеризуется в АДФ-содержащий G-актин. Таким образом достигается баланс процессов полимеризации и деполимеризации.

Б – тупые (+) концы актина полимеризуются быстрее, а острые (-) концы - медленнее. Боковые актиновые филаменты образуют угол в 70° по отношению к старому филаменту.

Фаза созревания заключается в установлении равновесного баланса между полимеризацией и деполимеризацией на концах филамента. Мономеры актина, присоединяющиеся и диссоциирующие в ходе полимеризации-деполимеризации, имеют

различную конформацию, что влияет на сродство актина к различным АВР (Kueh and Mitchison, 2009). *In vivo* сайт связывания нуклеотидов основной части молекул G-актина ассоциирован с АТФ, тогда как большая часть молекул F-актина содержит АДФ (Hegyí et al., 1988). Демонстрация актину - это не просто процесс, обратный полимеризации. Молекула G-актина, связанная с АДФ не может превратить свой нуклеотид в АТФ из АДФ и Pi. Субъединица, связанная с АДФ, должна быстро диссоциировать, отделив нуклеотид, и присоединить АТФ. Мономеры актину в составе филамента быстро перемещаются от его плюс-конца к минус-концу (Neidl and Engel, 1979).

### 3.2.2. Изоформы актину

Геном птиц и млекопитающих, в том числе человека, содержит шесть генов, кодирующих шесть паралоогов, или изоформ, актину. Это четыре изоформы мышечного актину:  $\alpha$ -скелетный - кодируется геном *ACTA1*, локализованном на хромосоме 1,  $\alpha$ -гладкомышечный (сосудистый) - ген *ACTA2* на хромосоме 10,  $\alpha$ -кардиальный (сердечный) - ген *ACTC1* на хромосоме 15,  $\gamma$ -гладкомышечный (кишечный) - ген *ACTG2* на хромосоме 2. Две немышечные цитоплазматические изоформы актину кодируются генами:  $\beta$ -актин - *ACTB* на хромосоме 7,  $\gamma$ -актин - ген *ACTG1* на хромосоме 17. Эта классификация основана на относительном количестве соответствующих изоформ в мышечных (около 20%) и немышечных (около 5%) клетках (Gunning P et al., 1984; Perrin and Ervasti, 2010; Otey et al., 1987). Изоформы актину имеют высокую степень гомологичности нуклеотидной последовательности (93-99%) и структурной идентичности (Arora et al., 2023, Otey et al., 1987). Изоформы актину образуют характерную двойную спираль с почти идентичным шагом спирали (около 27,6 Å) и скручиванием (около 166,7° - 168,0°). 22 аминокислотные замены между изоформами актину расположены в субдоменах SD3, SD4 и SD1. В N-концевой области субдомена SD1 изоформ актину сосредоточены четыре консервативные аминокислотные замены (Рис. 4, А) (Vandekerckhove and Weber, 1978). По данным структурных исследований, N-концевой участок принимает изоформ-специфические конформации и, вероятно, взаимодействует с молекулами миозина и АВР (Arora et al., 2023; Muller et al., 2013; Chen et al., 2017, Namba et al., 1992). Такая структурная вариабельность обуславливает различия в заряде молекул, на основании чего актину классифицированы как  $\alpha$ -,  $\beta$ -, и  $\gamma$ -изоформы в порядке возрастания изоэлектрических точек по данным изоэлектрофокусирования (Garrels et al., 1976; Rubenstein et al., 1990). С помощью криоэлектронной микроскопии была подтверждена возможность ко-полимеризации различных изоформ актину с образованием гетерологичных актиновых микрофиламентов в исследованиях *in vitro*. Также было

показано, что соотношение  $\beta$ -актин/ $\gamma$ -актин в таких филаментах определяет степень, с которой F-актин может влиять на увеличение АТФазной активности молекул миозина (Muller et al., 2013). Существование гетерологичных актиновых филаментов в клетках *in vivo* активно изучается и на данный момент ещё не доказано.

Было показано, что изоформы актина формируют *in vitro* структуры с различными механическими свойствами. Так,  $\gamma$ -актин образует более жесткие актиновые сети по сравнению с  $\beta$ -актином. В присутствии молекул миозина,  $\beta$ -актиновые системы демонстрируют большее количество сократительных взаимодействий, чем  $\gamma$ -актиновые, что может оказывать влияние структурные и функциональные особенности как отдельных цитоскелетных систем, так и клеток в целом (Neitmann et al., 2023).

Также показаны различия во взаимодействии между собой  $\beta$ -актиновых и  $\gamma$ -актиновых филаментов в присутствии  $Mg^{2+}$  -  $\beta$ -актин формирует сети с толстыми филаментами большим размером ячеек,  $\gamma$ -актин же формирует сети с меньшим размером ячеек. Это согласуется с их преимущественной локализацией в стресс-фибриллах или клеточном кортексе, соответственно. Детально механизм образования  $\gamma$ -актиновой сети не изучен. Предположительно,  $\gamma$ -актин способен образовывать сшивки в местах пересечения филаментов посредством взаимодействия ионов  $Mg^{2+}$  с выступающими N-концевыми участками молекул актина в составе соседних филаментов (Neitmann et al., 2023). Хотя важность изоформ актина в клеточных функциях не вызывает сомнений, механизмы их действия изучены неполно.

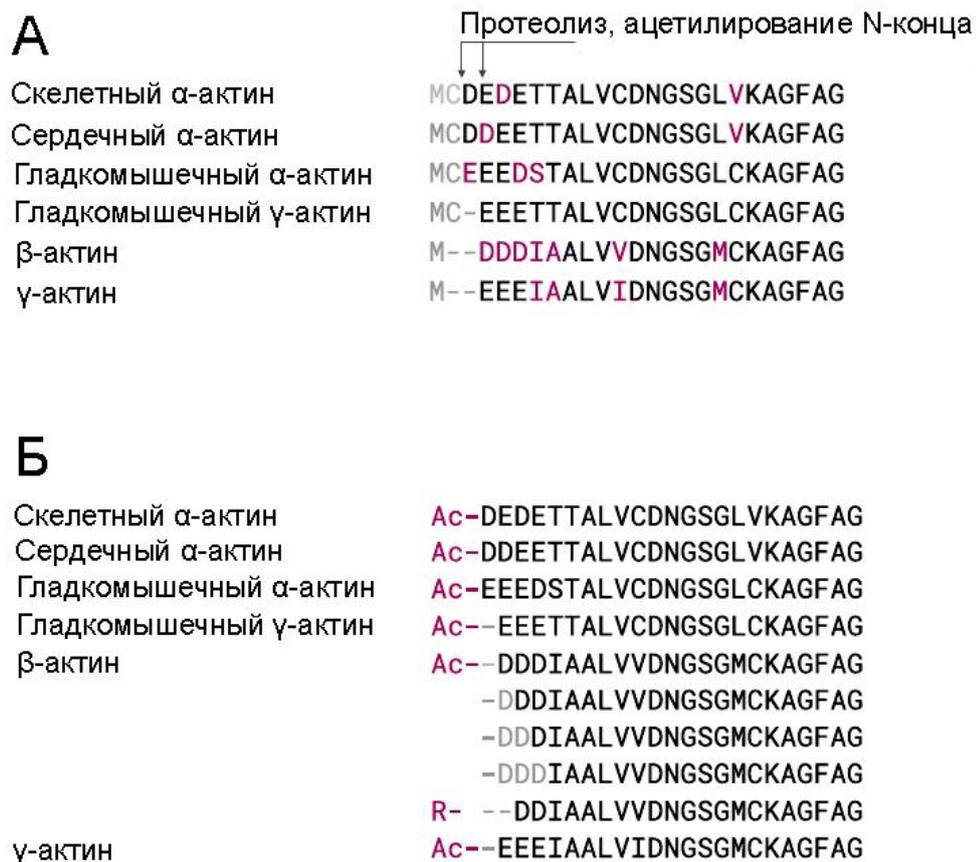
Изоформы  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина отличаются друг от друга лишь четырьмя консервативными аминокислотными заменами в N-концевой области (в положении 1, 2, 3 и 9) (Рис. 4, А), однако имеют разную пространственную организацию в пределах одной клетки, играют особую роль в таких клеточных процессах, как поляризация, миграция, адгезия и цитокинез (Шагиева и др., 2020; Dugina et al., 2009; Dugina et al., 2021, Perrin et al., 2010). При исследованиях на культурах нормальных фибробластов и эпителиальных клеток было показано, что  $\beta$ -актином в клетке обогащены стресс-фибриллы, области адгезионных межклеточных контактов и ведущего края. Локализация  $\gamma$ -актина зависит от состояния клетки: в мигрирующей клетке  $\gamma$ -актин находится в кортикальном слое и ламеллиподиях, а в спокойном состоянии - также обнаруживается в стресс-фибриллах (Dugina et al., 2009; Neitmann et al., 2023).

### **3.2.3. Специфические для изоформ актина модификации N-концевого участка**

Актин является высококонсервативным белком и имеет схожую последовательность аминокислот у различных представителей эукариот. Все изоформы

актина подвергаются изоформ-специфическим модификациям N-концевого участка (Drazic et al., 2018; Rebowski et al., 2020). В мышечных изоформах актина инициаторный метионин исчезает, а цистеин 2 подвергается ацетилированию. Впоследствии цистеин также удаляется ацетил-аминопептидазой, а вновь открытый N-концевой участок ацетилируется (Drazic et al., 2018, Rebowski et al., 2020). В неммышечных актинах иницирующий метионин ацетилируется и затем удаляется, при этом новый N-концевой участок также подвергается ацетилированию с помощью фермента ацетилтрансферазы NAA80 (N-terminal acetyltransferase) (Рис. 4, А). Модификация N-концевого участка путем ацетилирования обнаружена более чем в 90 % изоформ актина (Drazic et al., 2018). Показано, что фермент NAA80 не связывается с F-актином и ацетилирует молекулы актина, связанные с профилином. Это указывает на то, что ацетилирование N-концевого участка предшествует полимеризации актина (Rebowski et al., 2020).

Перед ацетилированием N-концевого участка с помощью NAA80 в молекулах  $\beta$ -актина N-концевые аспартатные остатки могут быть последовательно удалены N-концевыми аминопептидазами (DNPEP и ENPEP). В результате образуются варианты молекул  $\beta$ -актина с различным количеством кислых остатков на N-конце (Рис. 4, Б), которые обнаруживаются как в пуле G-актина, так и в составе филаментов (Chen et al., 2021). Эта модификация происходит в 1 - 3 % молекул  $\beta$ -актина от общего количества  $\beta$ -актина клетки, однако нокаутные по ферментам DNPEP и ENPEP клетки демонстрируют значительные изменения в строении актиновых структур и клеточной подвижности. Различные схемы модификаций N-концевого участка наблюдаются в различных типах клеток и тканей (Chen et al., 2021). Поскольку N-концевой участок выступает на поверхности  $\beta$ -актинового филамента, включение в его состав мономеров с модифицированным N-концевым участком может локально изменять плотность заряда микрофиламента. Это в свою очередь влияет на его способность связываться с АВР, молекулами миозина. Так, более короткий N-концевой участок с меньшим количеством отрицательных зарядов, предположительно, будет иметь более слабое сродство к молекулам миозина (Arora et al., 2023; Holmes et al., 1990).



**Рисунок 4.** N-концевой процессинг и посттрансляционные модификации в изоформах актина (Heissler, 2025).

А – Процессинг в N-концевой области изоформ актина. Консервативные аминокислоты показаны черным цветом, переменные аминокислоты – розовым, аминокислоты, отсутствующие в зрелых изоформах актина вследствие протеолиза – серым.

Б – различные виды изоформ актина образуются в результате N-концевого процессинга. Ацетилирование (Ac-) и аргинилирование (R-) показаны розовым цветом. Аминокислоты, отсутствующие в результате протеолитического расщепления, показаны серым цветом. Знак (-) указывает на пропуски при выравнивании.

В организме млекопитающих  $\alpha$ -сердечный актин сосредоточен преимущественно в сердечной мышце,  $\alpha$ -скелетный – в скелетной мускулатуре,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -гладкомышечные изоформы экспрессируются в гладкой мускулатуре сосудистых стенок и внутренних органов. Цитоплазматические же изоформы актина  $\alpha$ - и  $\beta$ -встречаются как в мышечных, так и в неммышечных клетках и имеют различную пространственную организацию в клетке, изменяющуюся во времени в зависимости от

функционального состояния клеток и необходимости в построении тех или иных цитоскелетных структур.

#### **3.2.4. Актин-связывающие белки, формирующие различные актиновые цитоскелетные системы клетки**

Организация и функционирование актинового цитоскелета *in vivo* обеспечиваются целым рядом АВП, которые отвечают за процессы полимеризации-деполимеризации микрофиламентов, связывают их друг с другом и придают контрактильные свойства (dos Remedios et al., 2003). По данным литературы описано более 160 АВП, а с учетом многочисленных изоформ - более 400 (Meenakshi et al., 2023; Yin et al., 2021). Количество известных белков, связывающихся с актином, постоянно растет по мере проведения новых исследований. Многие АВП связываются с одними и теми же локусами на поверхности G-актина, а значит между этими белками идет конкуренция за присоединение к мономеру актина. При этом некоторые из них действуют согласованно, образуя тройные комплексы. В миофибриллах по меньшей мере восемь саркомерных белков связываются с актиновыми филаментами. Как минимум двенадцать АВП являются мембранно-ассоциированными белками, еще девять - мембранными рецепторами или ионными транспортерами. Тринадцать АВП сшивают актиновые филаменты, в то время как другие обеспечивают взаимодействие актиновых филаментов с другими элементами цитоскелета. Микрофиламенты, вероятно, не взаимодействуют напрямую с микротрубочками и/или промежуточными филаментами, а делают это через линкерные белки (dos Remedios et al., 2003).

Как уже было отмечено выше, актиновые микрофиламенты в тандеме с АВП и молекулами миозина играют ключевую роль во множестве клеточных процессов: поддержание формы клетки, эндоцитоз, адгезия, деление и цитокинез, эмбриогенез (Pollard, 2016). Для реализации этих функций в клетке формируются различные типы актиновых цитоскелетных систем, каждая из которых имеет специализированные механические, пространственные и динамические характеристики и взаимодействует с определенным набором АВП. В мигрирующих клетках актиновые микрофиламенты образуют ветвящуюся сеть на ведущем крае, формирующую ламеллиподию. На периферии ближе к ведущему краю клетки она переходит в ламеллу, где актин организуется в длинные стресс-фибриллы, контактирующие в фокальными адгезионными комплексами в плазматической мембране. В этом месте образуется прочный контакт ведущего края мигрирующей клетки с внеклеточным матриксом, обеспечивающий эффективное продвижение. Полимеризация актиновых филаментов ламеллы может

инициироваться как ближе к телу клетки, в области ламеллеподии, так и в местах образования ФК с участием нуклеирующих полимеризацию АВР – форминов. В клетках человека они представлены в виде нескольких изоформ. Предположения о том, что определенные формины избирательно удлиняют микрофиламенты той или иной изоформы актина подтверждаются экспериментальными данными. Так, на завершающей стадии цитокинеза, область сократительного кольца в узком межклеточном канале между дочерними клетками, сформированная  $\beta$ -актиновыми филаментами, богата Dia2 формином. Предположительно, именно эта изоформа формины ответственна за удлинение филаментов  $\beta$ -актина (Valencia et al., 2021).

На самом дистальном участке ламеллы параллельно ориентированные пучки актина образуют тонкие выросты – филоподии, характеризующиеся особым набором АВР (формины, VASP).

Высокоспецифичные моноклональные антитела к цитоплазматическим  $\beta$ - и  $\gamma$ -актинам позволили выявить их специфическую локализацию в клетке, а метод РНК интерференции – функциональные различия:

- было выявлено, что  $\gamma$ -актин преимущественно образует динамические сети из тонких филаментов в кортикальном и ламеллярном компартментах мигрирующей клетки, обеспечивая процессы эндоцитоза, образования ламеллиподии и раффлов при движении.  $\gamma$ -актин в делящихся клетках преимущественно также локализуется в кортикальной субмембранной области.

-  $\beta$ -актин же формирует более стабильные и плотные линейные пучки в филоподиях, сократимых структурах совместно с миозином II – стресс-фибриллах, соединенных с ФК, обеспечивая натяжение, сократительную функцию и движение клетки. В делящихся клетках  $\beta$ -актин образует кольцевые пучки в области клеточной перетяжки во время телофазы (Шагиева и др., 2020; Dugina et al., 2009).

Формирование двух описанных выше актиновых систем, образованных преимущественно специфической изоформой актина, принято связывать с работой различной композиции АВР. Так, для образования кортикальной сети необходимы комплекс Arp2/3, белки кофилин, кортактин, филамины. Для построения более стабильной системы пучков и стресс-фибрилл требуется активность фасцина миозин II, тропомиозинов и  $\alpha$ -актинины.

Комплекс Arp2/3 (actin-related protein) играет ключевую роль в инициации сборки нового актинового филамента с боковой стороны уже существующей нити. Этот процесс чрезвычайно важен при формировании актиновой сети на ведущем крае клетки (Pollard and Borisy, 2003). Arp2/3 состоит из 7 белков, два из которых – молекулы Arp2 и Arp3

имеют схожую с мономерами актина структуру. Они играют ключевую роль в присоединении Arp2/3 к «затравке» и формировании стабильного триплета. В дальнейшем Arp2/3 служит кэпирующим белком и препятствует разборке быстро растущего нового филамента. *In vivo* для правильного функционирования комплекса Arp2/3 необходим ряд вспомогательных белков семейства NPF (Nucleation Promoting Factors, факторы способствующие нуклеации) – WASP, SCAR/WAVE и другие. Активированный WASP (получивший сигнал через PIP2, Cdc42) способен связывать глобулярный актин и Arp2/3. Активированный таким образом Arp2/3 изменяет свою конформацию и в таком состоянии способен инициировать сборку нового («дочернего») актинового филамента, отходящего от «материнского» под углом 70°. Затем тупые концы могут связываться с мембраной клетки через Scar и Rac, осуществляя таким образом протрузию и распластывание клетки (Dos Remedios et al., 2003). Роль WASP заключается в поставке мономеров актина к плюс-концу растущего филамента. Верпролин/WIP может связываться и с глобулярным, и с фибриллярным актином. Было показано, что он усиливает обусловленную Arp2/3 комплексом полимеризацию актина при участии белка кортактина, также являющегося активатором Arp2/3 (Paavilainen et al., 2004). Верпролин может связываться с интегринами, предположительно связывая процессы полимеризации актина и протрузию с клеточной адгезией, обусловленной интегринами (De Mali, et al., 2002). Полимеризация актина также инициируется белками форминами. Это семейство белков в клетках человека включает пятнадцать членов, катализирующих полимеризацию G-актина в линейный F-актин (Chesarone et al., 2010; Schonichen and Geyer, 2010). Все они имеют центральную область, содержащую FH2 (formin homology) домен, который обеспечивает активное присоединение мономеров актина к плюс-концу актинового микрофиламента (Xu et al., 2004, Zigmond et al., 2004). Этому домену предшествует богатый пролином домен FH1, который рекрутирует профилин (белок, связывающийся с G-актином). В ходе полимеризации FH2 домен димера формина стабилизирует димер актина и с помощью связанного с профилином G-актина происходит элонгация актинового филамента. На протяжении всего процесса полимеризации FH2 домен димера формина остается связанным (+) концом филамента, способствуя присоединению новых субъединиц актина (Labat-de-Hoz et al., 2024).

Большая часть АВР относится к группе факторов, деполимеризующих актин, родственных кофилину. Это небольшие белки (15-19 кДа), представленные большим количеством изоформ. Их основная функция заключается в регуляции быстрой сборки-разборки актиновых филаментов при цитокинезе и мембранном раффлинге (Abe et al., 1990). Кофилин располагается диффузно в цитоплазме покоящихся клеток и

концентрируется в, соответственно, кортикальной зоне мигрирующих клеток (Yonezawa et al., 1990). Этот белок обеспечивают высокий уровень деполимеризационной активности актиновых филаментов *in vivo* путем увеличения пороговой концентрации фибриллярного актина, необходимой для сборки филамента на остром конце (примерно в 30 раз) без изменения этого показателя для тупого конца (Carlier et al., 1997). Кофилин легче связывается с мономерами актина, содержащими АДФ или АДФ и P<sub>i</sub> (со свободным мономером или в составе филамента), чем АТФ. Связывание кофилина с мономером актина в составе микрофиламента сопровождается небольшим поворотом молекул актина друг относительно друга, что увеличивает вероятность разрыва связи между ними. В присутствии профилина процесс диссоциации F-актина на минус-конец ускоряется (Didry et al., 1998). В итоге высокая концентрация G-актина, связанного с кофилином, быстро падает в результате связывания (после отсоединения АДФ) мономера с плюс-концом нити актина, т.к. молекула G-актина-АДФ, может заменять нуклеотид в своем составе на АТФ. Это происходит при условии, что плюс-конец микрофиламента не связан с кэпирующим белком (например, CapZ), если же этот конец кэпирован – будет идти полная разборка филамента. Присоединяясь к мономеру актина в середине микрофиламента, кофилин способствуют «делению» актиновой нити. Кофилин может также инициировать сборку актиновой нити. Активность кофилина регулируется фосфатидилинозитами (PIP и PIP<sub>2</sub>) – при их связывании действие белка ингибируется (Yonezawa et al., 1990).

### 3.2.5. Изоформы актина и неопластическая трансформация

Показано, что для неопластической трансформации характерно изменение морфологии и увеличение миграционной активности клеток, сопровождающееся структурно-пространственным перераспределением изоформ актина и модуляцией их экспрессии. Исчезновение стресс-фибрилл, богатых β-актином сопровождается усилением подвижности опухолевых клеток и инвазивности (Pokorna et al., 1994; Sahai et al., 2003). Для β-актина также известно, что мутации в гене *ACTB* приводят к неопластической трансформации фибробластов человека (Vandekerckhove et al., 1980; Leavitt et al., 1987). Влияние β-актина на клеточную подвижность и пролиферацию может быть опосредовано как непосредственной локализацией β-актина и формированием пучков, так и его ролью в регуляции транскрипции. β-актин, локализованный в ядре, напрямую связывается с белками, ремоделирующими хроматин, а также с РНК-полимеразами (Zheng et al., 2009). β-актин регулирует экспрессию генов, связанных с клеточным циклом и динамикой актина, а также экспрессию своего собственного гена *ACTB* (Bunnell et al., 2011; Kalo et

al., 2015). Для вирус-трансформированных и опухолевых клеток также характерно уменьшение содержания  $\alpha$ -гладкомышечного актина (Leavitt et al., 1985; Witt et al., 1983).

Для  $\gamma$ -актина показано, что ген *ACTG1* отвечает за усиление пролиферации и миграции опухолевых клеток (Dong et al., 2018). С помощью селективной модуляции изоформ актина с использованием shRNA и экзогенной экспрессии *ACTG1* и *ACTB* было выявлено, что  $\beta$ -актин отвечает за сохранение нормального фенотипа клеток, а  $\gamma$ -актин усиливает опухолевую морфологию клеток карцином различного генеза (Dugina et al., 2015; Dugina et al., 2016). Клетки с пониженной экспрессией *ACTG1* демонстрируют снижение миграционной активности (Dugina et al., 2009; Shum et al., 2011).

В клетках рака молочной железы изоформы актина играют важную роль в процессе клеточного деления,  $\gamma$ -актин преимущественно на стадии G<sub>1</sub> фазы, а  $\beta$ -актин - на более поздних стадиях митоза и в ходе цитокинеза (Dugina et al., 2018), поэтому для культур клеток с пониженной экспрессией генов  $\beta$ - или, особенно,  $\gamma$ -актина характерна сниженная пролиферация (Bunnell et al., 2011; Joseph et al., 2014; Dugina et al., 2015).

### **3.3. Метаболизм и роль АФК в трансформированных клетках**

#### **3.3.1. Метаболическое перепрограммирование трансформированных клеток**

По мере роста опухоли в результате недостаточного формирования кровеносных сосудов и особенностей микросреды формируются условия гипоксии, повышенной кислотности и недостатка питательных веществ. Отто Варбургом был описан феномен перепрограммирования метаболизма в трансформированных клетках, обусловленный необходимостью адаптации клеток к подобным изменениям (Warburg, 1930). Метаболическое перепрограммирование играет решающую роль в поддержании пролиферации и выживании опухолевых клеток при ингибировании онкогенного сигнала (Lue et al., 2017). В аэробных условиях нормальные клетки используют глюкозу, сначала расщепляя ее до пирувата в ходе гликолиза (в цитоплазме), а затем пируват расщепляется до углекислого газа и воды уже в митохондриях. В анаэробных условиях лишь небольшое количество пирувата направляется в митохондрии, потребляющие кислород. Даже в присутствии достаточного количества кислорода трансформированные клетки могут перепрограммировать свой метаболизм, ограничиваясь, преимущественно, гликолизом. Такое «переключение» клеток с одного метаболизма на другой и получило название «эффект Варбурга».

Такое перепрограммирование энергетического метаболизма кажется нерациональным, так как синтез АТФ в ходе аэробного процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях в 18 раз эффективнее, чем при гликолизе.

Трансформированные клетки компенсируют это путем повышения активности транспортеров глюкозы, в частности GLUT1 (glucose transporter member 1), что значительно увеличивает поступление глюкозы в цитоплазму (Jones and Thompson, 2009; DeBerardinis et al., 2008). Методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) было показано, что метаболизм на основе гликолиза сопровождается активацией онкогенов (*RAS*, *MYC*) и мутантных опухолевых супрессоров (*TP53*), происходящей на фоне усиления пролиферации и нарушения процесса апоптоза (DeBerardinis et al., 2008; Jones and Thompson, 2009).

Запуск процесса гликолиза в трансформированных клетках и, соответственно, увеличение количества промежуточных продуктов этой реакции позволяет перенаправить их в различные биосинтетические пути. Так, в частности, увеличение количества нуклеозидов и аминокислот облегчает биосинтез макромолекул и органелл, необходимых для сборки новых опухолевых клеток (Vander Heiden et al., 2009).

### **3.3.2. Митохондрии трансформированных клеток**

Митохондрии отвечают за множество ключевых функций клетки таких как дыхание, продукция АФК, поддержание гомеостаза кальция, программируемая клеточная гибель и пролиферация (Trotta et al., 2017). Они также вовлечены в процесс клеточной трансформации и опухолевой прогрессии, демонстрируя гетерогенность морфологии и изменение пространственной организации (Desai et al., 2013; Trotta et al., 2017). Компоненты цитоскелета играют решающую роль в поддержании структурной и функциональной организации митохондрий, включая их морфологию, подвижность, внутриклеточную пространственную локализацию (Caino et al., 2016; Desai et al., 2013). В исследованиях последних лет активно изучается регуляторная роль актинового цитоскелета в функционировании митохондрий. Было показано участие некоторых АВР в трафике, динамике, биогенезе, метаболизме и апоптозе митохондрий (митоптозе); для гельзолина была показана его роль в нарушении механизма окислительного фосфорилирования (Шлескас et al., 2021). Митохондрии в ходе процесса трансформации и канцерогенеза демонстрируют высокую вариабельность формы и объема. На фоне общего уменьшения среднего объема митохондрий иногда можно наблюдать и митохондрии огромных размеров. Процессы гликолиза в трансформированных клетках сопровождаются патологическими изменениями в кристах и матриксе (присутствуют включения, может наблюдаться пикнотическая картина) митохондрий. Для опухолевых клеток описывают специфическое, ориентированное вдоль длинной оси клетки,

распределение митохондрий, связанное с недостаточностью цитохромоксидазы (Kim et al., 2020).

### 3.3.3. Биологическая роль АФК в клетке

Активные формы кислорода – это небольшие молекулы, являющиеся производными кислорода, образующие в результате аэробного метаболизма. К ним относятся радикалы кислорода (супероксид анион -  $O_2^{\cdot-}$ , гидроксил -  $OH^{\cdot}$ , пероксил -  $RO_2^{\cdot}$  и алкоксил -  $RO^{\cdot}$ ) и молекулы, которые представляют собой окисляющие агенты или легко превращаются в радикалы (хлорноватистая кислота, озон, синглетный кислород, перекись водорода) (Scandalios, 2005). Некоторые АФК, такие как супероксид или гидроксильный радикал, крайне нестабильны, другие же долго остаются стабильными и способны свободно диффундировать через мембраны (например, перекись водорода) (Finkel and Holbrook, 2000).

Источники АФК могут быть как экзогенными, так и внутриклеточными. Большая часть внутриклеточных АФК образуется в митохондриях в электрон-транспортной дыхательной цепи. Компоненты дыхательной цепи встроены в митохондриальную мембрану в виде 4 белково-липидных комплексов: НАДН-КоQН<sub>2</sub>-редуктаза (комплекс I), сукцинат-КоQ-редуктаза (комплекс II), КоQН<sub>2</sub>-цитохром *c*-редуктаза (комплекс III) и цитохром *a*-цитохромоксидаза (комплекс IV). В нормальных условиях, комплекс III является главным источником образования АФК (Chen et al., 2003). АФК появляются в клетке в качестве побочного продукта, если кислород в дыхательной цепи митохондрий восстанавливается не полностью. АФК образуются также за счет работы некоторых цитозольных ферментов, например, в случае ксантиноксидазы, как побочный продукт. Кроме того, существуют ферменты, единственное назначение которых - генерация активных форм кислорода. Так, белки семейства NOX (NADPH oxidase) - восстанавливают молекулярный кислород во внеклеточном пространстве до супероксида (Bedard and Krause, 2007).

Образование супероксида в клетке происходит в том числе в ходе каскадов свободнорадикальных реакций, приводящих к стремительному увеличению внутриклеточного уровня АФК. Супероксид может быстро превращаться в перекись водорода, вступать в реакцию с оксидом азота, участвовать в образовании гипохлористой кислоты из перекиси водорода, катализируемой пероксидазой, а также участвовать в реакции Фентона, приводящей к генерации гидроксильных радикалов (Bedard and Krause, 2007). АФК играют важную роль во многих внутриклеточных процессах, являясь частью регуляторных сигнальных каскадов. АФК активно взаимодействуют с малыми

неорганическими молекулами, белками, липидами, углеводородами и нуклеиновыми кислотами. Такие взаимодействия могут необратимо разрушать структуру или полностью изменять функции молекул-мишеней (Scandalios, 2005). Хорошо изученным примером такого взаимодействия является  $H_2O_2$ -опосредованное окисление остатков цистеина в белках (Rhee, 2006). Остатки цистеина существуют в виде тиолат-аниона ( $Cys-S^-$ ) при физиологическом значении pH и более восприимчивы к окислению по сравнению с цистеином с тиольной группой ( $Cys-SH$ ) (Finkel, 2012). Во время окислительно-восстановительных процессов  $H_2O_2$  окисляет тиолат-анион до формы  $Cys-SOH$ , вызывая аллостерические изменения в белке и модулируя его функцию. Такая модификация в присутствии наномолярных внутриклеточных концентраций  $H_2O_2$  обратима и может быть восстановлена до тиолат-аниона, например, дисульфидными редуктазами – т.е. является обратимым механизмом передачи сигнала (Winterbourn and Hampton, 2008). Однако более высокие уровни пероксида дополнительно окисляют тиолат-анионы до  $SO_2H$  или сульфоновых ( $SO_3H$ ) видов. Такого рода модификации могут приводить к необратимому повреждению белка (характерно для феномена «окислительного стресса»). Накоплению избытка внутриклеточного  $H_2O_2$  и связанным с этим повреждениям клеток препятствуют ряд специализированных ферментов, таких как пероксиредоксины и глутатионпероксидазы. Исторически, внутриклеточную продукцию АФК связывают именно с феноменом «окислительного стресса», в рамках которого считается, что они запускают патологические процессы в клетке, повреждая липиды, белки и ДНК (Cross et al., 1987). В норме продуцируемые внутриклеточные АФК находятся в равновесии с антиоксидантами. Окислительный стресс развивается, если этот баланс нарушается (вследствие истощения источника клеточных антиоксидантов или при чрезмерной продукции АФК). Маркерами окислительного стресса являются увеличенное содержание АФК или активация и деятельность антиоксидантной системы в клетке (Scandalios, 2005).

К повреждающим эффектам АФК относят:

- разрушение липидов при взаимодействии АФК с жирными кислотами в билипидном слое плазматической мембраны, что приводит к структурным поломкам в мембране, клеточной смерти. Перекисное окисление липидов.

- разрушение белков: сайт-специфическая модификация аминокислот (аминокислоты различаются по своей чувствительности к действию активных форм кислорода), фрагментация пептидной связи, образование поперечных связей, изменение электрического заряда, нарушение ферментативных функций белка (т.к.  $O_2^{\cdot-}$  способен окислять Fe-S центры ферментов).

- повреждение ДНК: делеции, мутации, одноцепочечные разрывы, образование поперечных межмолекулярных связей ДНК с белками.

К защитным функциям АФК в клетках животных относят феномен, аналогичный «окислительному взрыву» в растительных клетках. Так, в фагоцитах патогены уничтожаются с помощью продукции большого количества перекиси водорода, образованной из супероксида, генерированного семейством НАДФН-оксидаз NOX (NADPH oxidase). Эти ферменты обладают способностью переносить электроны через плазматическую мембрану и генерировать супероксид и другие АФК. Механизмы активации и тканевое распределение различных представителей семейства заметно отличаются. Физиологические функции ферментов семейства NOX включают защиту хозяина, посттрансляционный процессинг белков, клеточную сигнализацию, регуляцию экспрессии генов и дифференцировку клеток. Ферментные системы, сходные с НАДФН-оксидазой фагоцитов, существуют во многих других типах клеток, включая фибробласты, гладкомышечные клетки сосудов, различные опухолевые клетки (Bedard and Krause, 2007).

АФК также осуществляют ряд сигнальных функций, поддерживая окислительно-восстановительный гомеостаз в клетке. Они участвуют в регуляции активации ядерного фактора NF- $\kappa$ B и белка AP-1, играющих важную роль в пролиферации, дифференцировке и морфогенезе (Bedard and Krause, 2007). В настоящее время накоплено множество доказательств того, что АФК участвуют в регуляции организации цитоскелета, клеточной подвижности, в процессе распластывания клеток, заживлении ран, трансдифференцировке клеток и онкогенезе. Наиболее подробно изучены механизмы регуляции активности NOX малыми ГТФ-азами семейства Ras. Показано также, что Ras1 может регулировать уровень внутриклеточных АФК независимо от NOX через митохондрии (Hordijk, 2006).

Как внутриклеточные, так и внеклеточные АФК способны регулировать генную экспрессию. Малые дозы пероксида водорода (<20 мкМ) способствуют фосфорилированию специфических регуляторных белков, включая белковую киназу В (protein kinase B). АФК могут включать регуляторные антиоксидантные гены. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> влияет на активацию MAP-киназ, которые функционируют, как регуляторы транскрипции. Каскад MAP-киназ - это совокупность реакций, одни из которых контролируется протеинкиназным каскадом, передающим митогенные сигналы (ERK), а другие связаны с протеинкиназным каскадом, активируемым стрессом (SAPK), под контролем которого находятся ингибирование клеточного роста и воспалительные реакции. NOX-зависимая генерация АФК вызывает экспрессию TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и ангиотензина II (Thannickal and Fanburg, 2000). Регуляция экспрессии может осуществляться с помощью редокс-

чувствительных вторичных мессенджеров, например, путем активации MAP-киназ, или при участии транскрипционных факторов, таких как NF- $\kappa$ B, AP-1 и p53 (содержащих редокс-чувствительные цистеиновые остатки в ДНК-связывающем домене).

АФК способны запускать апоптоз, повреждая ДНК, липиды и белки, или за счет активации MAP-киназ SAPK/JNK, ERK1/2 и p38. Известно, что в высоких концентрациях пероксид водорода способен подавлять действие каспаз, что вызывает переключение программы апоптоза на некроз (Hampton et al., 1998). Активация NOX может в зависимости от условий приводить к клеточной смерти или, наоборот, подавлять апоптоз. Определяющими факторами являются: сила и продолжительность сигнала, внутриклеточная локализация NOX, участие редокс-чувствительных сигнальных мишеней (транскрипционные факторы, киназы, фосфатазы, каспазы) (Bedard and Krause, 2007). АФК участвуют в биосинтезе и образовании межбелковых связей, регулировании редокс-потенциала клетки, окислении ионов металла, играют важную роль в процессе ангиогенеза (через ряд сигнальных молекул способны увеличивать экспрессию ангиогенных факторов, таких как фактор роста сосудов VEGF (vascular endothelial growth factor) (Bedard and Krause, 2007).

### **3.3.4. АФК и клеточная трансформация**

Изменение метаболизма трансформированных клеток приводит к повышенной генерации АФК с участием митохондрий и белков семейства NOX (Cairns et al., 2011). Первые наблюдения, сделанные более трех десятилетий назад показали, что опухолевые клетки генерируют более высокий уровень АФК, чем нетрансформированные (Szatrowski et al., 1991). Исторически считалось, что повышенный уровень АФК вызывает нестабильность генома, способствуя развитию опухолевого процесса (Amez et al., 1993). Однако генетическая нестабильность трансформированных клеток скорее вызвана снижением функции p53 и другими механизмами, приводящими к анеуплоидии. Мус-индуцированная трансформация приводит к увеличению хромосомной нестабильности и способствуют опухолеобразованию через АФК-зависимое усиление сигнальных путей (Gao et al., 2007). Кроме того, присутствие антиоксиданта N-ацетилцистеина (NAC) или ингибитора NOX блокирует митогенные сигнальные пути в Kras-трансформированных фибробластах. Генерация митохондриальных АФК необходима таким клеткам для поддержания высокого уровня пролиферации (Irani et al., 1997). Митохондриальные мутации, приводящие к дисфункции цикла трикарбоновых кислот или электрон-транспортной цепи, приводят к генерации АФК для активации онкогенных сигнальных путей, включая PI3K и MAPK (Sullivan et al., 2013). Другой важной мишенью АФК при

клеточной трансформации является транскрипционный фактор NF-κB, контролирующий их выживаемость (Ben-Neriah et al., 2011). Высокий уровень продукции АФК в опухолевых клетках компенсируется столь же высокой активностью антиоксидантных систем, что препятствует окислительному стрессу, обеспечивает окислительно-восстановительный баланс и выживаемость (Gorrini et al., 2013; Nogueira et al., 2008). В спокойном состоянии такие клетки могут демонстрировать как общее увеличение, так и снижение уровня АФК по сравнению с нормальными клетками. Сигнальные пути, реагирующие на изменение уровня АФК, пространственно локализованы в цитоплазме трансформированных клеток вблизи источников генерации АФК. Благодаря этому активация АФК-сигнальных путей становится возможной несмотря на высокую активность антиоксидантных систем таких клеток.

Ведущий механизм поддержания высокого количества антиоксидантных белков при этом основан на активации ядерного фактора транскрипции NRF2 (erythroid 2-related factor 2) (Sporn et al., 2012). NRF2 активируется при повышении уровня внутриклеточных АФК, а также ERK, MAPK и PI3K опосредованными сигналами (Jaramillo et al., 2013). Показано, что инактивация NRF2 в опухолевых клетках усиливает окислительный стресс, что замедляет процесс канцерогенеза (DeNicola et al., 2011). Важно отметить, что ингибирование NRF2 снижает работу многочисленных механизмов антиоксидантной защиты, приводя к резкому повышению уровня АФК, при котором происходит повреждение клеток. Однако потеря конкретной системы антиоксидантной защиты может привести к повышению уровня АФК до уровня ниже порога, вызывающего повреждение клеток. В этом случае повышение внутриклеточных АФК активируют сигнальные пути, способствующие опухолевой прогрессии (например, как при инактивации пероксиредоксина-1) (Cao et al., 2009). Также экспрессию целого ряда антиоксидантов контролирует опухолевый супрессор p53 (Budanov et al., 2004). Более того, предотвращение канцерогенеза, опосредованное p53, может осуществляться в большей степени через регуляцию экспрессии генов антиоксидантной системы клетки и метаболизма, а не контроля апоптоза и клеточного цикла (Li et al., 2005).

Таким образом, трансформированные клетки генерируют высокие уровни АФК, активирующие сигнальные пути, поддерживающие выживание и пролиферацию, перепрограммирование метаболизма. В то же время, в таких клетках поддерживается высокий уровень антиоксидантной активности, чтобы предотвратить накопление АФК до критического уровня, что может привести к окислительному стрессу и гибели клеток.

### 3.3.5. Антиоксиданты, адресованные в митохондри

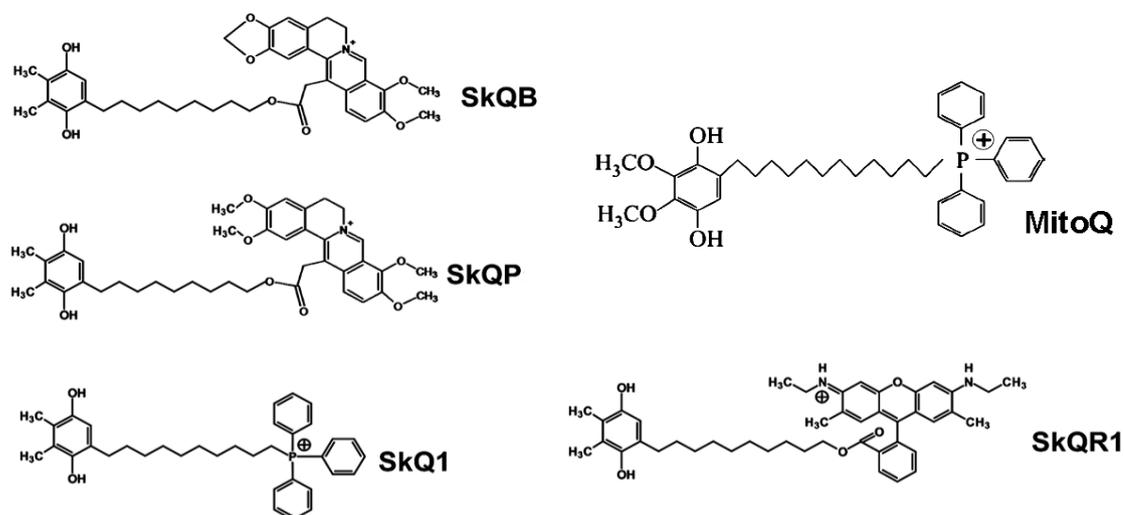
Антиоксиданты - вещества, способные ингибировать процессы свободнорадикального окисления. Такие вещества предотвращают перекисное окисление липидов и не дают активным формам кислорода накапливаться в клетке.

Дыхательная цепь митохондрий - основной источник внутриклеточного супероксида. Показано, что в митохондриях окислительные повреждения накапливаются гораздо быстрее, чем в остальных клеточных органеллах (Pletushkina et al., 2006). Митохондриальный убихинон – важный компонент дыхательной цепи, погруженный во внутреннюю часть липидного слоя наружной мембраны митохондрий. Он принимает 2 электрона от комплексов I и II, восстанавливаясь до убихинола, который служит донором электронов для комплекса III. Убихинол действует как антиоксидант и ограничивает процесс липидного окисления в пределах внутренней мембраны митохондрий.

Для изучения митохондриальных окислительных повреждений и их роли в клеточной смерти группой под руководством В. П. Скулачева был синтезирован митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ, состоящий из убихинона, присоединенного к трифенилфосфониевому липофильному катиону (Рис. 5)

MitoQ является эффективным антиоксидантом, защищающим митохондрии от окисления (Kelso et al., 2001). Убихиноновая часть участвует в процессе обмена электронами, а трифенилфосфоний необходим для быстрого и обратимого накопления MitoQ во внутренней мембране митохондрий. Показано, что MitoQ предотвращает апоптоз, вызванный пероксидом водорода, меняет устойчивость митохондриального ретикула к различным повреждениям, предотвращает дробление митохондрий, индуцируемое миксотиазолом и пероксидом водорода (Jauslin et al., 2003). Позднее та же группа ученых разработала антиоксиданты семейства SkQ (Antonenko et al., 2008). Они представляют собой соединение пластохинона, отвечающего за антиоксидантную функцию, и катиона, адресованного в митохондрии. Свойство этих молекул накапливаться в области внутренней мембраны митохондрий, где генерируются АФК, а также способность к многократному восстановлению после окисления в ходе инактивации митохондриальных АФК делает их высокоэффективными антиоксидантными агентами, работающими в низких наномолярных концентрациях. Они также защищают молекулы кардиолипина, контролирующего апоптоз, от окисления (Gonzalez et al., 2007; Yani et al., 2012). Одним из главных отличий соединений класса SkQ от MitoQ является меньшая токсичность. В более низких концентрациях они подавляют пролиферацию трансформированных клеток *in vitro* и рост опухолевых ксенографтов *in vivo* (Agarova et al., 2008; Severina et al., 2013; Shagieva et al., 2017).

К антиоксидантам семейства SkQ относится несколько адресованных в митохондрии молекул. Первым был синтезирован SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония), представляющий собой конъюгат катиона децилтрифенилфосфония (TPP<sup>+</sup>) с пластохиноном (Feniouk et al., 2017). Конъюгированный с родамином SkQR1 (10-(6'-пластохинонил)децилродамин 19) является одним из наиболее эффективных антиоксидантов семейства, показавшим эффективность в экспериментах *in vivo* (Plotnikov et al., 2010). Дигидрородамин используется для измерения митохондриальных АФК, но он приобретает положительный заряд и накапливается в митохондриях только после окисления, что затрудняет интерпретацию его эффектов (Koide et al., 2007). В 2010 году были синтезированы SkQB (13-[9-(6'-пластохинонил)нонилоксикарбонилметил]берберин) и SkQP (13-[9-(6'-пластохинонил)нонилоксикарбонилметил]пальматин). Берберин и пальматин, проникающие катионы растительного происхождения, были конъюгированы с децилпластохиноном (Chernyuk et al., 2012).



