

## ДЕЙСТВИЕ ФИКОЦИАНИНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ *Arthrospira platensis*, НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ДРОЖЖЕЙ

© 2023 г. А. Г. Рогов<sup>1,\*</sup>, Я. Э. Сергеева<sup>1,2</sup>, Д. В. Сухинов<sup>1</sup>, М. В. Ивашенко<sup>3</sup>,  
А. П. Кувырченкова<sup>1</sup>, Р. Г. Василев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: lloss@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

C-фикоцианин, компонент фотосинтетического аппарата цианобактерий, является эффективным антиоксидантом и противовоспалительным агентом и часто используется в медицинских исследованиях. Рассмотрено внутриклеточное действие C-фикоцианина, выделенного из цианобактерии *Arthrospira platensis*, на уровни окислительного стресса и гибели клеток дрожжей аэробного типа об-мена *Yarrowia lipolytica*, подвергнутых действию прооксидантов. Показано, что C-фикоцианин на-капливался в дрожжевых клетках и проявлял прямое антиоксидантное действие на суспензию дрожжей в диапазоне концентраций 10–100 мкг/мл, а при дальнейшем увеличении концентрации обладал цитотоксическим эффектом. В наиболее эффективной концентрации действие C-фикоци-анина сопоставимо с антиоксидантным эффектом митохондриально-направленного катиона SkQ1.

DOI: 10.56304/S1992722323010119

### ВВЕДЕНИЕ

C-фикоцианин (C-ФЦ) – это белковый ком-плекс с ковалентно присоединенным к нему хро-мофором фикоцианобилином, выполняющий светособирательную функцию в фотосинтетиче-ском аппарате цианобактерий [1, 2].

C-фикоцианин является эффективным анти-оксидантом и противовоспалительным агентом [2–4], часто используется в медицинских иссле-дованиях разного рода [5–8]. Фикоцианин сам по себе или содержащий его экстракт цианобакте-рии *Arthrospira platensis* безопасны при употребле-нии в пищу человеком, что делает их применимы-ми с терапевтической точки зрения [1, 8–10].

C-ФЦ проявлял антиоксидантные свойства и восстанавливал связанное со старением сниже-ние активности ферментов антиоксидантной за-щиты у мышей, получавших D-галактозу [5]. Бла-годаря своей антиоксидантной активности C-ФЦ снижал уровень запрограммированного некроза в клеточной линии GC-1 spg (иммортилизованная модель клеток Лейдига мыши), что позволяет предполагать его возможный терапевтический эффект при потере фертильности [6]. Кроме того, у самок мышей с индуцированным диетой ожире-нием добавление C-ФЦ в пищу приводило к уве-

личению количества и выживаемости потомства [11].

C-ФЦ предотвращал индуцированные доксо-рубицином когнитивные нарушения у мышей, снижал нейровоспаление и митохондриальную дисфункцию в клетках мозга мышей [4], а также улучшал клинические показатели мышей со мно-жественным склерозом, снижая экспрессию мар-керов воспаления [3] и впоследствии приводя к частичной ремиелинизации нейронов [12]. Из-вестны попытки применения C-ФЦ для сниже-ния эффектов, связанных с патогенезом болезни Альцгеймера [9].

При индуцированной введением  $CCl_4$  пече-ночной [13] или  $HgCl_2$  почечной недостаточности [14] длительное употребление C-ФЦ мышами приводило к улучшению биохимических показа-телей крови и частично предотвращало патологи-ческую деформацию тканей. Такие эффекты свя-зывают с антиоксидантным действием C-ФЦ [15]. При терапии C-ФЦ в течение недели до и по-сле рентгеновского облучения печени мышей удавалось уменьшить дисфункцию печени, вы-званную облучением [16].

Несмотря на множество оптимистичных ре-зультатов применения C-ФЦ при исследовании

развития различных патологий *in vivo*, внутриклеточный механизм действия С-ФЦ изучен довольно скудно [17]. Возможно, исследования на лабораторных животных или клеточных линиях млекопитающих не дают точной информации о механизмах действия физиологически активных веществ в силу сложности самих моделей (большую роль играют как межклеточные взаимодействия, так и физиологические реакции на уровне организма) [18]. Выводы об антиоксидантной активности С-ФЦ были сделаны в основном опосредованно, по снижению уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках, тканях и органах. Тем не менее в указанных условиях трудно определить, является ли С-ФЦ классическим антиоксидантом, т.е. снижает продукцию клеткой АФК, или этот эффект является опосредованным.