**Рисунок 5.** Схема строения антиоксидантов семейства SkQ и MitoQ.

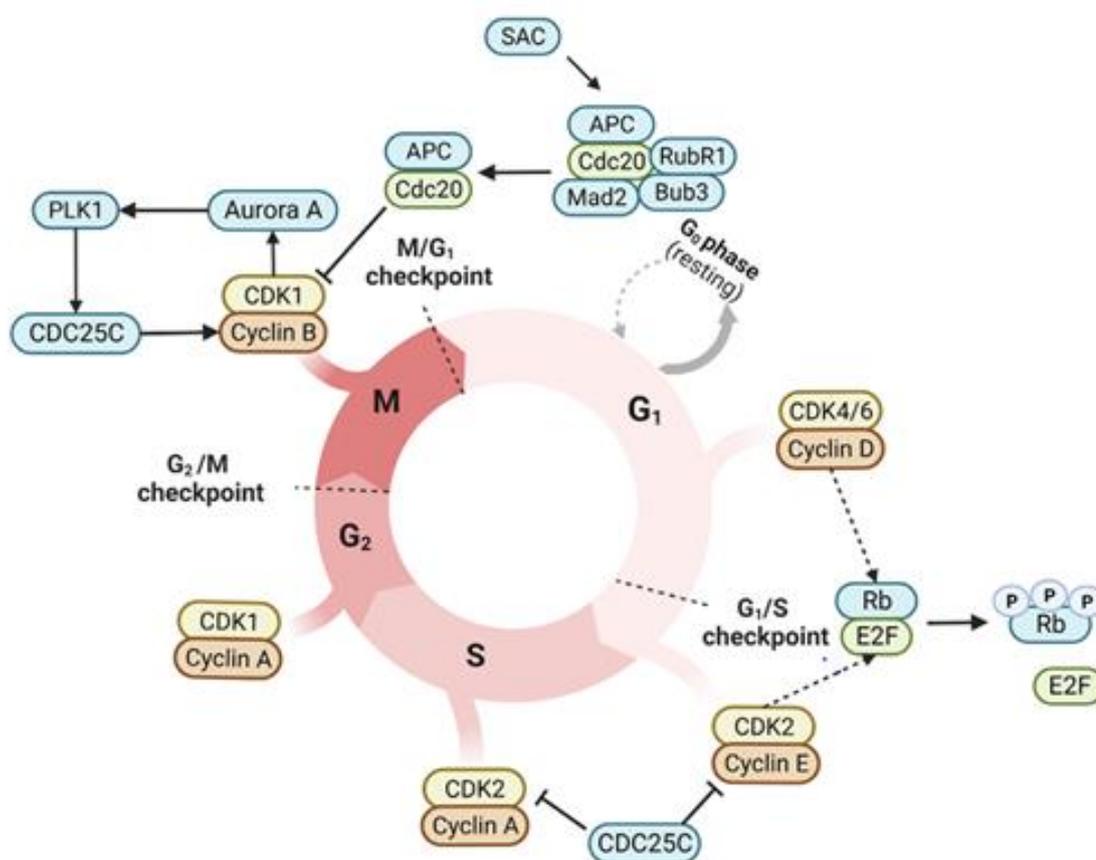
### 3.4. Основные регуляторы клеточного цикла

Прохождение клетки через каждую фазу клеточного цикла контролируется множеством регуляторных молекул. Нарушение их слаженной работы при мутации или сверхэкспрессии отдельных участников приводит к потере контроля пролиферации, что является важной особенностью канцерогенеза. Клеточный цикл млекопитающих регулируется подсемейством циклин-зависимых киназ (CDK, cyclin-dependent kinases), активность которых в свою очередь контролируется различными активаторами (циклинами), фосфорилированием и ингибиторами. Циклины представляют собой белки, уровень которых колеблется в результате экспрессии их генов и контролируемой

деградации в строго определенное время клеточного цикла (Mishra et al., 2013). Циклины активируют CDK, делая возможным их взаимодействие с субстратом, что способствует прогрессии клеточного цикла (Ding et al., 2020). Ведущую роль в этом процессе у млекопитающих играют циклины А (A1 и A2), В, D (D1, D2 и D3) и Е (E1 и E2) (Satyanarayana et al., 2009). Деградация митотических циклинов осуществляется E3 убиквитин-лигазами, для циклинов В и А такой лигазой служит APC. После убиквитинирования циклины подвергаются быстрой деградации благодаря постоянной активности протеасомного комплекса (Bansal et al., 2019).

Ткани взрослого человека состоят в основном из терминально дифференцированных клеток в состоянии G<sub>0</sub> фазы. Остальные клетки способны переходить из состояния G<sub>0</sub> в фазу G<sub>1</sub> под воздействием митогенных стимулов, таких как внеклеточные факторы роста (Zhou et al., 2021). Действительно, митогенные сигналы вызывают повышение уровня циклинов D, которые впоследствии связываются и активируют киназы CDK4 и CDK6. Образующиеся комплексы циклин D - CDK4/6 играют решающую роль в фосфорилировании различных клеточных мишеней, при этом особое значение имеет белок ретинобластомы Rb (Icard et al., 2019). Белок Rb в нефосфорилированной форме связывается с фактором транскрипции E2 (E2F), ингибируя его. Rb частично фосфорилируется и инактивируется комплексами циклин D-CDK4/6, что приводит к высвобождению фактора транскрипции E2F, который, в свою очередь, увеличивает активность циклинов E и A. Циклин E и циклин A образуют комплексы с CDK2, активируя её и завершая фосфорилирование Rb, что приводит к высвобождению транскрипционного фактора E2F (Leal-Esteban and Fajas, 2020). Таким образом, увеличение E2F-зависимой транскрипции позволяет клетке пройти через контрольную точку клеточного цикла, что приводит к синтезу белков, необходимых для входа клеток в S-фазу (Hume et al., 2020). Впоследствии оба комплекса циклин E-CDK2 и циклин A-CDK2 способствуют продвижению клетки через S-фазу путем фосфорилирования белков, которые запускают процесс синтеза ДНК. Циклин A также может связывать и активировать CDK1, которая играет важную роль в прохождении клеткой фазы G<sub>2</sub> и перехода G<sub>2</sub>/M. Во время стадии G<sub>2</sub>/M ключевая роль циклина A заключается в активации комплекса циклин B-CDK1 (Suski et al., 2021). Циклин B, главный активатор CDK1 в ходе митоза, синтезируется по мере продвижения клетки через G<sub>2</sub> и локализуется в основном в цитоплазме. В начале митоза после фосфорилирования киназами PLK1 (Polo-like kinase 1) и CDK1 циклин B транслоцируется в ядро и остается там в составе комплекса с CDK1 в неактивном состоянии благодаря WEE1/MYT1-зависимого фосфорилирования CDK1. Дефосфорилирование CDK1 фосфатазой 25C (CDC25C) на

стадии G<sub>2</sub>/M активирует комплекс циклин В-CDK1. Циклин В-CDK1 катализирует свою собственную активацию через петлю обратной связи, которая одновременно активирует CDC25C и деактивирует WEE1/MYT1. Первоначальная активация CDC25C может быть усилена PLK1, которая, в свою очередь, активируется киназой Aurora A и Bora (Kousholt et al., 2012). В активном состоянии комплекс циклин В-CDK1 фосфорилирует множество белков, необходимых для митотической прогрессии и деления клетки. Они ответственны за конденсацию хромосом, разрушение ядерной оболочки, сборку и функционирование митотического веретена, сегрегацию хромосом и реорганизацию цитоскелета, необходимую для цитокинеза (Dantas et al., 2021) (Рис. 6).



**Рисунок 6.** Схема регуляции клеточного цикла (описание см. в тексте) (Cavalu, 2024).

### 3.5. Киназы семейства Ауорога и их роль в регуляции клеточного цикла

#### 3.5.1. Общая характеристика киназ семейства Ауорога

Критическими точками в контроле клеточного цикла являются репликация геномной ДНК и сегрегация генетического материала между дочерними клетками. Как уже было описано, одной из основных характеристик трансформированных клеток является усиленная пролиферация и потеря контроля клеточного цикла.

Серин/треониновые протеинкиназы семейства Aurora участвуют в регуляции таких событий в клеточном делении, как конденсация и ориентация хромосом, контроль динамики веретена деления и взаимодействия микротрубочек с кинетохорами при образовании метафазной пластинки. Они также играют ведущую роль на стадии поздней телофазы, обеспечивая правильный цитокинез. Члены семейства эволюционно консервативны. У млекопитающих описано, как минимум, три киназы семейства Aurora – A, B, C, кодируемые генами: *AURKA* (Aurora A) – расположен на хромосоме 20, *AURKB* (Aurora B) – на хромосоме 17, *AURKC* (Aurora C) – на хромосоме 19 (Fu et al., 2007). Несмотря на сходство, представители семейства демонстрируют специфические функции и пространственно-временное распределение в ходе клеточного цикла. Отмечается повышение их экспрессии и/или активности во многих опухолях, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных противоопухолевых агентов.

Aurora C описана исключительно в клетках млекопитающих, её содержание максимально в семенниках, где она участвует в регуляции мейоза (Fernandez-Miranda et al., 2011). В соматических клетках уровень Aurora C минимален в ходе S-фазы и увеличивается во время митотического деления, где она локализуется в центросомальной области на стадии анафазы и телофазы (Kimura et al., 1999). Киназа локализуется в центросомах начиная с анафазы и заканчивая телофазой, взаимодействует с сурвивином и белком внутренней центромерной области INCENP (inner centromere protein). Aurora C совместно с Aurora B образуют каталитическую часть CPC комплекса (Sasai et al., 2016).

В процессе клеточного деления киназы Aurora A и B локализируются в различных структурах митотического аппарата. Aurora B входит в состав хромосомного пассажирского комплекса CPC (chromosomal passenger complex), состоящего из четырех белков, связанного с хромосомами в ходе митоза (Carmena et al., 2012). Локализация комплекса зависит от стадии митотического деления и обусловлена его функциями – регуляция сегрегации хромосом, корректной сборки и работы веретена деления, инвагинации цитоплазмы и цитокинеза, образования оболочки ядра (Broad and DeLuca, 2020). Киназа Aurora B играет важнейшую роль в регуляции клеточного цикла и, в частности, процесса клеточного деления. Транслокация Aurora B связана с её активностью в разных компартментах клетки в зависимости от фазы митоза. Роль данной киназы в регуляции клеточного цикла будет подробнее рассмотрена в разделе 3.5.2.

Aurora A локализуется на концах микротрубочек, обращенных к центросомам, и в центросомальной области с момента удвоения центросом в начале митоза и остается там до его завершения, участвуя в регуляции сборки веретена деления (Sugimoto et al., 2002; Barr and Gergely, 2007). Показано, что киназа также локализуется в области центромеры

(Eot-Houllier et al., 2018). Расположение киназы в центросомальной области наблюдается, начиная с S-фазы и указывает на то, что она регулирует созревание и функцию центросомы во время сборки митотического веретена, а также полимеризацию центросомальных микротрубочек. На стадии G2 наблюдается высокое содержание киназы, сопровождающее созревание центросом. В это же время сюда рекрутируется большое количество перицентриолярного материала (PCM, pericentriolar material) (Glover et al., 1995; Magnaghi-Jaulin et al., 2019). При этом фосфорилирование белка, связанного с центросомой, CPAP (Centrosomal P4.1 associated Protein) киназой Aurora A необходимо для предотвращения рассредоточения PCM в данной фазе митоза (Chou et al., 2016). Созревание центросомы характеризуется накоплением гамма-тубулинового кольцевого комплекса ( $\gamma$ TuRC, gamma-tubulin ring complex), способствующим нуклеации микротрубочек (Tillery et al., 2018), что необходимо для правильного пространственно-временного расположения веретена в митотических клетках. Ряд исследований указывает на то, что Aurora A является ведущим регулятором процесса созревания центросомы (Joukov et al., 2010; Joukov et al., 2014; Zhu et al., 2008).

Aurora A также локализуется в области концов микротрубочек, обращенных к центросомам в начале сборки веретена деления. Здесь ее активация, в отличие от пула в области центросомы, зависит от белка TPX2 (Targeting Protein for Xklp2) (Wittmann et al., 1998). Связываясь с импортинами  $\alpha$  и  $\beta$  в ходе интерфазы, TPX2 вызывает локальную активацию Aurora A (Bayliss, et al., 2003; Zorba et al., 2014). Пул Aurora A в области веретена деления способствует нуклеации микротрубочек путем фосфорилирования белка гамма-тубулинового кольцевого комплекса NEDD1 (Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1) (Haren et al., 2006). Фосфорилирование NEDD1 киназой Aurora A обеспечивает его локализацию в области веретена деления и нуклеации сборки микротрубочек веретена (Pinyol et al., 2013).

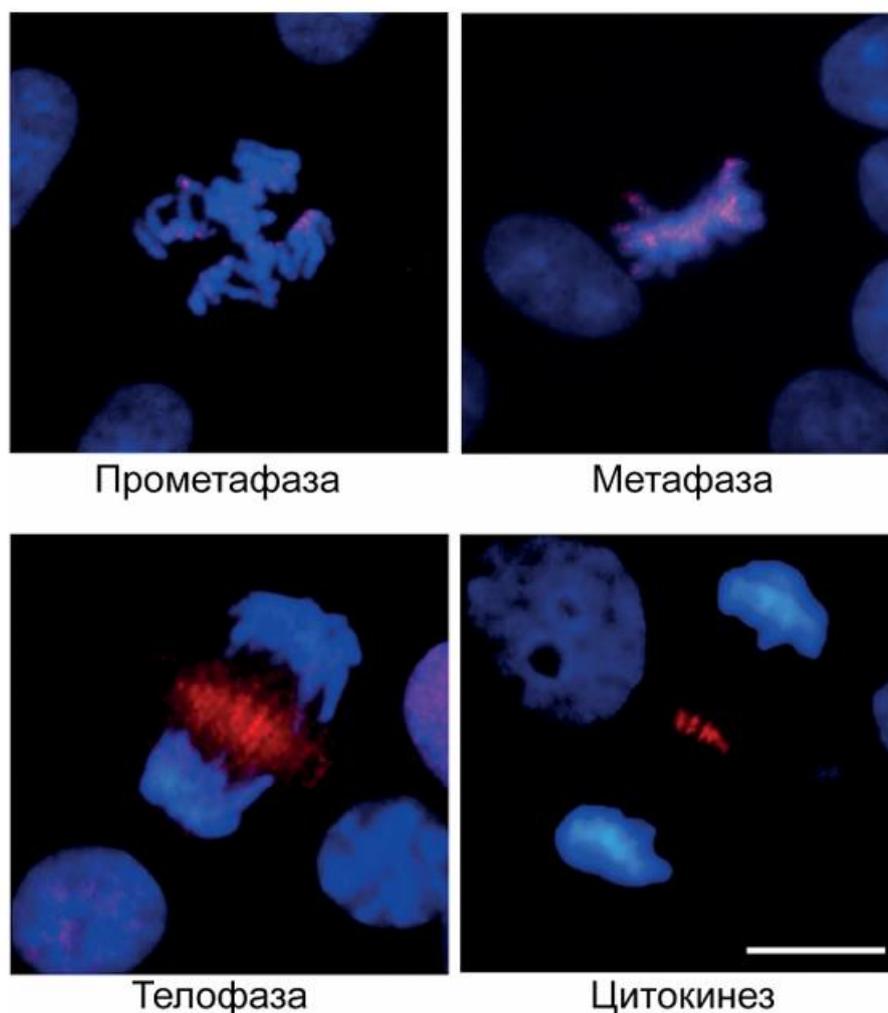
Большинство исследований описывают вклад Aurora A в функции центросомы, а Aurora B связывают с событиями, происходящими в области центромеры. Однако ряд работ указывает на то, что Aurora A играет важную роль в функциях, связанных с хроматином. Показано, что фосфорилирование гистона H3T118 во время профазы зависит от активности Aurora A (Kunitoku et al., 2003; Wike et al., 2016) и сопровождается локализацией эндогенного пула киназы в области центромер (Eot-Houllier et al., 2018). В профазе Aurora A отвечает за фосфорилирование CENP-A – белка нуклеосомы, представляющего собой вариант гистона H3, специфичного для центромеры (Sullivan et al., 1994; Tromer et al., 2019).

### 3.5.2. Роль Aurora B в регуляции клеточного деления

Киназа Aurora B играет важнейшую роль в регуляции клеточного цикла и, в частности, процесса клеточного деления. Транслокация Aurora B во время митоза связана с её активностью в разных компартментах клетки в зависимости от фазы деления (рис. 7). В начале митоза киназа рекрутирует остальные белки в составе CPC и фосфорилирует гистон H3 во внутренней прицентромерной области. Aurora B является ферментативным компонентом CPC комплекса и отвечает за процесс сегрегации хромосом во время митоза через фосфорилирование различных субстратов, расположенных на хромосомах.

В состав CPC помимо Aurora B входят также INCENP, сурвивин и бореалин. Два последних регулируют пространственное расположение комплекса в клетке (Carmena et al., 2012; Vader et al., 2006). INCENP имеет две функциональные части: C-концевая обеспечивает фосфокиназную активность Aurora B и правильную локализацию самого белка, а N-концевая часть – связывается с бореалином и сурвивином и ориентирует белок в области прицентромерного гетерохроматина (Bishop and Schuniacher, 2002; Honda et al., 2003; Broad and DeLuca, 2020). Все большее число исследований подтверждают локализацию Aurora B также и в области кинетохоров, что указывает на дополнительный механизм регуляции стабильности прикрепления кинетохоров к микротрубочкам. При этом Aurora B рекрутируется в область кинетохора в начале митоза, фосфорилируя соответствующие мишени, а затем покидает область кинетохоров по мере образования стабильных соединений микротрубочек веретена с кинетохорами (Broad et al., 2020; Caldas et al., 2013; Hadders et al., 2020).

Правильная пространственно-временная локализация CPC необходима для клеточного деления (Van der Horst et al., 2015), поскольку он играет важную роль в ходе конденсации хромосом и прикрепления их кинетохоров к микротрубочкам веретена деления, в контрольной точке сборки веретена деления SAC (spindle assembly checkpoint) и цитокинезе (Krenn and Musacchio, 2015; McVey et al., 2021). Частично каталитически активированная Aurora B рекрутируется в область кинетохора на стадии прометафазы (Caldas et al., 2013; Hadders et al., 2020). В конце прометафазы и метафазе CPC располагается в прицентромерной области, что обусловлено связыванием INCENP с фосфорилированными гистонами, опосредованным активностью сурвивина и бореалина (Hindriksen et al., 2017). На стадии анафазы CPC мигрирует в центральную область веретена деления, а на стадии телофазы - в область остаточного тельца. Локализация CPC в центральной области веретена деления обеспечивается множеством факторов, включая дефосфорилирование гистона H2A по Thr3 и киназы Cdk1 в INCENP (Van der Horst et al., 2015).



**Рисунок. 7.** Локализация Aurora B в различных фазах клеточного деления (Titova et al., 2023). синий - ДНК (DAPI), красный – Aurora B; масштаб – 10 мкм. Флуоресцентная микроскопия.

Завершение цитокинеза – абсцизия зависит от процесса сегрегации хромосом и корректного распределения генетического материала между дочерними клетками (Mierzwa and Gerlich, 2014). При появлении хроматиновых мостиков или отстающих хромосом процесс абсцизии приостанавливается для предотвращения разрывов ДНК или образования многоядерных клеток (Gisselsson, 2008; Petsalaki and Zachos, 2016). При формировании узкого межклеточного канала между клетками и его закрытии в ходе абсцизии происходит реорганизация цитоскелетных систем в этой области с участием белков виментина, глиального фибриллярного кислого белка и десмина. В регуляции этого процесса важную роль играет Aurora B (Goto et al., 2003). Эндосомальный сортировочный комплекс, необходимый для транспорта ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), связываясь с АТФазой Vps4, обеспечивает образование спиральных филаментов в области межклеточной перетяжки, и завершение цитокинеза

(Chris et al., 2017). Aurora В контролирует расположение и активность Vps4 в остаточном тельце, в норме ингибируя его, а при завершении абсциссии и разделении дочерних клеток – снижая свою активность благодаря регуляторным механизмам, обеспечивающих процесс клеточного деления (Davies et al., 2011).

### **3.5.3. Aurora В при опухолевой трансформации**

Aurora В играет важную роль в регуляции клеточного цикла и обеспечивает стабильность генетического материала дочерних клеток в ходе митоза. Процесс клеточной трансформации характеризуется нарушением её экспрессии и контроля активности, что обуславливает различные генетические аномалии (Borah and Reddy, 2021; Gonzalez-Loyola et al., 2015). Подобные изменения Aurora В описаны для ряда опухолей: рак молочной железы (Huang et al., 2019), простаты (Chieffi et al., 2006), кишечника (Pohl et al., 2011) и карцином различного генеза (Smith et al., 2005; Sorrentino et al., 2005; Vischioni et al., 2006). Исследования *in vitro* выявили влияние Aurora В на развитие устойчивости химиотерапевтическим препаратам (Failes et al., 2012; Skaland et al., 2009). Повышение содержания Aurora В в трансформированных клетках контролируется циклином К, онкогенами Мус (*c-Мус* и *MYCN*), белком MDM2, киназой CDK1 и приводит к нарушениям в процессе клеточного деления и анеуплоидии. В клетках рака предстательной железы Aurora В участвует в MDM2-опосредованных сигнальных каскадах совместно с CDK1 и циклином К, нарушая процесс апоптоза и стимулируя клеточное деление (Schecher et al., 2017). Снижение p53 опосредованно через уменьшение активности FBXW7 также повышает содержание Aurora В при трансформации (Teng et al., 2012). При этом фосфорилирование p53 киназой Aurora В уменьшает его активность, приводя к активации CDK1 и иммортализации опухолевых клеток (Gully et al., 2012). Для В-клеточных лимфом, вызванных активностью *c-Мус*, показано усиление экспрессии гена Aurora В (Den Hollander et al., 2010). *MYCN* ответственен за повышенное содержание Aurora В в опухолевых клетках нейробластомы (Bogen et al., 2015) и ретинобластомы (Borah et al., 2021).

### **3.5. Заключение**

Таким образом, при анализе литературы были обобщены и сформулированы основные признаки клеточной трансформации, включающие нарушение контроля пролиферации и клеточной гибели, изменение нормальной морфологии, необходимое для усиления подвижности и метастазирования. Важнейшую роль в приобретении клетками опухолевого фенотипа играет реорганизация актинового цитоскелета и активность АВР.  $\gamma$ -

и  $\beta$ - цитоплазматические изоформы актина в композиции с соответствующим набором АВР образуют две структурно-функционально отличные цитоскелетные системы -  $\gamma$ -актиновая кортикальная сеть из тонких филаментов и более стабильные и плотные линейные пучки  $\beta$ -актина, обеспечивающие натяжение и сократительную функцию. Реорганизация данных цитоскелетных систем является признаком опухолевых клеток, а снижение количества  $\beta$ -актина можно считать маркером клеточной трансформации.

Нарушение регуляции клеточного цикла при мутации или сверхэкспрессии отдельных участников соответствующих сигнальных механизмов приводит к потере контроля пролиферации, что является одним из этапов канцерогенеза. Реорганизация актинового цитоскелета является необходимым событием в процессе клеточного деления. Киназы семейства Auroga являются важными регуляторами клеточного деления. Особенно подробно изучена роль в этом процессе Auroga B, которая участвует в контроле сегрегации хромосом и цитокинеза. Повышенная активность данной киназы в ряде опухолей позволяют рассматривать ее как потенциальную мишень противоопухолевой терапии.

Еще одной важной характеристикой опухолевых клеток является нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза и митохондриальных функций, увеличение уровня МАФК. Помимо повреждающего окислительного эффекта, внутриклеточные АФК играют важную роль в регуляторных сигнальных путях и могут способствовать как клеточной гибели, так и усилению пролиферации и клеточной подвижности опухолевых клеток. МАО избирательно накапливаются в митохондриях, нейтрализуя избыток МАФК и способствуя нормализации окислительно-восстановительного статуса клетки, что влечет за собой соответствующие изменения в морфологии и параметрах клеточного цикла. Это даёт основание полагать, что МАО могут стать перспективными агентами коррекции опухолевого фенотипа и пролиферативных характеристик клеток при неопластической трансформации. В связи с этим целью настоящей работы является исследование влияния антиоксидантов, адресованных в митохондрии, на морфологию и пролиферацию нормальных и трансформированных фибробластов человека.

## 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1. Клеточные культуры и культивирование клеток

Для анализа влияния мАО на клетки мезенхимального происхождения в ходе исследования были использованы различные культуры.

1) В качестве контрольных клеток использовалась первичная культура нормальных фибробластов кожи человека HSCF (Human Subcutaneous Fibroblasts, человеческие подкожные фибробласты) из коллекции клеточных культур Института медицинской генетики РАН (Москва) и линия эмбриональных легочных фибробластов человека MRC-5 с ограниченным количеством пассажей, любезно предоставленные проф. Шапонье (лаб. патологии и иммунологии медицинского центра университета Женевы, Швейцария).

2) В качестве трансформированных фибробластов были использованы клональные производные клеток MRC-5, трансформированные вирусом SV40: линии MRC5-V1 и MRC5-V2, также любезно предоставленные проф. Шапонье (лаб. патологии и иммунологии медицинского центра университета Женевы, Швейцария). Перманентные линии V1 и V2 обладали трансформированными свойствами, такими как измененная морфология, продукция Т-антигена, способность к росту в полужидкой среде, потеря контактного торможения и способность к росту в низкой концентрации сыворотки. Клетки линии MRC5-V2 имели исходно более выраженный трансформированный фенотип (Huschtscha & Holiday, 1983).

3) В качестве опухолевых клеток мезенхимального происхождения были использованы культуры HT1080 - линия фибросаркомы человека с одним эндогенным мутантным аллелем N-Ras (Gupta, 2001) и RD - линия рабдомиосаркомы человека (McAllister, 1969)

Клетки культивировали на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (ПанЭко) с 5-10% сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), 100 U/мл пенициллина, 100 U/мл стрептомицина, 5 mU L-глутамин (ПанЭко) при 37° С в увлажненной атмосфере 5% CO<sup>2</sup> на культуральном пластике.

### 4.2. Экстракция и фиксация клеток

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки выращивали на покровных стеклах и промывали DMEM, содержащей 20 mM HEPES. Клетки фиксировали в течение 15 мин 1,5% параформальдегидом на среде DMEM (с 20 mM HEPES) без сыворотки при комнатной температуре с последующей экстракцией-фиксацией холодным метанолом при -20°С в течение 5 минут (для последующей окраски антителами), либо

пермеабилizировали с помощью 0,1% тритоном X-100 на фосфатно-буферном растворе (PBS, phosphate-buffered saline) в течение 3 минут (для окраски фаллоидином, DAPI) при комнатной температуре. После отмывки PBS клетки подвергались окраске красителями или антителами для выявления цитоскелетных структур, ДНК и распределения анализируемых белков.

#### **4.3. Анализ ростовых характеристик клеточных культур**

Клетки рассаживали в чашки Петри и подсчитывали количество клеток через каждые 24 часа с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе AxioPlan (Zeiss) с объективом 20x/0,50 (Plan-Neofluar). Анализировалось не менее 20 полей зрения для каждого из условий эксперимента.

#### **4.4. Обогащение клеточной популяции митотическими клетками**

Для обогащения культур опухолевых фибробластов митозами использовалось два метода:

- 1) Для анализа параметров и динамики клеточного цикла клетки предынкубировали в бессывороточной среде в течение 24 часов для обогащения культур митотическими клетками без химической обработки. Клетки пересаживали после 24 часов в бессывороточной среде и инкубировали в свежей среде, содержащей сыворотку, в течение 13-24 часов перед анализом.
- 2) Для иммуноблоттинга использовали предынкубацию клеток с малыми дозами колцемида (0,02 мкг/мл, Sigma) для обогащения культур митозами. Клетки пересаживали на культуральный пластик и через 3 часа (после прикрепления к субстрату) добавляли колцеמיד в среду на 24 часа. Затем клетки промывали один раз средой без сыворотки и затем инкубировали в среде с сывороткой в течение 24 часов перед анализом. Данный способ является менее физиологичным, чем первый, однако позволяет получить большую популяцию митотических клеток в культуре для последующего анализа содержания белка.

#### **4.5. Анализ параметров клеточного цикла**

После 24-96 часов инкубации клетки снимали с помощью раствора трипсина с ЭДТА (ПанЭко) для анализа параметров клеточного цикла. Клетки снимали с пластиковой подложки, промывали PBS и фиксировали ледяным 80% этанолом (1:2), инкубировали в течение ночи при 4<sup>0</sup>C и хранили при 4<sup>0</sup>C до анализа методом проточной цитофлуориметрии. Непосредственно перед анализом клетки центрифугировали для

удаления этанола, промывали PBS и окрашивали пропидий йодидом (MP Biomedicals) 30 мкг/мл с РНКазой А (Fermentas) 10 нг/мл в буфере PBS в течение 45 минут при 37°C в темноте. Анализировали не менее 20000 клеток на каждое условие эксперимента с помощью проточного цитометра Beckman Coulter Cytomics FC500. Для дальнейшей визуализации и анализа полученных данных использовалось программное обеспечение Beckman Coulter CXP.

#### **4.6. Измерение внутриклеточных АФК**

Для измерения внутриклеточных АФК клетки RD и HT1080 инкубировали в бессывороточной среде DMEM с 1,8 мкМ DCFH-DA (2',7'- дихлордигидрофлуоресцеин диацетат, Invitrogen) в течение 10 минут при 37°C в темноте. После окисления под действием АФК дихлордигидрофлуоресцеин превращается в высокофлуоресцентный дихлорфлуоресцеин (DCF). Затем клетки снимали с помощью раствора трипсина с ЭДТА (ПанЭко). Накопление АФК измеряли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter Cytomics FC500.

#### **4.7. Фазово-контрастная микроскопия живых клеток**

Клетки культивировали на покровных стеклах в закрытых стеклянных камерах в течение 24 часов перед началом наблюдения. Клетки анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Opton, с использованием объектива 40x/1,0 Planapo с масляной иммерсией). Для динамических наблюдений использовали длительную цейтраферную видеосъемку (замедление в 120 раз) с помощью камеры Hamamatsu C2400-01. При исследовании поддерживалась температура 37°C. Для обработки изображений использовалось программное обеспечение Studio Launcher. Для подсчета продолжительности митотических фаз анализировали не менее 30 митотических клеток для каждого из условий эксперимента.

#### **4.8. Морфометрический анализ клеток**

Изображения анализировались с помощью программы MetaMorph. Клетки фиксировали через 72 часа после рассадки на покровные стекла. Морфометрический анализ проводился на изображениях препаратов, окрашенных фаллоидином, выявляющим общий актин. Для исключения влияния на площадь и форму клеток межклеточных взаимодействий исследовали одиночные клетки в редких культурах. В качестве морфометрических характеристик была выбрана площадь проекции, занимаемая клеткой на субстрате, которую определяли по контурам клетки.

#### **4.9. Морфометрический анализ фокальных контактов**

Морфометрия фокальных контактов проводилась с использованием программы Image J при анализе изображений, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Исследовались изображения препаратов, окрашенных антителами к паксиллину в комбинации с фаллоидином, выявляющим общий актин. Для измерения выбиралась квадратная зона площадью 500 мкм<sup>2</sup> вблизи ведущего края клетки. Длину фокальных адгезий измеряли как максимальный размер контакта независимо от его ориентации относительно края и тела клетки.

#### **4.10. Антиоксиданты и ингибиторы**

Вещества группы SkQ («Митотехнологии») – SkQ1, SkQB, SkQP, SkQR1, DPQ, SkQRC12, использовали в концентрации 10-100 нМ в среде для культивирования, при постановке эксперимента добавляли из спиртового раствора концентрацией 10-100 мМ, соответственно (1 мкл на 1 мл среды). Липофильный катион додецилтрифенилфосфония C12TPP и децилродамина C12R1 в отличие от SkQ1 не имеют остатка пластохинона, отвечающего за антиоксидантную активность. DPQ – децилпластохинон не имеет катионной части, обеспечивающей адресное накопление вещества в митохондриях. Данные молекулы использовались нами в качестве контрольных соединений.

АО Тролокс (Sigma) использовался в концентрации 100 мМ, NAC (Sigma) - в концентрации 1 мМ в среде для культивирования.

Ингибиторы каспаз использовались для предотвращения апоптоза в клетках рабдомиосаркомы RD. Ингибитор каспазной активности zVAD-fmk (Sigma) и ингибитор каспазы-3 DEVD (Sigma) использовались в концентрации 20 мМ в среде для культивирования.

Митохондриальный разобщитель окислительного фосфорилирования FCCP (карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон) (Sigma) использовался в концентрации 5 мМ в среде для культивирования.

#### **4.11. Антитела**

Использовали следующие первичные антитела:

- мышинные моноклональные антитела к цитоплазматическому β-актину (μA5775GA, AbD Serotec), γ-актину (μA5776GA, AbD Serotec), альфа-гладкомышечному актину (клон SM-1, IgG2a, были получены и любезно предоставлены проф. Шапонье, лаб. патологии и иммунологии медицинского центра университета Женевы, Швейцария), α-

актинину-1 (Sigma), паксиллину (BD Transduction Lab),  $\alpha$ -тубулину (клон DM1A, Cell Signaling),  $\alpha$ -тубулину (клон DM1A, Sigma), Rb (Cell Signaling); виментину (клон V9, DAKO);

- кроличьи высокоспецифичные поликлональные антитела к белку p34-Arc/ARPC2 комплекса Arp2/3 (Upstate), кроличьи поликлональные антитела к миозину II (BTI), кроличьи антитела к Aurora B (клон E3R8N, Cell Signaling), фосфо-Aurora A/B/C (Cell Signaling), фосфо-Rb (Ser795) (Cell Signaling), фосфо-Rb (Ser 807/811) (Cell Signaling).

Использовали следующие вторичные антитела: козы Alexa 488-, AlexaFluor 594-конъюгированные к иммуноглобулинам IgG1, IgG2b, IgG мыши (Molecular Probes) и родамин-конъюгированные к иммуноглобулинам кролика (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc), козы флуоресцеин- и родамин-конъюгированные антитела к иммуноглобулинам Ig2a, Ig2b и IgG1 мыши (Southern Biotechnology).

#### **4.12. Флуоресцентная, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, микроскопия со структурированным освещением**

Клетки фиксировались описанными выше методиками.

Для окрашивания антителами клетки инкубировали 40 минут в растворе первых антител на PBS, отмывали 3 раза в PBS в течение 5 минут, затем инкубировали в растворе вторых антител на PBS в течение 30 минут. Окрашивание проводили при комнатной температуре. Препараты заключали в эльванол.

Для совместного выявления общего актина и паксиллина, родамин-конъюгированный фаллоидин добавляли в раствор вторых антител. Для совместного выявления Aurora B, тубулина и ДНК – DAPI добавляли в раствор вторых антител. Для ядерного окрашивания использовали DAPI (Sigma). Общий F-актин окрашивали родамин-конъюгированным фаллоидином (Sigma). Для выявления митохондрий использовался SkQR1 (SkQ1, меченный родамином), 20 мкМ в среде для инкубации.

Имунофлуоресцентное исследование проводили с помощью микроскопа AxioPlan (Zeiss) с увеличением 40 $\times$ /0,75 и 63 $\times$ /1,25 объективами Plan-Neofluar с масляной иммерсией. Полученные цифровые изображения препаратов подвергались компьютерной обработке, качественному и количественному анализу. Окрашивание DAPI и родамин-конъюгированным фаллоидином использовали для оценки количества клеток на разных стадиях митоза (500 клеток на каждое условие эксперимента, от трех до пяти независимых экспериментов на каждое из экспериментальных условий).

Окрашивание DAPI и антителами к Aurora B использовали для оценки флуоресценции Aurora B в митотических клетках. Интенсивность флуоресценции белка

измеряли с помощью программы Image J в квадрате площадью 100 мкм<sup>2</sup> (10 мкм на 10 мкм) чтобы захватить всю область флуоресценции киназы в области клетки, где она была локализована. Для каждого экспериментального условия исследовали не менее 30 полей зрения.

Микроскопию сверхвысокого разрешения со структурированным освещением (3D-SIM) использовали для анализа совместного распределения Auroga B, тубулина и ДНК. Анализ проводили с помощью микроскопа Nikon N-SIM (Nikon) с объективом 100x/1.49 NA с масляной иммерсией, диодным лазером 488 нм и 561 нм. возбуждения. Стопки изображений (z-шаг 0,12 мкм) были получены с помощью EμCD-камеры (iXon 897, Andor, эффективный размер пикселя 60 нм). Серийные оптические срезы одной и той же клетки, полученные в широкоугольном режиме были деконволюционированы с помощью алгоритма слепой деконволюции AutoQuant. Получение изображений, реконструкция SIM-изображений и выравнивание данных осуществлялись с помощью программного обеспечения NIS Elements 4.2 (Nikon).

Распределение общего актина, изоформ актина и паксиллина анализировали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Анализ проводили с помощью конфокального микроскопа LSM 510 с использованием аргон-неонового лазера (исходящая длина волны 488).

Исследовали различные уровни фокуса – базальный вблизи субстрата и кортикальный над ядром. Далее путем сложения изображений двух уровней получали совмещенные проекции с помощью программы Adobe Photoshop.

Были получены серии последовательных x/y оптических срезов с шагом 0,3 мкм, от базальной к дорзальной области клетки. Были получен z-срезы, наглядно показывающие толщину и рельеф поверхности клетки. Ось прохождения z-среза выбиралась в участке ламеллярной цитоплазмы и проходила радиально от тела клетки к ее ведущему краю. Для обработки полученных изображений и морфометрических измерений использовались программы Zeiss LSM Image Browser и Zeiss LSM Image Examiner.

#### **4.13. Вестерн-блот анализ**

Клетки экстрагировали холодным буфером для образцов (62,5 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 2% додецилсульфат натрия (SDS), 10% глицерин, 50 мМ дитиотреитол, 0,01% бромфеноловый синий). Лизаты разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле SDS и переносили на поливинилиденфторидную мембрану (Amersham GE Healthcare). После блокирования неспецифического связывания бычьим сывороточным альбумином, мембраны инкубировали со специфическими антителами. В качестве контроля нагрузки

использовали  $\alpha$ -тубулин. Мембраны инкубировали с вторичными антителами, связанными с пероксидазой хрена (Amersham GE Healthcare). Мембраны окрашивали методом хемилюминесценции с использованием реагентов ECL (Amersham GE Healthcare) в соответствии с протоколом производителя. Полученные пленки сканировали или проявляли с помощью ChemiDoc MP (BioRad) и анализировали денситометрически с помощью программы ImageJ 1,37C (НИН, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) и программного обеспечения Image Lab (BioRad).

#### **4.14. Статистический анализ**

Данные представлены с указанием среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего по трем - пяти независимым экспериментам. Межгрупповые различия анализировали с помощью U-критерия Манна-Уитни или t-теста Стьюдента, если это применимо. Значения  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*), и  $p < 0,05$  (\*) считались статистически значимыми.

## 5. РЕЗУЛЬТАТЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Agarova L.S., Chernyak B.V., Domnina L.V., Dugina V.B., Efimenko A.Y., Fetisova E.K., Ivanova O.Y., Kalinina N.I., Khromova N.V., Kopnin B.P., Kopnin P.B., Korotetskaya M.V., Lichinitser M.R., Lukashev A.L., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Skulachev M.V., Shagieva G.S., Stepanova E.V., Titova E.V., Tkachuk V.A., Vasiliev J.M., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 3. Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. V. 73, № 12. – P. 1300-1316.

Chernyak B.V.a, Antonenko Y.N.a, Galimov E.R.a, Domnina L.V.a, Dugina V.B.a, Zvyagilskaya R.A.b, Ivanova O.Y.a, Izyumov D.S.a, Lyamzaev K.G.a, Pustovidko A.V.a, Rokitskaya T.I.a, Rogov A.G.b, Severina I.I.a, Simonyan R.A.a, Skulachev M.V.a, Tashlitsky V.N.a, Titova E.V.a, Trendeleva T.A.b, Shagieva G.S. Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents: Conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone // *Biochemistry (Moscow)* – 2012. V. 77, № 9. – P. 983-995

Titova, E., Shagieva, G., Ivanova, O., Domnina, L., Domninskaya, M., Strelkova, O., Khromova, N., Kopnin, P., Chernyak, B., Skulachev, V., and Dugina, V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth // *Cell Cycle*. – 2018. V. 17. – P. 1797-1811.

Титова Е.В., Иванова О.Ю., Дугина В.Б. Нормализация ростовых характеристик клеток фибросаркомы в культуре при действии митохондриально-направленных антиоксидантов // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2016 – Т. 52, № 10, Часть 4. С. 49-52.

### 5.1. Влияние МАО на морфологию трансформированных фибробластов

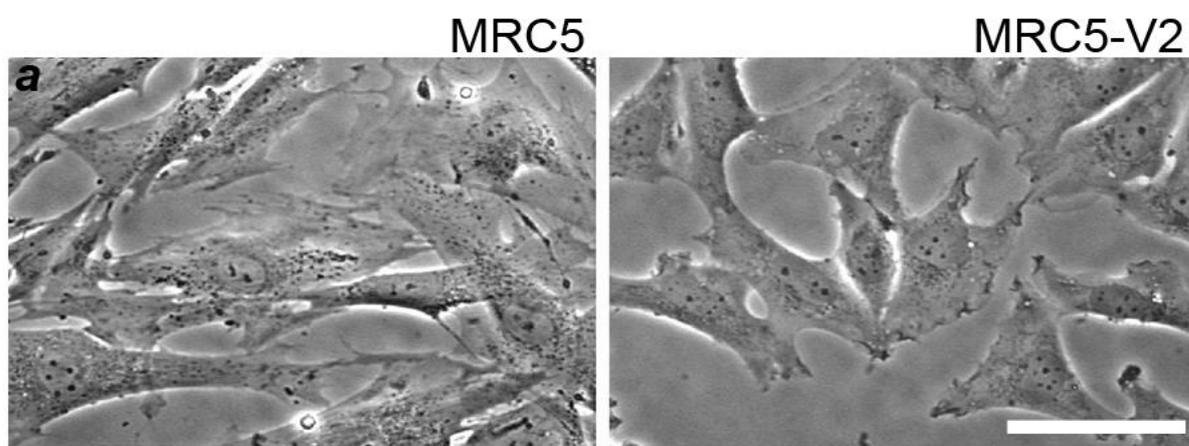
#### 5.1.1. Сравнительная характеристика культур нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов

В качестве контрольных нормальных клеток в работе были использованы линии нормальных клеток человека мезенхимального происхождения: линия легочных фибробластов MRC5 и первичная культура фибробластов кожи человека HSCF. Линия нормальных человеческих фибробластов HSCF состояла из популяций нормальных фибробластоподобных клеток классической морфологии: удлиненной треугольной, редко - полигональной формы. Популяцию составляли преимущественно одноядерные, поляризованные клетки, можно было выделить ведущий край с выраженной псевдоподиальной активностью (Рис. 9). В густой культуре клетки вытягивались, образуя характерные тяжи, фибробласты были ориентированы вдоль длинной оси клеток параллельно друг другу. В трех- и семисуточных культурах клетки располагались близко друг к другу, имело место контактное торможение, клетки не «наползали» друг на друга, образуя правильный плотный монослой.

Описанная нами культура HSCF похожа на большинство культур нормальных фибробластов различного тканевого происхождения (Dugina et al., 1998). Существуют культуры, выделенные из легочной ткани, такие как MRC5, в которых фибробласты обладают повышенной стабильностью и сократимостью, связанной с экспрессией альфа-гладкомышечного актина (Hinz et al., 2002; Hinz et al., 2003), что характерно для миофибробластной дифференцировки. Содержание данной изоформы актина в миофибробластах и ремоделирование актинового цитоскелета зависит от активации

SMAD- и RhoA (независимо от SMAD) сигнальных путей, индуцируемых TGF- $\beta$  (Derynck et al., 2003). По данным наших коллег Поповой и др., длительная инкубация фибробластов с SkQ1 приводит к миофибробластной дифференцировке по TGF- $\beta$ -зависимому типу (Pорова et al., 2010). Поэтому, кроме обычных фибробластов кожи с невысоким содержанием миофибробластов в культуре мы анализировали действие MAO на культуру легочных фибробластов MRC5 и культуры ее вирус-трансформированных производных.

Линия MRC5 была представлена преимущественно миофибробластами - морфологический тип хорошо распланных клеток большой площади с сильно изрезанным краем (Рис. 8, А).



**б**

	MRC5	MRC5-V1	MRC5-V2
Средняя площадь клеток, мкм <sup>2</sup>	4647,38 ± 198,35	3185,34 ± 86,37	1448,59 ± 79,52

**Рисунок 8.** Сравнительные характеристики культур нормальных и трансформированных фибробластов.

*а* – общий вид контрольных культур MRC-5 и MRC5-V2, 24 часа инкубации; фазовый контраст, масштаб 50 мкм;

*б* – сравнение средней площади клеток, занимаемой на субстрате, 72 часа инкубации; данные морфометрического анализа: среднее значение ± стандартная ошибка среднего, мкм<sup>2</sup>; три независимых эксперимента;

Линии MRC5-V1 и MRC5-V2 являются трансформированными вирусом SV40 клональными производными фибробластов линии MRC5 (Huschtscha, Holliday, 1983).

**MRC5-V1:** линия эмбриональных легочных фибробластов человека, трансформированных вирусом SV40. Средняя площадь, занимаемая клетками на

субстрате, в трехсуточных культурах основной популяции MRC5-V1 была примерно в 1,5-2 раза меньше, чем у нормальных фибробластов линии MRC-5 по (Рис. 8, Б). Клетки имели преимущественно одно ядро. Также выявлялась небольшая ( $0,5 \pm 0,09$  % от общего числа клеток в культуре) популяция многоядерных клеток (подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.2). В редкой культуре клетки были поляризованы хуже нормальных фибробластов. Помимо ведущего края наблюдалось некоторое количество участков цитоплазмы с выраженной псевдоподиальной активностью (Рис. 10). Клетки двигались ненаправленно. В густом монослое было нарушено контактное торможение, клетки могли наползать друг на друга, образуя многослойные островки.

**MRC5-V2:** линия эмбриональных легочных фибробластов человека, трансформированных вирусом SV40. По морфологическим критериям и степени опухолеродности – более трансформированное клональное производное клеток MRC5 по сравнению с линией MRC5-V1 (Huschtscha and Holliday, 1983). Культура, в основном, состояла из мелких, плохо распластанных клеток (Рис. 10, А). Средняя площадь, занимаемая клетками на субстрате, в трехсуточных культурах основной популяции MRC5-V2 была примерно в 3-3,5 раза меньше, чем у нормальных фибробластов линии MRC-5 (Рис. 8, Б). В монослое клетки имели эпителиальноподобный фенотип. При распластывании клеток данной культуры можно было наблюдать многочисленные псевдоподии, раффлы и блебы (Рис. 8, А). Культура была морфологически полиморфна: встречались клетки полигональной и немного удлинённой формы, которые имели одно, реже два ядра, выявлялась популяция многоядерных клеток ( $0,9 \pm 0,15$  % от общего числа клеток, подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.2). В плотном монослое было нарушено контактное торможение, в культуре можно было обнаружить очаги интенсивного деления (так называемые «фокусы роста»), где клетки наползали друг на друга, не наблюдалось регулярного расположения клеток.

В перспективе данных исследований нашими соавторами планировалось проведение исследований на животной модели подкожных опухолевых ксенографтов, подобной работе Агаповой и соавторов (Агапова et al., 2008). Поэтому мы анализировали действие МАО на две опухолевые линии мезенхимального происхождения:

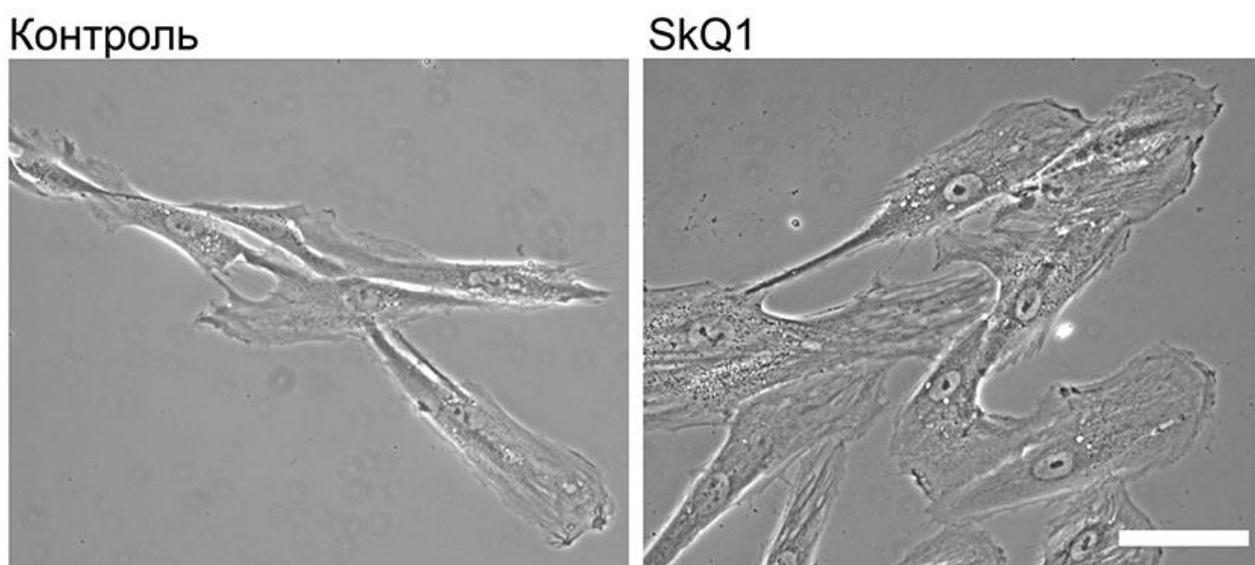
**HT1080:** линия клеток фибросаркомы человека. Псевдодиплоидная, морфологически полиморфная культура, содержащая мутантный аллель онкогена N-Ras (Gupta and Stanbridge, 2001). Клетки были плохо распластаны, по периметру клеток выявлялись многочисленные участки активности края, на поверхности имелись многочисленные раффлы и блебы. В культуре выявлялась популяция двуядерных клеток ( $2 \pm 1,2$  % от общего числа клеток в культуре, подробный количественный анализ описан в

разделе 5.2.2). Клетки быстро делились с образованием плотного монослоя уже через сутки инкубации на субстрате, контактное торможение было нарушено (Рис. 10).

**RD:** псевдодиплоидная культура клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека (McAllister et al., 1969). Клетки веретеновидной формы, мелкие по площади, занимаемой на субстрате. По периметру клеток выявлялись участки активности края, на поверхности имелись многочисленные раффлы и блебы. В культуре выявлялись единичные многоядерные клетки. Культура клеток быстро делилась с образованием плотного монослоя.

### 5.1.2. Воздействие мАО на морфологию нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов

При инкубации с мАО SkQ1 (20нМ, инкубация в течение 3-7 суток) значительных изменений в морфологии культур нормальных фибробластов не наблюдалось: клетки становились еще более распластанными, статистически значимого увеличения площади клеток, занимаемой ими на субстрате, выявлено не было, снижалась активность ведущего края (Рис. 9).

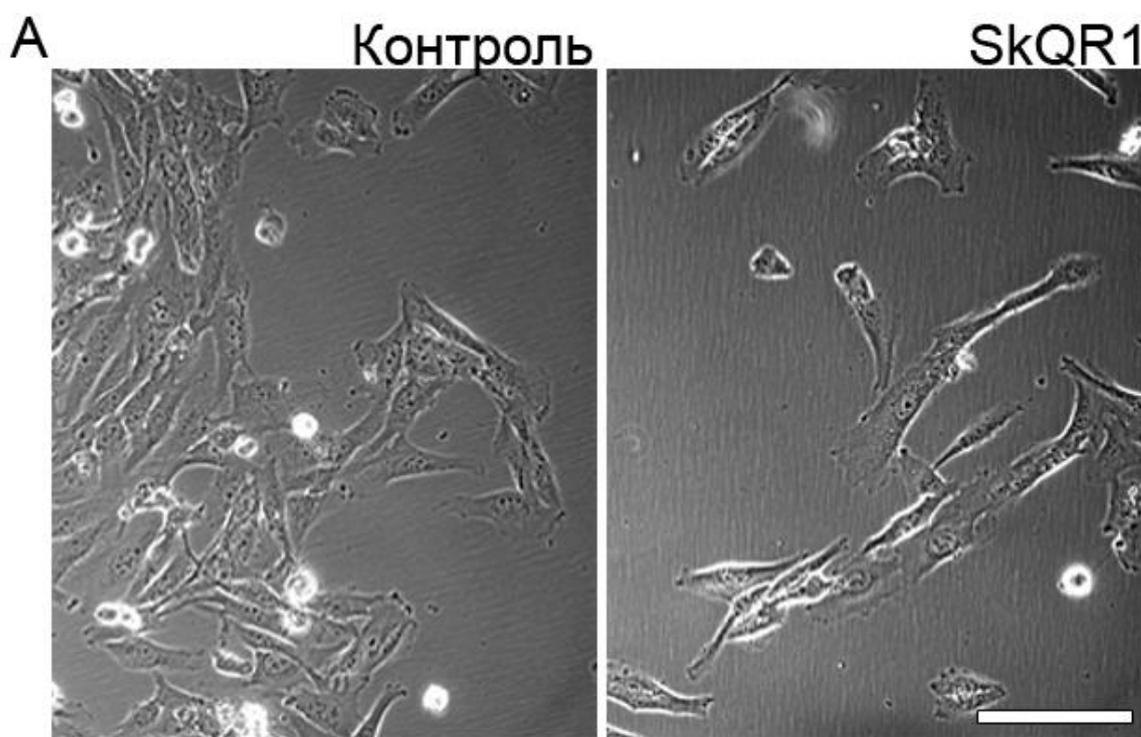


**Рисунок 9.** Эффект мАО на морфологию нормальных фибробластов кожи HSCF, общий вид культуры, SkQR1 (20нМ, 48 часов инкубации); фазовый контраст, масштаб 50 мкм.

При инкубации клеток MRC5-V1 с SkQ1 наблюдалась частичная морфологическая нормализация фенотипа, заметно уменьшалась плотность исследуемой культуры по сравнению с контрольной (Рис. 10, А), улучшалось распластывание: достоверно увеличивалась площадь клеток, занимаемая на субстрате (Рис. 10, Б). Процент

многоядерных клеток увеличивался до  $4,5 \pm 0,35\%$  (3 сут.) и  $18,2 \pm 1,23\%$  (7 сут.) при инкубации с SkQ1 (20 нМ; среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего; три независимых эксперимента). Подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.2.

При инкубации с мАО клеток линии MRC5-V2 наблюдалась частичная морфологическая нормализация фенотипа клеток, уменьшалась плотность исследуемой культуры по сравнению с контрольной, улучшалось распластывание: увеличивалась средняя площадь, занимаемая клетками на субстрате (Рис. 10, Б). Процент многоядерных клеток увеличивался до  $1,5 \pm 0,72\%$  (3 сут.) и  $19,5 \pm 2,31\%$  (7сут.) при инкубации с SkQ1 (20 нМ; среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего; три независимых эксперимента). Подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.2.



**Б**

	MRC5	MRC5-V1	MRC5-V2
Контроль	$4647,38 \pm 198,35$	$3185,34 \pm 86,37$	$1448,59 \pm 79,52$
SkQ1	$4962,05 \pm 201,49$	$5517,85 \pm 119,41$	$2545,32 \pm 157,89$

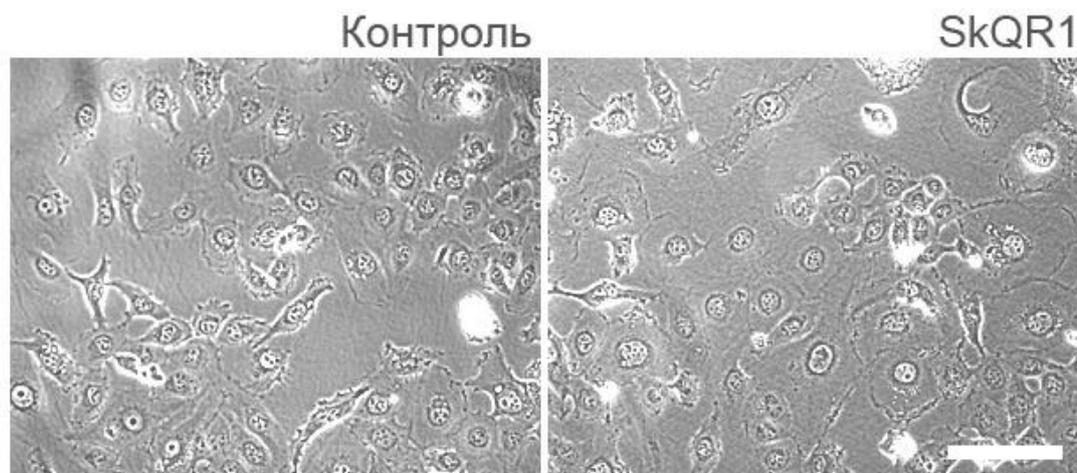
**Рисунок 10.** Эффект мАО на морфологию культур трансформированных фибробластов.

А – общий вид культуры MRC5-V1, SkQR1 (20нМ, 48 часов инкубации); фазовый контраст, масштаб 50 мкм;

Б – действие SkQ1 (20 нМ, 72 часа) на среднюю площадь клеток, занимаемую на субстрате, 72 часа инкубации; данные морфометрического анализа: среднее значение  $\pm$

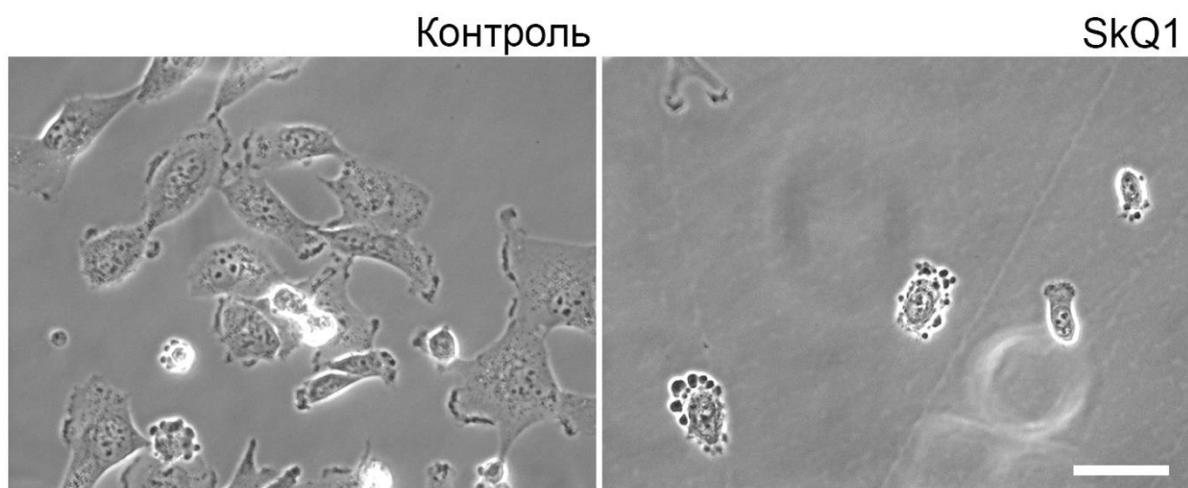
стандартная ошибка среднего,  $\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,001$  (для MRC5-V1) и  $p < 0,01$  (для MRC5-V2) согласно критерию Манна-Уитни; три независимых эксперимента.

Клетки культуры HT1080 в присутствии MAO становились более распластанными. Культура приобретала более нормальный фенотип, активность края по периметру клеток существенно снижалась (Рис. 11). Процент многоядерных клеток на 2 сутки инкубации с SkQ1 (40нМ) увеличивался до  $34 \pm 3\%$  (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего; три независимых эксперимента) по сравнению с контрольной культурой. Подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.2.



**Рисунок 11.** Эффект MAO на морфологию культуры фибросаркомы HT1080; SkQ1 (40нМ, 48 часов инкубации); фазовый контраст, масштаб 50  $\mu\text{m}$ .

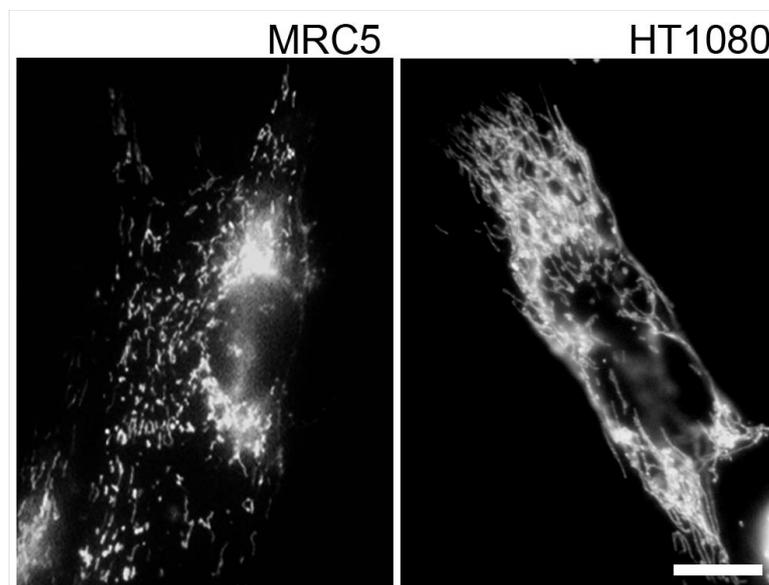
MAO приводили к резкому уменьшению плотности клеток в культуре RD уже через 1-2 суток инкубации. Основная популяция клеток при этом имела измененную морфологию, характерную для апоптотических клеток (Рис. 12). Подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.1.



**Рисунок 12.** Эффект MAO на морфологию культуры рабдомиосаркомы RD; SkQ1 (20нМ, 48 часов инкубации); фазовый контраст, масштаб 50  $\mu\text{m}$ .

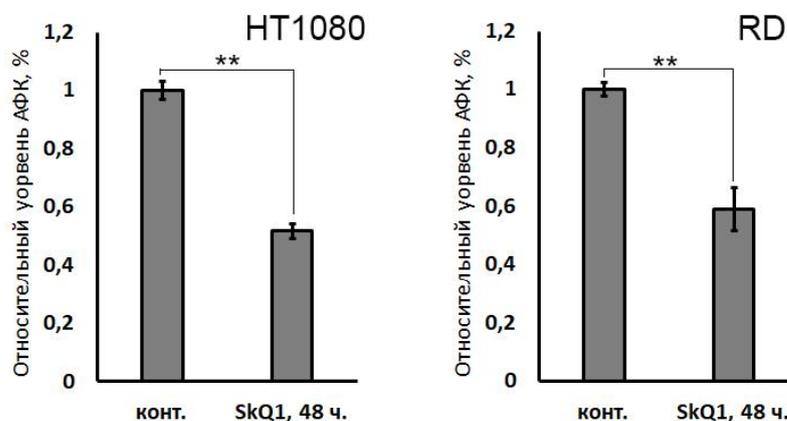
### 5.1.3. Оценка адресного действия МАО семейства SkQ

При инкубации нормальных и трансформированных фибробластов с SkQR1, родаминовым производным SkQ1, было показано избирательное накопление антиоксиданта в митохондриях, что подтверждает адресное действие МАО семейства SkQ (Рис. 13).



**Рисунок 13.** Накопление родамин- меченного МАО SkQR1 (20 нМ, 2 часа инкубации) в митохондриях нормальных фибробластов линии MRC5 и клеток фибросаркомы HT1080; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

Снижение уровня цитоплазматических АФК в присутствии SkQ1 было показано для клеток сарком HT1080 и RD методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфического флуоресцентного красителя DCF, что согласуется с данными литературы (Antonenko et al., 2008). Для культур рабдомиосаркомы и HT1080 уровень флуоресценции красителя после инкубации с SkQ1 (40 нМ, 48 часов) существенно снижался, указывая на уменьшение уровня АФК в присутствии МАО (Рис. 14).



**Рисунок 14.** SkQ1 снижает уровень АФК в клетках HT1080 и RD.

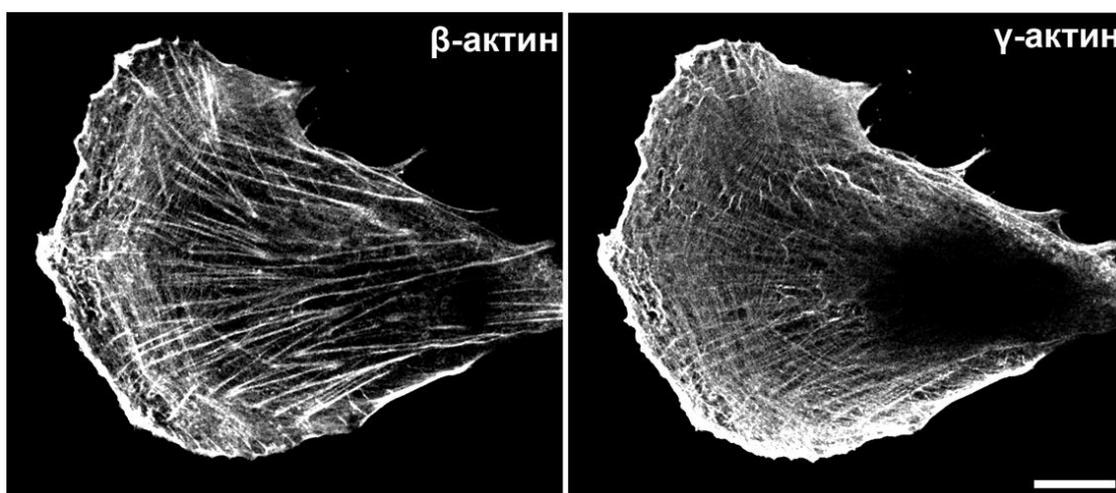
Данные количественного анализа продукции АФК после инкубации с SkQ1 (40 нМ, 48 часов); на графиках показана относительная флуоресценция DCF (по сравнению с контролем); статистический анализ данных проточной цитофлуориметрии, значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

По данным, полученным ранее в нашей лаборатории, SkQ1 эффективно снижает подъем уровня АФК в нормальных фибробластах, вызванный перекисью водорода, а также предотвращает индуцированный при этом апоптоз (Antonenko et al., 2008).

#### 5.1.4. Влияние MAO на организацию актинового цитоскелета в нормальных фибробластах

Для изучения организации морфологии и организации актинового цитоскелета нормальных фибробластов человека нами были выбраны две культуры клеток – HSCF и MRC-5. Как было описано выше, HSCF являются первичной культурой подкожных фибробластов человека с классической фибробластной морфологией. Исследование распределения общего актина показало, что клетки культуры были хорошо распластаны, имели стабильные края и один хорошо выраженный ведущий край. Отчетливо выявлялись длинные, параллельно идущие вдоль оси клетки и стабильного края пучки актина. В ламелле на ведущем крае выявлялась упорядоченная сеть из тангенциальных и радиальных пучков.

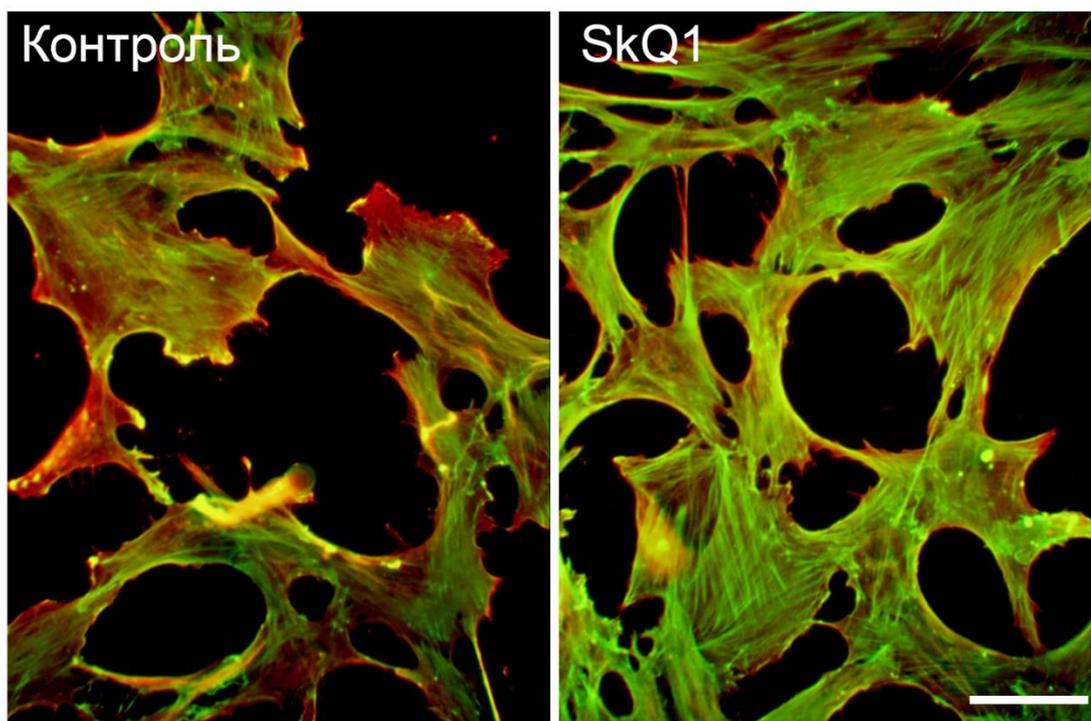
При анализе организации актиновых изоформ была выявлена характерная для нормальных фибробластов система пучков  $\beta$ -актина и сеть  $\gamma$ -актина (Рис. 15).



**Рисунок 15.** Организация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в первичных подкожных фибробластах человека HSCF; 72 часа инкубации; конфокальная микроскопия; масштаб 10мкм.

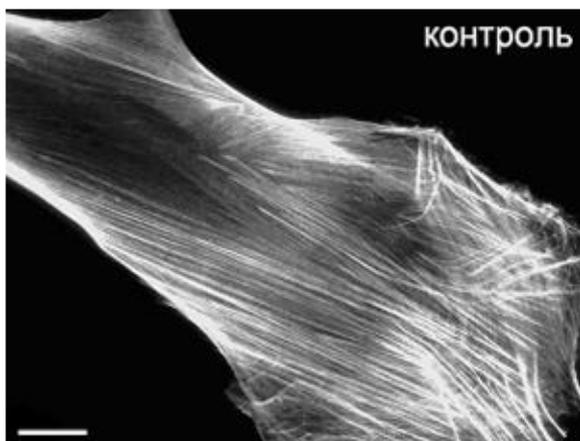
$\beta$ -актин был организован в толстые длинные пучки, идущие параллельно стабильным краям клетки, вдоль ее длинной оси. В ламелле на ведущем крае встречались редкие тангенциальные пучки, более интенсивная окраска при выявлении  $\beta$ -актина наблюдалась на ведущем крае клетки.  $\gamma$ -актин формировал плотную сеть тангенциальных пучков, идущих параллельно краю клетки, встречались редкие радиальные пучки. Также более выраженная окраска при анализе распределения  $\gamma$ -актина наблюдалась в ламеллиподиальных областях, на ведущем крае клетки.

Инкубация клеток HSCF с MAO приводила к появлению клеток с миофибробластным фенотипом – у них были еще более выражены длинные пучки  $\beta$ -актина, клетки имели стабильный, изрезанный край (Рис. 16). Исследование таких клеток на организацию и содержание белка миофибробластной дифференцировки -  $\alpha$ -гладкомышечного актина, описано в разделе 5.1.11.



**Рисунок 16.** Влияние MAO на организацию  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в первичных подкожных фибробластах человека HSCF; 40 нМ SkQ1, 72 часа инкубации;  $\beta$ -актин – зеленый,  $\gamma$ -актин – красный; флуоресцентная микроскопия; масштаб 50 мкм.

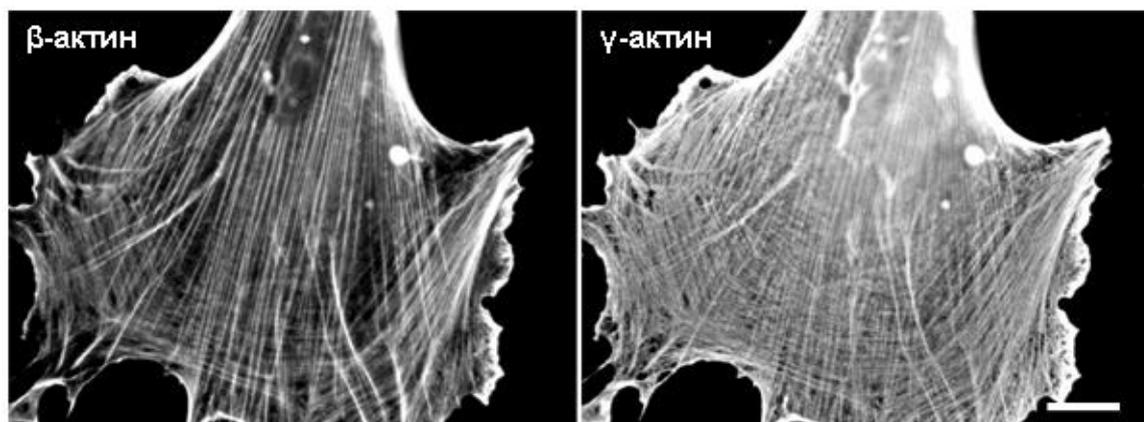
В качестве второй контрольной культуры нормальных клеток нами была выбрана культура легочных фибробластов (миофибробластов) MRC-5. При анализе организации общего актина клетки были хорошо распластаны, имели стабильные края и один выраженный ведущий край (Рис. 17).



**Рисунок 17.** Выявление общего актина (фаллоидин) в клетках линии MRC5, 72 часа инкубации; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

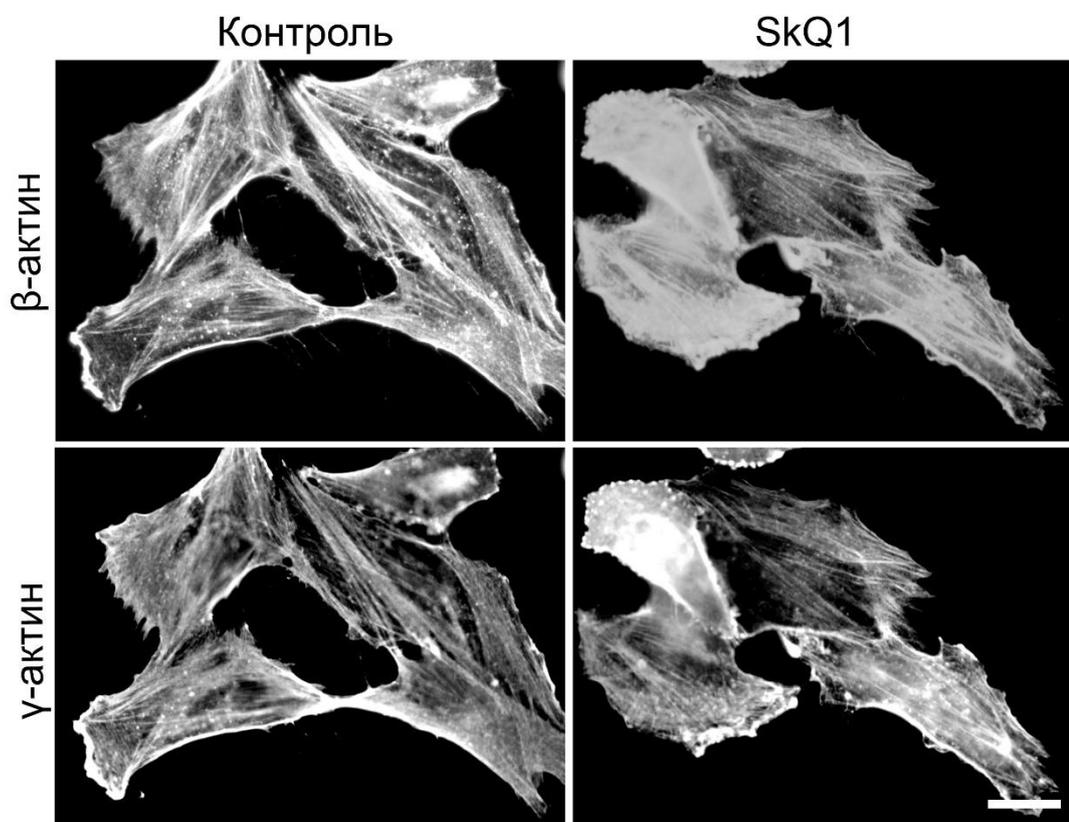
Отчетливо выявлялись длинные, параллельно идущие вдоль оси клетки и стабильного края толстые пучки актиновых стресс-фибрилл, характерные для миофибробластов. В ламелле на ведущем крае выявлялась упорядоченная сеть из тангенциальных и радиальных пучков актина.

При выявлении цитоплазматических изоформ актина в нормальных фибробластах человека наблюдалась характерная организация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в пучках. В легочных фибробластах линии MRC-5  $\beta$ -актиновая система была сформирована толстыми стресс-фибриллами, идущими преимущественно параллельно длинной оси клетки, также наблюдалась более интенсивная окраска при выявлении  $\beta$ -актина в ламеллиподии на ведущем крае клетки (Рис. 18). Плотная выраженная  $\gamma$ -актин-содержащая сеть была представлена тангенциальными пучками, идущими параллельно краю клетки, встречались редкие пучки, идущие параллельно длинной оси клетки, редкие радиальные пучки. Также более выраженная окраска при выявлении  $\gamma$ -актина наблюдалась на периферии края клетки, в ламеллиподиальной области (Рис. 18).



**Рисунок 18.** Выявление  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в контрольных фибробластах линии MRC-5; 72 часа инкубации на субстрате; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

Инкубация клеток MRC-5 с MAO не вызывала значительных изменений в организации актиновых систем (Рис. 19).



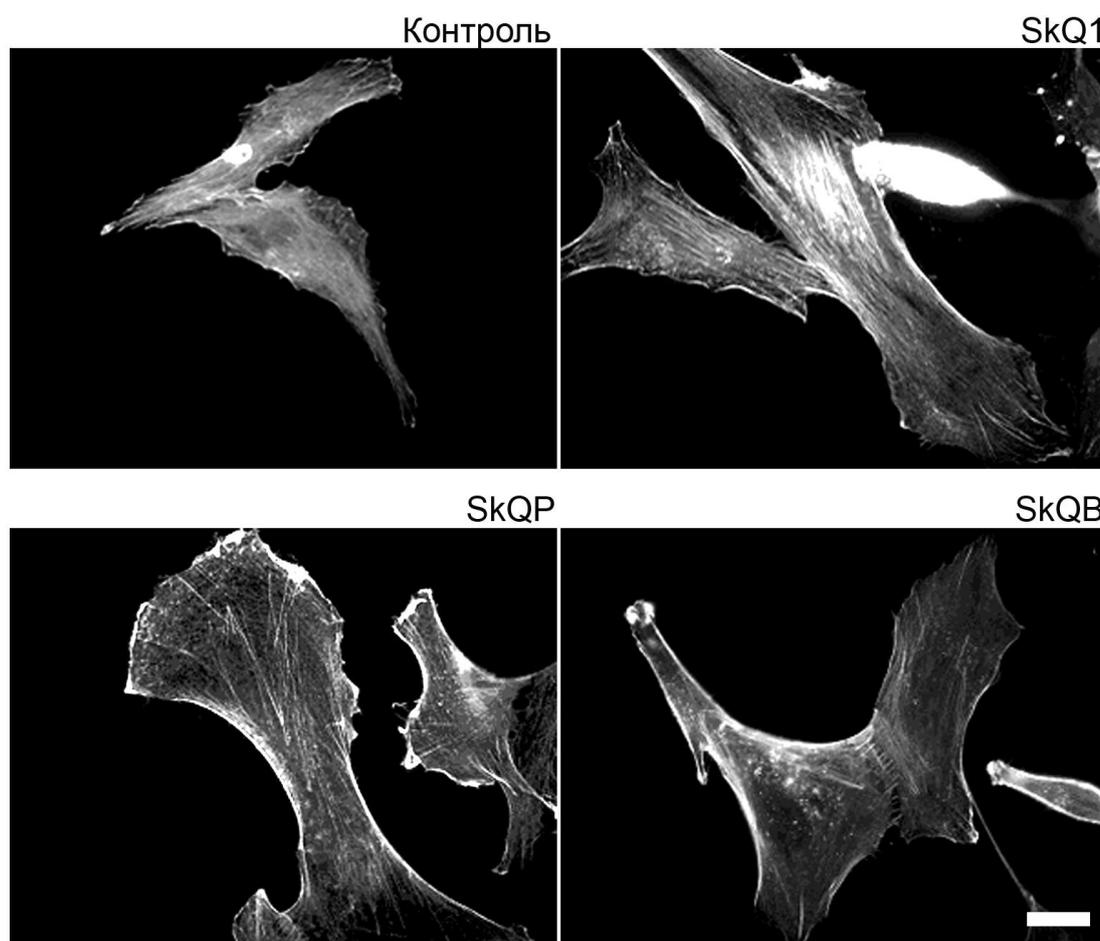
**Рисунок 19.** Влияние SkQ1 на организацию  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в клетках MRC-5; 40 нМ SkQ1, 48 часов инкубации; флуоресцентная микроскопия; масштаб 20 мкм.

#### 5.1.5. Влияние MAO на организацию актинового цитоскелета в SV40-трансформированных фибробластах

Нами было исследовано действие антиоксидантов на организацию актинового цитоскелета в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2. Как уже было сказано ранее, это культуры - клональные производные эмбриональных легочных фибробластов линии MRC5, трансформированные вирусом SV40, с разной степенью выраженности трансформированного фенотипа. По морфологическим критериям и степени опухолеродности клетки MRC5-V2 являются более трансформированными клональными производными по сравнению с линией MRC5-V1.

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что SkQ1, SkQP, SkQB, SkQR1 эффективно восстанавливают организацию актина в пучки в SV40-трансформированных фибробластах.

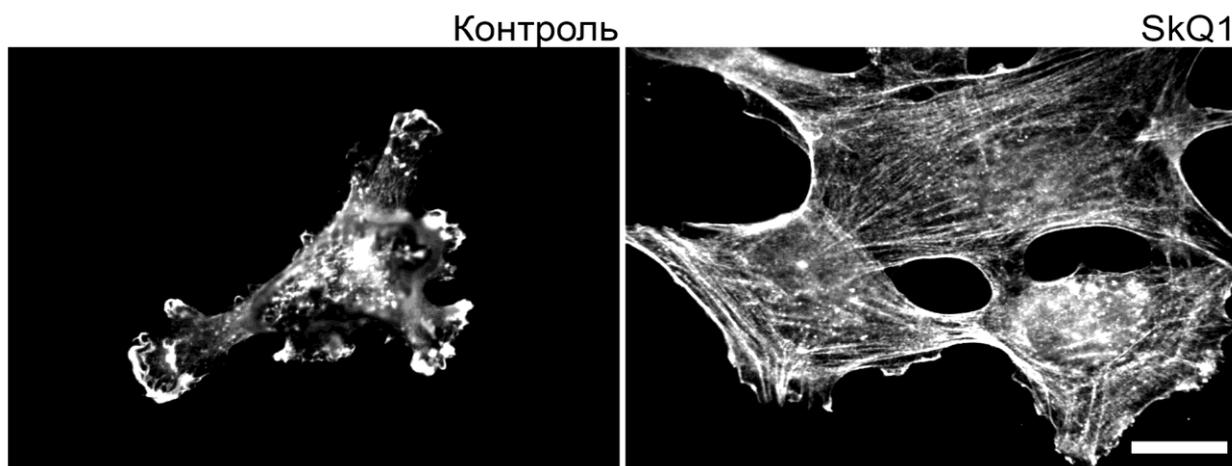
В контрольных клетках MRC5-V1 актиновый цитоскелет был представлен тонкими параллельными пучками, идущими вдоль длинной оси клетки (Рис. 20) При обработке MAO в течение 3-7 суток клетки увеличивались в размерах, пучки актина становились толще. На ведущем крае клеток выявлялась организованная сеть из тангенциальных и радиальных пучков актина. В периферических участках клетки несколько пучков могли соединяться в один. Клетки были более поляризованы, стабилизировался край (Рис. 20). Действие антиоксидантов NAC и тролокс было схоже с эффектом MAO, однако рабочие концентрации данных веществ были существенно выше и составляли 5 мМ и 100μМ, соответственно.



**Рисунок 20.** Изменение организации общего актина (фаллоидин) в клетках линии MRC5-V1 в присутствии MAO; 72 часа инкубации с SkQ1 (20нМ), SkQP (20нМ), SkQB (20нМ); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

В контрольных клетках линии MRC5-V2 преобладала диффузная локализация актина, небольшая часть актиновых микрофиламентов была организована в тонкие короткие ненаправленные пучки. По всему периметру клеток были видны участки с более интенсивной окраской. Клетки не были поляризованы, имели большое количество

раффлов. После инкубации с мАО клетки становились поляризованными, актин был организован в параллельные толстые пучки, идущие вдоль длинной оси клетки. Цитоплазма на выраженном ведущем крае в области ламеллы имела сеть из тангенциальных и радиальных пучков актина (Рис. 21).

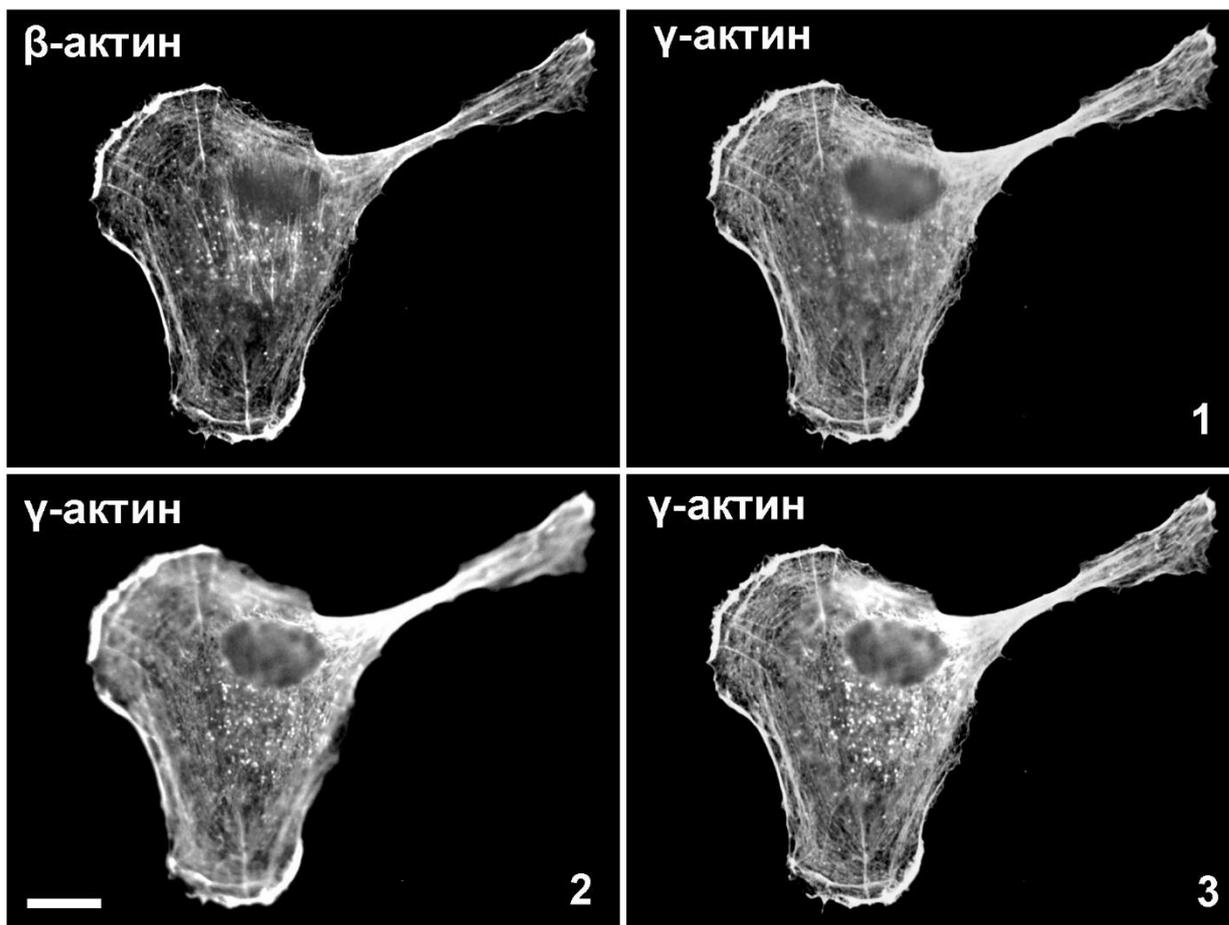


**Рисунок 21.** Изменение организации общего актина (фаллоидин) в клетках линии MRC5-V2 после инкубации с SkQ1 (20 нМ, 72 часа инкубации); конфокальная микроскопия, совмещенная проекция базального и кортикального уровней; масштаб 10 мкм.

#### **5.1.6. Влияние мАО на организацию актиновых структур из цитоплазматических изоформ актина в SV40-трансформированных фибробластах человека**

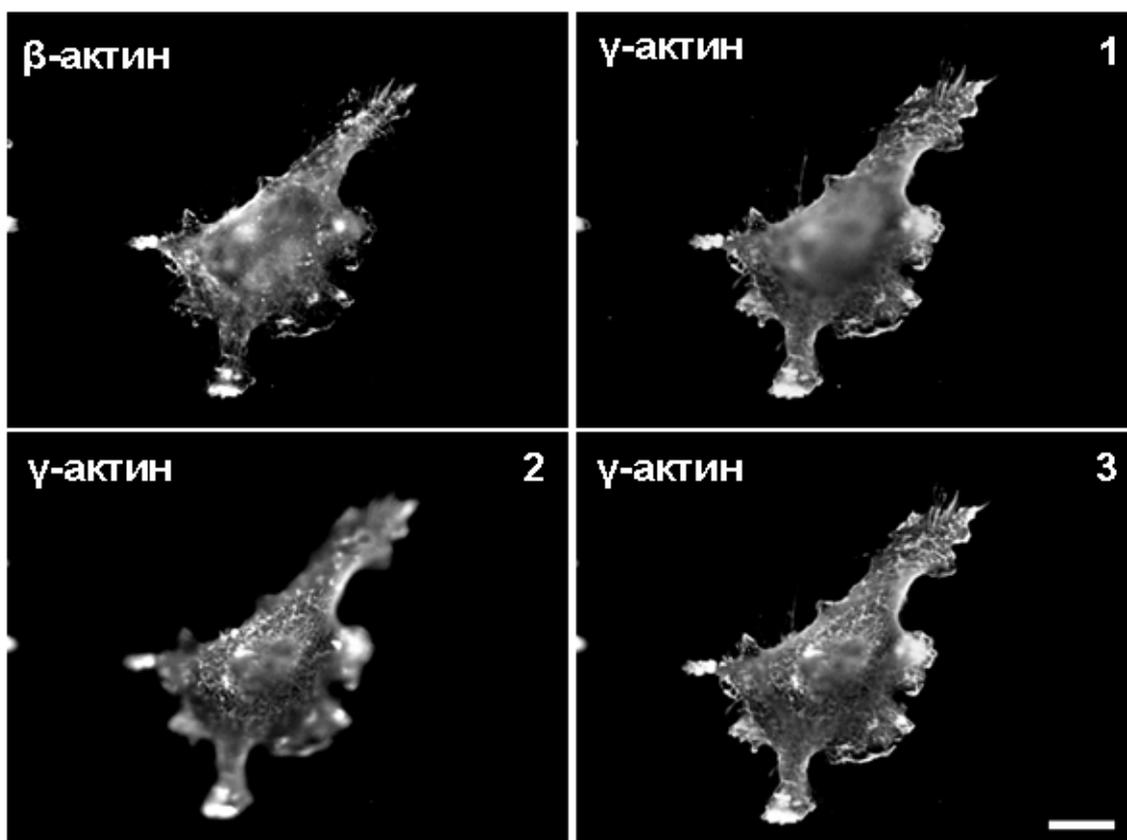
В связи с полученными данными об изменении распределения общего актина при трансформации и воздействии мАО семейства SkQ далее был проведен более подробный сравнительный анализ структур актиновых цитоскелетных систем с помощью выявления  $\gamma$ - и  $\beta$ -актина.

При анализе  $\beta$ -актиновой системы в клетках MRC5-V1 наблюдалась диффузная окраска цитоплазмы со слабо выраженной сетью тонких коротких пучков. Радиальные пучки были локализованы преимущественно в теле клетки, тонкие тангенциальные – в ламеллярных областях, выявлялись ярко окрашенные раффлы на ведущем крае.  $\gamma$ -актин был организован в виде развитой сети пучков в кортикальном слое клетки и ламеллиподиальных структурах, кортекс был ярко выражен. (Рис. 22).



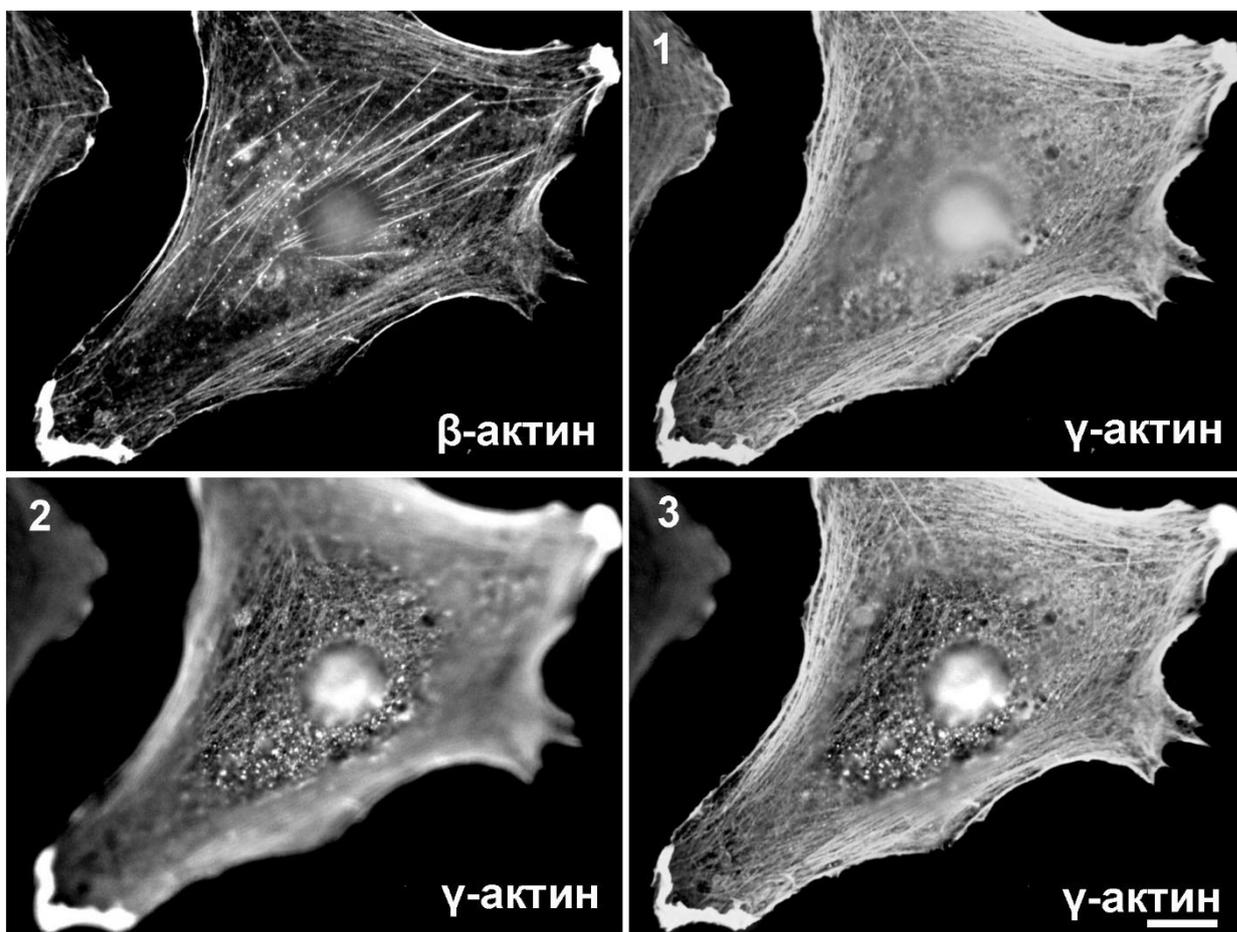
**Рисунок 22.** Организация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых систем в контрольных клетках линии MRC5-V1; 72 часа инкубации; 1,2 – различные уровни фокуса (вблизи субстрата и над ядром, соответственно), 3 – совмещенная проекция 1+2; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

При исследовании распределения  $\beta$ -актина в контрольных клетках MRC5-V2 была выявлена диффузная окраска цитоплазмы, практически не наблюдалось окрашивания  $\beta$ -актина в пучках. Встречались многочисленные ярко окрашенные раффлы.  $\gamma$ -актин частично был локализован диффузно в цитоплазме, и образовывал сеть тонких фибрилл в кортикальном слое клетки и ламелле, был ярко выражен кортекс (Рис. 23).