При изучении внутриклеточного действия физиологически активных веществ одними из наиболее перспективных моделей являются дрожжи [19] благодаря простоте своего строения, одноклеточному образу жизни, способности расти на множестве сред простого состава и большому количеству методик для генетических манипуляций [20]. Однако традиционно используемые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в случае с С-ФЦ, для которого предполагается антиоксидантное действие, а значит, определенное влияние на биоэнергетику, не являются оптимальной моделью, поскольку это факультативные анаэробы, не имеющие комплекса I в дыхательной цепи и с точки зрения биоэнергетики плохо воспроизводящие события в клетках млекопитающих [21]. Поэтому в работе были использованы уникальные дрожжи аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*, имеющие все преимущества дрожжевых моделей и вдобавок обладающие разветвленной сетью полностью функциональных митохондрий с полноценной дыхательной цепью “животного типа” [22], содержащей комплекс I. Дрожжи *Y. lipolytica* успешно применялись в исследованиях действия физиологически активных веществ про- и антиоксидантной природы на окислительный стресс и выживаемость эукариотических клеток [23, 24], а также на энергетические параметры выделенных из дрожжей митохондрий [25–28]. В данной работе показано действие С-ФЦ на изменение уровня индуцированного прооксидантом окислительного стресса в дрожжах *Y. lipolytica* и выживаемость дрожжевых клеток под окислительным стрессом, а также выявлен диапазон концентраций, при которых С-ФЦ проявлял физиологическое действие на суспензию клеток.

## МЕТОДЫ

**Культивирование микроорганизмов.** Экстракты С-ФЦ получали из биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619 из Всероссийской

коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Культивирование цианобактерий проводили на модифицированной среде Заррука [29] в колбах Эрленмейера рабочим объемом 2000 мл с 1000 мл питательной среды (начальное значение рН  $9.50 \pm 0.05$ ) в шейкере-инкубаторе Innova 42R (New Brunswick, США) при температуре  $30^\circ\text{C}$ , 140 об./мин и круглосуточном освещении с плотностью потока фотонов  $14\text{--}16$  мкмоль/( $\text{m}^2 \text{c}$ ).

Дрожжи *Yarrowia lipolytica*, штамм W39, были получены из ВКПМ. Дрожжи выращивали при  $28^\circ\text{C}$  в перемешиваемых (220 об./мин) в 500 мл колбах Эрленмейера в 50 мл полусинтетической среды [21], содержащей 1.3%-ный сукцинил в качестве источника углерода и энергии. Клетки собирали в экспоненциальной фазе роста ( $\text{ОП}_{600} = 1.0$ ).

**Выделение фикоцианина.** Сбор биомассы цианобактерии *A. platensis* проводили центрифугированием (12500 g, 10 мин) на центрифуге SL40R (Thermo Scientific, США), дважды промывали дистиллированной водой. Искерпывающую экстракцию С-ФЦ из предварительно обработанной (трехкратный цикл замораживания при  $-20^\circ\text{C}$  и оттаивания при комнатной температуре) влажной биомассы проводили при  $4^\circ\text{C}$  0.1 М натрий-фосфатным буфером (рН  $7.00 \pm 0.02$ ). Осаждение биомассы осуществляли центрифугированием (20500 g, 30 мин). Далее первичный экстракт С-ФЦ ступенчато осаждали сульфатом аммония (20, 40, 60%), диализовали против деионизованной воды (мембрана CelluSep T3 25 мм, MWCO 12000–14000 Да, 24 ч,  $4^\circ\text{C}$ ), замораживали при  $-70^\circ\text{C}$  и лиофильно высушивали на лиофильной сушилке FreeZone 2.5 (Labconco, США). Растворы С-ФЦ получали перед проведением эксперимента растворением порошка в деионизованной воде.