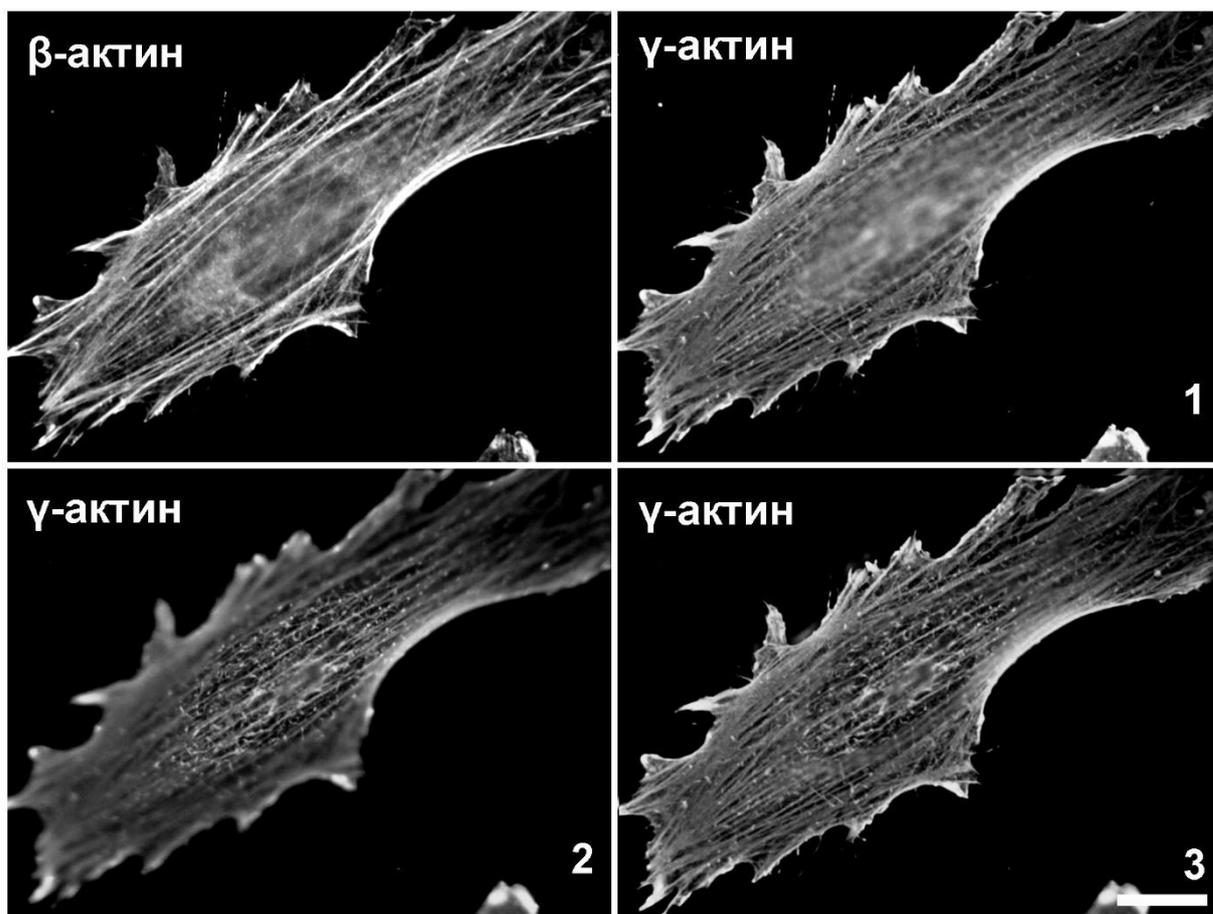
**Рисунок 23.** Организация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых систем в контрольных клетках линии MRC5-V2; 72 часа инкубации; 1, 2 – различные уровни фокуса (вблизи субстрата и над ядром, соответственно), 3 – совмещенная проекция 1+2; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

После инкубации с MAO в клетках линии MRC5-V1 выявлялись выраженные стресс-фибриллы  $\beta$ -актина, идущие преимущественно параллельно между собой, вдоль длинной оси клетки, а также параллельно стабильным краям клетки. Пучки могли пересекаться, на периферии несколько пучков могли сливаться в один. При выявлении  $\gamma$ -актина после инкубации с MAO в клетках появлялись радиальные и выраженные длинные, идущие через всю клетку тангенциальные пучки, образующие плотную развитую сеть. Единичные раффлы встречались редко, кортекс был слабо выражен (Рис. 24).



**Рисунок 24.** Реорганизация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых систем в клетках линии MRC5-V1 в присутствии SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации); 1,2 – различные уровни фокуса (вблизи субстрата и над ядром, соответственно), 3 – совмещенная проекция 1+2; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

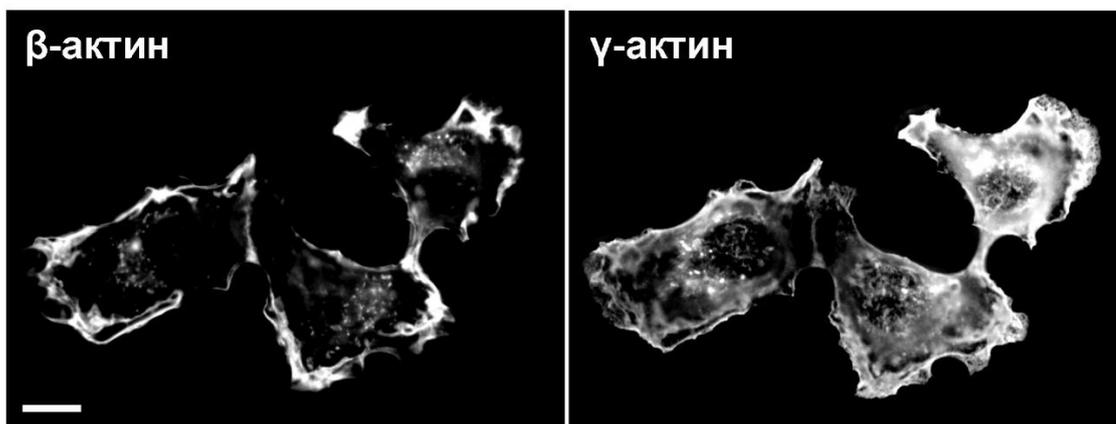
При инкубации с MAO в фибробластах линии MRC5-V2 появлялась четкая сеть тангенциальных и радиальных длинных фибрилл  $\gamma$ -актина. Выявлялась сеть толстых длинных стресс-фибрилл  $\beta$ -актина, идущих параллельно длинной оси клетки, вдоль стабильных краев клетки. Раффлы отсутствовали, или встречались в единичном количестве, кортекс был слабо выражен. (Рис. 25).



**Рисунок 25.** Реорганизация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых систем в клетках линии MRC5-V2 в присутствии SkQ1 (20 нМ, 72 часа инкубации); 1,2 – различные уровни фокуса (вблизи субстрата и над ядром, соответственно), 3 – совмещенная проекция 1+2; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

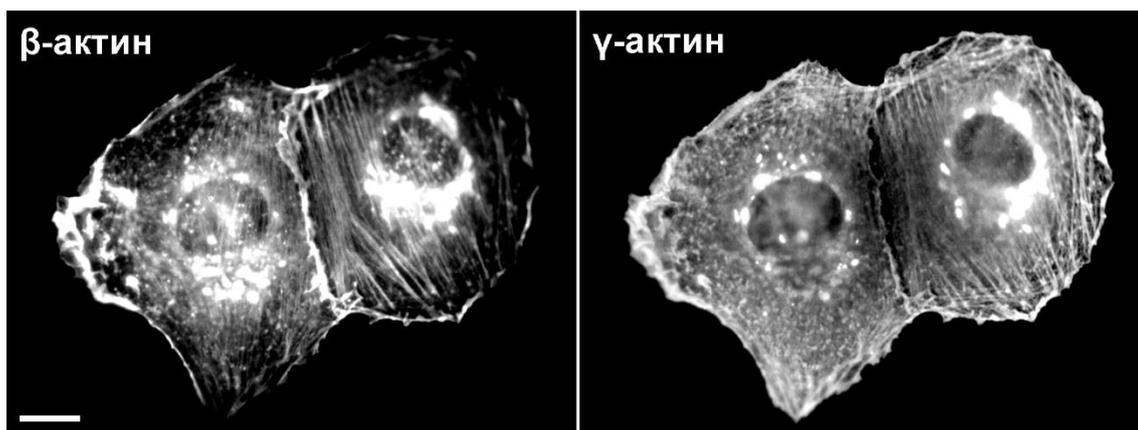
### **5.1.7. Влияние MAO на организацию актиновых структур из цитоплазматических изоформ актина в опухолевых фибробластах**

При анализе  $\beta$ -актиновой системы в клетках линии фибросаркомы человека HT1080 была выявлена слабая диффузная окраска цитоплазмы со значительно более выраженной окраской в области края практически по всей периферии клетки. Локализация  $\gamma$ -актина была также диффузна, на краю по периметру клеток окраска была более заметна, был ярко выражен кортекс. Не наблюдалось окрашивания  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в пучках. (Рис. 26).



**Рисунок 26.** Организация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых систем в контрольных клетках фибросаркомы HT1080; 72 часа инкубации;  $\gamma$ -актин - совмещенная проекция; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

Инкубация клеток фибросаркомы HT1080 с МАО вызывала аналогичные, но менее выраженные, чем в вирус-трансформированных сублиниях MRC-5, изменения организации  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина. При анализе распределения  $\beta$ -актина на фоне диффузной окраски цитоплазмы были выявлены яркие параллельно ориентированные пучки, более выраженная окраска цитоплазмы наблюдалась в области края клетки, в раффлах. На фоне диффузной окраски цитоплазмы при выявлении  $\gamma$ -актина была выявлена сеть длинных тангенциальных и радиальных пучков, края клеток в области раффлов были ярко окрашены (Рис. 27).



**Рисунок 27.** Реорганизация  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновых систем в клетках HT1080 в присутствии SkQR1 (20 нМ, 72 часа инкубации); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

Распределение  $\gamma$ -актиновой окраски на разных уровнях препарата, что было особенно выражено в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2, создавало проблемы фокусировки изображения при использовании обычного флуоресцентного микроскопа. Поэтому, для

более детального изучения организации  $\gamma$ -актинового цитоскелета, дополнительно использовалась лазерная сканирующая конфокальная микроскопия с исследованием серии оптических X/Y срезов, а также Z-срезов.

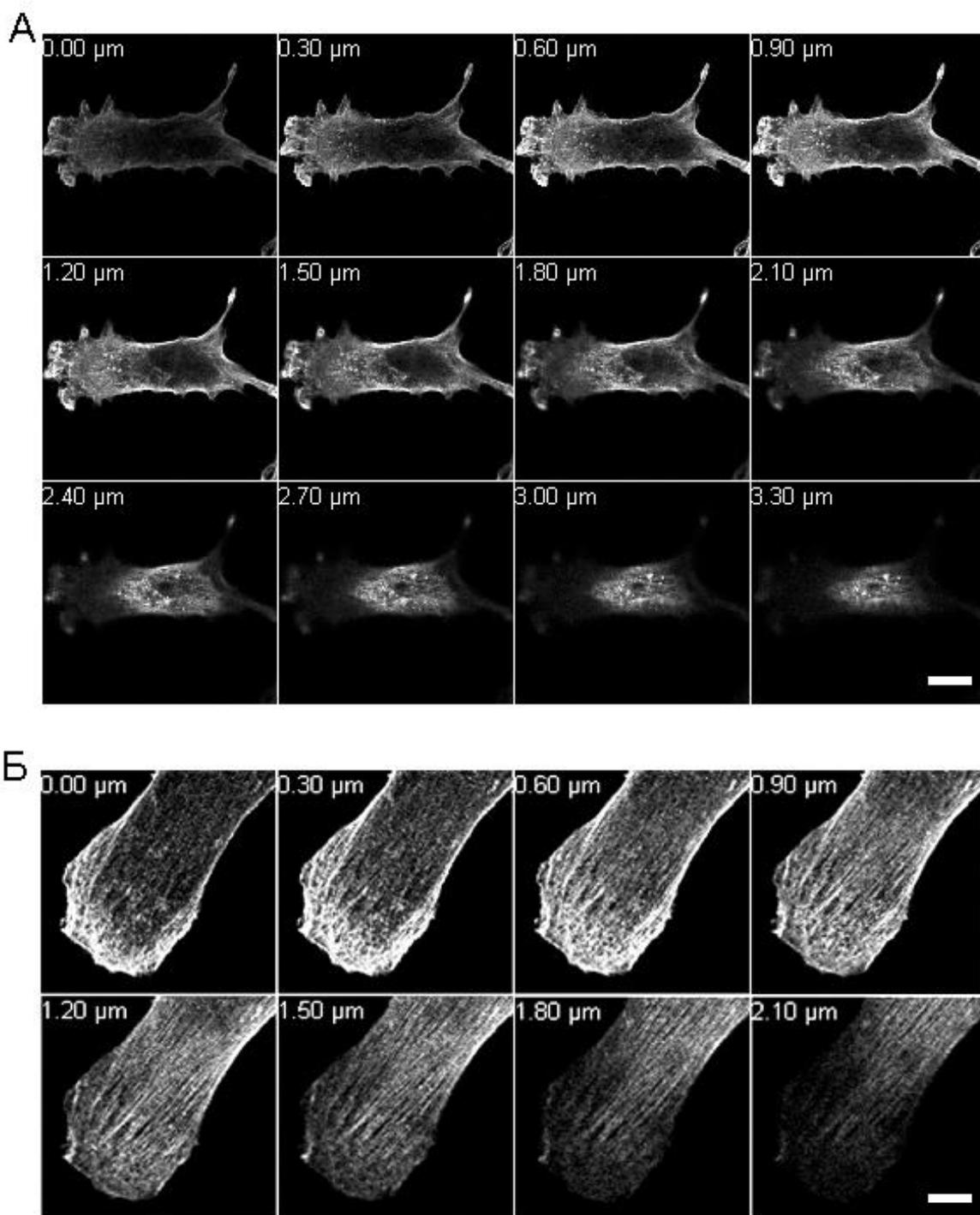
#### **5.1.8. Исследование влияния MAO на реорганизацию $\gamma$ -актиновой цитоскелетной системы в SV40-трансформированных фибробластах методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии**

При исследовании распределения  $\gamma$ -актиновой окраски в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2 с помощью метода конфокальной микроскопии были получены серии оптических x/y срезов. На Рис. 28 показаны результаты исследования для контрольных и обработанных MAO клеток MRC5-V1, в которых реорганизация  $\gamma$ -актиновой системы в присутствии MAO была наиболее выраженной. Видно, что в контрольных клетках  $\gamma$ -актин образует развитую сеть филаментов на базальном уровне в области ламеллы, а также развитую сеть в области ядра и дорзальной части клетки, формируя выраженные кортикальные структуры. После инкубации с MAO толщина распределения  $\gamma$ -актиновой окраски существенно уменьшается, клетки становятся более распластанными, кортикальные структуры становятся менее выражены.  $\gamma$ -актин в большей степени реорганизуется в толстую сеть тангенциальных и радиальных филаментов в области ведущего края и тела клетки.

При анализе распределения  $\gamma$ -актина также были получены серии оптических z-срезов. Ось прохождения z-срезов выбиралась в области ламеллярной цитоплазмы и проходила радиально от тела клетки к ее ведущему краю. На Рис. 29 представлены z-срезы контрольных и обработанных SkQ1 фибробластов. Поскольку  $\gamma$ -актиновая сеть локализуется в кортикальных областях, по полученным Z-срезам можно было судить о 3D-форме клеток, их поверхности, толщине кортикального слоя микрофиламентов. Видно, что контрольные клетки линии MRC5-V1 и MRC5-V2 были плохо распластаны, интенсивность окраски была равномерна в области всей клеточной поверхности. После инкубации с MAO профиль клеток уплощался, т.е. клетки становились более распластаны. Интенсивность флуоресценции была значительно слабее, чем в контрольных клетках, и увеличивалась лишь в области ламеллоподии, на ведущем крае клетки, что было характерно для Z-среза нормальных фибробластов линии MRC-5 (Рис. 29).

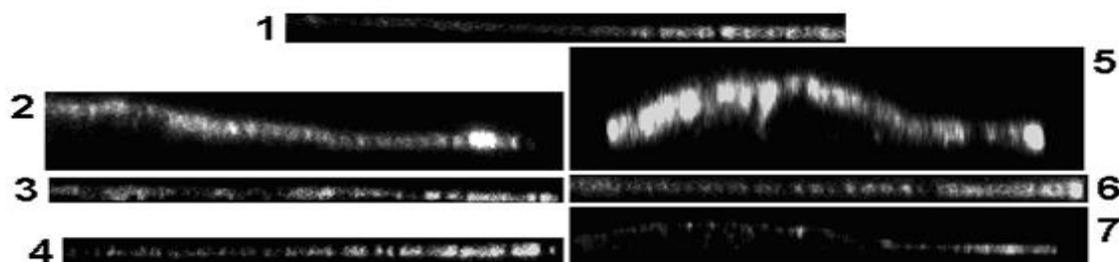
С помощью программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser была измерена сравнительная толщина  $\gamma$ -актинового кортекса в области ламеллы и над клеточным ядром клеток. Эта величина уменьшалась для клеток линии MRC5-V1 и MRC5-V2, обработанных SkQ1 (20 нМ, 72 часа инкубации), по сравнению с контрольными

культурами. Также была измерена сравнительная ширина клеточной ламеллы. Для клеток линии MRC5-V1 и MRC5-V2 эта величина увеличивалась после инкубации SkQ1 (20 нМ, 72 часа инкубации) (Рис. 30). Для нормальных клеток MRC5 подобных изменений в размерах ламеллы и толщине кортикального слоя в этой области в присутствии MAO выявлено не было.



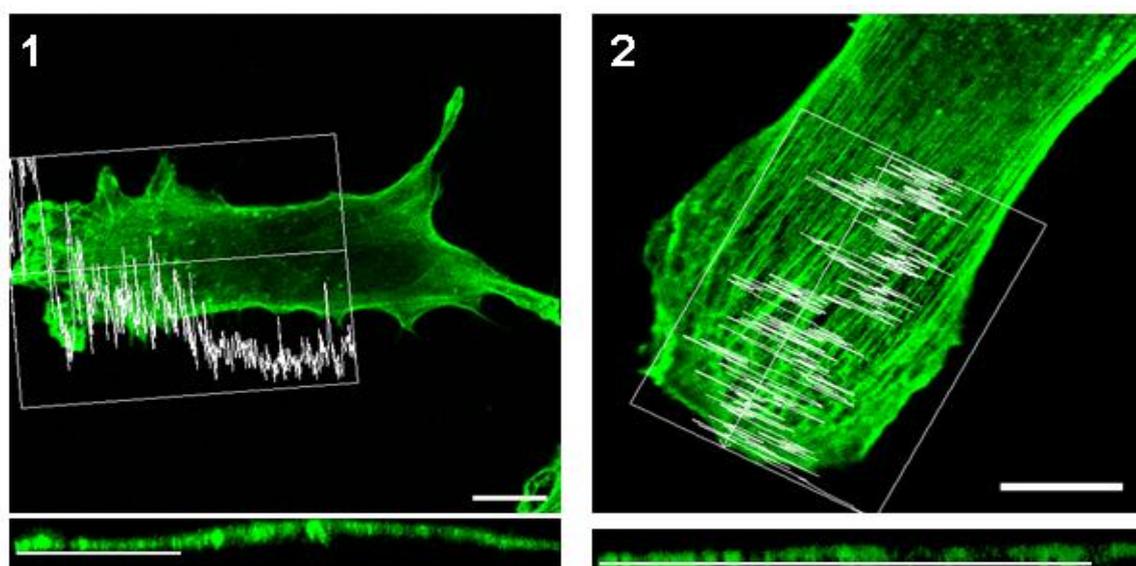
**Рисунок 28.** Изменение организации  $\gamma$ -актиновой системы в трансформированных фибробластах в присутствии MAO; серии последовательных x/y оптических срезов с шагом 0,3 мкм, от базальной к дорзальной области клетки; а – MRC5-V1, контроль; б -

MRC5-V1, SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации); лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; масштаб 10 мкм.



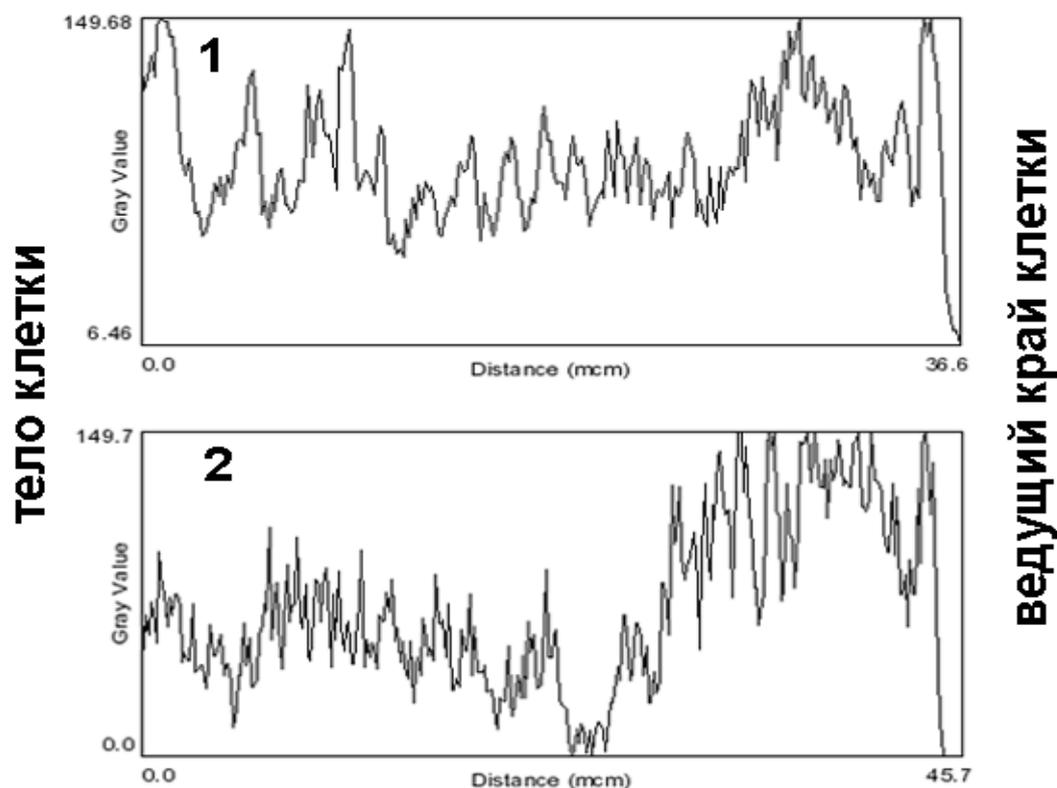
**Рисунок 29.** Влияние МАО на изменение профиля одиночных оптических z-срезов клеток MRC5-V1 и MRC5-V2 при выявлении  $\gamma$ -актина;

1 - MRC5 (контроль, 72 часа инкубации), 2 - MRC5-V1 (контроль, 72 часа инкубации), 3 - MRC5-V1 (SkQ1 20нМ, 72 часа инкубации), 4 - MRC5-V1 (SkQ1 20нМ, 7 сут. инкубации), 5 - MRC5-V2 (контроль, 72 часа инкубации), 6 - MRC5-V2 (SkQ1 20нМ, 72 часа инкубации), 7 - MRC5-V4 (SkQ1 20нМ, 7сут. инкубации); лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.



**Рисунок 30.** Влияние МАО на реорганизацию  $\gamma$ -актиновой сети в ламеллярной области клеток линии MRC5-V1; 1 – контроль, 72 часа инкубации; 2 – SkQ1 20нМ, 72 часа инкубации; сверху – область ламеллы, где показана белая линия с графиком интенсивности флуоресценции по данной оси, по которой получали серию оптических z-срезов; снизу – одиночные z-срезы клеток и измерение ширины ламеллы – белая черта соответствует ширине ламеллярной цитоплазмы; лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; масштаб 10 мкм.

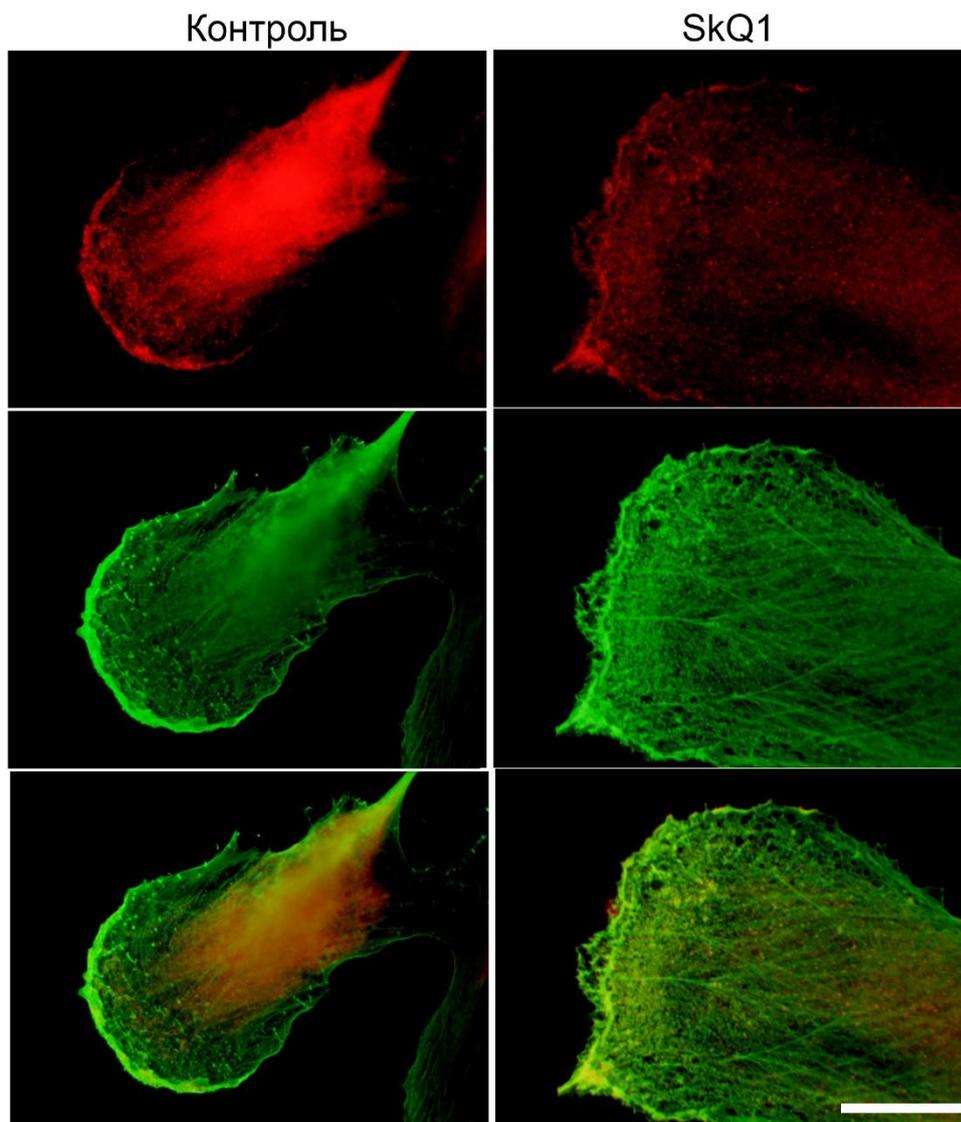
На Рис. 31 представлены графики интенсивности флуоресценции по оси прохождения z-срезов в области ламеллярной цитоплазмы, по направлению от тела клетки к ведущему краю. Отмечалось уменьшение среднего уровня интенсивности флуоресценции после инкубации клеток с МАО. Интенсивная флуоресценция после инкубации с SkQ1 сохранялась лишь на ведущем крае.



**Рисунок 31.** Влияние МАО на интенсивность флуоресценции на ведущем крае клетки при выявлении  $\gamma$ -актина в линии MRC5-V1; 1 – контроль; 2 – SkQ1 20 нМ, 72 часа инкубации; данные получены при обработке одиночных z-срезов с помощью программы Zeiss LSM Image Browser.

### 5.1.9. Влияние МАО на локализацию актин-связывающих белков в SV40-трансформированных фибробластах

При исследовании распределения белка p34 комплекса Agr2/3 в нормальных фибробластах кожи выявлялась слабая диффузная окраска цитоплазмы и обогащение края в области ламеллы. Инкубация с SkQ1 не вызывала видимых изменений в распределении белка (Рис. 32).

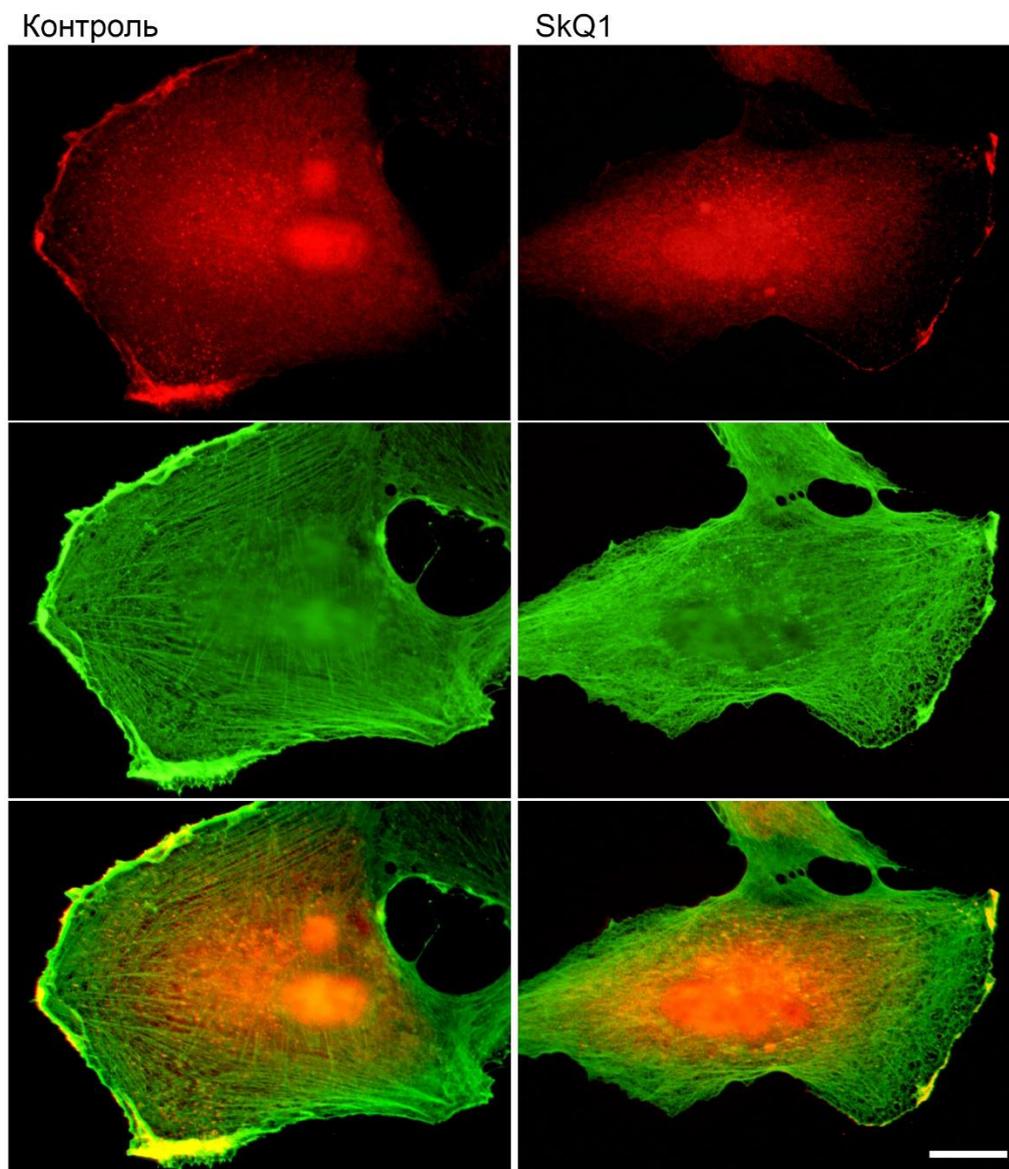


**Рисунок 32.** Влияние MAO на распределение белка p34 комплекса Agr2/3 в нормальных фибробластах HSCF (20 нМ SkQ1, 72 часа инкубации); зеленый –  $\gamma$ -актин, красный – p34; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

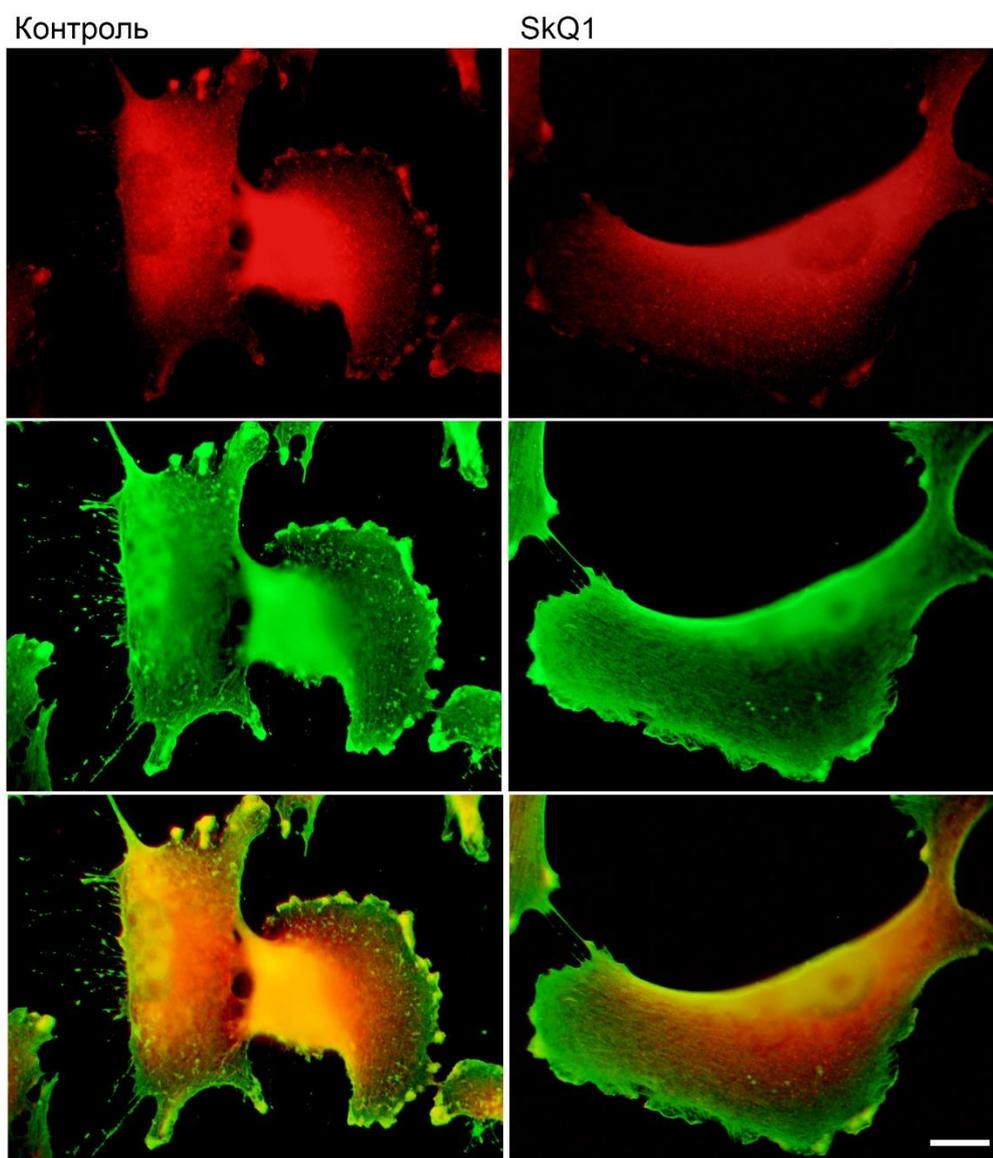
При исследовании распределения p34 в контрольных клетках линии MRC5-V1 выявлялось диффузное окрашивание цитоплазмы и яркая флуоресценция на протяженных активных краях клетки (Рис. 33). В контрольных клетках линии MRC5-V2 также наблюдалось обильное диффузное распределение белка в цитоплазме и яркое окрашивание многочисленных активных участков края (Рис. 34).

При выявлении белка p34 в клетках MRC5-V1 в присутствии MAO, на фоне диффузного окрашивания цитоплазмы выявлялась менее обогащенная по сравнению с контролем окраска на одном выраженном ведущем крае поляризованных клеток (Рис. 33). В клетках MRC5-V2 при инкубации с MAO также уменьшалось число краевых участков цитоплазмы, обогащенной белком p34, выраженная флуоресценция присутствовала

только в области активного ведущего (одного или нескольких) края клетки, диффузная окраска цитоплазмы сохранялась (Рис. 34). Аналогичное распределение p34 наблюдалось в контрольных фибробластах линии MRC-5 и HSCF.

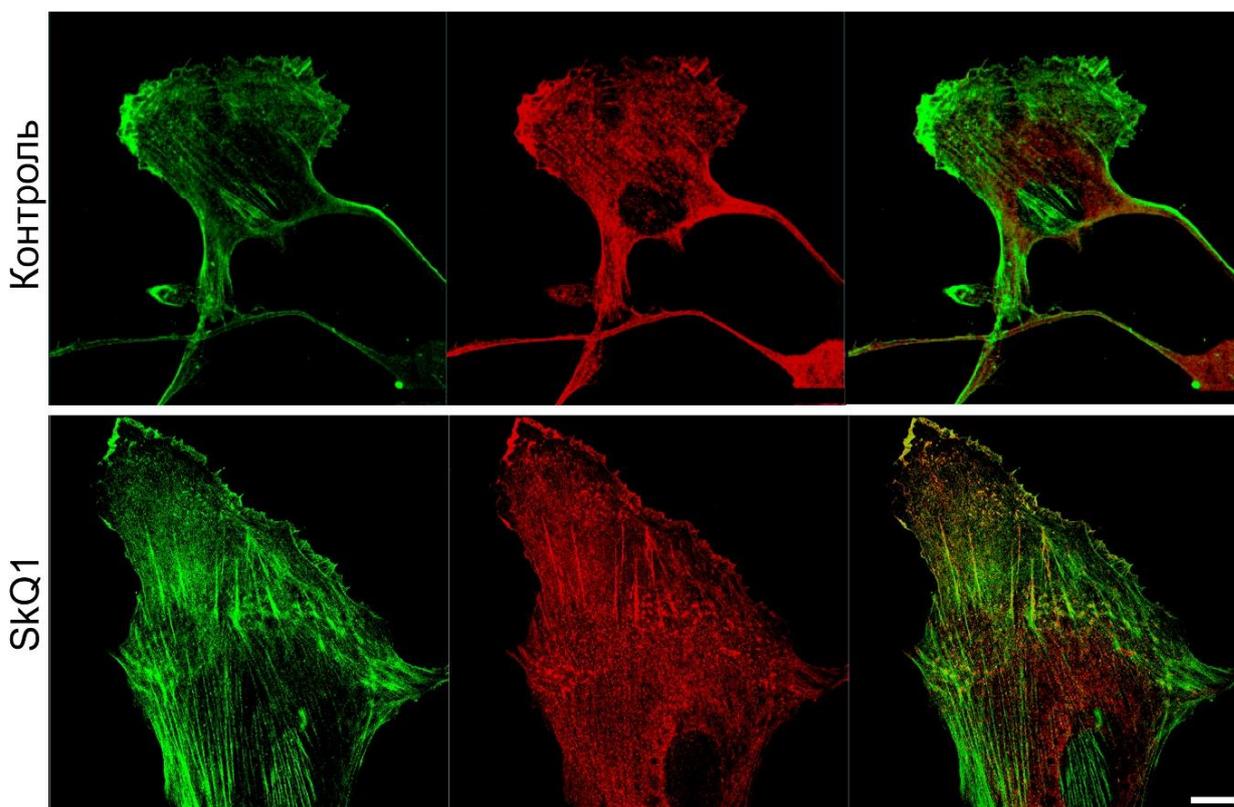


**Рисунок 33.** Влияние MAO на распределение белка p34 комплекса Atp2/3 в клетках MRC5-V1 (20 нМ SkQ1, 72 часа инкубации); зеленый –  $\gamma$ -актин, красный – p34; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.



**Рисунок 34.** Влияние MAO на распределение белка p34 комплекса Arp2/3 в клетках MRC5-V2 (20 нМ SkQ1, 72 часа инкубации); зеленый –  $\gamma$ -актин, красный – p34; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

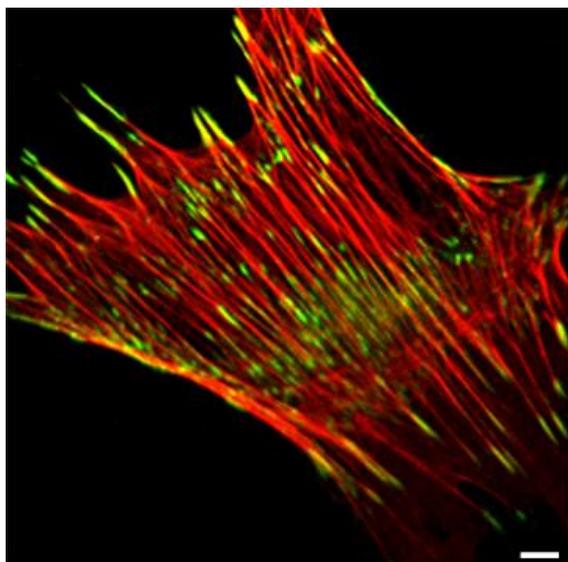
При анализе распределения белка  $\alpha$ -актинина-1 в клетках линий MRC5-V1 и MRC5-V2 для обеих культур было показано диффузное окрашивание цитоплазмы. В присутствии MAO (SkQ1 20нМ, 72 часа инкубации) в клетках появлялась интенсивная окраска концевых участков микрофиламентов на краях и в теле клетки. Данные изменения были более выражены в клетках MRC5-V1 (Рис 35).



**Рисунок 35.** Влияние MAO на распределение белка  $\alpha$ -актинина-1 в клетках MRC5-V1 (20 нМ SkQ1, 72 часа инкубации); зеленый –  $\beta$ -актин, красный –  $\alpha$ -актинин-1; конфокальная микроскопия; масштаб 10мкм.

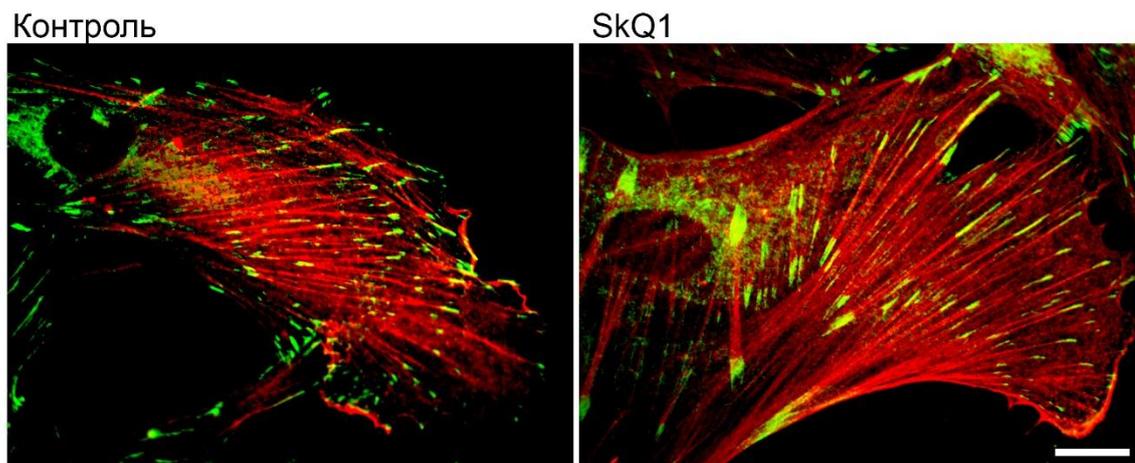
#### 5.1.10. Влияние MAO на систему фокальных контактов в SV40-трансформированных фибробластах

Нашей целью было выявить в исследуемых клетках ФК разной степени зрелости, поэтому для их выявления использовалось иммунофлуоресцентное окрашивание на паксиллин – белок, присутствующий как в незрелых, так и в крупных зрелых адгезионных структурах. Данная окраска выявила в контрольных клетках MRC-5 крупные длинные ФК, характерные для нормальных фибробластов. Контакты преимущественно располагались на краю клетки, на концах стресс-фибрилл, что выявлялось при двойном окрашивании на паксиллин и актин (Рис. 36).



**Рисунок 36.** Система фокальных контактов в контрольной культуре MRC5, 72 часа инкубации; зеленый - паксиллин, красный - актин (фаллоидин); конфокальная микроскопия; масштаб 10мкм.

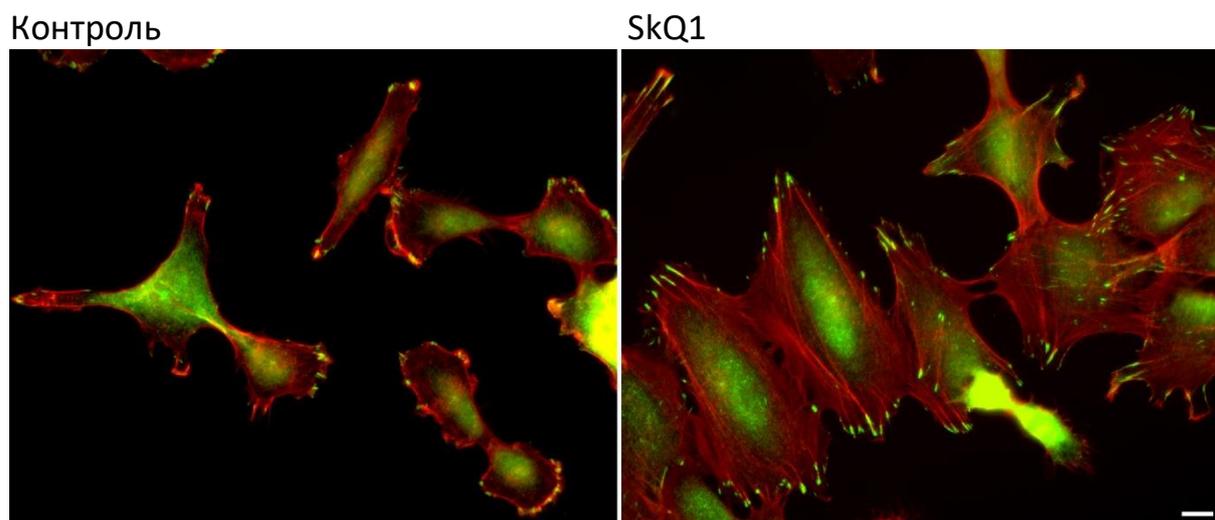
В контрольной культуре фибробластов кожи также наблюдалась популяция зрелых длинных ФК, однако она была выражена в меньшей степени по сравнению с клетками MRC5. В присутствии МАО клетки HSCF занимали большую площадь на субстрате, актин формировал длинные стресс-фибриллы, на концах которых располагались зрелые ФК, характерные для миофибробластов линии MRC5 (Рис. 37).



**Рисунок 37.** Влияние SkQ1 на систему фокальных контактов нормальных фибробластов HSCF (SkQ1 20нМ, 72 часа инкубации); зеленый - паксиллин, красный – общий актин (фаллоидин); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

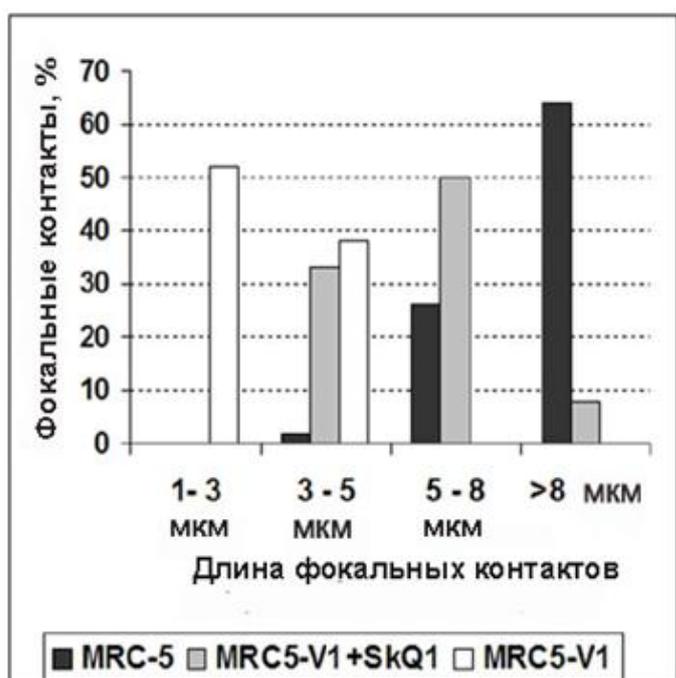
В трансформированных фибробластах MRC5-V1 выявлялись короткие, средней толщины ФК, преимущественно расположенные на краю клетки. Большинство ФК клетках MRC5-V2 были точечные или крайне короткие, тонкие, располагались параллельными «штрихами». При инкубации с МАО в клетках обеих культур ФК становились толще, длиннее, располагались на ведущем крае поляризованной клетки.

Более выраженные изменения организации ФК наблюдались в клетках линии MRC5-V1 (Рис. 38).



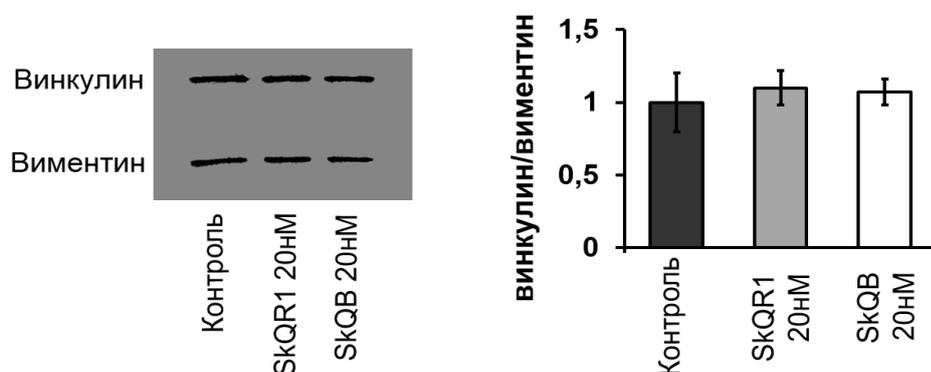
**Рисунок 38.** Влияние MAO на систему фокальных контактов в культуре MRC5-V1. Выге,fbwz с SkQ1 (20 нМ, 72 часа инкубации); зеленый - паксиллин, красный - актин (фаллоидин); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

Количественные морфометрические данные подтвердили изменение длины ФК, полученные с помощью выявления паксиллина, после инкубации с SkQ1 в культуре MRC5-V1. Так как паксиллин присутствует и в молодых, и в зрелых адгезионных структурах, мы исследовали изменения числа ФК разной степени зрелости. В присутствии MAO средняя длина одиночного ФК увеличивалась примерно вдвое (Рис. 39)



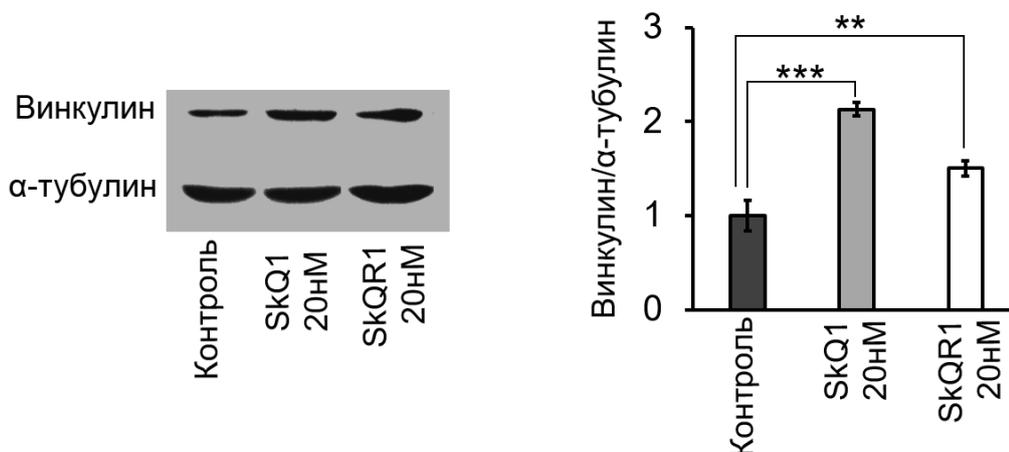
**Рисунок 39.** Влияние MAO на распределение фокальных контактов по длине в культуре клеток MRC5-V1 (SkQ1 20 нМ, 7 сут. инкубации) по сравнению с контрольными миофибробластами MRC5; данные морфометрии.

С помощью метода белкового иммуноблоттинга было исследовано влияние мАО на относительное содержание винкулина, белка зрелых фокальных контактов, в нормальных фибробластах линии MRC-5 и трансформированной линии клеток MRC5-V1. Было показано, что инкубация с SkQR1 и SkQB клеток линии MRC-5 не вызывает изменения содержания винкулина в лизатах тотального клеточного белка (Рис. 40).



**Рисунок 40.** Влияние мАО (7 суток инкубации) на содержание винкулина в клетках культуры MRC5. Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по виментину. Показаны среднее и стандартная ошибка среднего, различие между значениями согласно критерию Манна-Уитни статистически не значимо; 3 независимых эксперимента.

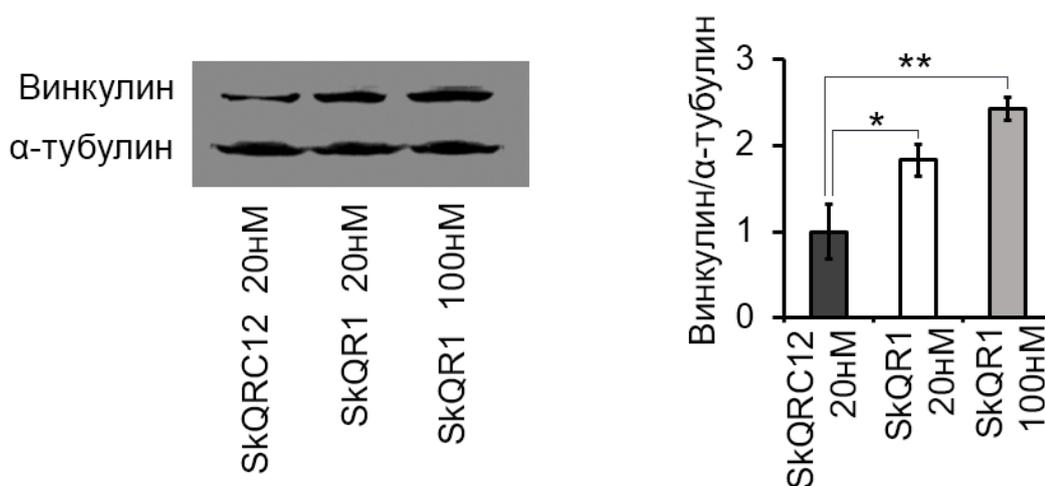
При этом в лизатах линии MRC5-V1 были выявлены существенные изменения. По данным иммуноблоттинга и денситометрии уровень экспрессии винкулина в клетках линии MRC5-V1 после инкубации с производными SkQ1 увеличивался в 1,5 – 2,5 раза (Рис. 41).



**Рисунок 41.** Влияние мАО (5 суток инкубации) на содержание винкулина в клетках культуры MRC5-V1. Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по α-тубулину. Показаны среднее и стандартная ошибка среднего;

значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно критерию Манна-Уитни; 3 независимых эксперимента.

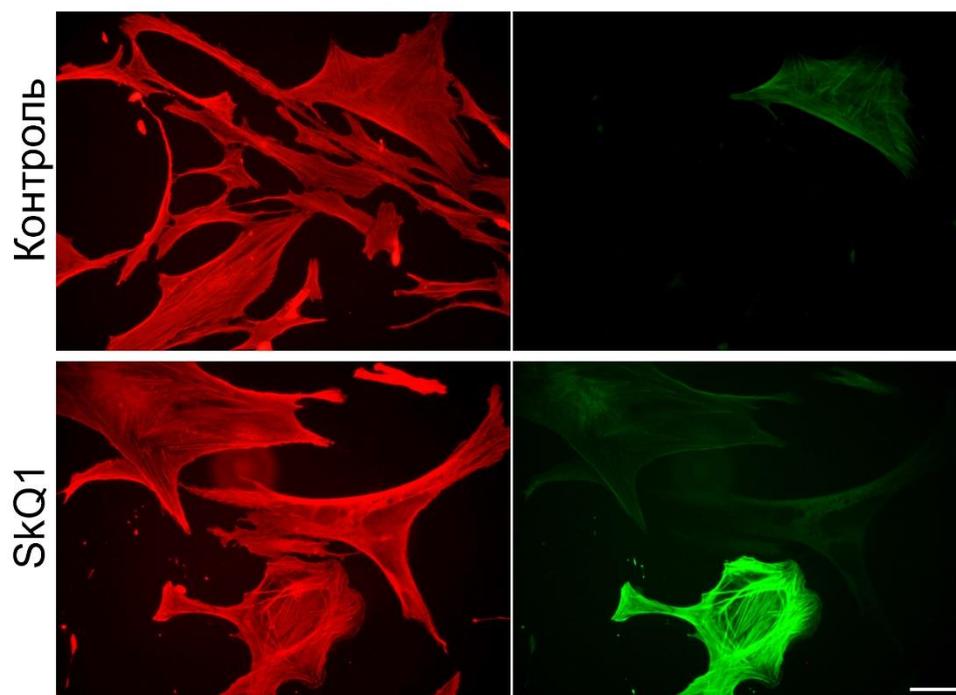
Также было показано, что увеличение рабочей концентрации антиоксиданта (до 100 нМ) не оказывало на клетки MRC5-V1 прооксидантного эффекта, не препятствовало улучшению фокальных контактов, а, напротив, индуцировало дальнейшее повышение уровня содержания винкулина в клетках (Рис. 42). В качестве контрольной молекулы при этом использовалась производная SkQR1 - SkQRC12 (не содержит остатка пластохиона, отвечающего за антиоксидантную активность).



**Рисунок 42.** Влияние MAO (7 суток инкубации) на содержание винкулина в клетках культуры MRC5-V1 в присутствии различных концентраций вещества. Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по α-тубулину. Показаны среднее и стандартная ошибка среднего; значимые различия: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  согласно критерию Манна-Уитни; 3 независимых эксперимента.

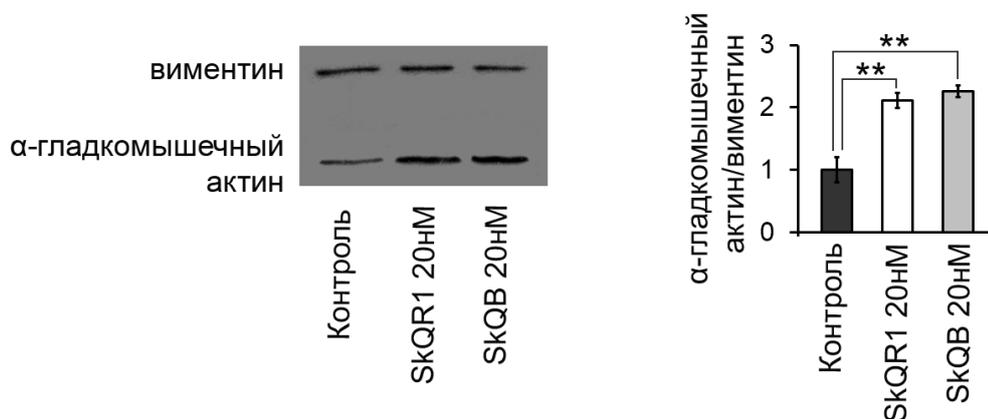
#### 5.1.11. Влияние MAO на организацию α-гладкомышечного актина в SV40-трансформированных фибробластах

В культурах нормальных фибробластов, таких как клетки HSCF, как правило присутствует небольшой процент миофибробластоподобных клеток, содержащих α-гладкомышечный актин (Dugina et al., 1998, Hinz et al., 2002; Hinz et al., 2003). Инкубация с MAO приводит к появлению большего количества клеток в культуре, позитивных на данный маркер миофибробластной дифференцировки (Рис. 43).



**Рисунок 43.** Влияние MAO на распределение  $\alpha$ -гладкомышечного актина в культуре фибробластов кожи HSCF (20 нМ SkQ1, 72 часа инкубации); красный – актин (фаллоидин), зеленый –  $\alpha$ -гладкомышечный актин; флуоресцентная микроскопия; масштаб 20 мкм.

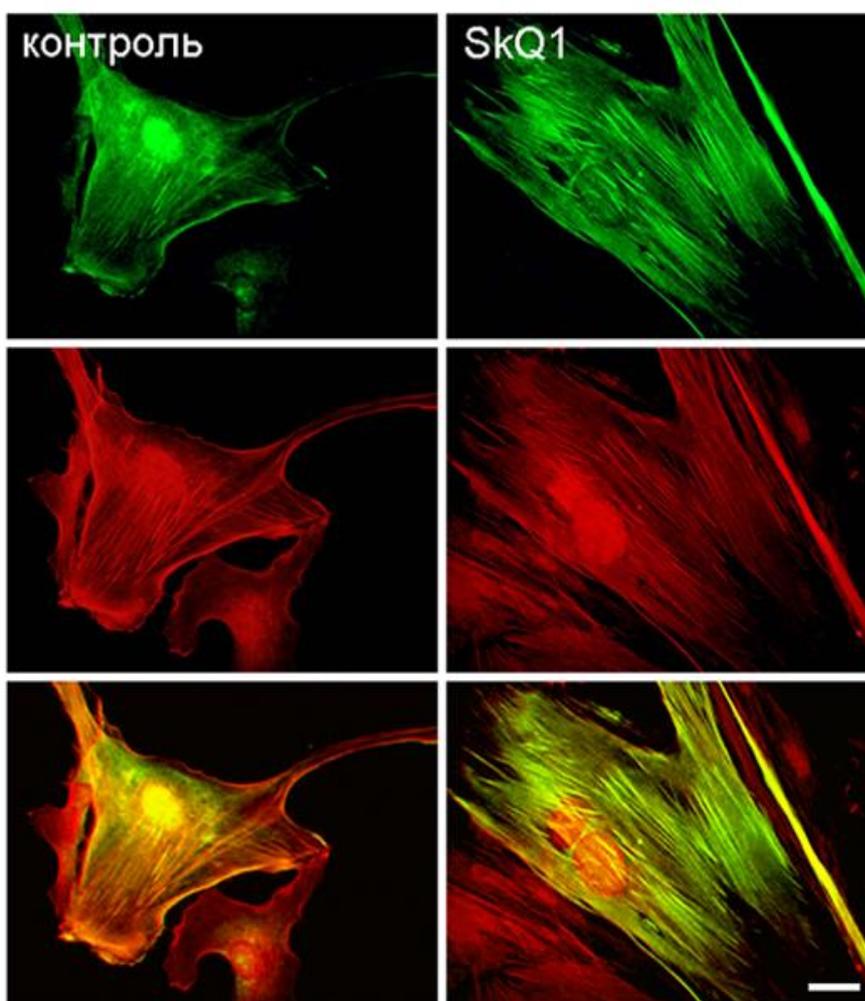
В клетках HSCF с помощью иммуноблоттинга было исследовано содержание  $\alpha$ -гладкомышечного актина. Было показано, что MAO вдвое увеличивают количество данного белка на седьмые сутки инкубации (Рис. 44)



**Рисунок 44.** Влияние MAO (7 суток инкубации) на содержание  $\alpha$ -гладкомышечного актина в клетках культуры HSCF. Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по виментину. Среднее и стандартная ошибка

среднего; значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$  согласно критерию Манна-Уитни; 3 независимых эксперимента.

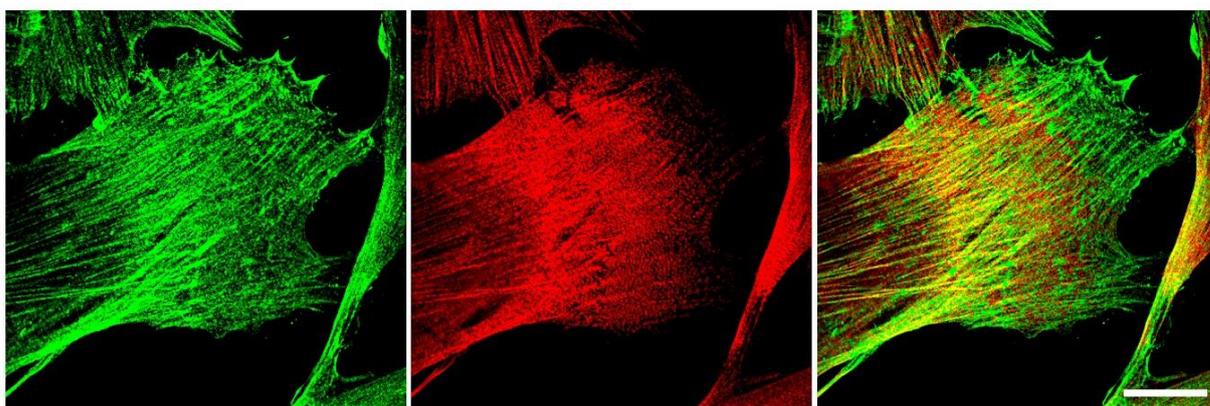
При иммунофлуоресцентном анализе контрольных клеток культуры MRC5-V1,  $\alpha$ -гладкомышечный актин был распределен в цитоплазме преимущественно диффузно. В присутствии SkQ1 (20 нМ, 72 часа инкубации) отмечалась реорганизация гладкомышечного актина в длинные пучки, идущие вдоль тела клетки, колокализация этой изоформы актина с  $\beta$ -актиновыми пучками (Рис. 45). При этом в клетках культуры MRC5-V2 таких изменений не наблюдалось,  $\alpha$ -гладкомышечный актин обнаруживался в цитоплазме и был распределен преимущественно диффузно как в контрольных клетках, так и в присутствии MAO.



**Рисунок 45.** Влияние MAO на организацию  $\alpha$ -гладкомышечного актина в клетках MRC5-V1; SkQ 20нМ, 72 часа инкубации; зеленый -  $\alpha$ -гладкомышечный актин; красный –  $\beta$ -актин; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

### 5.1.12. Влияние мАО на организацию немышечного миозина II в SV40-трансформированных фибробластах

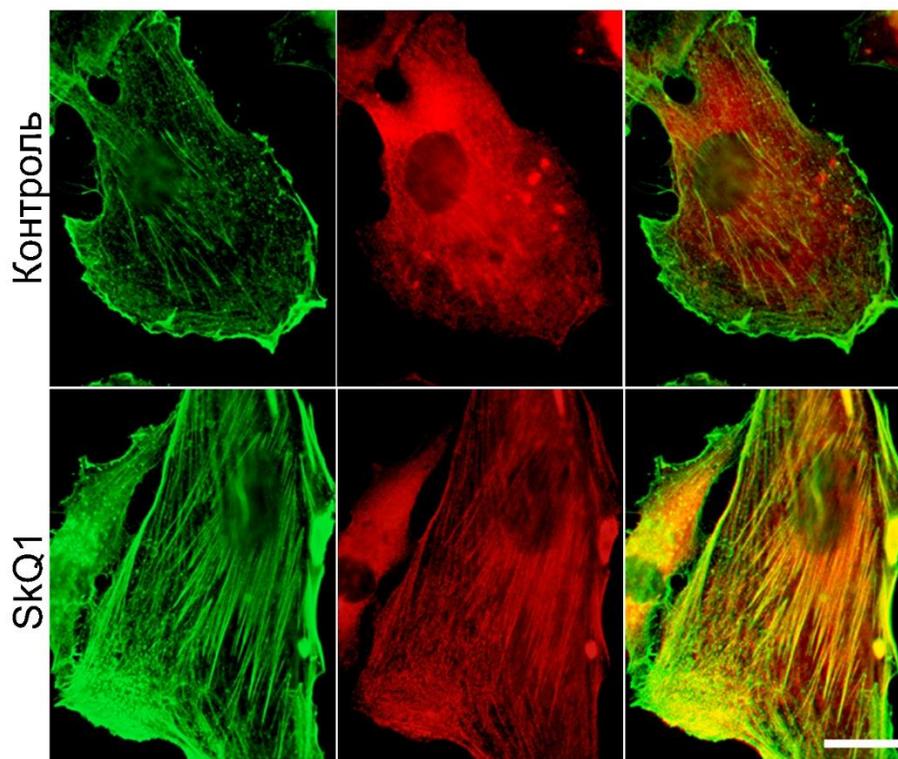
При выявлении  $\beta$ -актина и немышечного миозина II в нормальных фибробластах линии HSCF (Рис. 46) и миофибробластах MRC-5 мы наблюдали организацию этих белков в пучках. Окрашивались характерные толстые пучки, идущие вдоль стабильного края клетки, параллельно длинной оси клетки. Была выявлена колокализация пучков  $\beta$ -актина и немышечного миозина II. Инкубация с мАО не приводила к заметным изменениям в распределении миозина II, также наблюдалась колокализация с пучками  $\beta$ -актина



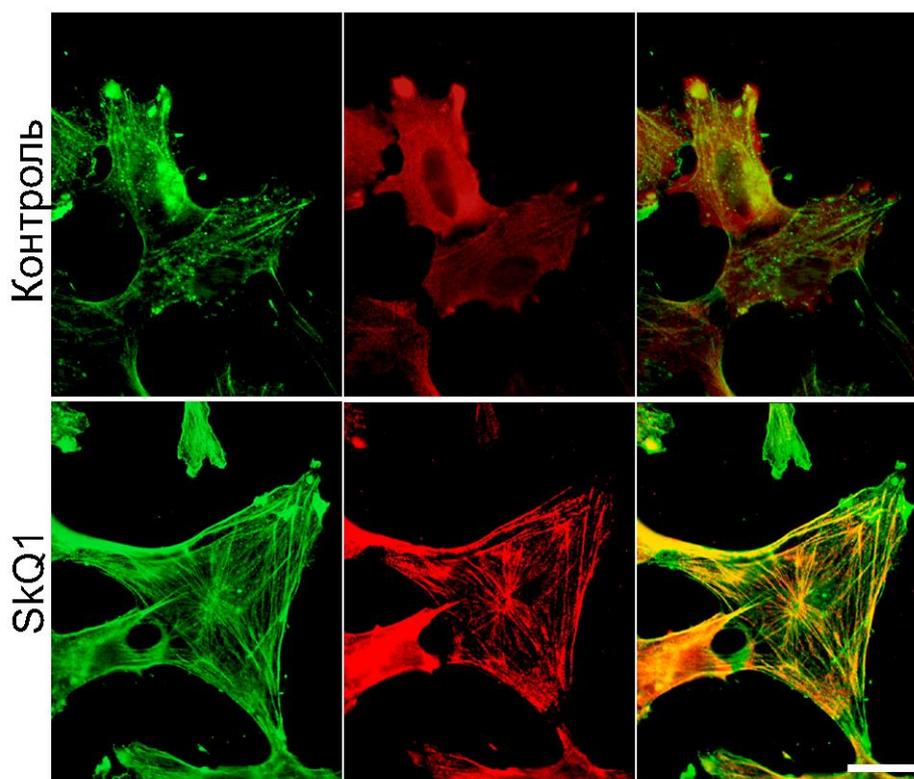
**Рисунок 46.** Организации  $\beta$ -актина и немышечного миозина II в нормальных фибробластах кожи HSCF (72 часа инкубации); зеленый -  $\beta$ -актин, красный - миозин II; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

При выявлении  $\beta$ -актина в контрольных клетках MRC5-V1 окраска цитоплазмы была диффузной с небольшим количеством тонких пучков в теле клетки, немышечный миозин II был локализован преимущественно диффузно. В присутствии SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации) выявлялись толстые длинные пучки  $\beta$ -актина, содержащие немышечный миозин II. Пучки были ориентированы параллельно друг другу, вдоль длинной оси клетки и частично перпендикулярно ей. В периферических участках клетки несколько пучков могли соединяться в один. Была выявлена колокализация пучков  $\beta$ -актина и немышечного миозина II (Рис. 47).

При выявлении  $\beta$ -актина и немышечного миозина II в контрольных клетках MRC5-V2 преобладала диффузная окраска цитоплазмы, встречались редкие тонкие пучки. После инкубации с антиоксидантом выявлялись длинные пучки  $\beta$ -актина, идущие параллельно стабильным краям клетки. Пучки содержали немышечный миозин II (Рис. 48).



**Рисунок 47.** Изменение организации  $\beta$ -актина и немышечного миозина II в клетках линии MRC5-V1 в присутствии SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации); зеленый -  $\beta$ -актин, красный - миозин II; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.



**Рисунок 48.** Изменение организации  $\beta$ -актина и немышечного миозина II в клетках линии MRC5-V2 в присутствии SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации); зеленый -  $\beta$ -актин, красный - миозин II; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

Реорганизация актинового цитоскелета является критически необходимым фактором в процессе клеточного деления. В ряде исследований показана роль в этом процессе взаимодействия различных актиновых систем с микротрубочками (Kunda and Baum, 2009; Plessner et al., 2019).  $\beta$ - и  $\gamma$ -актиновые структуры пространственно разделены на протяжении всего периода клеточного деления и выполняют различные функции. Показано, что уменьшение количества  $\gamma$ -актина в делящихся клетках приводит к нарушению веретена деления, а подавление полимеризации тубулина вызывает нарушение  $\beta$ -актиновой системы (Шагиева и др., 2020). Наблюдаемые нами в ходе исследования изменения в распределении изоформ актина в трансформированных клетках в присутствии МАО позволили сделать предположение о том, что воздействие веществ семейства SkQ1 может через реорганизацию актинового цитоскелета влиять на динамику клеточного цикла и митоза в исследуемых нами культурах.

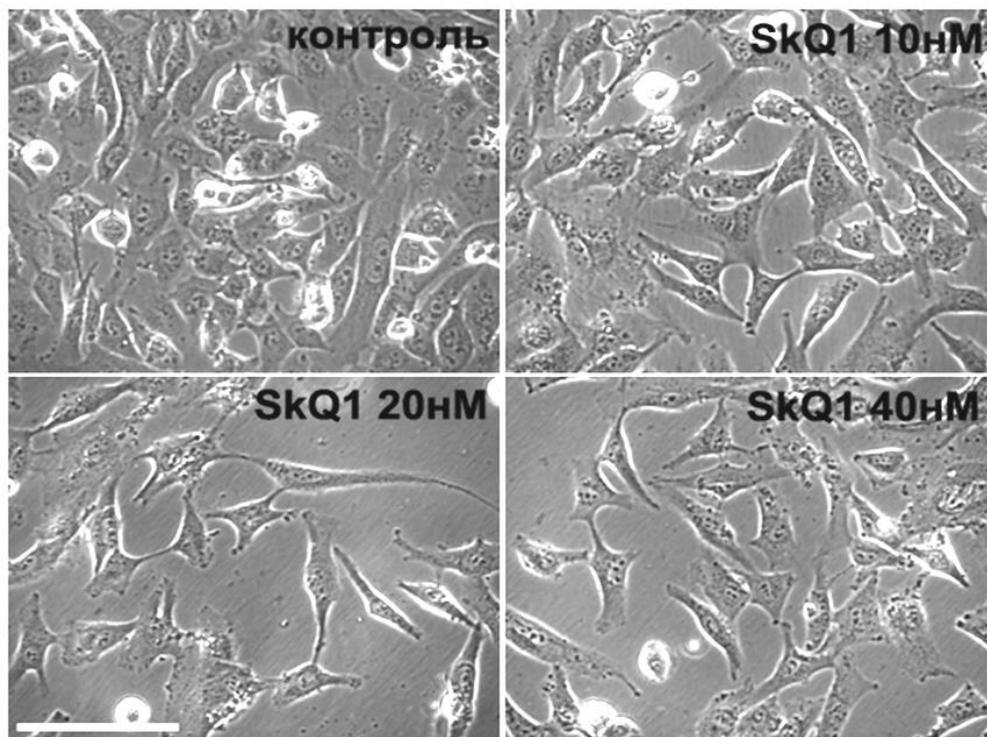
## **5.2. Действие МАО на рост и динамику клеточного цикла SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов**

### **5.2.1. Действие антиоксидантов на рост SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов в культуре**

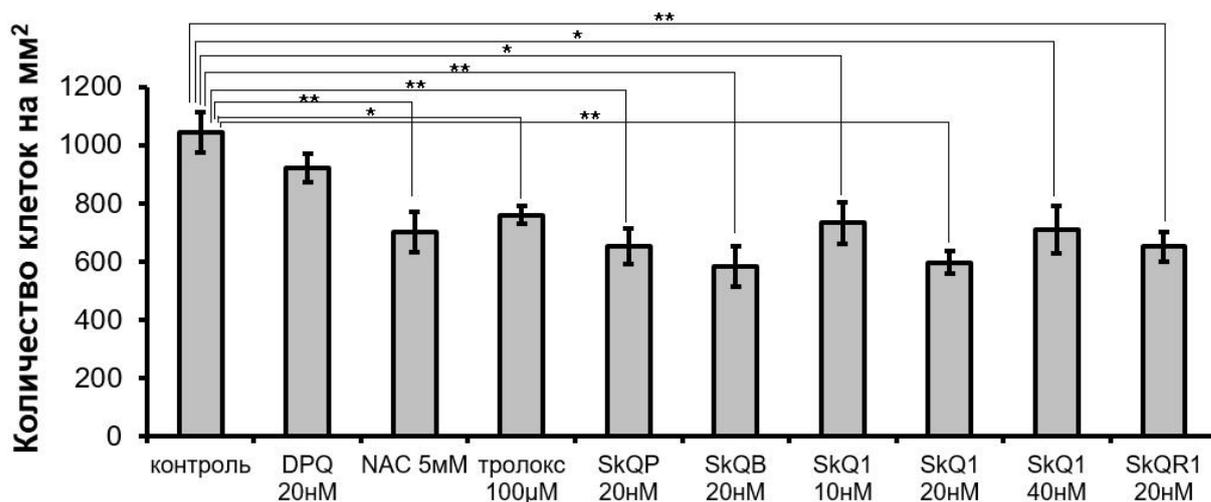
При анализе общего вида культур контрольных фибробластов линий MRC5-V1 и MRC5-V2 и культур, инкубированных с МАО, нами была выявлена разница в плотности клеток в культуре. Инкубация с МАО приводила к уменьшению плотности клеток в культуральных чашках по сравнению с контрольными культурами, что указывало на снижение пролиферации трансформированных фибробластов. Наиболее ярко данный эффект был показан для культуры клеток линии MRC5-V1 (Рис. 49).

При подсчете количества клеток на единицу площади было показано, что SkQ1 и его производные эффективно (в 1,5-2 раза) тормозят пролиферацию фибробластов MRC5-V1. Контрольная молекула DPQ (не имеет катионной части, обеспечивающей адресное накопление вещества в митохондриях) не оказывала статистически значимого эффекта на рост исследуемых культур. Антиоксиданты NAC и тролокс, по сравнению с МАО, вызывали менее выраженный эффект, а действующие концентрации веществ при этом были значительно выше: 5 мМ для NAC и 100 мкМ для тролокс. Эффективность МАО может быть связана с адресным накоплением этих молекул в митохондриях. Так, инкубация клеток с митохондриальным разобщителем окислительного фосфорилирования FCCP предотвращала адресное накопление веществ группы SkQ в митохондриях, ингибируя их влияние на пролиферацию трансформированных клеток в культуре (Рис.

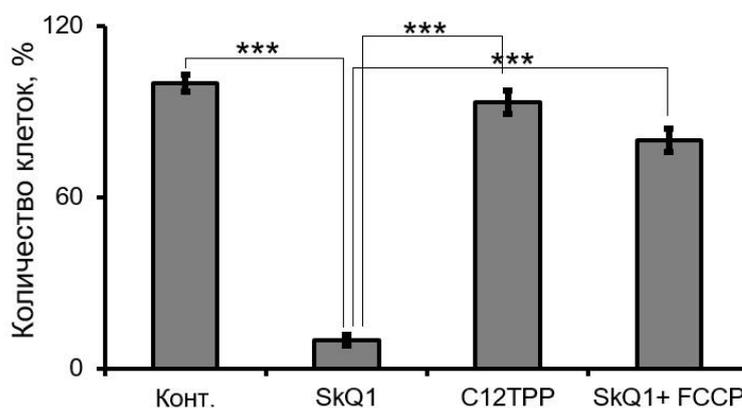
51). Для более детальных исследований нами преимущественно использовалась минимальная эффективно работающая концентрация SkQ1 в 20 нМ (Рис. 50).



**Рисунок 49.** Влияние MAO на плотность культуры клеток MRC5-V1; SkQ1 (10-40нМ, 48 часов инкубации); фазовый контраст; масштаб 50 мкм.

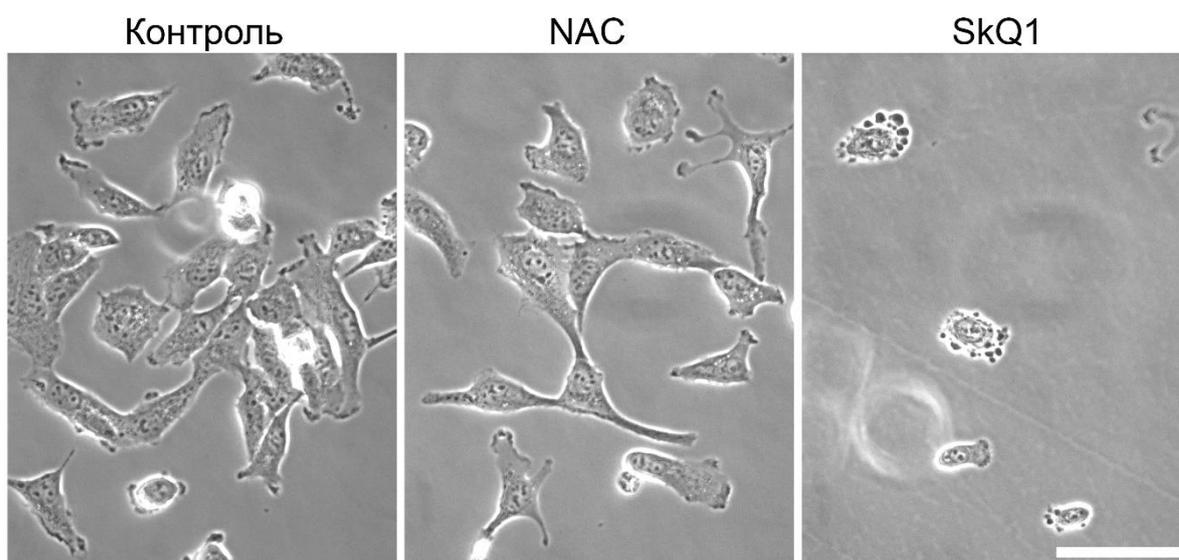


**Рисунок 50.** Изменение количества клеток в культуре MRC5-V1 после инкубации с NAC (5 мМ), тролокс (100 μМ), MAO семейства SkQ, 120 часов инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.



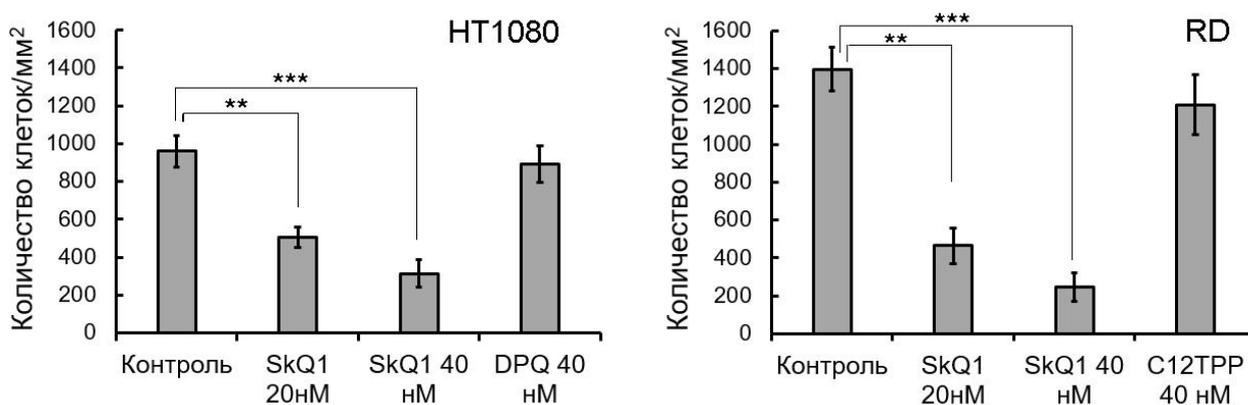
**Рисунок 51.** Влияние FCCP на эффект, оказываемый SkQ1 на количество клеток в культуре HT1080. Представлено количество клеток на единицу площади (относительно контроля) в присутствии SkQ1 (20 нМ), C12TPP (20 нМ) и FCCP (5 мкМ), 24 часа инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента;

При анализе общего вида культур опухолевых фибробластов после инкубации с МАО, нами также было выявлено уменьшение количества клеток в культуральных чашках по сравнению с контрольными культурами. Особенно ярко данный эффект был показан для культуры клеток RD. При этом наблюдалось изменение фенотипа клеток - они становились поджатыми, с многочисленными блебами по периметру клетки. Такая морфология клеток RD могла указывать на апоптоз. Классический антиоксидант NAC также приводил к уменьшению количества клеток в культуре RD, однако эффект был менее выражен (Рис. 52).



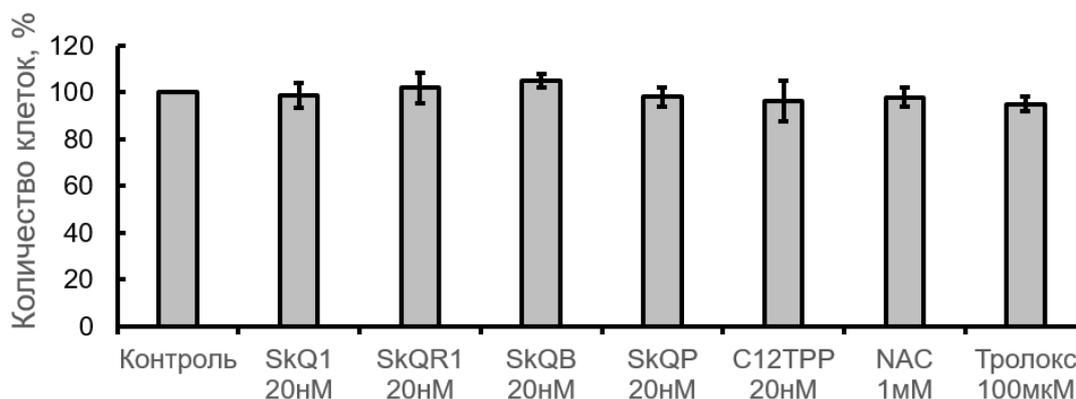
**Рисунок 52.** Влияние различных АО на количество клеток в культуре RD; SkQ1 (40 нМ), NAC (1 мМ, 48 часов); фазовый контраст; масштаб 40 мкм.

При подсчете количества клеток фибросаркомы HT1080 и рабдомиосаркомы RD в культуральных чашках было показано, что SkQ1 эффективно (в 2-2,5 раза) тормозит пролиферацию. Контрольная молекула DPQ не оказывала статистически значимого эффекта на плотность исследуемых культур (Рис. 53).



**Рисунок 53.** Влияние SkQ1 на количество клеток в культурах HT1080 и RD. 72 часа инкубации с SkQ1 (20 - 40 нМ) вызывает торможение пролиферации клеток HT1080 и RD, контрольная молекула DPQ (40 нМ) не оказывает такого эффекта; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии; значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

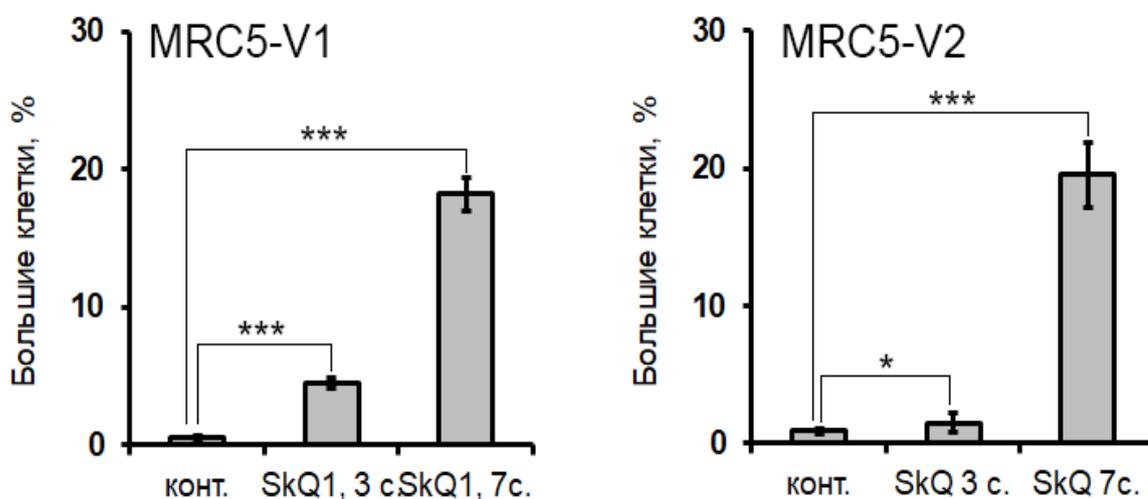
При этом вещества группы SkQ не оказывали статистически значимого влияния на пролиферацию нормальных фибробластов в культуре (Рис. 54).



**Рисунок 54.** Влияние веществ группы SkQ на количество клеток в культуре фибробластов кожи HSCF. 72 часа инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии; количество клеток на единицу площади относительно контроля; три независимых эксперимента.

### 5.2.2. Выявление популяции больших многоядерных клеток в культурах SV40-трансформированных фибробластов после инкубации с мАО

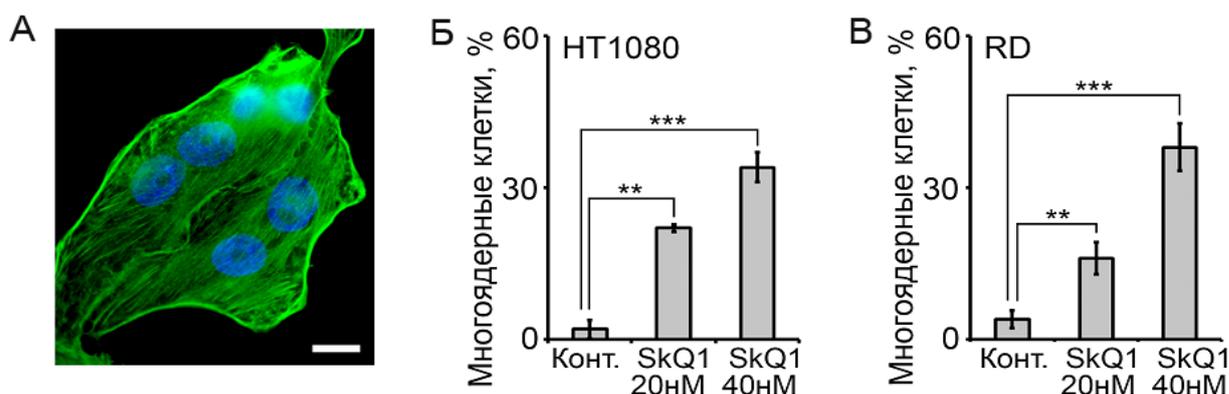
При анализе культуры клеток MRC5-V1, инкубируемых с мАО, была выявлена популяция *больших многоядерных клеток*. Такие клетки имели большую площадь, занимаемую на субстрате (в 3-5 раз больше контроля) и имели два и более ядер. При подсчете процента больших многоядерных клеток в культурах MRC5-V1 и MRC5-V2 было показано, что инкубация с SkQ1 (20 нМ, 7 сут.) увеличивает количество таких клеток в 15-20 раз (Рис. 55).



**Рисунок 55.** Влияние мАО на содержание больших многоядерных клеток в культуре MRC5-V1 и MRC5-V2; SkQ1 (20нМ, 3-7 сут. инкубации). Показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия: \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

Аналогичные данные были получены для клеток фибросаркомы HT1080 и рабдомиосаркомы RD. В присутствии SkQ1 увеличивалось количество многоядерных клеток (Рис. 56).

Для более детального изучения выявленной популяции больших клеток в культурах трансформированных фибробластов, клетки были проанализированы с помощью метода проточной цитофлуориметрии.