**Количественное определение содержания и чистоты С-фикоцианина.** Концентрацию в растворе (мг/мл) и чистоту С-ФЦ рассчитывали с использованием уравнений (1) [30] и (2), снимая спектры поглощения в диапазоне 190–700 нм (спектрофотометр Genesys 10S UV-Vis):

$$\text{С-ФЦ}_v(\text{мг/мл}) = \frac{(A_{620} - 0.474 \times A_{650})}{5.34}, \quad (1)$$

$$\text{Чистота} = \frac{A_{620}}{A_{280}}, \quad (2)$$

где  $A_\lambda$  — поглощение при  $\lambda$  нм,  $V$  (мл) — объем экстракта.

**Оценка накопления С-фикоцианина в клетках дрожжей.** О накоплении С-ФЦ в дрожжевых клетках судили по флуоресценции клеток в канале APC на проточном цитометре FACSAria Fusion (Becton Dickinson, США). Данные получали минимум для 20000 клеток и обрабатывали с помо-

шью программного пакета FlowJo (FlowJo LLC, США).

**Генерация АФК в клетках дрожжей и их измерение.** Окислительный стресс в клетках дрожжей индуцировали прооксидантом трет-бутилгидропероксидом (**t-BHP**, Sigma, Германия). Генерацию АФК клетками оценивали, используя краситель диацетат дигидродихлорфлуоресцеина (**H<sub>2</sub>DCF-DA**, Thermo, США). Краситель проникает в дрожжевые клетки, где ацетильные группы удаляются внутриклеточными эстеразами, после чего дигидродихлорфлуоресцеина (**H<sub>2</sub>DCF**) теряет возможность выходить из клетки. H<sub>2</sub>DCF окисляется АФК до флуоресцентного дихлорфлуоресцеина (**DCF**), чья флуоресценция зависит от уровня окислительного стресса в клетке [31]. Флуоресценцию DCF детектировали на проточном цитометре FACS Aria Fusion (Becton Dickinson, США). Данные получали минимум для 20000 клеток и обрабатывали с помощью программного пакета FlowJo (FlowJo LLC, США).

**Измерение уровня клеточной гибели.** Гибель клеток дрожжей детектировали окраской пропилий йодидом (**PI**), флуоресцентным красителем, проникающим только в клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной. Флуоресценцию PI детектировали на проточном цитометре FACS Aria Fusion (Becton Dickinson, США). Данные получали минимум для 20000 клеток и обрабатывали с помощью программного пакета FlowJo (FlowJo LLC, США).

**Статистический анализ** проводили посредством однофакторного ANOVA-теста с апостериорным тестом Тьюки. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение минимум из трех независимых экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация выделенного из биомассы цианобактерий *A. platensis* С-ФЦ составила  $4.5 \pm 0.1$  мг/мл, а чистота –  $2.5 \pm 0.1$ . Далее раствор С-ФЦ использовали для оценки уровня окислительного стресса и гибели клеток дрожжей *Y. lipolytica*.

О накоплении С-ФЦ в клетках дрожжей *Y. lipolytica* судили по изменению медианы флуоресценции клеток в канале APC на проточном цитометре (рис. 1). Показано, что медиана флуоресценции клеток при увеличении количества С-ФЦ в среде инкубации также возрастает.

Для выявления возможного про- или антиоксидантного эффекта С-ФЦ суспензию клеток дрожжей в среде выращивания преинкубировали с различными концентрациями С-ФЦ в течение 1 ч. В качестве контроля дрожжи инкубировали с 800 нМ SkQ1 – мембранотропным митохондриально-направленным катионом, для которого ра-

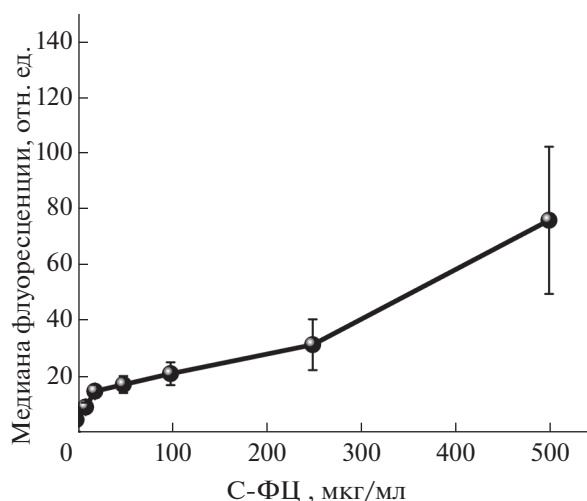
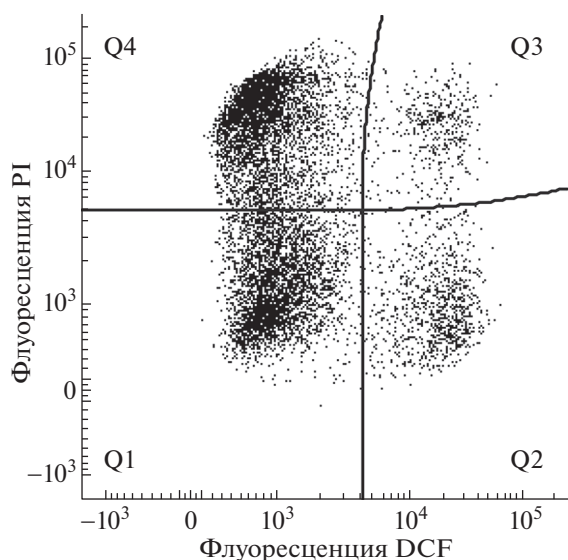


Рис. 1. Накопление С-ФЦ в клетках дрожжей *Y. lipolytica*.

нее было показано сильное антиоксидантное действие на суспензию дрожжей *Y. lipolytica* [23].

Окислительный стресс в суспензии клеток *Y. lipolytica* индуцировали добавлением 750 мкМ t-BHP в среду выращивания клеток в течение 2 ч, предварительно отмыв клетки от среды с С-ФЦ и SkQ1. При дальнейшем окрашивании суспензии дрожжей парой красителей H<sub>2</sub>DCF-DA и PI и анализе методом проточной цитометрии клетки дрожжей разделялись на четыре популяции по уровню флуоресценции красителей (рис. 2). Популяция Q1 с низким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствовала нормальным живым клеткам без окислительного стресса. Популяция Q2 с высоким уровнем флуоресценции DCF и низким уровнем PI соответствовала живым клеткам, подверженным окислительному стрессу. Популяции Q3 + Q4, где наблюдали высокий уровень флуоресценции PI, соответствовали мертвым клеткам.

На рис. 3 показано распределение по описанным популяциям клеток, преинкубированных с различными концентрациями С-ФЦ и подвергнутых действию прооксиданта t-BHP. На рис. 3а показано действие С-ФЦ на дрожжевые клетки без последующего добавления прооксиданта. Наиболее высокие концентрации С-ФЦ из исследованных сами по себе проявляли цитотоксический эффект, вызывая окислительный стресс и снижая выживаемость клеток дрожжей в суспензии. Как и ожидалось, инкубация контрольных клеток с 750 мкМ t-BHP снижала количество нормальных клеток, увеличивала уровень клеточной смерти и количество клеток, подверженных окислительному стрессу (рис. 3б). Если дрожжи преинкубировали с SkQ1, негативный эффект от прооксиданта достоверно снижался. Похожее, но



**Рис. 2.** Прооксидантное действие t-ВНР на суспензию дрожжей *Y. lipolytica*. Типичный график распределения популяций дрожжей, окрашенных красителями  $H_2DCF-DA$  и PI. Q1 – популяция живых нормальных клеток, Q2 – популяция живых клеток с окислительным стрессом, Q3 + Q4 – популяция мертвых клеток.

в большинстве случаев менее выраженное действие оказывала преинкубация с различными концентрациями С-ФЦ, что говорит о его прямом антиоксидантном действии на клетки. Показано, что низкие концентрации С-ФЦ (10–100 мкг/мл) снижали уровень клеточной смерти, вызванной прооксидантом, преинкубация с 20 и 50 мкг/мл С-ФЦ также достоверно снижала размер популяции клеток с окислительным стрессом. Наиболее выраженное антиоксидантное действие проявлялось С-ФЦ в концентрации 20 мкг/мл. При данной концентрации действие С-ФЦ сопоставимо с антиоксидантным эффектом митохондриально-направленного катиона SKQ1. Действующая концентрация SKQ1 была приблизительно на 2 порядка ниже (~0.5 мкг/мл), что объясняется его митохондриальной направленностью и тем фактом, что С-ФЦ является белковым комплексом и содержит достаточно много структурообразующих элементов, не вовлеченных в антиоксидантную активность. Интересно, что С-ФЦ в концентрации 20 мкг/мл в присутствии прооксиданта более эффективно снижал уровень клеточной смерти дрожжей, чем SKQ1, что говорит о его сильном прямом антиоксидантном действии.