**Рисунок 56.** SkQ1 увеличивает количество многоядерных клеток в культурах HT1080 и RD.

А - морфология многоядерных клеток HT1080 в присутствии SkQ1 (20нМ, 48 часов); зеленый -  $\beta$ -актин, синий - DAPI, масштаб 10  $\mu$ м;

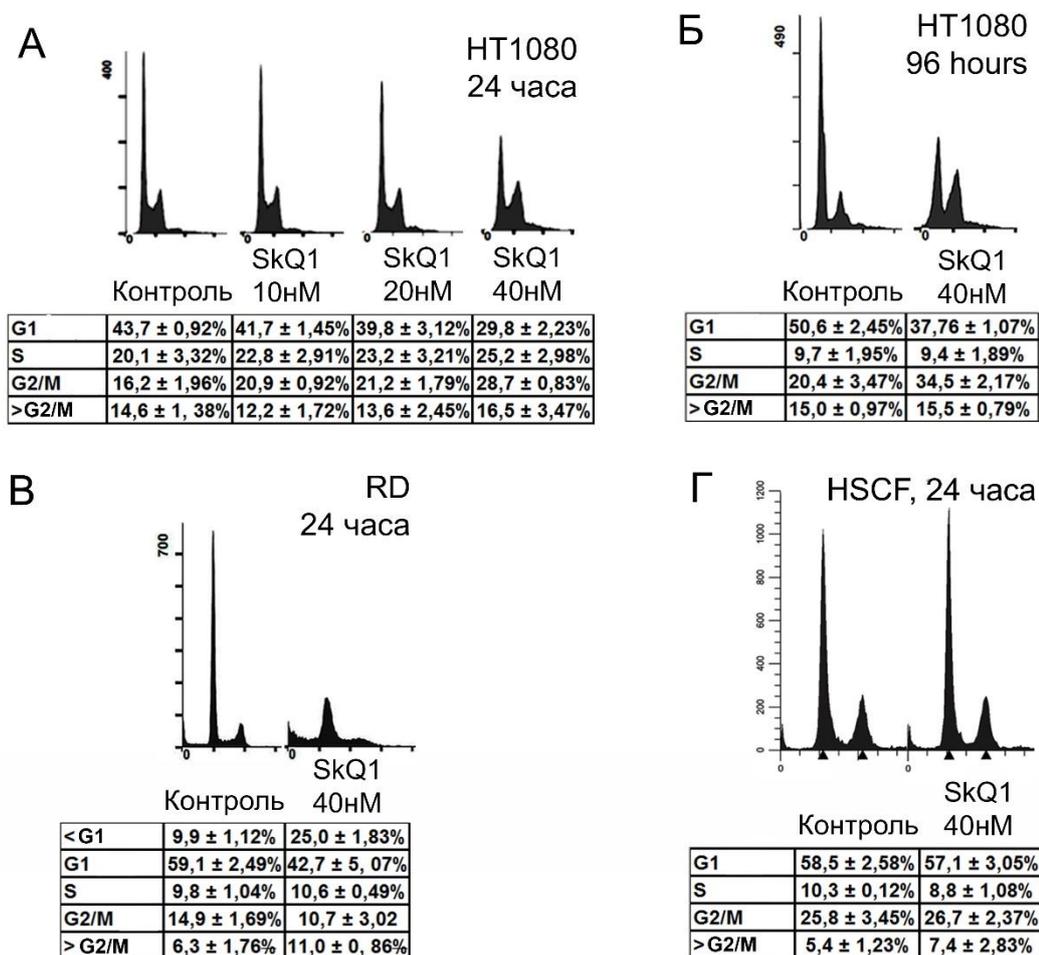
Б - увеличение количества многоядерных клеток в культуре HT1080 после инкубации с SkQ1 (20 - 40 нМ, 48 часов); статистический анализ данных иммунофлуоресцентной микроскопии, значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; четыре независимых эксперимента;

В - увеличение количества многоядерных клеток в культуре RD после инкубации с SkQ1 (20 - 40 нМ, 72 часа); статистический анализ данных иммунофлуоресцентной микроскопии, значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

### 5.2.3. Влияние MAO на динамику клеточного цикла опухолевых клеток

С помощью метода проточной цитофлуориметрии были исследованы параметры клеточного цикла клеток культур HSCF, HT-1080 и RD в присутствии MAO. Культура клеток фибросаркомы HT-1080 была выбрана нами для более подробного описания как наиболее наглядная экспериментальная модель, где крупные многоядерные (преимущественно, двуядерные) клетки в популяции появлялись уже на вторые сутки после инкубации с MAO, при этом также изменялась динамика клеточного цикла. Так, SkQ1 (10 - 40нМ, 24 часов инкубации) вызывал уменьшение количества митотических клеток на стадии G1-фазы и приводил к увеличению G2/M популяции (Рис. 57, А). При более длительной инкубации с MAO (96 часов) наблюдался аналогичный эффект уменьшения G1 и увеличения G2/M популяции (Рис. 57, Б). Похожие изменения характеристик клеточного цикла, а также увеличение популяции клеток  $< G1$  (область слева от пика G1 на графике распределения клеток по данным проточной цитофлуориметрии) и уменьшение G1 пула были описаны для культуры RD (Рис. 57, В).

При этом МАО не индуцировали статистически значимых изменений в динамике клеточного цикла в нормальных фибробластах человека (Рис. 57, Г).



**Рисунок 57.** Влияние МАО на изменение параметров клеточного цикла в культурах HT1080, RD и HSCF. Данные проточной цитофлуориметрии после окраски йодидом пропидия, на графиках по вертикальной оси – число событий, по горизонтальной оси – интенсивность флуоресценции пропидий йодида, представленные данные: среднее значение ± стандартная ошибка среднего:

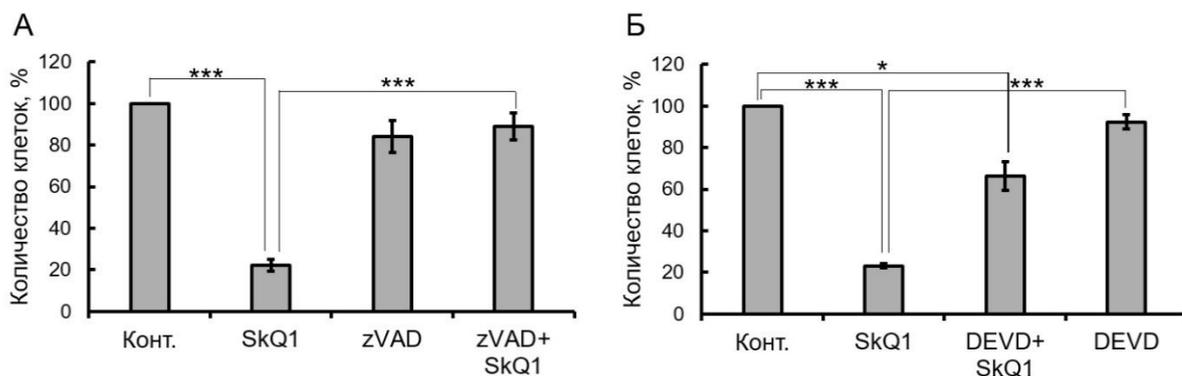
А – изменение параметров клеточного цикла клеток HT1080 при инкубации с SkQ1 (10-40нМ), 24 часа; значимые различия продемонстрированы для G1 и G2/M периодов после инкубации с 20 нМ ( $p < 0,05$ ) и 40 нМ ( $p < 0,01$ ) SkQ1 по сравнению с контролем согласно t-критерию Стьюдента; четыре независимых эксперимента;

Б – изменение параметров клеточного цикла клеток HT1080 при инкубации с SkQ1(40нМ, 96 часов); значимые различия по сравнению с контролем продемонстрированы для G1 и G2/M периодов ( $p < 0.01$ ) согласно t-критерию Стьюдента; пять независимых экспериментов;

В – SkQ1 (40 нМ, 24 часа) приводит к увеличению популяции клеток < G1 ( $p < 0,01$ ) и уменьшению количества G1 ( $p < 0,05$ ) клеток в культуре RD (значимые различия согласно t-критерию Стьюдента); пять независимых экспериментов;

Г – SkQ1 (40нМ, 24 часа) не вызывает значимых изменений параметров клеточного цикла фибробластов HSCF по сравнению с контролем; три независимых эксперимента;

Для более детального исследования появления клеточной популяции < G1 (область слева от пика G1 на графике распределения клеток по данным проточной цитофлуориметрии, которая могла соответствовать пулу апоптотических клеток) в культуре RD в присутствии MAO были использованы ингибиторы каспаз zVAD и DEVD. В присутствии данных ингибиторов SkQ1 практически не снижал количество клеток в культуральных чашках. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что SkQ1 индуцирует апоптоз в клетках RD, который ингибируется zVAD и DEVD. Это объясняет снижение плотности культуры в культуральных чашках и появление популяции клеток < G1 по данным цитофлуориметрии в присутствии MAO (Рис. 58).



**Рисунок 58.** Влияние ингибиторов каспаз zVAD и DEVD на снижение плотности культур рабдомиосаркомы RD в присутствии MAO.

А - Изменение количества клеток RD на единицу площади (относительно контроля) в присутствии SkQ1 (20 нМ) и zVAD (20 мкМ), 24 часа инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента;

Б - Изменение количества клеток RD на единицу площади (относительно контроля) в присутствии SkQ1 (20 нМ) и DEVD (20 мкМ), 24 часа инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

Увеличение количества клеток в G2/M популяции в исследуемой культуре, в присутствии SkQ1, могло свидетельствовать как об увеличении процента митотических клеток, так и о появлении популяции полиплоидных и многоядерных клеток. С целью более подробного описания состава G2/M популяции был проведен подсчет митотических клеток при разных сроках и условиях инкубации с МАО.

#### **5.2.4. Влияние МАО на количество митозов и динамику митотического цикла в культуре клеток фибросаркомы НТ1080**

Данные проточной цитофлуориметрии были дополнены иммунофлуоресцентным микроскопическим анализом культуры клеток НТ1080 при воздействии МАО. При анализе количества митотических клеток в контрольных культурах НТ1080 и в присутствии МАО было выявлено, что инкубация с SkQ1 приводит к снижению числа митотических клеток (Рис. 60, А). Контрольные молекулы DPQ и C12TPP не оказывали действия на количество митозов. При анализе количества митотических клеток в культурах НТ1080, обогащенных митозами (путем инкубации клеток в бессывороточной среде 24 часа и последующей рассадки в среду с 5% сыворотки), было также выявлено, что инкубация с МАО приводит к снижению числа митотических клеток (Рис. 60, Б). Количество митозов снижалось более чем в 2 раза уже через 24 часа предынкубации с МАО. Подбор оптимальных условий для обогащения культуры митотическими клетками показал, что оптимальный срок инкубации с сывороткой (после культивации в бессывороточной среде) составляет 18 часов (Рис. 60, Б).

Для более подробного анализа состава G2/M популяции, выявленной методом проточной цитофлуориметрии, были проведены динамические наблюдения за культурами клеток НТ1080 с помощью прижизненной цейтраферной видеомикроскопии. При этом была выявлена популяция митотических клеток с измененной морфологией, которые находились на стадии телофазы. Клетки имели асимметричные контуры, дочерние клетки заметно отличались друг от друга по размеру и форме, были вытянуты, имели неровные контуры и множество активных псевдоподий с многочисленными блебами (Рис. 59). Стадия телофазы в таких клетках была затянута во времени (продолжительность составляла более 2 часов), клетки совершали частые ненаправленные движения. Стадию телофазы с описанными характеристиками называли *затянутой во времени телофазой*. Митозы с такой длительной телофазой называли *затянутыми во времени митозами*. Различия в длительности фаз в каждом из двух типов митозов были слишком велики, поэтому дальнейший анализ продолжительности стадий деления клеток был проведен внутри каждой из групп – в нормальных и в затянутых митозах отдельно.

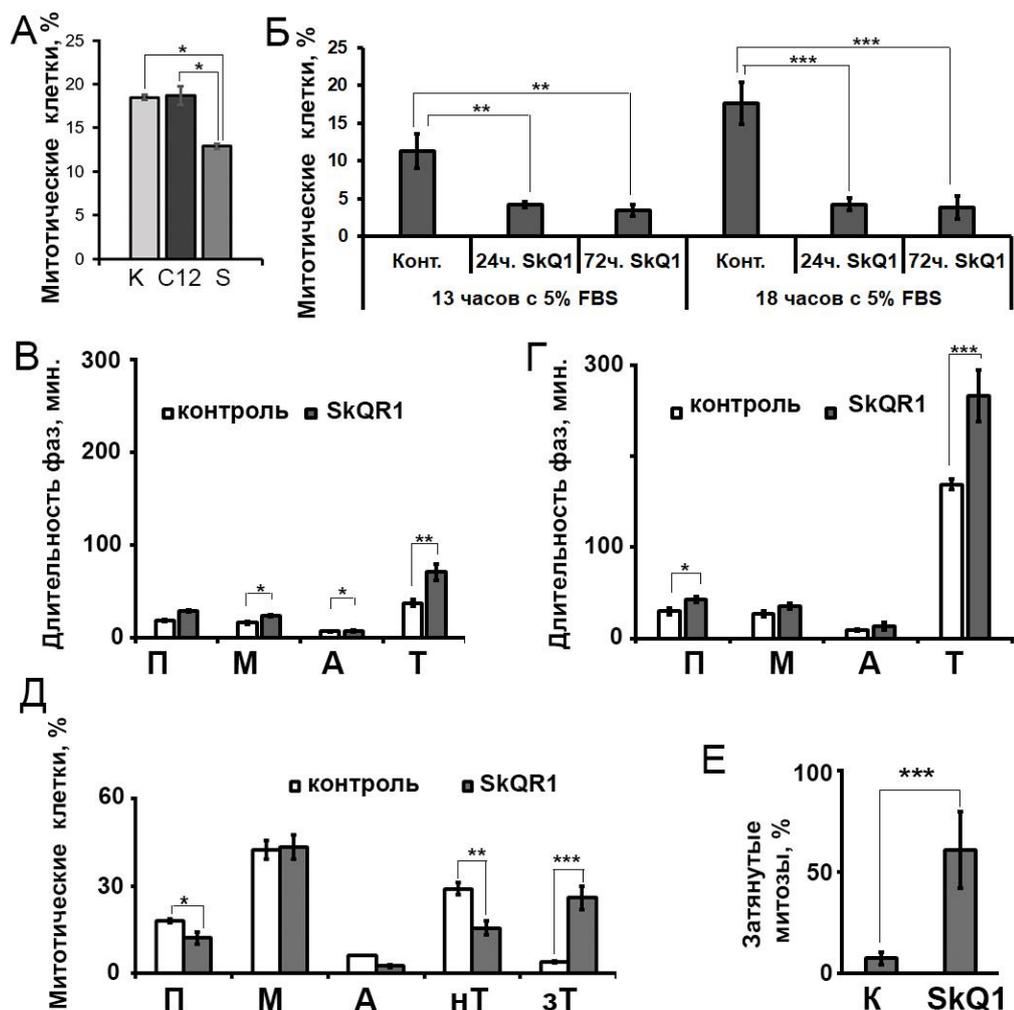


**Рисунок 59.** Влияние мАО на морфологию митотических клеток НТ1080 на стадии телофазы. SkQ1 (20 нМ, 24 часа инкубации); фазовый контраст, масштаб 50 мкм.

В ходе экспериментов было выявлено, что инкубация с мАО вызывает изменения продолжительности фаз как нормальных, так и затянутых митотических делений в культуре НТ1080 (Рис. 60, В, Г). В обеих указанных популяциях наблюдалось увеличение продолжительности митотических фаз после инкубации с мАО, в особенности - телофазы. Для контрольной культуры в популяции клеток с нормальным клеточным делением средняя длительность телофазы составляла  $37,9 \pm 3,26$  мин., с затянутым клеточным делением -  $169,3 \pm 6,2$  мин. После инкубации клеток с мАО длительность телофазы как в популяции клеток с нормальными, так и с затянутыми митозами увеличивалась в 2 - 2,5 раза. Также было отмечено увеличение продолжительности профазы как в нормальных, так и в затянутых митотических делениях, а метафазы – в нормальных (Рис. 60, В-Г). При инкубации клеток с DPQ и C12TPP изменений в продолжительности фаз митоза выявлено не было.

Таким образом, в ходе динамических наблюдений было показано, что мАО приводят к значительному увеличению процента затянутых митозов в культуре НТ1080. Доля затянутых митозов от общего количества митотических клеток составляла  $7,3 \pm 3,04\%$  для контрольной культуры и  $60,9 \pm 18,86\%$  для опытной (Рис. 60, Е). В присутствии контрольных молекул DPQ и C12TPP такого эффекта не наблюдалось.

Анализ иммунофлуоресцентно окрашенных препаратов культуры НТ1080 также показал, что мАО вызывают изменения в распределении популяции митотических клеток по фазам клеточного деления, наиболее выраженные – также на стадии телофазы (Рис. 60, Д). В присутствии мАО количество митотических клеток на стадии нормальной телофазы уменьшалось на 40-50% относительно контрольной культуры, а доля клеток на стадии затянутой телофазы увеличивалась примерно в 4,5 раза. Контрольные молекулы DPQ и C12TPP не влияли на распределение клеток по фазам митотического цикла, увеличения количества клеток на стадии затянутой телофазы по сравнению с контролем также не наблюдалось.



**Рисунок 60.** Изменение количества митотических делений, параметров клеточного цикла и продолжительности митозов в культуре клеток HT1080 под действием MAO:

А - действие MAO на количество митотических клеток в культуре HT1080: К – контроль, С12 - C12TPP (40 нМ) S - SkQ1 (40 нМ, 24 часа); статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии; показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента;

Б – Подбор оптимальных условий обогащения культуры HT1080 митотическими клетками. Предынкубация с SkQ1, 40 нМ в течение 24 и 72 часов. Анализ проводился после предынкубации клеток в среде без сыворотки через 13 и 18 часов инкубации с 5% сыворотки; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии; показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия \* –  $p < 0,05$ , согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента;

В – изменение продолжительности фаз нормальных митозов в культуре HT1080 после 72 часов инкубации с SkQ1 (40 нМ): П – профаза, М – метафаза, А – анафаза, Т - телофаза; статистический анализ данных цейтраферной видеомикроскопии; показано среднее  $\pm$

стандартная ошибка среднего; значимые различия: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , согласно t-критерию Стьюдента; семь независимых экспериментов (5-7 клеток на экспериментальное условие в одном эксперименте);

Г – изменение продолжительности фаз затянутых митозов в культуре НТ1080 после 72 часов инкубации с SkQ1 (40 нМ): П – профазы, М – метафаза, А – анафаза, Т – телофаза; статистический анализ данных цейтраферной видеомикроскопии; показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия: \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; семь независимых экспериментов (5-7 клеток на экспериментальное условие в одном эксперименте);

Д - распределение митотической клеточной популяции по фазам митоза в культуре клеток НТ1080, SkQ1 (40нМ, 24 часа): П – профазы, М – метафаза, А – анафаза, нТ – нормальная телофаза, зТ – затянутая телофаза; статистический анализ данных цейтраферной видеомикроскопии; показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; семь независимых экспериментов (5-7 клеток на экспериментальное условие в одном эксперименте).

Е - индукция затянутых митозов в популяции делящихся клеток культуры фибросаркомы НТ1080 после инкубации с МАО; К – контроль, SkQ1 - 20 нМ, 72 часа; статистический анализ данных цейтраферной видеомикроскопии; показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно t-критерию Стьюдента; семь независимых экспериментов (5-7 клеток на экспериментальное условие в одном эксперименте).

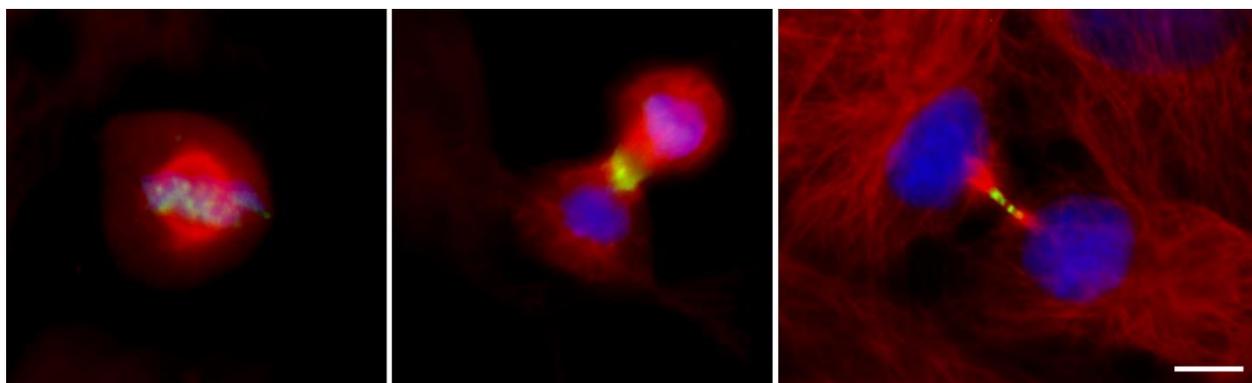
Таким образом, было показано значительное увеличение продолжительности митоза. Были выявлены: 1) увеличение продолжительности профазы и метафазы после инкубации с МАО; 2) задержка митотических клеток на стадии телофазы.

#### **5.2.5. Исследование механизмов действия МАО на изменение динамики клеточного цикла клеток культуры НТ1080**

Выявленные в ходе динамических наблюдений изменения клеток на стадии митоза указывали на возможные воздействия SkQ1 на APC-комплекс. На выходе из митотического деления APC отвечает за деградацию киназ семейства Auroга, в частности, Auroга В, и завершение процесса цитокинеза (Willems et al., 2018). В связи с этим, в данной работе были изучены изменения локализации и содержания фосфокиназы Auroга

В в клетках НТ1080, демонстрирующих выраженные изменения в динамике клеточного цикла в присутствии МАО.

Изменение распределения белка Aurora В в митотических клетках было исследовано с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. В контрольных опухолевых клетках киназа была локализована: на стадии метафазы - в области прицентромерного гетерохроматина в области метафазной пластинки; в ранней телофазе - в экваториальной области клетки (центральной части веретена), на стадии цитокинеза - в области межклеточной перетяжки в виде точечных структур (Рис. 61). В опытных клетках Aurora В была локализована похожим образом. Интенсивность окраски на Aurora В на всех стадиях клеточного деления снижалась в присутствии МАО, что было подтверждено анализом локального уровня интенсивности флуоресценции (Рис. 62 А, Б).

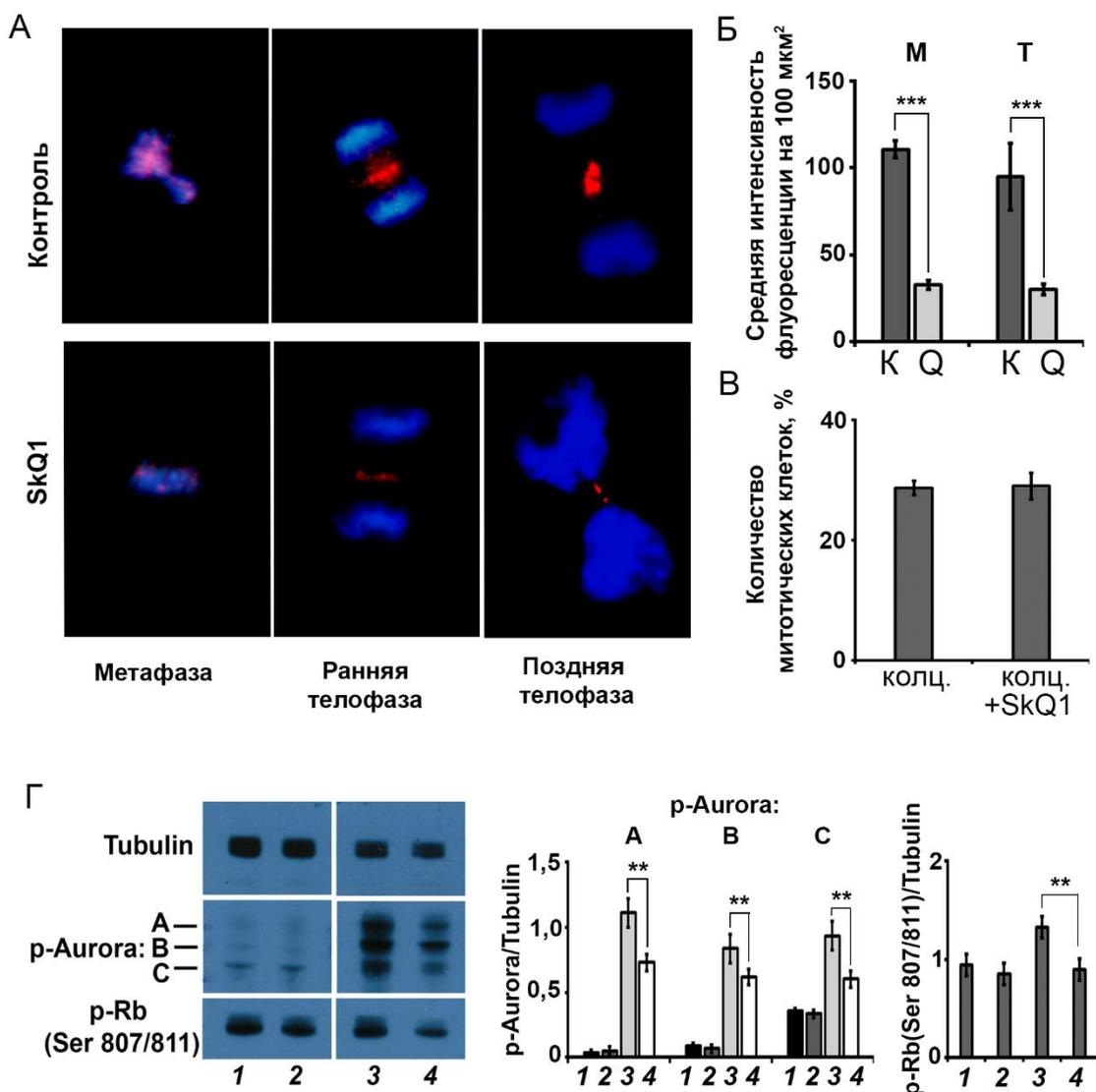


**Рисунок 61.** Изменение локализации белка Aurora В на разных стадиях митоза в контрольных клетках НТ1080. Синий - ДНК, красный –  $\alpha$ -тубулин, зеленый - Aurora В; масштаб – 10 мкм; флуоресцентная микроскопия.

Анализ распределения Aurora В в митотических клетках НТ1080 был проведен с помощью метода микроскопии сверхвысокого разрешения. В метафазе контрольных клеток Aurora В распределялась в области прицентромерного гетерохроматина, окраска была ярко выражена. В присутствии МАО белок был локализован в той же области в виде более компактных, точечных структур с менее интенсивной окраской. На стадии телофазы Aurora В была локализована в центральной области веретена деления, а на стадии цитокинеза – в остаточном тельце. Особенно отчетливо данные изменения были заметны на стадии метафазы и телофазы клеточного деления (Рис. 63).

Показано, что инактивация Aurora В приводит к ингибированию E2F-опосредованной транскрипции и остановке клеточного цикла благодаря опухолевым супрессорам p53 и белку ретинобластомы Rb. В многочисленных источниках литературы подробно описана роль Rb в регуляции входа клетки в S-фазу, однако белок также

контролирует более поздние стадии клеточного цикла и апоптоз (Kumari et al., 2014). Для понимания возможных механизмов действия мАО на клетки NT1080, содержащие активированный N-Ras онкоген (Paterson, et al., 1987), были изучены сигнальные пути с участием опухолевого супрессора pRb и киназы семейства Aurora B.



**Рисунок 62.** Количественная оценка изменения интенсивности окрашивания Aurora B и уровня экспрессии фосфокиназ семейства Aurora и белка фосфо-Rb в митотических клетках линии NT1080 под действием мАО:

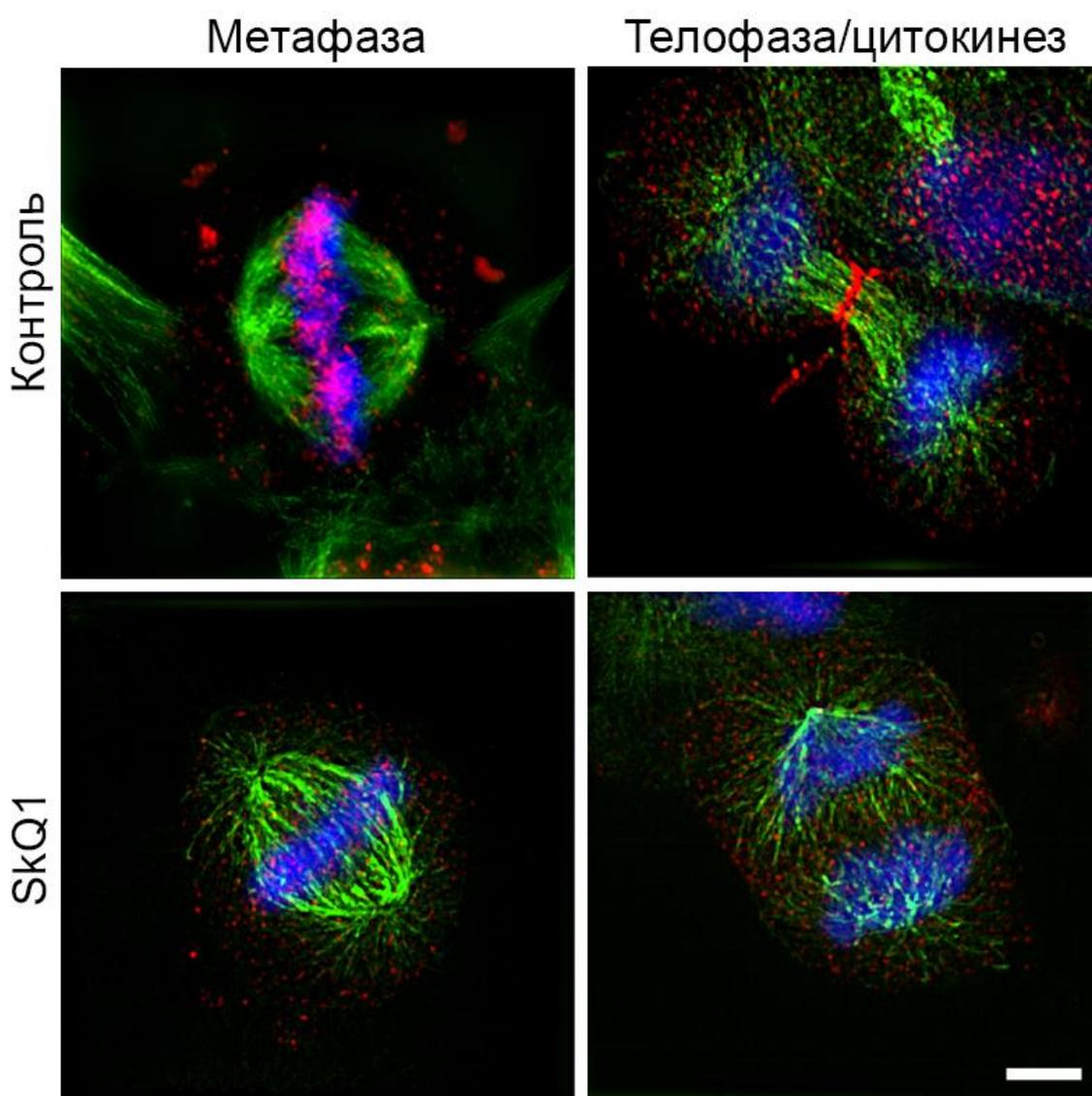
А – изменение интенсивности флуоресцентного окрашивания белка Aurora B при инкубации с мАО: 1 – контроль, 2 – SkQ1 (40 нМ, 24 часа инкубации); синий - ДНК, красный – Aurora B; флуоресцентная микроскопия.

Б – измерение интенсивности окрашивания Aurora B при действии мАО на митотические клетки NT1080: М – на стадии метафазы, Т – на стадии поздней телофазы; К – контроль, Q - SkQ1 (40 нМ, 24 часа инкубации), интенсивность флуоресценции на единицу

площади: среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия: \*\*\* –  $p < 0,001$  согласно критерию Манна-Уитни; три независимых эксперимента;

В – влияние мАО на количество митозов в культурах НТ1080 после инкубации клеток с малыми дозами колцемида: 1 – колцеמיד (0,02 мкг/мл), 2 – колцеמיד (0,02 мкг/мл) + SkQ1 (40 нМ, 24 часа инкубации); показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего;

Г - экспрессия белков фосфо-Aurora A, B, C, фосфо-Rb (Ser807/811) в клетках фибросаркомы НТ1080 после 24 часов инкубации с мАО: 1 – контроль, 2 - SkQ1 (100 нМ), 3 – колцеמיד (0,02 мкг/мл), 4 – колцеמיד (0,02 мкг/мл) + SkQ1 (100 нМ). Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по  $\alpha$ -тубулину; показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; значимые различия: \*\* –  $p < 0,01$  согласно критерию Манна-Уитни; четыре независимых эксперимента.



**Рисунок 63.** Изменение распределения киназы Ауорога В в митотических клетках линии НТ1080 в присутствии мАО; SkQ1 (40нМ, 24 часа инкубации); красный - Aurora B,

зеленый -  $\alpha$ -тубулин, синий – ДНК; масштаб 5 мкм; микроскопия сверхвысокого разрешения со структурированным освещением (3D-SIM).

Поскольку среди киназ семейства Auroga в регуляции клеточного цикла на разных стадиях участвует и Auroga A, а также встречаются данные о роли Auroga C в процессе опухолевой трансформации, было проанализировано содержание в клетках фосфорилированной формы всех представителей семейства. Активное фосфорилированное состояние киназ исследовали с помощью белкового иммуноблоттинга в контрольных и синхронизированных коллечидом культурах HT1080. Данный вид синхронизации был выбран для накопления достаточного количества исследуемых белков в митотических клетках. Содержание фосфо-Auroga A, B, C в несинхронизированных культурах было значительно ниже, чем в присутствии 0,02 мкг/мл коллечидом, что объясняется активацией киназ семейства Auroga во время митотического деления. При инкубации с MAO уровень экспрессии в несинхронизированных культурах также оставался низким. В синхронизированных клетках HT1080 уровень экспрессии фосфо-Auroga A, B, C был достаточно высоким. В присутствии MAO в таких культурах наблюдалось значительное снижение количества данного белка (Рис. 62, Г). Важно отметить, что это происходило не за счет уменьшения числа пролиферирующих клеток - относительное количество митотических клеток в синхронизированных культурах, как в контрольных, так и в присутствии MAO, практически не отличалось (Рис. 62, В).

Было также обнаружено, что MAO снижают количество белка ретинобластомы фосфо-Rb (Ser 807/811) в синхронизированных коллечидом культурах HT1080. Содержание белка фосфо-Rb в несинхронизированных контрольных культурах было низким и практически не менялось в присутствии MAO (Рис. 62, Г). Контрольные молекулы DPQ и C12TPP, SkQRC12 не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемых белков фосфо-Auroga A, B, C и фосфо-Rb (Ser 807/811) в клетках HT1080.

## 6. ОБСУЖДЕНИЕ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Titova, E., Shagieva, G., Ivanova, O., Domnina, L., Domninskaya, M., Strelkova, O., Khromova, N., Kopnin, P., Chernyak, B., Skulachev, V., and Dugina, V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth // *Cell Cycle*. – 2018. V. 17. – P. 1797-1811.

Титова Е.В., Шагиева Г.С., Дугина В.Б., Копнин П.Б. Роль киназы Aurora B в нормальных и опухолевых клетках // *Биохимия*. – 2023. – Т. 88. – № 12. – С. 2435 – 2445.

### 6.1. Влияние мАО на морфологию трансформированных фибробластов

Как уже было подробно описано в обзоре литературы, опухолевые клетки претерпевают ряд критических изменений, связанных с реорганизацией цитоскелета и адгезионных структур, клеточной поляризацией, характером клеточной подвижности и регулирующим эти процессы клеточным сигналингом. Особую роль в неопластической трансформации играют патологические изменения в организации актинового цитоскелета. Такая реорганизация актиновой системы опосредована изменениями в молекулярных сигнальных механизмах клетки, а также изменениями в экспрессии АВР, таких как моторный белок миозин (Halder et al., 2021), гельзолин (Alsofyani and Nedjadi, 2023), тропомиозин (Cagigas et al., 2022). Реорганизация актина в трансформированных клетках происходит в результате активации онкогенных сигнальных путей (семейства Ras, Src, Rac), инактивации АВР, выполняющих функции опухолевых супрессоров (таких как гельзолин) (Rao et al., 2004).

Опухолевые клетки также часто характеризуются повышенным уровнем АФК и нарушениями в окислительно-восстановительном потенциале по сравнению с нормальными клетками (Fruehauf et al., 2007). АФК усиливают пролиферацию, подвижность и запускают сигнальные пути, обеспечивающие выживание трансформированных клеток, что способствует процессу опухолеобразования. С другой стороны, АФК играют важную роль в защите клеток от неопластической трансформации, участвуя в процессах апоптоза и клеточного старения. Таким образом, митохондрии являются регуляторами опухолевого роста и прогрессии благодаря их специфической роли в метаболизме и контроле апоптотических сигнальных путей при трансформации. Показано, что для правильной пространственной ориентации, перемещения в нужный компартмент клетки, динамики и корректной работы митохондрий по поддержанию окислительно-восстановительного гомеостаза клетки необходимо участие актиновых микрофиламентов (Kim et al., 2020). Окислительно-восстановительные модификации актина внутриклеточными АФК контролируют множество клеточных событий, зависящих от локального и своевременного ремоделирования актинового цитоскелета (Rouyere et al., 2022). В литературе появляется все больше данных о АВР, являющихся мишенью для

окисления и восстановления активными формами кислорода. Например, окисление цистеина 139/147 в молекуле кофилина под действием  $H_2O_2$  ухудшает его связывание с молекулой актина и, как следствие, уменьшает возможность разрыва актинового филамента, регулируя тем самым миграцию мезенхимальных клеток (Cameron et al., 2015). Окислительный стресс также регулирует экспрессию многочисленных генов, кодирующих АФК (Balta et al., 2020)

Одним из актуальных направлений современных исследований является поиск агентов, напрямую модулирующих полимеризацию актина, а также направленных на взаимодействие с малыми ГТФ-азами Rac, Rho, и Cdc42, семейством Ras или актин-связывающими белками (Rao et al., 2004, Terri, 2024, Sun, 2023, Matos, 2022). К группе таких веществ относятся антиоксиданты, нейтрализующие избыток внутриклеточных АФК при патологических событиях в клетке, таких как трансформация, старение. Один из механизмов действия АФК на цитоскелет и клеточную подвижность связан с их способностью модулировать сигнальные каскады, в которых участвует Rac1. Этот фактор опосредованно через WAVE-Arp2/3 путь может стимулировать полимеризацию актиновых микрофиламентов на ведущем крае, усиливая клеточную подвижность (Ridley et al., 1992; Chan et al., 2005). В ряде работ было показано действие антиоксидантов, в том числе и специфически адресованных в митохондрии, на морфологию трансформированных клеток (Alexandrova et al., 2006; Popova et al., 2006).

В нашей работе был исследован эффект изменения уровня мАФК на нормальные и трансформированные фибробласты человека с помощью мАО. Молекула SkQ1 представляет собой конъюгат децил-TRP<sup>+</sup> с пластохиноном. Присоединение алкил-трифенилфосфониевого катиона (TRP<sup>+</sup>) к различным молекулам стало хорошо зарекомендовавшим себя подходом к получению специфически адресованных в митохондрии соединений. Значительное количество конъюгатов алкил-TRP<sup>+</sup> было изучено для противоопухолевой терапии (Guzman-Villanueva et al., 2017). Делокализованные липофильные катионы (такие как производные алкил-TRP<sup>+</sup>) накапливаются в митохондриях опухолевых клеток, поскольку их митохондрии имеют значительно более высокий отрицательный заряд со стороны матрикса на внутренней мембране по сравнению с нормальными клетками (Modica-Napolitano et al., 2001).

Специфическая локализация мАО в митохондриях была показана нами с помощью родаминового производного SkQR1 и подтверждена в ряде исследований наших соавторов (Antonenko et al., 2008; Skulachev, 2007). Было выявлено снижение уровня цитоплазматических АФК в присутствии SkQ1 в клетках сарком HT1080 и RD методом

проточной цитофлуориметрии с использованием специфического флуоресцентного красителя DCF, что согласуется с данными литературы (Antonenko et al., 2008).

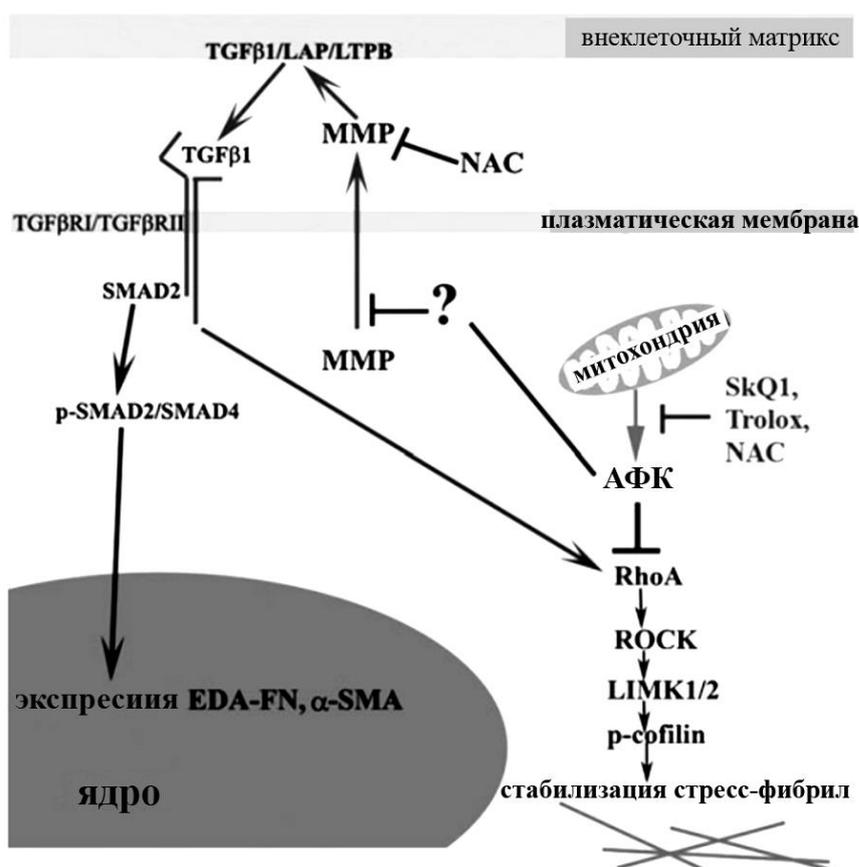
Полученные в данной работе результаты показали различие в морфологии выбранных в качестве экспериментальной модели культур нормальных и трансформированных фибробластов человека. Нормальные клетки HSCF имели фибробластоподобную морфологию – преимущественно удлинённые поляризованные клетки с выраженной ламеллярной активностью на ведущем крае. Культура MRC5 была представлена клетками с миофибробластным фенотипом. SV40-трансформированные клетки имели морфологию, отличную от нормальных (множество псевдоподий, раффлов и блебов, многочисленные участки активности края). В присутствии MAO значительного изменения в морфологии нормальных фибробластов не наблюдалось, тогда как в вирус-трансформированных клетках наблюдалась частичная морфологическая нормализация фенотипа. Клетки рабдомиосаркомы в присутствии MAO приобретали изменённую морфологию, характерную для апоптотических клеток, сильно уменьшалась плотность культуры. При этом появление апоптотических клеток в культуре рабдомиосаркомы не было результатом окислительного действия, присущего SkQ1 в более высоких концентрациях (Skulachev et al., 2009).

Проведённое ранее сравнение организации  $\beta$ - и  $\gamma$ -цитоплазматических актинов в фибробластах из нормальных человеческих эмбриональных легочных линий WI38 и MRC-5 с их SV40-трансформированными опухолеродными производными WI38-VA13 и MRC-5V2, показало, что трансформированные клетки отличаются от нормальных редукцией  $\beta$ -актиновых пучков и развитием кортикальных и ламеллиподиальных  $\gamma$ -актиновых протрузий (Zwaenepoel et al., 2005). В отделе патологии Женевского университета группой К. Шапонье были получены высокоспецифичные моноклональные антитела к двум цитоплазматическими изоформам актина, что позволило использовать их для изучения нормальных и опухолевых клеток. В литературе описаны различные функции этих изоформ актина и их различное пространственное распределение в клетке. Специфические моноклональные антитела и аккуратно подобранная последовательная фиксация клеток параформальдегидом и метанолом позволила выявить два типа актиновых структур. Первый тип, в котором преимущественно преобладает  $\beta$ -актин – это пучки микрофиламентов, образующие стресс-фибриллы, филоподии, пучки, участвующие в образовании межклеточных контактов и межклеточной перетяжки в ходе телофазы, что указывало на роль  $\beta$ -актина в клеточной адгезии и сокращениях. Второй тип, преимущественно образованный  $\gamma$ -актином – кортикальные и ламеллярные сети ветвящихся микрофиламентов (Dugina et al., 2005). В литературе встречаются данные,

указывающие на возможность использования  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в качестве маркеров в дифференциальной диагностике опухолей (Дугина и др., 2017). В нашей работе для более детального изучения морфологических изменений исследуемых культур в ходе трансформации и в присутствии МАО, также была проанализирована реорганизация актинового цитоскелета как важного признака неопластической трансформации. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание позволило параллельно исследовать организацию в одной и той же клетке двух актиновых систем -  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина. Селективная организация актиновых систем наблюдалась нами как в нормальных, так и в трансформированных фибробластах. В трансформированных клетках структурно-пространственное различие между двумя актиновыми системами было особенно выражено.

Иммунорфологический анализ показал, что актиновая система в нормальных первичных подкожных фибробластах HSCF была представлена толстыми длинными, идущими параллельно оси клетки пучками  $\beta$ -актина, тогда как  $\gamma$ -актин формировал плотную сеть тангенциальных пучков, идущих параллельно краю клетки, обе изоформы наблюдались на ведущем ярко окрашенном крае. Культура легочных фибробластов MRC-5 была представлена преимущественно миофибробластами. Миофибробласты – высоко дифференцированные мезенхимальные клетки, имеющие характеристики гладкомышечных клеток и фибробластов, способные к сокращению, с толстыми пучками актина, содержащие  $\alpha$ -гладкомышечный актин – стресс-фибриллами (Hinz et al., 2002). Эти клетки играют ключевую роль в заживлении тканей и ремоделировании внеклеточного матрикса. Обычные фибробласты могут приобретать свойства миофибробластов как вынужденный ответ на изменение внеклеточного матрикса и в присутствии различных веществ, например, TGF- $\beta$  (Tomasek et al., 2002). В клетках линии MRC5 выявлялись длинные толстые пучки актиновых стресс-фибрилл, характерные для миофибробластов. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание выявило стресс-фибриллы преимущественно  $\beta$ -актина, содержащие  $\alpha$ -гладкомышечный актин. В ламелле на ведущем крае выявлялась упорядоченная сеть из тангенциальных и радиальных пучков актина обеих изоформ. Клеток с такой миофибробластной морфологией практически не было в контрольной культуре HSCF. В присутствии МАО популяция миофибробластов появлялась, что согласуется с данными литературы. Ранее группой Поповой было показано, что снижение МАФК в нормальных подкожных фибробластах с помощью МАО приводит к миофибробластной дифференцировке через активацию Rho/ROCK/LIMK сигнального пути, приводящей к фосфорилированию кофилина и стабилизации актиновых стресс-фибрилл. Тот же эффект оказывали классические АО, не направленные в митохондрии (NAC, тролокс), но при более высоких концентрациях. Наблюдаемое при

этом повышение количества маркеров миофибробластной дифференцировки - изоформы фибронектина EDA-FN и  $\alpha$ -гладкомышечного актина было опосредовано фактором TGF- $\beta$ 1, который активировался металлопротеазой MMP9 (matrix metalloprotease 9). Фенотип миофибробластов поддерживался в течение длительного времени после удаления MAO из культуральной среды благодаря аутокринной TGF $\beta$ 1-зависимой стимуляции (Porova et al., 2010).



**Рисунок 64.** Схема регуляции миофибробластной дифференцировки митохондриальными АФК (Porova et al., 2010).

Для изучения эффекта MAO на уровень  $\alpha$ -гладкомышечного актина в нормальных клетках с помощью белкового иммуноблоттинга нами был проведен количественный анализ экспрессии данного маркера в подкожных фибробластах HSCF. На 7 сутки инкубации MAO приводили к увеличению количества  $\alpha$ -гладкомышечного актина вдвое, что свидетельствовало о процессе дифференцировки HSCF в миофибробластоподобные клетки, а также сопровождалось характерным изменением фенотипа. Подобный эффект на клеточную морфологию и содержание  $\alpha$ -гладкомышечного актина был описан для нормальных фибробластов человека в присутствии MAO MitoQ (Porova et al., 2006).

Было подробно исследовано влияние мАО на реорганизацию актинового цитоскелета в трансформированных клетках. Вирус-трансформированные и опухолевые клетки демонстрировали схожую сегрегацию в распределении двух актиновых систем -  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина, характерную для процесса трансформации. Клональные производные MRC5, трансформированные вирусом SV40 - MRC5-V1 и MRC5-V2 имели измененную морфологию, сопровождающуюся частичной потерей  $\beta$ -актиновых пучков, которая была более выражена в более трансформированной культуре MRC5-V2.  $\gamma$ -актин был организован в виде развитой сети фибрилл в кортикальном слое и ламеллиподиальных структурах, более выраженной в клетках MRC5-V2, что указывало на наличие многочисленных активных ведущих краев по периметру клетки.

В клетках HT1080 была выявлена еще более измененная организация актинового цитоскелета: в цитоплазме наблюдалось диффузное распределение как  $\beta$ -, так и  $\gamma$ -актина, не выявлялись пучки, ярко выраженные раффлы содержали обе изоформы актина. Изменения цитоскелетных систем в виде потери организованных  $\beta$ -актиновых пучков, его диффузного распределения соотносятся с данными литературы об опухолеродности культуры фибросаркомы (Gupta and Stanbridge, 2001; Slovak et al., 1991). При этом данных об опухолеродности вирус-трансформированных фибробластов MRC5-V2, имеющих, по сравнению с HT1080, организованную сеть тонких  $\beta$ -актиновых пучков, в литературе не встречается. Таким образом, можно предположить, что редукция  $\beta$ -актина является маркером опухолевой трансформации клеток фибросаркомы, что согласуется с данными литературы (Dugina et al., 2015). Сопоставление этих результатов и данных литературы для опухолевых тканей молочной железы человека подтверждает, что уменьшение экспрессии бета-актина и гомогенное распределение  $\gamma$ -актина можно считать характерными признаками трансформированных и злокачественных клеток. В исследуемых нами трансформированных культурах  $\gamma$ -актин был организован в виде сети в кортикальном слое клетки и ламеллиподиальных структурах, что согласуется с данными о его роли в клеточной подвижности. В работах по изучению процесса миграции клеток в экспериментальную рану  $\gamma$ -актин преимущественно выявлялся в подвижных доменах клетки, в то время как экспрессия бета-актина преобладала в стабильных пучках микрофиламентов (Dugina et al., 2005).

Особые трудности в исследовании кортикальных структур при выявлении  $\gamma$ -актина в трансформированных клетках возникали при микроскопии линии MRC5-V2, в связи с чем для анализа данной культуры нами дополнительно использовалась лазерная сканирующая конфокальная микроскопия с исследованием серии оптических X/Y срезов, а также Z-срезов клеток. Были выявлены различия в толщине  $\gamma$ -актинового кортекса в

области ламеллы – она была больше в трансформированных MRC5-V1 и MRC5-V2 клетках по сравнению с нормальными MRC5, что указывало на высокую активность клеточного края.

В присутствии MAO и его аналогов наблюдалась морфологическая нормализация трансформированных клеток, особенно выраженная в культуре MRC5-V1 (клетки приобретали миофибробластоподобный фенотип). Аналогичная, но менее выраженная реорганизация актиновых систем наблюдалась в клетках MRC5-V2. Проведенный нами подробный иммуноморфологический анализ с использованием конфокальной микроскопии показал существенные различия в распределении  $\gamma$ -актина в дорзальной субмембранной области клеток MRC5-V1 и MRC5-V2 в присутствии MAO. Было выявлено усиление организации кортикального слоя с появлением ориентированных сетей микрофиламентов с радиальной и тангенциальной направленностью. С помощью полученных Z-срезов мы показали уменьшение толщины кортикального слоя микрофиламентов, увеличение ширины ламеллярной цитоплазмы и снижение интенсивности флуоресценции в дорзальном (кортикальном) слое в присутствии MAO, что свидетельствовало о снижении псевдоподиальной активности трансформированных клеток.

В клетках HT1080 в присутствии MAO нормализация фенотипа была менее выражена. Обе изоформы актина частично сохраняли диффузное распределение в цитоплазме и концентрировались в области выраженных раффлов,  $\beta$ -актин также присутствовал в виде ярких параллельно ориентированных пучков,  $\gamma$ -актин был организован в сеть длинных тангенциальных и радиальных пучков. Таким образом, наиболее выраженный эффект MAO на клеточную морфологию - реорганизация актиновых систем и нормализация фенотипа, был продемонстрирован для клеток линии MRC5-V1. В данной культуре было исследовано изменение распределения  $\alpha$ -гладкомышечного актина и немышечного миозина II.  $\alpha$ -гладкомышечный актин является маркером дифференцировки миофибробластов (Skalli et al., 1986). В литературе описано исчезновение  $\alpha$ -гладкомышечного актина при спонтанной клеточной трансформации, его содержание также снижается в опухолевых клетках и в клетках, трансформированных вирусом SV40 (Leavitt et al., 1985, Okamoto-Inoue et al., 1990). Описано, что при дифференцировке фибробластов в миофибробласты при изменениях внеклеточного матрикса, в клетках появляется гладкомышечный актин и популяция зрелых и суперзрелых фокальных контактов (Dugina et al., 2001). Немышечный миозин II – белок миофибробластов, связывающийся с актиновыми микрофиламентами. Он отвечает за сокращение и натяжение актиновой системы. С помощью датчика натяжения и FLIM-

FRET микроскопии была описана значительная пространственная и временная неоднородность натяжения вдоль актинового цитоскелета, опосредованного немышечным миозином II. Это указывает на роль такого актомиозинового взаимодействия как в миграции и движении клеток вперед, так и в ретракции «хвоста» клетки (Hart et al., 2024, Weissenbruch et al., 2024). При анализе распределения  $\alpha$ -гладкомышечного актина в линии MRC5-V1 наблюдалась преимущественно диффузная окраска, тогда как в присутствии MAO клетки приобретали миофибробластоподный фенотип, в них отмечалась реорганизация гладкомышечного актина в длинные пучки, идущие вдоль тела клетки. Присутствовала колокализация  $\alpha$ -гладкомышечного актина с  $\beta$ -актиновыми пучками. Аналогичные изменения в присутствии MAO были описаны при выявлении немышечного миозина II - преимущественно диффузное распределение сменялось образованием толстых длинных пучков  $\beta$ -актина, содержащих немышечный миозин II. Подобные изменения в присутствии MAO, указывающие на дифференцировку трансформированных клеток, также наблюдались в более трансформированной культуре MRC5-V2, однако эффект был выражен слабее. Таким образом, полученные данные могли указывать на улучшение контрактильности и снижение миграционной активности SV40-трансформированных фибробластов в присутствии MAO.

Данные иммунофлуоресцентного анализа распределения АВР показали перераспределение белка p34 комплекса Arp2/3 и  $\alpha$ -актинина-1 в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2 в присутствии MAO. Известно, что разные АВР участвуют в организации различных актиновых структур в клетке. Белок p34 является специфическим маркером ламеллиподий и в составе комплекса Arp2/3 обеспечивает сборку и динамику сети актиновых филаментов на ведущем крае клетки.  $\alpha$ -актинин-1 поддерживает организацию актина в пучки и стресс-фибриллы вдоль тела клетки в тандеме с миозином II, фасцином, тропомиозином и другими АВР. В трансформированных клетках p34 был распределен диффузно в цитоплазме и особенно выражено присутствовал в протяженных участках активности на краях, в области раффлов. В присутствии MAO на фоне диффузного распределения в цитоплазме выявлялось выраженное присутствие p34 на одном ведущем крае поляризованных клеток для MRC5-V1 и в области нескольких краевых участков активности для MRC5-V2. MAO также вызывали перераспределение  $\alpha$ -актинина-1 – диффузное распределение в цитоплазме контрольных клеток MRC5-V2 и MRC5-V1 сменялось интенсивной окраской концевых участков микрофиламентов на краях и в теле клетки. Описанные изменения указывали на стабилизацию актиновых пучков и уменьшение активности клеточного края трансформированных фибробластов в присутствии MAO.

Ранее были получены данные об изменении фокальных контактов и появлении популяции «суперзрелых» контактов большой длины при миофибробластном переходе и появлении в клетках  $\alpha$ -гладкомышечного актина (Dugina, 2001). С помощью морфометрического анализа нами была исследована длина ФК клеток MRC5-V1 и MRC5. Для выявления контактов разной степени зрелости мы применяли иммунофлуоресцентное окрашивание на паксиллин, белок, присутствующий в адгезиях разной зрелости. В клетках MRC5 наблюдались крупные длинные ФК на концах стресс-фибрилл. Тонкие, короткие контакты в контрольных клетках MRC5-V1 сменялись на более длинные, более толстые и выраженные структуры на концах актиновых пучков. Морфометрическое измерение длины ФК показало появление в присутствии МАО популяции зрелых (длина 5-8 мкм) и суперзрелых (длина более 8 мкм) контактов, характерных для нормальных миофибробластов MRC5, тогда как в контрольных клетках MRC5-V1 все адгезии имели длину менее 5 мкм. В литературе описаны данные о том, что образование длинных и толстых суперзрелых (площадью более 6 мкм<sup>2</sup>) ФК происходит путем созревания незрелых адгезий, их удлинения и слияния в более крупные адгезионные структуры (Dugina et al., 2001; Pletjushkina et al., 1998). С помощью белкового иммуноблоттинга мы оценили влияние МАО на содержание в клетках MRC5-V1 и MRC5 винкулина - белка зрелых ФК. Было показано, что в присутствии МАО количество винкулина в клетках MRC5-V1 увеличивалось, а в клетках MRC5 достоверно не менялось. Эффект МАО на содержание винкулина в линии MRC5-V1 усиливался с ростом концентрации вещества. Полученные данные указывают на улучшение ФК в присутствии МАО, что косвенно может свидетельствовать о улучшении распластывания и прикрепления к субстрату, стабилизации миграционной активности клеток.

Ранее было показано, что инкубация подкожных диплоидных фибробластов человека с МАО вызывает изменения в клеточной морфологии и организации актинового цитоскелета (Porova et al., 2010). Данные указывают на активацию Rho-ROCK сигнального пути в ответ на инкубацию клеток с SkQ1, а также описывают механизм АФК-индуцированного ингибирования Rho в Ras-трансформированных фибробластах (Shinohara et al., 2007). Также известно, что фибробласты, трансфицированные N-Ras-содержащим конструктором, имеют более трансформированный фенотип по сравнению с нетрансфицированными исходными клетками (Alexandrova et al., 1993). Показано также, что трансформация p53<sup>-/-</sup> мышечных фибробластов онкогеном N-Ras вызывает значительное уменьшение площади клеток, индуцируя разборку актиновых стресс-фибрилл и связанных с ними винкулин-содержащих фокальных контактов клеток с субстратом. Воздействие МАО на Ras-трансформированные фибробласты приводит к

восстановлению актиновых пучков, фокальных контактов и адгезии клеток к субстрату, увеличению площади клеток, занимаемой ими на субстрате (Agarova et al., 2008). Фенотип клеток фибросаркомы человека HT1080 обусловлен активированным онкогеном N-Ras (Paterson et al., 1987). Активированный Ras повышает уровень внутриклеточных АФК (Archer et al., 2002; Serù et al., 2004). Мы пришли к выводу, что снижение уровня мАФК под действием мАО индуцировало Rho-зависимую реорганизацию актинового цитоскелета в клетках HT1080. Антиоксидант NAC вызывает аналогичные изменения морфологии и нормализацию подвижности клеток в Ras-трансформированных фибробластах через модуляцию активности Rac1, Rho и кофилина (Alexandrova et al., 2006).

Таким образом, проведенные в ходе нашей работы эксперименты показали изменение морфологии вирус-трансформированных и опухолевых клеток в присутствии мАО. АО приводили к нормализации фенотипа клеток: реорганизации  $\beta$ -актина в толстые пучки – стресс-фибриллы,  $\gamma$ -актина – в развитую сеть радиальных и тангенциальных пучков. Появление в присутствии мАО выраженных актиновых пучков в вирус-трансформированных фибробластах сопровождалось появлением в них маркеров миофибробластной дифференцировки  $\alpha$ -гладкомышечного актина и появлением немышечного миозина II. При этом перераспределение актин-связывающих белков p34 комплекса Arp2/3 и  $\alpha$ -актинина-1 указывало на стабилизацию клеточного края и снижение миграционного потенциала. Суммируя полученные результаты, выбранная нами экспериментальная модель показала влияние мАФК на морфологию трансформированных и опухолевых клеток. Снижение уровня мАФК с помощью мАО вызывало нормализацию фенотипа клеток, сопровождающуюся реорганизацией цитоскелетных систем  $\beta$ - и  $\alpha$ -актина и перераспределением АВР.

## **6.2. Влияние мАО на динамику клеточного цикла вирус-трансформированных и опухолевых фибробластов**

Митохондрии являются важными регуляторами роста и прогрессии опухолей благодаря своей специфической роли в метаболизме и модуляции апоптотических путей. Активные формы кислорода, продуцируемые митохондриями, могут иметь особое значение для проопухолевого сигналинга (Sabharwal et al., 2014). Ранее было показано, что некоторые мАО, представляющих собой конъюгаты децил-TPP<sup>+</sup> с пластохиноном (SkQ1) (Agarova et al., 2008; Shagieva et al., 2017; Skulachev et al., 2009), децил-TPP<sup>+</sup> с тимохиноном (SkQT1) (Severina et al., 2018), децил-TPP<sup>+</sup> с коэнзимом Q10 (MitoQ) (Rao et al., 2010), нитроксидами (Mito-CP) (Starenki et al., 2013) или аналогом витамина E (Mito-

хроманол) (Cheng et al., 2013), подавляют пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и рост опухолевых ксенотрансплантатов *in vivo*. Противоопухолевый эффект MAO, использованных в этих исследованиях в высоких концентрациях, был опосредован в первую очередь их прооксидантным действием.

В нашей работе мы использовали низкие наномолярные концентрации антиоксидантов семейства SkQ1, адресованных в митохондрии и снижающих уровень MAФК, чтобы изучить, может ли подавление опухолевого роста быть обусловлено прооксидантным действием этих соединений, или же, наоборот, ингибирование пролиферации клеток может быть результатом их антиоксидантного действия. Ранее нами было выявлено, что SkQ1 ингибирует опухолевый рост рабдомиосаркомы RD в ксенотрансплантатах на модели голых мышей nude (Titova et al., 2018). В тех же условиях прооксидантного действия MAO на рост клеток первичных подкожных фибробластов человека не наблюдалось. Подавление роста опухоли являлось результатом антиоксидантного действия низких наномолярных концентраций SkQ1.

В разделе 5.2 был оценен вклад MAФК в регуляцию клеточного цикла клеток фибросаркомы HT1080 и рабдомиосаркомы RD с помощью MAO. Нами было показано, что MAO подавляют рост вирус-трансформированных фибробластов, а также клеток фибросаркомы и рабдомиосаркомы в культуре. Ранее нами уже было выявлено, что MAO ингибируют пролиферацию в культурах других опухолевых клеток (Agarova et al., 2008; Shagieva et al., 2017). В нашем исследовании митохондриальный разобщитель окислительного фосфорилирования FCCP предотвращал индуцированное SkQ1 ингибирование роста клеток фибросаркомы HT1080, что подтверждает предположение о критической роли MAФК в регуляции пролиферации опухолевых клеток.

В исследуемых опухолевых культурах в торможение пролиферации вносили вклад различные процессы. Так, в клетках HT1080 уменьшение количества клеток в культуральных чашках сопровождалось снижением числа митозов и значительным увеличением популяции многоядерных клеток, а также задержкой клеточного деления на стадии телофазы. Тогда как в культуре рабдомиосаркомы RD, помимо тех же процессов, что и в клетках HT1080, MAO индуцировали гибель клеток через апоптоз. помимо морфологической типичной картины гибели клеток RD, апоптоз блокировала предынкубация со специфическими ингибиторами каспаз zVAD и каспазы-3 DEVD, т.е. при ингибировании апоптоза клетки не погибали. Также апоптотический пик (популяция клеток < G1) был выявлен по результатам проточной цитофлуориметрии.

Липофильный катион додецилтрифенилфосфония C12TPP (в отличие от SkQ1 не имеет остатка пластохинона, обладающего антиоксидантными свойствами) и молекула

DPQ (не имеет катионной части, обеспечивающей адресное накопление вещества в митохондриях) не влияли на пролиферацию и ploидность клеток HT1080 и RD. Не адресованные в митохондрии антиоксиданты NAC и тролокс оказывали схожий ингибирующий эффект на рост клеток, но в гораздо больших концентрациях. MAO не оказывали токсического эффекта на пролиферацию нормальных диплоидных подкожных фибробластов человека.

Мы выявили значительное увеличение продолжительности митоза, индуцированного MAO в культурах RD и HT1080. Для клеток линии HT1080 было показано: 1) увеличение продолжительности профазы и метафазы после инкубации с MAO; 2) задержка митотических клеток на стадии телофазы, т.е. увеличение ее продолжительности после инкубации с MAO. По-видимому, данный эффект MAO на митотические клетки опухолевых культур являлся причиной снижения пролиферативной активности неопластически трансформированных клеток после воздействия на них АО семейства SkQ. Для клеток культуры RD снижение пролиферации в присутствии данных антиоксидантов может быть также следствием апоптоза и задержки митоза.

Подавление роста культуры HT1080 сопровождалось задержкой клеток на стадии телофазы и цитокинеза, а также образованием многоядерных клеток. Выявленные в ходе динамических наблюдений изменения свойств клеток на стадии митоза, указывали на возможный эффект MAO на APC-комплекс. Известно, что активированный APC регулирует переход клетки из метафазы в анафазу, а также отвечает за финальные события в митозе через инактивацию циклин-зависимых киназ. На выходе из митотического деления APC отвечает за деградацию киназ семейства Aurora и завершение процесса цитокинеза (Littlepage et al., 2002; Stewart S et al., 2005). В связи с этим, в данной работе были изучены изменения локализации Aurora B и содержания фосфорилированных Aurora A, B и C в исследуемых клетках HT1080 при действии MAO. В литературе описано повышение экспрессии киназ Aurora A и B при опухолевой прогрессии (Anand et al., 2003). В нашей работе было выявлено, что влияние MAO на клеточный цикл может быть обусловлено инактивацией киназ семейства Aurora.

Помимо ингибирования роста клеток, MAO вызывали значительные изменения морфологии опухолевых клеток HT1080. Реорганизация цитоплазматического  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина сопровождалась увеличением площади клеток. Реорганизация двух актиновых систем цитоплазматического  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина регулирует различные изменения в клеточном цикле через взаимодействие между собой цитоплазматических актинов, MAP-киназ и других регуляторов клеточного деления (Dugina et al., 2015). Относительное количество  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина и организация соответствующих цитоплазматических актиновых систем клетки

изменяются в ходе трансформации клеток и опухолевой прогрессии (Shagieva et al., 2017; Shagieva et al., 2012). Как уже было отмечено выше,  $\beta$ -актин действует как опухолевый супрессор, подавляя рост и инвазию клеток *in vitro* и рост опухоли *in vivo*. Напротив,  $\gamma$ -актин способствует проонкогенным изменениям путем регуляции активности ERK1/2, актин-связывающих белков и некоторых других регуляторных белков (Dugina et al., 2015).

Чтобы оценить частоту митотических делений в клетках HT1080 и RD, делящиеся клетки были посчитаны в соответствии с тем, в какой фазе деления (профаза, метафаза, анафаза или телофаза) или цитокинеза они находятся. Мы выявили увеличение продолжительности митоза и цитокинеза после инкубации с мАО. Данные вещества индуцировал значительное увеличение количества асимметричных по форме митотических клеток с затянутой во времени телофазой/цитокинезом и уменьшение количества нормальных митотических клеток. Как уже говорилось выше, митозы с затянутой во времени телофазой мы называли затянутыми митозами. В культуре RD в присутствии мАО выявлялась популяция клеток с морфологическими признаками апоптоза. Увеличение количества апоптотических клеток в культуре рабдомиосаркомы не было результатом окислительного действия, присущего SkQ1 в более высоких концентрациях (Skulachev et al., 2009), что было подтверждено методом проточной цитофлуориметрии с использованием DCFH-DA.

Мы изучили локализацию, количество и активность киназ семейства Aurora, ответственных за прогрессию митоза и цитокинеза. Киназы семейства Aurora представлены тремя белковыми изоформами (A, B и C), которые считаются перспективными молекулярными мишенями для противоопухолевой терапии (Титова и др, 2023; Baldini et al., 2012; Vats et al., 2025). Показано, что повышенная экспрессия Aurora A и B приводит к генетической нестабильности и опухолевой прогрессии (Anand et al., 2003), роль Aurora C в клеточной трансформации изучена недостаточно. мАО снижали количество фосфорилированной формы всех трех киназ Aurora, тем самым, по-видимому, подавляя их активность. Aurora A регулирует вступление клеток в митоз, контролирует созревание центросом, дубликацию, разделение и сборку веретена деления в митозе (Carmena et al., 2003). Низкая активность Aurora A вызывает митотический арест на стадии G2/M и разборку веретена деления (Magumoto et al., 2003). Задержка клеток HT1080 на стадии про- и метафазы может быть результатом снижения активности киназы Aurora A, индуцированной мАО.

Цитокинез, заключительная стадия клеточного деления, является решающим событием для разделения дочерних клеток после расхождения хромосом. Незавершенный цитокинез может являться причиной появления популяции многоядерных клеток в

исследуемой культуре HT1080. Цитокинез регулируется множеством факторов, в том числе протеинкиназами, такими как Aurora-B и Rho-киназа/ROCK. Aurora-B активно функционирует как на ранних, так и на поздних стадиях митоза, сегрегации/конденсации хромосом и цитокинезе. Aurora-B и Rho-киназа/ROCK регулируют продвижение цитокинеза в месте образования межклеточной перетяжки (Yokoyama et al., 2005). Показано, что снижение активности Aurora-B с помощью siRNA или специфических ингибиторов приводит к образованию многоядерных клеток (Hauf et al., 2003) так же, как и ингибирование Rho-киназы/ROCK, причем эффект от подавления активности обеих киназ еще более выражен (Yokoyama et al., 2005). Есть данные о том, что ингибирование активности киназы Aurora B в клетках рака молочной железы приводит к полиплоидии, апоптозу и митотической катастрофе, а также эффективно подавляет опухолевый рост в модели мышинных ксенографтов (Gully et al., 2010). Мы наблюдали снижение количества киназы Aurora B и количество активной фосфорилированной формы белков Aurora A/B/C в присутствии МАО. Можно предположить, что такие изменения в содержании Aurora-B отвечают за появление многоядерных клеток и подавление роста культуры HT1080, а снижение уровня МАФК с помощью МАО при этом индуцировало сигнальные пути с участием Rho.

По данным научной группы под руководством Фернандес, Киназа Aurora C была обнаружена исключительно у млекопитающих, а её экспрессия максимальна в семенниках. В половых клетках данная киназа играет роль в мейозе, аналогичную Aurora B в митозе (Fernandez-Miranda et al., 2011). В работах Кимура и соавторов было показано, что в митозе уровень Aurora C остаётся низким в течение S-фазы и достигает пика во время митоза (Kimura et al., 1999). Киназа локализуется в области centrosom начиная с анафазы и заканчивая телофазой, взаимодействует с сурвивином и INCENP и служит каталитическим компонентом CPC вместе с Aurora B (Sasai et al., 2016). Aurora C способствует трансформации клеток рака молочной железы, но ее роль в канцерогенезе остается неясной (Han et al., 2017). Полученные в нашей работе данные позволяют сделать предположение о возможном участии Aurora C в процессе митоза в клетках с активированным онкогеном N-Ras.

МАО снижали количество фосфорилированного белка ретинобластомы Rb в синхронизированных клетках HT1080 и RD. Rb играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, старения и апоптотической гибели клеток. Роль Rb в опухолевой прогрессии противоречива, поскольку он действует как ингибитор клеточного роста, так и как ингибитор клеточной гибели. Rb играет центральную роль в ингибировании клеточной пролиферации, поэтому опухолевая прогрессия часто

сопровождается инактивацией данного белка (Sherr, 1996). Известно, что Rb может быть инактивирован различными механизмами, включая фосфорилирование и деградацию. В большинстве раковых клеток человека функция Rb инактивируется через сигнальные пути, регулирующие его фосфорилирование (Sherr, 1996). Следовательно, активная пролиферация клеток HT1080 могла быть вызвана инактивацией Rb, связанной с его фосфорилированием. MAO значительно снижали количество фосфорилированного Rb в синхронизированных клетках HT1080 и ингибировали пролиферацию.

Мы предполагаем, что в обеих исследованных клеточных культурах фибросаркомы и рабдомиосаркомы MAO индуцируют изменение динамики клеточного цикла, а также вызывают апоптоз клеток рабдомиосаркомы. Известно, что после длительной задержки митоза, клетки либо погибают в результате апоптоза, либо выходят из митоза без деления и выживают - процесс, известный как митотическое проскальзывание (Topham et al., 2013). Этот процесс защищает клетки от анеуплоидии и генетической нестабильности, и его индукция в опухолевых клетках экзогенными агентами может быть перспективной терапевтической мишенью (Vitale et al., 2011).

Подводя итог, можно сказать, что MAO подавляют рост опухолевых клеток HT1080 и RD благодаря своей антиоксидантной активности, хотя сохраняется вероятность того, что накопление MAO в митохондриях вызывает локальное оксидантное действие (Skulachev, 2007). Цитостатический эффект MAO может быть обусловлен снижением активности киназ семейства Aurora.

## 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя, в ходе диссертационной работы было показано, что воздействие мАО группы SkQ приводит к фенотипической нормализации и снижению пролиферации вирус-трансформированных и опухолевых фибробластов в культуре.

На первом этапе исследования было проведено сравнение морфологии, организации актинового цитоскелета в нормальных и SV40-трансформированных клетках. Оказалось, что при трансформации нарушается структурно-пространственное распределение актиновых цитоскелетных систем, происходит потеря  $\beta$ -актиновых пучков и ухудшение адгезионных структур.

Далее было проведено исследование эффекта мАО, модулирующих окислительно-восстановительный статус клеток путем снижения уровня мАФК, на морфологию SV40-трансформированных клеток, особенности актинового цитоскелета и адгезионных структур. Было показано, что мАО вызывают нормализацию фенотипа, сопровождающуюся реорганизацией  $\gamma$ - и  $\beta$ -актиновых цитоскелетных систем. При этом в клетках восстанавливались плотные организованные  $\beta$ -актиновые пучки, богатые  $\alpha$ -гладкомышечным актином и немышечным миозином II, что указывало на миофибробластную дифференцировку в присутствии мАО. Перераспределение белков p34 комплекса Arp2/3 и  $\alpha$ -актина-1 в SV40-трансформированных культурах при воздействии мАО указывало на уменьшение активности клеточного края и стабилизацию системы актиновых пучков.

Последующий анализ воздействия мАО на фокальные адгезии SV40-трансформированных клеток выявил увеличение их размера и появление популяции зрелых ФК. Данный эффект также сопровождался появлением актиновых пучков, богатых  $\alpha$ -гладкомышечным актином. Полученные данные говорят в пользу того, что снижение мАФК с помощью мАО вызывает ряд последовательных этапов модуляции трансформированных фибробластов в направлении миофибробластной дифференцировки.

На втором этапе работы была исследована роль мАФК в регуляции клеточного цикла SV40-трансформированных и опухолевых клеток. Оказалось, что уменьшение уровня мАФК в присутствии мАО подавляет рост вирус-трансформированных фибробластов, а также клеток фибросаркомы и рабдомиосаркомы в культуре. Действие мАО на опухолевые клетки HT1080 и RD имело цитостатический эффект. Важно отметить, что данное воздействие предположительно обусловлено не прооксидантной, а антиоксидантной активностью за счет использования мАО в сверхмалых наномолярных концентрациях. Наблюдаемые при этом изменения - значительное увеличение продолжительности митоза и задержка на стадии цитокинеза, по крайней мере частично,

опосредованы снижением уровня фосфокиназ семейства Auroга и фосфорилированного белка ретинобластомы Rb. При этом была показана возможная роль Auroга C в процессе митоза в клетках с активированным онкогеном N-Ras.

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на то, что МАФК играют важную роль в процессе клеточной трансформации. Они участвуют в реорганизации цитоплазматических изоформ актина и АВР, а также в процессе клеточного деления опухолевых и SV40-трансформированных фибробластов. Киназы семейства Auroга и белок Rb принимают участие в регуляции этих событий. Антиоксиданты семейства SkQ можно рассматривать как потенциальные противоопухолевые агенты, которые модулируют организацию актинового цитоскелета, приводя к восстановлению системы  $\beta$ -актиновых пучков, ФК и снижению пролиферации.

## 7. ВЫВОДЫ

1. Антиоксиданты, адресованные в митохондрии (мАО) вызывают реорганизацию актинового цитоскелета и нормализацию фенотипа SV-40-трансформированных клеток MRC5-V1 и MRC5-V2. Данный процесс сопровождается восстановлением системы  $\beta$ -актиновых пучков. Аналогичные, но менее выраженные изменения морфологии выявлены в опухолевых клетках фибросаркомы HT1080.

2. мАО индуцируют появление зрелых ФК и увеличение содержания белка зрелых ФК винкулина в клетках линии MRC5-V1, а также перераспределение  $\alpha$ -актинина-1, поддерживающего структуру стресс-фибрилл.

3. мАО вызывают появление пучков  $\beta$ -актина, содержащих  $\alpha$ -гладкомышечный актин (в клетках линии MRC5-V1), что характерно для миофибробластной дифференцировки, и немышечный миозин II (в клетках линий MRC5-V1 и MRC5-V2).

4. мАО индуцируют распределение белка ламеллиподий p34 комплекса Arp2/3, характерное для нормальных фибробластов, в клетках линий MRC5-V1 и MRC5-V2.

5. мАО снижают пролиферацию опухолевых клеток HT1080 и RD благодаря изменению динамики клеточного цикла. В культуре RD исследуемые вещества индуцируют апоптоз. Цитостатический эффект мАО сопровождается снижением количества фосфокиназ семейства Aurora и белка ретинобластомы фосфо-Rb.

## 8. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 9.1. Статьи

1. **Титова Е.В.**, Шагиева Г.С., Дугина В.Б., Копнин П.Б. Роль киназы Aurora B в нормальных и опухолевых клетках // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 12. – С. 2435 – 2445. Импакт-фактор 2,200 (JIF) (1.155/0.809)

2. **Титова Е.В.**, Иванова О.Ю., Дугина В.Б. Нормализация ростовых характеристик клеток фибросаркомы в культуре при действии митохондриально-направленных антиоксидантов // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Т. 10. – № 52. – С. 49-52. Импакт-фактор 0,141 (РИНЦ) (0.462/0.347)

3. **Titova E.**, Shagieva G., Ivanova O., Domnina L., Domninskaya M., Strelkova O., Khromova N., Koptin P., Chernyak B., Skulachev V., Dugina V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth // Cell Cycle. – 2018. V. 17. – P. 1797-1811. Импакт-фактор 3,400 (SJR) (1.733/1.271)

4. Chernyak B.V., Antonenko Y.N., Galimov E.R., Domnina L.V., Dugina V.B., Zvyagilskaya R.A., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Rogov A.G., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev M.V., Tashlitsky V.N., **Titova E.V.**, Trendeleva T.A., Shagieva G.S. Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents: Conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone // Biochemistry (Moscow) – 2012. V. 77, № 9. – P. 983-995. Импакт-фактор 2,200 (JIF) (1.502/0.231)

5. Agapova L.S., Chernyak B.V., Domnina L.V., Dugina V.B., Efimenko A.Y., Fetisova E.K., Ivanova O.Y., Kalinina N.I., Khromova N.V., Koptin B.P., Koptin P.B., Korotetskaya M.V., Lichinitser M.R., Lukashev A.L., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Skulachev M.V., Shagieva G.S., Stepanova E.V., **Titova E.V.**, Tkachuk V.A., Vasiliev J.M., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 3. Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells // Biochemistry (Moscow). – 2008. V. 73, № 12. – P. 1300-1316. Импакт-фактор 2,200 (JIF) (2.310/0.347)

*\*В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.*

### 9.2. Тезисы докладов

1. Титова Е.В., Шагиева Г.С., Дугина В.Б. Снижение уровня митохондриальных активных форм кислорода вызывает инактивацию киназ семейства Aurora и снижение

пролиферации в культурах клеток фибросаркомы и рабдомиосаркомы человека // Современные проблемы и перспективы исследований клеточного ядра – материалы XIX Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра». Санкт-Петербург, 21–22 мая 2024 г. – С. 141.

2. Титова Е.В., Иванова О.Ю., Попова Е.Н., Дугина В.Б. Действие митохондриально- направленных антиоксидантов на нормальные и неопластически трансформированные фибробласты в культуре // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 46.

3. Титова Е.В., Иванова О.Ю., Попова Е.Н., Плетюшкина О.Ю., Дугина В.Б. Действие митохондриальных антиоксидантов на нормальные и трансформированные фибробласты в культуре // Цитология. – 2010. – Т. 52. – №3. – С. 265-266.

4. Титова Е.В., Иванова О.Ю., Домнина Л.В., Черняк Б.В., Дугина В.Б. Действие митохондриальных антиоксидантов на нормальные и трансформированные фибробласты в культуре // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54. – №2. – С. 28.

5. Titova E.V., Ivanova O.Yu, Dugina V.B. Mitochondria-targeted antioxidants are responsible for morphological and cell cycle changes in transformed human fibroblasts in cell culture // Super-resolution in different dimensions – international meeting on advanced microscopy. A.N. Belozersky institute of physico-chemical biology MSU. Moscow. 2-3 June 2015.

6. Titova E.V., Ivanova O.Yu., Popova E.N., Pletjushkina O.Yu., Dugina V.B. The effect of mitochondria-targeted antioxidants on normal and transformed fibroblasts in cell culture // the FEBS Journal. – 2010. – V. 277. – P. 302.

7. Titova E.V., Ivanova O.Yu., Popova E.N., Pletjushkina O.Yu., Dugina V.B. The effect of mitochondria-targeted antioxidants on normal and transformed fibroblasts in cell culture // Biological Motility. – 2010. – P. 288-289.

## 10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев Н.Б. Движение немышечных клеток и реорганизация актиновых микрофиламентов // Соровский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – №7. – С. 9–16.
2. Дугина В.Б., Шагиева Г.С., Копнин П.Б. Биологическая роль изоформ актина в клетках млекопитающих // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 6. – С. 747–758.
3. Дугина В.Б., Шагиева Г.С., Хромова Н.В., Копнин П.Б. Изоформы актина и неопл астическая трансформация // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т. 4. – № 1. – С. 8-16.
4. Титова Е.В., Шагиева Г.С., Дугина В.Б., Копнин П.Б. Роль киназы Aurora B в нормальных и опухолевых клетках // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 12. – С. 2435 – 2445.
5. Федорова М. А., Благовещенский И. Ю., Филимонов В. Б., Кулева Н. В. Неэнзиматическая модификация актина *in vitro* под влиянием факторов окислительного, гликоокислительного и нитрозактивного стрессов // Biological Communications. – 2006. – Т. 2. – С. 51-59.
6. Шагиева Г.С., Алиева И.Б., Шапонье К., Дугина В.Б. Различные роли изоформ актина в процессе деления эпителиальных клеток // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – № 9. – С. 1274-1284.
7. Abe H., Endo T., Yamamoto K., Obinata T. Sequence of cDNAs encoding actin depolymerizing factor and cofilin of embryonic chicken skeletal muscle: two functionally distinct actin-regulatory proteins exhibit high structural homology // Biochemistry. – 1990. – V. 29. – P. 7420–7425.
8. Adams J.M. and Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy // Oncogene. – 2007. – V. 26. – P. 1324–1337.
9. Agapova L.S., Chernyak B.V., Domnina L.V., Dugina V.B., Efimenko A.Y., Fetisova E.K., Ivanova O.Y., Kalinina N.I., Khromova N.V., Koptin B.P., Koptin P.B., Korotetskaya M.V., Lichinitser M.R., Lukashev A.L., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Skulachev M.V., Shagieva G.S., Stepanova E.V., Titova E.V., Tkachuk V.A., Vasiliev J.M., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 3. Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells // Biochemistry. (Mosc). – 2008. –V. 73. – P. 1300–1316.
10. Alexandrova A.Y., Dugina V.B., Paterson H., Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. Motility of intracellular particles in rat fibroblasts is greatly enhanced by phorbol ester and by over-expression of normal p21N-ras // Cell Motil. Cytoskeleton. – 1993. – V. 25. – P. 254–266.

11. Alexandrova A.Y., Kopnin P.B., Vasiliev J.M., Kopnin B.P. (2006). ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility // *Eexp. Cell Research*. – 2006. – V. 312. – P. 2066–2073.
12. Alsofyani AA, Nedjadi T. Gelsolin, an Actin-Binding Protein: Bioinformatic Analysis and Functional Significance in Urothelial Bladder Carcinoma // *Int J Mol Sci*. – 2023. – V. 24. – № 21. – P. 15763.
13. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – V. 90. – P. 7915–7922.
14. Ampe C., Markey F., Lindberg U., Vandekerckhove J. The primary structure of human platelet profilin: reinvestigation of the calf spleen profilin sequence // *FEBS Lett*. – 1988. – V. 228. – P. 17–21.
15. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol // *Cancer Cell*. – 2003. – V. 3. – P. 51–62.
16. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Muntyan M.S., Nepryakhina O.K., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Pustovidko A.V., Roginsky V.A., Rokitskaya T.I., Ruuge E.K., Saprunova V.B., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev I.V., Skulachev M.V., Sumbatyan N.V., Sviryaeva I.V., Tashlitsky V.N., Vassiliev J.M., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zamyatnin A.A. Jr., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies // *Biochemistry (Mosc)*. – 2008. – V. Dec. 73. – № 12. – P. 1273-87.
17. Archer H, Bar-Sagi D. Ras and Rac as Activators of Reactive Oxygen Species (ROS) // *GTPase Protoc*. New Jersey: Humana Press. – 2002. – V. 9. – P. 067–073.
18. Arora A.S., Huang H.L., Singh R., Narui Y., Suchenko A., Hatano T., Heissler S.M., Balasubramanian M.K, Chinthalapudi K. Structural insights into actin isoforms // *Elife*. – 2023. – T. 12. – P. e82015.
19. Athreya K., Xavier M. F. (2017). Antioxidants in the treatment of cancer // *Nutr. Cancer*. – 2017. – V. 69. – P. 1099–1104.
20. Bai Y., Zhao F., Wu T., Chen F., Pang X. Actin polymerization and depolymerization in developing vertebrates // *Front Physiol*. – 2023. – V. Sep. 8. – № 14. – P. 1213668.

21. Bakalova R., Semkova S., Ivanova D., Zhelev Z., Miller T., Takeshima T., et al. Selective targeting of cancerous mitochondria and suppression of tumor growth using redox-active treatment adjuvant // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2020. – P. 6212935.
22. Baldini E., Sorrenti S., E DA, et al. Aurora kinases: new molecular targets in thyroid cancer therapy // *Clin Ter.* – 2012. – V. 163. – P. e457-62.
23. Balta, E., Kramer, J., Samstag, Y.. Redox regulation of the actin cytoskeleton in cell migration and adhesion: on the way to a spatiotemporal view // *Front Cell Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – P. 618261.
24. Bansal S. and Tiwari S. Mechanisms for the temporal regulation of substrate ubiquitination by the anaphase-promoting complex/cyclosome // *Cell Div.* – 2019. – V. 14. – P. 1-18.
25. Barr A.R., Gergely F. Aurora-A: The maker and breaker of spindle poles // *J. Cell Sci.* – 2007. – V. 120. – P. 2987–2996.
26. Bayliss R., Sardon T., Vernos I., Conti E. Structural basis of aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle // *Mol. Cell.* – 2003. – V. 12. – P. 851–862.
27. Bedard K. and Krause K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology // *Physiological Reviews.* – 2007. – V. 87. – P. 245-313
28. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker // *Nat Immunol.* – 2011. – V. 12. – P. 715–723.
29. Berx G. and van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2009. – V. Dec. 1. – № 6. – P. a003129.
30. Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression // *Nature.* – 2004. – V. 432. – P. 332–337.
31. Bishop, J. D., and Schuniacher, J. M. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 27577-27580.
32. Bjorklund G., Dadar M., Aaseth J., Chirumbolo S. Thymosin beta4: A Multi-Faceted Tissue Repair Stimulating Protein in Heart Injury // *Curr. Med. Chem.* – 2020. – V. 27. – P. 6294–6305.
33. Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., Sykes C., Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility // *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94. – № 1. – P. 235–263.
34. Blanchoin L. and Pollard T.D. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profiling // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41 – P. 597–602.

35. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond // *Nat. Rev. Genet.* – 2005. – V. 6, – P. 611–622.
36. Bogen D., Wei J. S., Azorsa D. O. Ormanoglu P., Buehler E., Guha R., Keller J. M., Mathews Griner L. A., Ferrer M., Song Y. K., Liao H., Mendoza A., Gryder B. E., Sindri S., He, J., Wen X., Zhang S., Shern J. F., Yohe M. E., Taschner-Mandl S., Shohet J. M., Thomas C. J., Martin, S. E. Ambros P. F., and Khan J. Aurora B kinase is a potent and selective target in MYCN-driven neuroblastoma // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6. – P. 35247-35262.
37. Bora N. A. and Reddy, M. M. Aurora kinase B inhibition: a potential therapeutic strategy for cancer // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – P. 1981.
38. Borah N. A., Sradhanjali S., Barik M. R., Jha A., Tripathy D., Kaliki S., Rath S., Raghav S. K., Patnaik S., Mittal R., Reddy M. M. Aurora kinase B expression, its regulation and therapeutic targeting in human retinoblastoma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2021. – V. 62. – P. 16.
39. Bravo-Cordero J.J., Hodgson L., Condeelis J., 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2012. – V. 24. – № 2. – P. 277–283.
40. Broad, A. J., and DeLuca, J. G. The right place at the right time: Aurora B kinase localization to centromeres and kinetochores // *Essays Biochem.* – 2020. – T. 64. – P. 299-311.
41. Broad A.J., DeLuca K.F., DeLuca J.G. Aurora B kinase is recruited to multiple discrete kinetochore and centromere regions in human cells // *J. Cell Biol.* – 2020. – V. 219. - №. 3.
42. Budanov A.V., Sablina A.A., Feinstein E., Koonin E.V., Chumakov P.M. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD // *Science.* – 2004. – V. 304. – P. 596–600.
43. Bunnell T.M., Burbach B.J., Shimizu Y., Ervasti J.M.  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool // *Mol. Biol. Cell.* – 2011. – V. 22. – P. 4047–4058.
44. Burkhardt, D.L., and Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – V. 8. – 671–68.
45. Cagigas M.L., Bryce N.S., Ariotti N., Brayford S., Gunning P.W., Hardeman E.C. Correlative cryo-ET identifies actin/tropomyosin filaments that mediate cell-substrate adhesion in cancer cells and mechanosensitivity of cell proliferation // *Nat Mater.* – 2022 Jan. – V. 21. – №1. – P. 120-128.
46. Caino M.C., Seo J.H., Aguinaldo A., Wait E., Bryant K.G., Kossenkov A.V., Hayden J.E., Vaira V., Morotti A., Ferrero S. et al. A neuronal network of mitochondrial dynamics regulates metastasis // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 13730.

47. Cairns R.A., Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism // *Nat Rev Cancer.* – 2011. – V. 11. – P. 85–95.
48. Caldas G. V., DeLuca K. F., DeLuca J. G. KNL1 facilitates phosphorylation of outer kinetochore proteins by promoting Aurora B kinase activity // *J. Cell Biol.* – 2013. – V. 203. – P. 957-969.
49. Cameron J.M., Gabrielsen M., Chim Y.H., Munro J., McGhee E.J., Sumpton D., Eaton P., Anderson K.I., Yin H., Olson M.F. Polarized cell motility induces hydrogen peroxide to inhibit cofilin via cysteine oxidation // *Curr. Biol.* – 2015. – V. 25. – P. 1520–1525
50. Cao J., Schulte J., Knight A., Leslie N.R., Zagozdzon A., Bronson R., Manevich Y., Beeson C., Neumann C.A. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – P. 1505–1517.
51. Carlier M.F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G.X., Hong Y., Chua N.H., Pantaloni D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actinbased motility // *J Cell Biol.* – 1997. – V. 136. - P. 1307–1322
52. Carlier M.F. and Pantaloni D. Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATPactin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments // *Biochemistry.* – 1986. – V. 25. – P. 7789–7792.
53. Carlier M.F. and Shekhar S. Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2017. – V. 18. – P. 389–401.
54. Carman P.J., Barrie K.R., Rebowski G., Dominguez R. Structures of the free and capped ends of the actin filament // *Science.* – 2023. – V. 380. – P. 1287–1292.
55. Carmena M. and Earnshaw W.C. The cellular geography of Aurora kinases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 4. – P. 842–854.
56. Carmena M., Wheelock M., Funabiki H., Earnshaw W. C. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 13. – P. 789-803.
57. Cavallaro U. and Christofori G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – V. 4. – P. 118–132.
58. Cavalu S., Abdelhamid A.M., Saber S., Elmorsy E.A., Hamad R.S., Abdel-Reheim M.A., Yahya G., Salama M.M. Cell cycle machinery in oncology: A comprehensive review of therapeutic targets // *FASEB J.* – 2024. – V. 38. – № 11. – P. e23734.
59. Chan A.Y., Coniglio S.J., Chuang Y.Y., Michaelson D., Knaus U.G., Philips M.R., Symons M. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion // *Oncogene.* – 2005. – V. 24. – P. 7821–7829.

60. Chen A., Arora P.D., McCulloch C.A., Wilde A. Cytokinesis requires localized beta-actin filament production by an actin isoform specific nucleator // *Nat Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 1530.
61. Chen L., Tang H.-Y., Kashina A. Differential N-terminal processing of beta and gamma actin in vivo // *bioRxiv [Preprint]*. – 2021. – № 471626.
62. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of complex III // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 38. – P. 36027-36031
63. Cheng G., Zielonka J., McAllister D.M., Mackinnon A.C. Jr., Joseph J., Dwinell M.B., Kalyanaraman B. Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death // *BMC Cancer.* – 2013. – V. 13. – P. 285.
64. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion // *Mol. Cancer Res.* – 2008. – V. 6. – P. 1521–1533.
65. Chernyak B.V., Antonenko Y.N., Galimov E.R., Domnina L.V., Dugina V.B., Zvyagilskaya R.A., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Rogov A.G., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev M.V., Tashlitsky V.N., Titova E.V., Trendeleva T.A., Shagieva G.S. Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents: conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone // *Biochemistry (Mosc).* – 2012. – V. 77. – № 9. – P. 983-95.
66. Chesarone M.A., DuPage A.G., Goode B.L. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – T. 11. – P. 62–74.
67. Chieffi P., Cozzolino L., Kisslinger A., Libertini S., Staibano S., Mansueto G., De Rosa G., Villacci A., Vitale M., Linardopoulos S., Portella G., Tramontano D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation // *Prostate.* – 2006. – V. 66. – P. 326 333.
68. Chou E.J., Hung L.Y., Tang C.J., Hsu W.B., Wu H.Y., Liao P.C., Tang T.K. Phosphorylation of CPAP by aurora-A maintains spindle pole integrity during mitosis // *Cell Rep.* – 2016. – V. 14. – P. 2975–2987.
69. Chou S.Z. and Pollard T.D. Cryo-EM structures of both ends of the actin filament explain why the barbed end elongates faster than the pointed end // *bioRxiv [Preprint]*. – 2023. – № 540494.
70. Pollard T.D. and Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // *Cell.* – 2003. – V. 112. – № 4. – P. 453-65.

71. Christ L., Raiborg C., Wenzel E. M., Campsteijn C., Stenmark H. Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane scission machinery // *Trends Biochem. Sci.* – 2017. – V. 42. – P. 42-56.
72. Clarke D.N. and Martin A.C. Actin-based force generation and cell adhesion in tissue morphogenesis // *Curr Biol.* – 2021. – V. 31. – P. R667–R680.
73. Collado M. and Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – V. 10. – P. 51–57.
74. Cooper J.A., Buhle E.L. Jr., Walker S.B., Tsong T.Y., Pollard T.D. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization // *Biochemistry.* – 1983. – V. 22. – P. 2193–2202.
75. Coumans J.V.F., Davey R.J., Moens P.D.J. Cofilin and profilin: Partners in cancer aggressiveness // *Biophys. Rev.* – 2018. – V. 10. – P. 1323–1335.
76. Cross C.E., Halliwell B., Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M., Harman D. Oxygen radicals and human disease // *Annals of internal medicine.* – 1987. – V. 107. – P. 526–545.
77. Curto M., Cole B.K., Lallemand D., Liu C.H., McClatchey A.I. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin // *J Cell Biol.* – 2007. – V. 177. – № 5. – P. 893-903.
78. Dantas M., Lima J.T., Ferreira J.G. Nucleus- cytoskeleton crosstalk during mitotic entry // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 649899.
79. Davies B. A., Babst M., Katzmann D.J. Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis // *Traffic.* – 2011. – V. 12. – № 10. – P. 1298-305.
80. De La Cruz E.M. and Pollard T.D. Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 5452–5461.
81. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation // *Cell Metab.* – 2008. – V. 7. – P. 11–20.
82. DeMali K.A., Barlow C.A., Burridge K. Recruitment of the Arp 2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 159. – P. 881-891.
83. Den Hollander J., Rimpi S., Doherty J. R., Rudelius M., Buck A., Hoellein A., Kremer M., Graf N., Scheerer M., Hall M. A., Goga A., von Bubnoff N., Duyster J., Peschel C., Cleveland J. L., Nilsson J. A., Keller, U. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state // *Blood.* – 2010. – V. 116. – P. 1498 1505.

84. DeNicola G.M., Karreth F.A., Humpton T.J., Gopinathan A., Wei C., Frese K., Mangal D., Yu K.H., Yeo C.J., Calhoun E.S. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis // *Nature*. – 2011. – V. 475. – P. 106–109.
85. Derynck R., Zhang Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling // *Nature*. – 2003. – V. 425. – P. 577–84.
86. Desai, S.P.; Bhatia, S.N.; Toner, M.; Irimia, D. Mitochondrial localization and the persistent migration of epithelial cancer cells // *Biophys. J.* – 2013. – V. 104. – P. 2077–2088.
87. Didry D., Carlier M.F., Pantaloni D. Synergy between actin depolymerizing factor cofilin and profilin in increasing actin filament turnover // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 25602–25611.
88. Ding L., Cao J., Lin W., Chen H., Xiong X., Ao H., Yu M., Lin J., Cui Q. The roles of cyclin- dependent kinases in cell- cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 1960.
89. Dominguez R. Actin-binding proteins – a unifying hypothesis // *Trends Biochem Sci.* – 2004. – V. 29. – P. 572–578.
90. Dominguez R. and Holmes K.C. Actin structure and function // *Annu Rev Biophys.* – 2011. – V. 40. – P. 169–186.
91. Dong X., Han Y., Sun Z., Xu J. Actin gamma 1, a new skin cancer pathogenic gene, identified by the biological featurebased classification // *J. Cell. Biochem.* – 2018. – V. 119. – P. 1406-1419.
92. dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments // *Physiol Rev.* – 2003. – V. 83. – № 2. – P. 433-73.
93. Drazic A., Aksnes H., Marie M., Boczkowska M., Varland S., Timmerman E., Foyn H., Glomnes N., Rebowski G., Impens F., Gevaert K., Dominguez R., Arnesen T. NAA80 is actin's N-terminal acetyltransferase and regulates cytoskeleton assembly and cell motility // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. – V. 115. – P. 4399–4404.
94. Dugina V., Alexandrova A., Chaponnier C., Vasiliev J., Gabbiani G. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization // *Exp Cell Res.* – 1998. – V. 238. – № 2. – P. 481-90.
95. Dugina V., Alieva I., Khromova N., Kireev I., Gunning P. W., Kopnin P. Interaction of microtubules with the actin cytoskeleton via cross talk of EB1containing +TIPs and actin in epithelial cells // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – P. 72699-72715.

96. Dugina V., Gabbiani G., Chaponnier C. Cytoplasmic Actins  $\beta$  and  $\gamma$  are Differentially Distributed in Stationary and Motile Cells // *Wound Repair and Regeneration*. – 2005. – V. 13. – № 1. – P. A19.
97. Dugina V., Fontao L., Chaponnier C., Vasiliev J., Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114. – P. 3285-3286.
98. Dugina V., Khromova N., Rybko V., Blizniukov O., Shagieva G., Chaponnier C., Kopnin B., Kopnin P. Tumor promotion by  $\gamma$  and suppression by  $\beta$  non muscle actin isoforms // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – P. 14556-14571.
99. Dugina V.B., Shagieva G.S., Kopnin P.B. Cytoplasmic Beta and Gamma Actin Isoforms Reorganization and Regulation in Tumor Cells in Culture and Tissue // *Front Pharmacol.* – 2022. – V. 26. – № 13. – P. 895703.
100. Dugina V.B., Shagieva G.S., Shakhov A.S., Alieva I.B. The cytoplasmic actins in the regulation of endothelial cell function // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 7836.
101. Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clement S., Chaponnier C. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity // *J Cell Sci.* – 2009. – V.122. – P. 2980–2988.
102. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol Pathol.* – 2007. – V. 35. – № 4. – P. 495-516.
103. Eot-Houllier G., Magnaghi-Jaulin L., Fulcrand G., Moyroud F.X., Monier S., Jaulin C. Aurora A-dependent CENP-A phosphorylation at inner centromeres protects bioriented chromosomes against cohesion fatigue // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – P. 1888.
104. Estes J.E., Selden L.A., Kinosian H.J., Gershman L.C. Tightly-bound divalent cation of actin // *J Muscle Res Cell Motil.* – 1992. – V. 13. – P. 272–284.
105. Failes T. W., Mitic G., Abdel-Halim H., Po'uha S. T., Liu M., Hibbs D. E., Kavallaris M. Evolution of resistance to Aurora kinase B inhibitors in leukaemia cells // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – P. e30734.
106. Feniouk B.A., Skulachev V.P. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants // *Curr. Aging Sci.* – 2017. – V. 10. – № 1. – P. 41–48.
107. Fernandez-Miranda G., Trakala M., Martin J., Escobar B., González A., Ghyselinck N.B., Ortega S., Cañamero M., Pérez de Castro I., Malumbres M. Genetic disruption of aurora B uncovers an essential role for aurora C during early mammalian development // *Development*. – 2011. – V. 138. – P. 2661–2672.
108. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 789–791.

109. Finkel T. From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate // *Sci Signal.* – 2012. – V. 5. – P. 10.
110. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species // *J Cell Biol.* – 2011. – V. 194. – P. 7–15.
111. Finkel T. and Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // *Nature.* – 2000. – V. 408. – P. 239-247.
112. Fruehauf J.P. and Meyskens F.L. Reactive oxygen species: a breath of life or death? // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – V. 13. – P. 789–794.
113. Fu J., Bian M., Jiang Q., Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis // *Mol. Cancer Res.* – 2007. – V. 5. – P. 1-10.
114. Ganesh J. M., P P., Dharmarajan A., Warriar S., Gandhirajan R. K. Modulation of reactive oxygen species in cancers: Recent advances // *Free Radic. Res.* – 2022. – V.56. – P. 447–470.
115. Gao P., Zhang H., Dinavahi R., Li F., Xiang Y., Raman V., Bhujwalla Z.M., Felsner D.W., Cheng L., Pevsner J. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo // *Cancer Cell.* – 2007. – V. 12. – P. 230–238.
116. Garrels J.I., Gibson W. Identification and characterization of multiple forms of actin // *Cell.* – 1976. – V. 9. – №4. – Pt 2. – P. 793–805.
117. Gisselsson D. Classification of chromosome segregation errors in cancer // *Chromosoma.* – 2008. – V. 117. – P. 511-519.
118. Glover D.M.; Leibowitz M.H.; McLean D.A.; Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles // *Cell.* – 1995. – V. 81. – P. 95–105.
119. Glyakina A.V., Galzitskaya O.V. Bioinformatics Analysis of Actin Molecules: Why Quantity Does Not Translate Into Quality? // *Front Genet.* – 2020. – V. 10. – № 11. – P. 617763.
120. Glyakina A.V., Surin A.K., Grishin S.Y., Selivanova O.M., Suvorina M.Y., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Galzitskaya O.V. New Model for Stacking Monomers in Filamentous Actin from Skeletal Muscles of *Oryctolagus cuniculus* // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 8319.
121. Goldschmidt-Clermont P.J., Furman M.I., Wachsstock D., Safer D., Nachmias V.T., Pollard T.D. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells // *Mol Biol Cell.* – 1992. – V. 3. – P. 1015–1024.

122. Goldschmidt-Clermont P.J., Machesky L.M., Balassare J.J., Pollard T.D. The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C // *Science*. – 1990. – V. 247. – P. 1575–1578.
123. González-Loyola A., Fernández-Miranda G., Trakala M., Partida D., Samejima K., Ogawa H., Cañamero M., de Martino A., Martínez-Ramírez Á., de Cárcer G., Pérez de Castro I., Earnshaw W. C., Malumbres, M. Aurora B overexpression causes aneuploidy and p21Cip1 repression during tumor development // *Mol. Cell. Biol.* – 2015. – V. 35. – P. 3566-3578.
124. Gonzalez F., Gottlieb E. Cardiolipin: setting the beat of apoptosis // *Apoptosis*. – 2007. – V. 12. – № 5. – P. 877–885.
125. Gorrini C., Harris I.S., Mak T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy // *Nature reviews Drug discovery*. – 2013. – V. 12. – P. 931–947.
126. Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E. A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K., and Inagaki, M. Aurora-B regulates the cleavage furrow specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 8526-8530.
127. Graceffa P. and Dominguez R. Crystal structure of monomeric actin in the ATP state: structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 36. – P. 34172–34180.
128. Grazi E. and Trombetta G. Effects of temperature on actin polymerized by  $Ca^{2+}$  // *Biochem J.* – 1985. – V. 232. – P. 297–300.
129. Gully C.P., Zhang F., Chen J., Yeung J.A., Velazquez-Torres G., Wang E., Yeung S.C., Lee M.H. Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer // *Mol. Cancer*. – 2010. – V. 9. – P. 42.
130. Gully C. P., Velazquez-Torres G., Shin J. H., Fuentes-Mattei E., Wang E., Carlock C., Chen J., Rothenberg D., Adams H. P., Choi H. H., Guma S., Phan L., Chou P. C., Su C. H., Zhang F., Chen J. S., Yang T. Y., Yeung S. C. J., Lee M. H. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – V. 109, - P. e1513-e1522.
131. Gunning P., Ponte P., Kedes L., Eddy R., Shows T. Chromosomal location of the co-expressed human skeletal and cardiac actin genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1984. – V. 81. – № 6. – P. 1813–7.
132. Gupta S., Stanbridge E.J. Paired human fibrosarcoma cell lines that possess or lack endogenous mutant N-ras alleles as experimental model for Ras signaling pathways // *Methods Enzymol.* – 2001. – V. 333. – P. 290–306.

133. Gupta S., Stuffrein S., Plattner R., Tencati M., Gray C., Whang Y.E., Stanbridge E.J. Role of phosphoinositide 3-kinase in the aggressive tumor growth of HT1080 human fibrosarcoma cells // *Mol Cell Biol.* – 2001. – V. 21. – № 17. – P. 5846-56.
134. Guzman-Villanueva D., Weissig V. Mitochondria-Targeted Agents: Mitochondriotropics, Mitochondriotoxics, and Mitocans // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2017. – V. 240. – P. 423–438.
135. Hadders M. A., Hindriksen S., Truong M. A., Mhaskar A. N., Pepijn Wopken J., Vromans M. J. M., Lens S. M. A. Untangling the contribution of Haspin and Bub1 to Aurora B function during mitosis // *J. Cell Biol.* – 2020. – V. 219. – P. e201907087.
136. Hampton M.B., Fadeel B., Orrenius S. Redox regulation of the caspases during apoptosis // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1998. – V. 854. – P. 328–335.
137. Halder D., Mallick D., Chatterjee A., Jana S.S. Nonmuscle Myosin II in cancer cell migration and mechanotransduction // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2021. – V. 139. – P. 106058.
138. Han E.H., Min J.-Y., Yoo S.-A., et al. A small-molecule inhibitor targeting the AURKCI $\kappa$ B $\alpha$  interaction decreases transformed growth of MDA-MB-231 breast cancer cells // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – P. 69691-69708.
139. Hanahan D. and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis // *Cell.* – 1996. – V. 86. – P. 353–364.
140. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. – V. 144. – № 5. – P. 646-74.
141. Haren L., Remy M.H., Bazin I., Callebaut I., Wright M., Merdes A. Nedd1-dependent recruitment of the  $\gamma$ -tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 172. – P. 505–515.
142. Hart R.G., Kota D., Li F., Zhang M., Ramallo D., Price A.J., Otterpohl K.L., Smith S.J., Dunn A.R., Husing M.O., Liu J., Chandrasekar I. Myosin II tension sensors visualize force generation within the actin cytoskeleton in living cells // *J Cell Sci.* – 2024. – V. 4. – P. 262281.
143. Hauf S., Cole R.W., LaTerra S., et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint // *J. Cell Biol.* – 2003. – V. 161. – P. 281–294.
144. Hegyi G., Szilagyi L., Belagyi J. Influence of the bound nucleotide on the molecular dynamics of actin // *Eur J Biochem.* – 1988. – V. 175. – P. 271–274.
145. Heissler S.M., Chinthalapudi K. Structural and functional mechanisms of actin isoforms // *FEBS J.* – 2025. – V. 292. – № 3. – P. 468-482.

146. Hezel A.F. and Bardeesy N. LKB1; linking cell structure and tumor suppression // *Oncogene*. – 2008. – V. 27. – P. 6908–6919.
147. Hindriksen S., Lens S., Hadders M. A. The ins and outs of Aurora B inner centromere localization, *Front // Cell Dev. Biol.* – 2017. – V. 5. – P. 112.
148. Hinz B., Dugina V., Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts // *Mol. Biol. Cell*. – 2003. – V. 14. – № 6. – P. 2508-2519.
149. Hinz B., Gabbiani G., Chaponnier C. The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo // *J Cell Biol.* – 2002 – V.157. – P. 657-663.
150. Holmes K.C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. Atomic model of the actin filament // *Nature*. – 1990. – V. 347. – P. 44–49.
151. Honda R., Körner R., Nigg E. A. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis // *Mol. Biol. Cell*. – 2003. – V. 14. – P. 3325-3341.
152. Hong K.O., Lee J.I., Hong S.P., Hong S.D. Thymosin beta4 induces proliferation, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma // *Amino Acids*. – 2016. – V. 48. – P. 117–127.
153. Hordijk P.L. Regulation of NADPH Oxidases: The Role of Rac Proteins // *Circulation Research*. – 2006. – V. 98. – P. 453-462.
154. Huang D., Huang Y., Huang Z., Weng J., Zhang S., Gu W. Relation of AURKB over expression to low survival rate in BCRA and reversine modulated aurora B kinase in breast cancer cell lines // *Cancer Cell Int*. – 2019. – V. 19. – P. 166.
155. Hume S., Dianov G.L., Ramadan K. A unified model for the G1/S cell cycle transition // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – V. 48. – P. 12483-12501.
156. Huschtscha L.I. and Holliday R. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts // *J. Cell Sci*. – 1983. – V. 63. – P. 77-99
157. Icard P., Fournel L., Wu Z., Alifano M., Lincet H. Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer // *Trends Biochem Sci*. – 2019. – V. 44. – P. 490-501.
158. Ikushima, H., and Miyazono, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression // *Nat. Rev. Cancer*. – 2010. – V. 10. – P. 415–424.
159. Illescas M., Peñas A., Arenas J., Martín M.A., Ugalde C. Regulation of Mitochondrial Function by the Actin Cytoskeleton // *Front Cell Dev Biol*. – 2021. – V. 21. - № 9. – P. 795838.

160. Irani K., Xia Y., Zweier J.L., SolloTT S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P.J. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts // *Science*. – 1997. – V. 275. – P. 1649–1652.
161. Jaramillo M.C., Zhang D.D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer // *Genes Dev*. – 2013. – V. 27. – P. 2179–2191.
162. Jiang B.H., and Liu, L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis // *Adv. Cancer Res*. – 2009. – V. 102. – P. 19–65.
163. Johnston A.B., Hilton D.M., McConnell P., Johnson B., Harris M.T., Simone A., Amarasinghe G.K., Cooper J.A., Goode B.L. A novel mode of capping protein-regulation by twinfilin // *Elife*. – 2018. – V. 7. – P. e41313.
164. Joukov V., Walter J.C., De Nicolo A. The CEP192-organized aurora A-Plk1 cascade is essential for centrosome cycle and bipolar spindle assembly // *Mol. Cell*. – 2014. – V. 55. – P. 578–591.
165. Kaishang Z., Xue P., Shaozhong Z., Yingying F., Yan Z., Chanjun S., Zhenzhen L., Xiangnan L. Elevated expression of Twinfilin-1 is correlated with inferior prognosis of lung adenocarcinoma // *Life Sci*. – 2018. – V. 215. – P. 159–169.
166. Jones R.G. and Thompson C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth // *Genes Dev*. – 2009. – V. 23. – P. 537–548.
167. Joseph R., Srivastava O.P., Pfister R.R. Downregulation of  $\beta$ -actin and its regulatory gene HuR affect cell migration of human corneal fibroblasts // *Mol. Vis*. 2014. – V. 20. – P. 593–605.
168. Joukov V.; De Nicolo A.; Rodriguez A.; Walter J.C.; Livingston D.M. Centrosomal protein of 192 kDa (Cep192) promotes centrosome-driven spindle assembly by engaging in organelle-specific aurora A activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – V. 107. – P. 21022–21027.
169. Junttila M.R. and Evan G.I. p53—a Jack of all trades but master of none // *Nat. Rev. Cancer*. – 2009. – V. 9. – P. 821–829.
170. Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F., Holmes K.C. Atomic structure of the actin: DNase I complex // *Nature*. – 1990. – V. 347. – P. 37–44.
171. Kalo A., Kanter I., Shraga A., Sheinberger J., Tzemach H., Kinor N., Singer R.H., Lionnet T., Shav-Tal Y. Cellular levels of signaling factors are sensed by  $\beta$ -actin alleles to modulate transcriptional pulse intensity // *Cell Rep*. – 2015. – V. 11. – P. 419–432.
172. Kazerounian S., Yee K.O., Lawler J. Thrombospondins in cancer // *Cell. Mol. Life Sci*. – 2008. – V. 65. – P. 700–712.

173. Khalil K., Eon A., Janody F. Cell Architecture-Dependent Constraints: Critical Safeguards to Carcinogenesis // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23. - № 15. – P. 8622.
174. Khromova N., Vasileva M., Dugina V., Kudlay D., Chumakov P., Boichuk S., Kopnin P. Actin-Dependent Mechanism of Tumor Progression Induced by a Dysfunction of p53 Tumor Suppressor // *Cancers (Basel).* – 2024. – V. 16. - № 6. – P. 1123.
175. Kim J., Cheong J.H. Role of Mitochondria-Cytoskeleton Interactions in the Regulation of Mitochondrial Structure and Function in Cancer Stem Cells // *Cells.* – 2020. – V. 9. - № 7. – P. 1691.
176. Kim J. H., Choi T. G., Park S., Yun H. R., Nguyen N. N. Y., Jo Y. H., et al. Mitochondrial ROS-derived PTEN oxidation activates PI3K pathway for mTOR-induced myogenic autophagy // *Cell Death Differ.* – 2018, - V. 25. – P. 1921–1937.
177. Kimura M., Matsuda Y., Yoshioka T., Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3 // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 7334-7340.
178. Koide Y., Urano Y., Kenmoku S., Kojima H., and Nagano. Design and synthesis of fluorescent probes for selective detection of highly reactive oxygen species in mitochondria of living cells // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. - № 34. – P. 10324-10325.
179. Kousholt A.N., Menzel T., Sørensen C.S. Pathways for genome integrity in G2 phase of the cell cycle // *Biomolecules.* – 2012. – V. 2. – P. 579-607.
180. Krenn V. and Musacchio A. The Aurora B kinase in chromosome bi-orientation and spindle checkpoint signaling // *Front. Oncol.* – 2015. – V. 5. – P. 225.
181. Kueh H.Y., Mitchison T.J. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics // *Science* – 2009 – V. 325. – P. 960-963.
182. Kunda P., Baum B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning // *Trends Cell Biol.* – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 174-9.
183. Kunitoku N., Sasayama T., Marumoto T., Zhang D., Honda S., Kobayashi O., Hatakeyama K., Ushio Y., Saya H., Hirota T. CENP-A phosphorylation by aurora-A in prophase is required for enrichment of aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function // *Dev. Cell.* – 2003. – V. 5. – P. 853–864.
184. Labat-de-Hoz L., Jimenez M.A., Correas I., Alonso M.A. Regulation of formin INF2 and its alteration in INF2-linked inherited disorders // *Cell Mol. Life Sci.* – 2024. – T. 81. – № 1. – P. 463.
185. Leal-Esteban L.C., Fajas L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism // *Biochim Biophys Acta Mol basis Dis.* – 2020. – V. 1866. – P. 165715.

186. Leavitt J., Gunning P., Kedes L. et al. Smooth muscle alpha-action is a transformation-sensitive marker for mouse NIH 3T3 and Rat-2 cells // *Nature* – 1985 – V.316. – P. 840-842.
187. Leavitt, J., Ng, S. Y., Aebi, U., Varma, M., Latter, G., Burbeck, S., Kedes, L., and Gunning, P. Expression of transfected mutant betaactin genes: alterations of cell morphology and evidence for autoregulation in actin pools // *Mol. Cell. Biol.* – 1987. – V. 7. – P. 2457-2466.
188. Li T., Kon N., Jiang L., Tan M., Ludwig T., Zhao Y., Baer R., Gu W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence // *Cell.* – 2012. – V. 149. – P. 1269–1283.
189. Littlepage L.E. and Ruderman J.V. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – P. 2274–2285.
190. Lowe S.W., Ceper E., Evan G. Intrinsic tumour suppression // *Nature.* – 2004. – V. 432. – P. 307–315.
191. Lue H.W., Podolak J., Kolahi K., Cheng L., Rao S., Garg D., Xue C.H., Rantala J.K., Tyner J.W., Thornburg K.L. Metabolic reprogramming ensures cancer cell survival despite oncogenic signaling blockade // *Genes Dev.* – 2017. – V. 31. – P. 2067–2084.
192. Luo J., Solimini N. L., Elledge S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction // *Cell.* – 2009. – V. 136. – P. 823–837.
193. MacTaggart B. and Kashina A. Posttranslational modifications of the cytoskeleton // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2021. – V. 78. – P. 142–173.
194. Magnaghi-Jaulin L., Eot-Houllier G., Gallaud E., Giet R. Aurora A Protein Kinase: To the Centrosome and Beyond // *Biomolecules.* – 2019. – V. 9. - № 1. – P. 28.
195. Marumoto T., Honda S., Hara T. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 51786–51795.
196. Massagué J., Sheppard D. TGF- $\beta$  signaling in health and disease // *Cell.* – 2023. – V. 186. - № 19. – P. 4007-4037.
197. Matos P., Pereira J.F.S., Jordan P. Targeting Cancer by Using Nanoparticles to Modulate RHO GTPase Signaling // *Adv Exp Med Biol.* – 2022. – V. 1357. – P. 115-127.
198. McAllister R.M., Melnyk J., Finklestein J.Z. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma // *Cancer.* – 1969. – V. 24. – P. 520–526.
199. McVey S. L., Cosby J. K., Nanna N. J. Aurora B tension sensing mechanisms in the kineto chore ensure accurate chromosome segregation // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 8818.

200. Meenakshi S.I., Rao M., Mayor S., Sowdhamini R. A census of actin-associated proteins in humans // *Front Cell Dev Biol.* – 2023. – V. 11. – P. 1168050.
201. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* – 2010. – V. 15. - P 117–134.
202. Mierzwa B. and Gerlich D. W. Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control // *Dev. Cell.* – 2014. – V. 31. – P. 525-538.
203. Mishra R. Cell cycle- regulatory cyclins and their deregulation in oral cancer // *Oral Oncol.* – 2013. – V. 49. – P. 475-481.
204. Modica-Napolitano J.S., Aprille J.R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – V. 49. – P. 63–70.
205. Mooi W.J., Peeper D.S. Oncogene-induced cell senescence-halting on the road to cancer // *N Engl J Med.* – 2006. – V. 355. - № 10. – P. 1037-46.
206. Muller M., Diensthuber R.P., Chizhov I., Claus P., Heissler S.M., Preller M., Taft M.H., Manstein D.J. Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – P. e70636.
207. Murakami K., Yasunaga T., Noguchi T.Q., Gomibuchi Y., Ngo K.X., Uyeda T.Q., Wakabayashi T. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release // *Cell.* – 2010. – V.143. – P. 275-287.
208. Murphy D.B., Gray R.O., Grasser W.A., Pollard T.D. Direct demonstration of actin filament annealing in vitro // *J. Cell Biol.* – 1988 – V.106. – P.1947-1954.
209. Namba Y., Ito M., Zu Y., Shigesada K., Maruyama K. Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner // *J Biochem.* – 1992. – V. 112. – P. 503–507.
210. Neidl C. and Engel J. Exchange of ADP, ATP and 1,N-ethenoadenosine 5'-triphosphate on G-actin. Equilibrium and kinetics // *Eur. J. Biochem.* – 1979. – V. 101. – P. 163–169
211. Nietmann P., Kaub K., Suchenko A., Stenz S., Warnecke C., Balasubramanian M.K., Janshoff A. Cytosolic actin isoforms form networks with different rheological properties that indicate specific biological function // *Nat Commun.* – 2023. – V. 14. – P. 7989.
212. Nogueira V., Park Y., Chen C., Xu P., Chen M., Tonic I., Unterman T., Hay N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis // *Cancer Cell.* – 2008. – V. 14. – P. 458–470.
213. Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maeda Y., Narita A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition // *Nature.* – 2009. – V. 457. – P. 441–445.

214. Okada T., Lopez-Lago M., Giancotti F.G. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane // *J. Cell Biol.* – 2005. – V. 171 – P. 361–371.
215. Okamoto-Inoue M., Taniguchi S., Sadano H., Kawano T., Kimura G., Gabbiani G., Baba T. Alteration in expression of smooth muscle alpha-actin associated with transformation of rat 3Y1 cells // *J. Cell Sci.* – 1990. – V. 96. – P. 631–637.
216. Oosawa F., Asakura S., Hotta K., Ooi T. G-F transformation of actin as a fibrous condensation // *J Polymer Sci.* – 1959. – V. 37. – P. 323–326.
217. Oosterheert W., Klink B.U., Belyy A., Pospich S., Raunser S. Structural basis of actin filament assembly and aging // *Nature.* – 2022. – V. 611. - № 7935. – P. 374–379.
218. Otey C.A., Kalnoski M.H., Bulinski J.C. Identification and quantification of actin isoforms in vertebrate cells and tissues // *J Cell Biochem.* – 1987. – V. 34, 113–124.
219. Ott A., Magnasco M., Simon A., Libchaber A. Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy // *Phys.Rev.* – 1993. – V. 48. – P. 1642–1645.
220. Paavilainen V.O., Bertling E., Falck S., Lappalainen P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins // *Trends Cell Biol.* – 2004. – V. 14. – P. 386–394.
221. Partanen J.I., Niemine A.I., Klefstrom J. 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc // *Cell Cycle.* – 2009. – V. 8. – P. 716–724.
222. Paterson H., Reeves B., Brown R. Activated N-ras controls the transformed phenotype of HT1080 human fibrosarcoma cells // *Cell.* – 1987. – V. 51. – P. 803–812.
223. Peinado H., Marin F., Cubillo E., Stark H.J., Fusenig N., Nieto M.A., Cano A. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo // *J. Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – P. 2827–2839.
224. Perez L.M., Milkiewicz P., Ahmed-Choudhury J., Elias E., Ochoa J.E., Sánchez Pozzi E.J., Coleman R., Roma M.G. Oxidative stress induces actin-cytoskeletal and tight-junctional alterations in hepatocytes by a Ca<sup>2+</sup> -dependent, PKC-mediated mechanism: protective effect of PKA // *Free Radic Biol Med.* – 2005. – V. 40. – P. 17.
225. Perrin B.J. and Ervasti J.M. The actin gene family: function follows isoform // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2010. – V. 67. – P. 630–634.
226. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – V. 25. – P. 1605–1612.

227. Petsalaki E. and Zachos G. Clks 1, 2 and 4 prevent chromatin breakage by regulating the Aurora B-dependent abscission checkpoint // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 11451.
228. Pinyol R., Scrofani J., Vernos I. The role of NEDD1 phosphorylation by aurora A in chromosomal microtubule nucleation and spindle function // *Curr. Biol.* – 2013. – V. 23. – P. 143–149.
229. Plessner M., Knerr J., Grosse R. Centrosomal Actin Assembly Is Required for Proper Mitotic Spindle Formation and Chromosome Congression // *iScience.* – 2019. – V. 15. – P. 274-281.
230. Pletjushkina O.J., Belkin A.M., Ivanova O.J., Oliver T., Vasiliev J.M., Jacobson K. Maturation of cell-substratum focal adhesions induced by depolymerization of microtubules is mediated by increased cortical tension // *Cell Adhes Commun.* – 1998. – V. 5. - № 2. – P. 121-35.
231. Pletushkina O.Yu., Lyamzaev K.G., Popova E.N., Nepryakhina O.K., Ivanova O.Yu., Domnina L.D., Chernyak B.V., Skulachev V.P. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum // *BBA.* – 2006. – V. 1757. – P. 518-524.
232. Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Chupyrkina A. A., Danshina M. I., Jankauskas S. S., Morosanova M. A., Stelmashook E. V., Vasileva A. K., Goryacheva E. S., Pirogov Y. A., Isaev N. K., Zorov D. B. New-generation Skulachev ions exhibiting nephroprotective and neuroprotective properties // *Biochemistry (Moscow).* – 2010. – V. 75. – P. 145-150.
233. Pohl, A., Azuma, M., Zhang, W., Yang, D., Ning, Y., Winder, T., Danenberg, K., and Lenz, H. J. Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer // *Pharmacogenom. J.* – 2011. – V. 11. – P. 93-99.
234. Pokorna E., Jordan P. W., O'Neill C. H., Zicha D., Gilbert C. S., Vesely P. Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1994. – V. 28. – P. 2533.
235. Pollard T.D. Actin and actin-binding proteins // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2016. – V. 8. – P. a018226.
236. Pollard T.D, Cooper J.A. Actin, a central player in cell shape and movement // *Science.* – 2009. – V. 326. - № 5957. – P. 1208–1212.
237. Polyak K. and Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – V. 9. – P. 265–273.
238. Poolard T.D. and Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // *Cell.* – 2003. – V. 112. – P. 453-465.

239. Popova E.N., Domnina L.V., Ivanova O.Yu., Izyumov D.S., Dugina V.B., Pletjushkina O.Yu., Chernyak B.V., Vasiliev Ju.M. MitoQ induced miofibroblast differentiation of human fibroblasts // *Biochim. Biophys. Acta, suppl.* – 2006. – V. 14. – P. 433.
240. Popova E.N., Pletjushkina O.Y., Dugina V.B., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 13. - № – P. 1297-1307.
241. Poukkula M., Kremneva E., Serlachius M., Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor homology domain: A conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics // *Cytoskeleton.* – 2011. – V. 68. – P. 471–490.
242. Rajan S., Terman J.R., Reisler E. MICAL-mediated oxidation of actin and its effects on cytoskeletal and cellular dynamics // *Front Cell Dev Biol.* – 2023. – V. 11. – P. 1124202.
243. Rao J., Li N. Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2004. – V. 4. - № 4. – P. 345-54.
244. Rao V.A., Klein S.R., Bonar S.J., et al. The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitoquinone // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 34447–34459.
245. Raynaud C.M., Hernandez J., Llorca F.P., Nuciforo P., Mathieu M.C., Commo F., Delalogue S., Sabatier L., Andre F., Soria J.C. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer // *Am. J. Clin. Oncol.* – 2010. – V. 33. – P. 341–345.
246. Rebowski G., Boczkowska M., Drazic A., Ree R., Goris M., Arnesen T., Dominguez R. Mechanism of actin N-terminal acetylation // *Sci Adv.* – 2020. – T. 6. – P. 8793.
247. Reymann A.C., Staniscia F., Erzberger A., Salbreux G., Grill S.W. Cortical flow aligns actin filaments to form a furrow // *Elife.* – 2016. – V. 5. – P. e17807.
248. Rhee S. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling // *Science.* – 2006. – V. 312. – P. 1882–1883.
249. Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling // *Cell.* – 1992. – V. 70. – P. 401–410.
250. Rouyere C., Serrano T., Fremont S., Echard A. Oxidation and reduction of actin: Origin, impact in vitro and functional consequences in vivo // *Eur J Cell Biol.* – 2022. V – 101. - № 3. – P. 151249.

251. Rubenstein P.A. The functional importance of multiple actin isoforms // *Bioessays*. – 1990. – V. 12. – P. 309–15.
252. Rubtsova S.N., Kondratov R.V., Kopnin P.B., Chumakov P.M., Kopnin B.P., Vasiliev J.M. Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53 // *FEBS Lett*. – 1998. – V. 430. - № 3. – P. 353-7.
253. Sabharwal S., Schumacker P. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? // *Nat Rev Cancer*. – 2014. – V. 14. – P. 709–721.
254. Sahai E. and Marshall C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – V. 5. – P. 711-719.
255. Sasai K., Katayama H., Hawke D. H., Sen S. Aurora-C interactions with survivin and INCENP reveal shared and distinct features compared with Aurora-B chromosome passenger protein complex // *PLoS One*. – 2016. – V. 11. – P. e0157305.
256. Satyanarayana A., Kaldis P. Mammalian cell- cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms // *Oncogene*. - 2009. – V. 28. – P. 2925-2939.
257. Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2005. – V. 38. – P. 995-1014.
258. Schaks M., Giannone G., Rottner K. Actin dynamics in cell migration // *Essays Biochem*. – 2019. – V. 63. – P. 483–495.
259. Schecher S., Walter B., Falkenstein M., Macher Goepfinger S., Stenzel P., Krümpelmann K., Hada schik B., Perner S., Kristiansen G., Duensing S., Roth W., Tagscherer K. E. Cyclin K dependent regulation of Aurora B affects apoptosis and proliferation by induction of mitotic catastrophe in prostate cancer // *Int. J. Cancer*. – 2017. – V. 141. – P. 1643-1653.
260. Schmidt E.J., Funes S., McKeon J.E., Morgan B.R., Boopathy S., O'Connor L.C., Bilsel O., Massi F., Jegou A., Bosco D.A. ALS-linked PFN1 variants exhibit loss and gain of functions in the context of formin-induced actin polymerization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2021. – V. 118. – P. e2024605118.
261. Schonichen A., Geyer M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins // *Biochim. Biophys. Acta. – Mol. Cell Res.* – 2010. – V. 1803. – P. 152–163.
262. Sellers J.R. Myosins: a diverse superfamily // *Biochim Biophys Acta*. – 2000. – V. 1496. P. 3–22.

263. Seru R., Mondola P., Damiano S. et al. HaRas activates the NADPH oxidase complex in human neuroblastoma cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway // *J. Neurochem.* – 2004. – V. 91. – P. 613–622.
264. Severina I.I., Severin F.F., Korshunova G.A. et al. In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: Thymoquinone and its cationic derivatives // *FEBS Lett.* – 2013. – V. 587. – P. 2018–2024.
265. Shagieva G., Domnina L., Makarevich O., Chernyak B., Skulachev V., Dugina V. Depletion of mitochondrial reactive oxygen species downregulates epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer cells // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – P. 4901–4913.
266. Shagieva G.S., Domnina L.V., Chipysheva T.A., Ermilova V.D., Chaponnier C., Dugina V.B. Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells // *Biochem. (Mosc.)*. – 2012. – V. 77. – P. 1266–1276.
267. Shay J.W. and Wright W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 1. – P. 72–76.
268. Sherr C.J. Cancer cell cycles // *Science.* – 1996. – V. 274. – P. 1672–1677.
269. Shinohara M., Shang W.-H., Kubodera M., Harada S., Mitsushita J., Kato M., Miyazaki H., Sumimoto H., Kamata T. Nox1 redox signaling mediates oncogenic Ras-induced disruption of stress fibers and focal adhesions by downregulating Rho // *J. Biol. Chem.* - 2007. – V. 282. – P. 17640–17648.
270. Shum M., Pasquier E., Po’uha S.T., O’Neill G.M., Chaponnier C., Gunning P.W., Kavallaris M.  $\gamma$ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway // *FASEB J.* – 2011. – V. 25. – P. 4423–4433.
271. Skaland I., Janssen E., Gudlaugsson E., Hui Ru Guo L., Baak, J. The prognostic value of the proliferation marker Phosphohistone H3 (PPH3) in luminal, basal-like and triple negative p53 negative lymph node-negative breast cancer // *Cell. Oncol.* – 2009. – V. 31. – P. 261-271.
272. Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A., Benzonana G., Gillessen D., Gabbiani G.A. Monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation // *J. Cell Biol.* – 1986 – V. 103. – P. 2787-2796.
273. Skrubber K., Read T.A., Vitriol E.A. Reconsidering an active role for G-actin in cytoskeletal regulation // *J. Cell Sci.* – 2018. V. 131. – P. 203760.
274. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Elichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky

V.A., Ruuge E.K., Senin I.I., Severina I.I., Skulachev M.V., Spivak I.M., Tashlitsky V.N., Tkachuk V.A., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zorov D.B. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* – 2009. – V. 1787. – P. 437–461.

275. Skulachev V.P. A biochemical approach to the problem of aging: "megaproject" on membrane-penetrating ions. The first results and prospects // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2007. – V. 72. - № 12. – P. 1385-96.

276. Slovak M.L., Mirski S.E., Cole S.P., Gerlach J.H., Yohem K.H., Trent J.M. Tumourigenic multidrug-resistant HT1080 cells do not overexpress receptors for epidermal growth factor // *Br J Cancer*. – 1991. – V. 64/ - № 2. – P. 296-8.

277. Smith S. L., Bowers N. L., Betticher D. C., Gautschi O., Ratschiller D., Hoban P. R., Booton R., Santibáñez-Koref M. F., Heighway J. Overexpression of aurora B kinase in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability // *Br. J. Cancer*. – 2005. – V. 93. – P. 719-729.

278. Sorrentino R., Libertini S., Pallante P. L., Troncone G., Palombini L., Bavetsias V., Spalletti-Cernia D., Laccetti P., Linardopoulos S., Chieffi P., Fusco A., Portella G. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – V. 90. – P. 928-935.

279. Sporn M.B., Liby K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – V. 12. – P. 564–571.

280. Starenki D., Park J.-I. Mitochondria-targeted nitroxide, Mito-CP, suppresses medullary thyroid carcinoma cell survival in vitro and in vivo // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – V. 98. – P. 1529–1540.

281. Stewart S., Fang G. Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1 // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 8730-8735.

282. Sugimoto K., Urano T., Zushi H., Inoue K., Tasaka H., Tachibana M., Dotsu M. Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin alpha // *Cell Structure Funct.* – 2002. – V. 27. – P. 457-467.

283. Sullivan K. F., Hechenberger M., Masri K. Human CENP-A Contains a Histone H3 Related Histone Fold Domain that Is Required for Targeting to the Centromere // *J. Cell Biol.* – 1994. – V. 127. – P. 581–592.

284. Sullivan L.B., Martinez-Garcia E., Nguyen H., Mullen A.R., Dufour E., Sudarshan S., Licht J.D., Deberardinis R.J., Chandel N.S. The Proto-oncometabolite Fumarate Binds Glutathione to Amplify ROS-Dependent Signaling // *Mol Cell*. – 2013. – V. 51. – P. 236–248.
285. Sun D., Guo Y., Tang P., Li H., Chen L. Arf6 as a therapeutic target: Structure, mechanism, and inhibitors // *Acta Pharm Sin B*. – 2023. – V. 13. - № 10. – P. 4089-4104.
286. Suski J.M., Braun M., Strmiska V., Sicinski P. Targeting cell- cycle machinery in cancer // *Cancer Cell*. – 2021. – V. 39. – P. 759-778.
287. Svitkina T. The actin cytoskeleton and actinbased motility // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2018. – V. 10. – P. a018267.
288. Szatrowski T.P., Nathan C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells // *Cancer Res*. – 1991. – V. 51. – P. 794–798.
289. Teng C. L., Hsieh Y. C., Phan L., Shin J., Gully C., Velazquez-Torres G., Skerl S., Yeung S. C. J., Hsu S. L., Lee M. H. FBXW7 is involved in Aurora B degradation // *Cell Cycle*. – 2012. – V. 11. – P. 4059-4068.
290. Terri M., Sandoval P., Bontempi G., Montaldo C., Tomero-Sanz H., de Turrís V., Trionfetti F., Pascual-Antón L., Clares-Pedrero I., Battistelli C., Valente S., Zwergel C., Mai A., Rosanò L., Del Pozo M.Á., Sánchez-Álvarez M., Cabañas C., Tripodi M., López-Cabrera M., Strippoli R. HDAC1/2 control mesothelium/ovarian cancer adhesive interactions impacting on Talin-1- $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated actin cytoskeleton and extracellular matrix protein remodeling // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* - 2024. – V. 43. - № 1. – P. 27.
291. Thannickal V.J. and Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. – 2000. – V. 279. – P. L1005-L1028.
292. Thiery J.P. and Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. – 2006. – V. 7. – P. 131–142.
293. Tillery M.M.L.; Blake-Hedges C.; Zheng Y.; Buchwalter R.A.; Megraw T.L. Centrosomal and non-centrosomal microtubule-organizing centers (MTOCs) in *Drosophila melanogaster* // *Cells*. – 2018. - V. 7. – P. 121.
294. Titova E., Shagieva G., Ivanova O., Domnina L., Domninskaya M., Strelkova O., Khromova N., Kopnin P., Chernyak B., Skulachev V., Dugina V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth // *Cell Cycle*. – 2018. – V. 17. - № 14. – P. 1797-1811.
295. Tomasek J. J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. – 2002. – V.3. – P. 349 -363.

296. Topham C.H., Taylor S.S. Mitosis and apoptosis: how is the balance set? // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2013, - V. 25. – P. 780–785.
297. Tromer E. C., van Hooff J. J. E., Kops G. J. P. L., Snel B. Mosaic Origin of the Eukaryotic Kinetochore // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2019. – V. 116. – P. 12873–12882.
298. Trotta A.P., Chipuk J.E. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology // *Cell Mol. Life Sci.* – 2017. – T. 74. – P. 1999–2017.
299. Vader G., Medema R. H., Lens S. M. A. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 173. – P. 833-837.
300. Valencia D.A., Quinlan M.E. Formins // *Curr. Biol.* – 2021. – V. 31. – P. R517–R522.
301. Van der Horst A., Vromans M. J. M., Bouwman K., van der Waal M. S., Hadders M. A., Lens S. M. A. Inter-domain cooperation in INCENP promotes Aurora B relocation from centromeres to microtubules // *Cell Rep.* – 2015. – V. 12. – P. 380-387.
302. Vandekerckhove J., Leavitt J., Kakunaga T., Weber K. Coexpression of a mutant betaactin and the two normal beta and gamma cytoplasmic actins in a stably transformed human cell line // *Cell.* – 1980. – V. 22. – P. 893-899.
303. Vandekerckhove J. and Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide // *J Mol Biol.* – 1978. – V. 126. – P. 783-802.
304. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science.* – 2009. – V. 324. – P. 1029–1033.
305. Vartiainen M.K., Sarkkinen E.M., Matilainen T., Salminen M., Lappalainen P. Mammals have two twinfilin isoforms whose subcellular localizations and tissue distributions are differentially regulated // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 34347–34355.
306. Vats P., Saini C., Baweja B., Srivastava S.K., Kumar A., Kushwah A.S., Nema R. Aurora kinases signaling in cancer: from molecular perception to targeted therapies // *Mol Cancer.* – 2025. – V. 24. – № 1. – P. 180.
307. Vischioni B., Oudejans J. J., Vos W., Rodriguez J. A., Giaccone G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non small cell lung carcinoma patients // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – V. 5. – P. 2905-2913.
308. Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – V. 12. – P. 385–392.
309. Warburg O.H. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable). – 1930.

310. Wegner A., Engel J. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments // *Biophys Chem.* – 1975 – V. 3. – P. 215-225.
311. Weissenbruch K., Mayor R. Actomyosin forces in cell migration: Moving beyond cell body retraction // *Bioessays.* – 2024. – V. 46. - № 10. – P. e2400055.
312. Wike C.L., Graves H.K., Hawkins R., Gibson M.D., Ferdinand M.B., Zhang T., Chen Z., Hudson D.F., Ottesen J.J., Poirier M.G. et al. Aurora-A mediated histone H3 phosphorylation of threonine 118 controls condensin I and cohesin occupancy in mitosis // *Elife.* – 2016. – V. 5. – P. e11402.
313. Willems E., Dedobbeleer M., Digregorio M., Lombard A., Lumapat P.N., Rogister B. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review // *Cell Div.* – 2018. – V. 13. – P. 7.
314. Willis S.N. and Adams, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2005. – V. 17. – P. 617–625.
315. Winterbourn C.C., Hampton M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – V. 45. – P. 549–561.
316. Witt D. P., Brown D. J., Gordon J. A. Transformationsensitive isoactin in passaged chick embryo fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus // *J. Cell Biol.* – 1983. – V. 96. – P. 1766-1771.
317. Wittmann T., Boleti H., Antony C., Karsenti E., Vernos I. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein // *J. Cell Biol.* – 1998. – V. 143. – P. 673–685.
318. Xu Y., Moseley J.B., Sagot I., Poy F., Pellman D., Goode B.L., Eck M.J. Crystal structures of a Forming Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture // *Cell.* – 2004. – V. 116. – P. 711-723
319. Yamaguchi H., Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion // *Biochim. Biophys. Acta* – 2007. – V.1773. - № 5. – P. 642-652.
320. Yang, J. and Weinberg, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis // *Dev. Cell.* – 2008. – V. 14. – P. 818–829.
321. Yani E.V., Katargina L.A., Chesnokova N.B., Beznos O.V., Savchenko A.Yu., Vygodin V.A., Gudkova E.Yu., Zamyatnin A.A.Jr., Skulachev M.V. The first experience of using the drug Vizomitin in the treatment of «dry eyes» // *Prakticheskaya Meditsina.* – 2012. – V. 4-1. - № 59. – P. 134–137.
322. Yin L.M., Schnoor M., Jun C.D. Editorial: Evolution, Emerging Functions and Structure of Actin-Binding Proteins // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 819300.

323. Yokoyama T., Goto H., Izawa I., et al. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin // *Genes Cells*. -2005. – V. 10. – P. 127–137.
324. Yonezawa N., Nishida E., Iida K., Yahara I., Sakai H. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides // *J Biol Chem*. – 1990. – V. 265. – P. 8382–8386.
325. Zheng B., Han M., Bernier M., Wen J. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression // *FEBS J*. – 2009. – V. 276. – P. 2669–2685.
326. Zhou S., Han L., Weng M., et al. Paxbp1 controls a key checkpoint for cell growth and survival during early activation of quiescent muscle satellite cells // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2021. – V. 118. – P. 12.
327. Zhu F., Lawo S., Bird A., Pinchev D., Ralph A., Richter C., Muller-Reichert T., Kittler R., Hyman A.A., Pelletier L. The mammalian SPD-2 ortholog CEP192 regulates centrosome biogenesis // *Curr. Biol*. – 2008. – V. 18. – P. 136–141.
328. Zigmond S.H. Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end // *Curr Top Dev Biol*. – 2004. – V. 63. – P. 145-88.
329. Zorba A., Buosi V., Kutter S., Kern N., Pontiggia F., Cho Y.J., Kern D. Molecular mechanism of aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2 // *Elife*. – 2014. – V. 3. – P. e02667.
330. Zwaenepoel I., Dugina V. and Chaponnier C. Expression of cytoplasmic actins is modulated in transformed compared to normal cells. FEBS-ESF workshop “Integrated Approaches in Cytoskeleton Research”. – 2005. – V. 27-30. – P. 127.