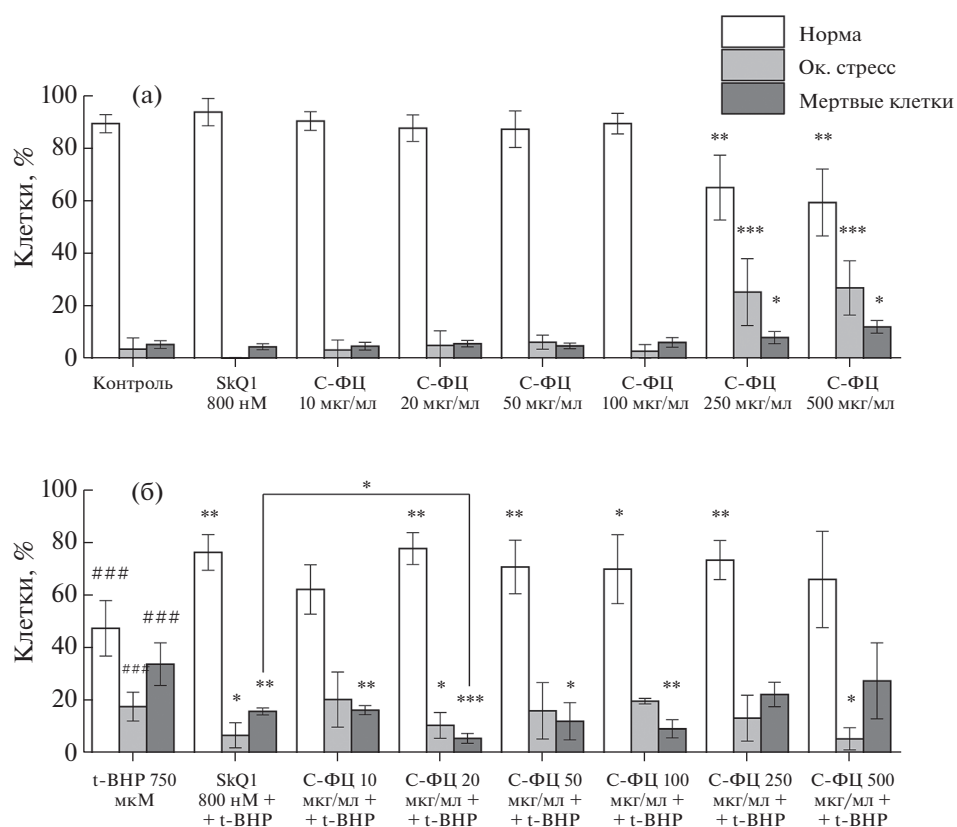
## ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондрии являются основными источниками избыточных количеств АФК в большинстве

клеток [32]. Окислительный стресс, вызываемый избыточной продукцией АФК и часто являющийся следствием дисфункции митохондрий, лежит в основе или является симптомом большого количества системных хронических метаболических заболеваний, затрагивающих большинство систем органов [23, 33, 34]. Данные заболевания нередко классифицируются как возрастные, а значит, в условиях увеличения средней продолжительности жизни их социальная значимость возрастает [35]. В таких условиях наиболее перспективными терапевтическими средствами против заболеваний, связанных с окислительным стрессом, становятся антиоксиданты, особенно направленного действия [36]. Поскольку С-ФЦ является относительно легко доступным физиологически активным веществом с показанным антиоксидантным действием, с точки зрения его применения в терапевтических целях возникает вопрос о механизме его работы, допустимых концентрациях, а также о побочных эффектах.

В работе показано, что наиболее выраженный антиоксидантный эффект *in situ* С-ФЦ проявляет в концентрации 20–50 мкг/мл, а при концентрациях выше 100 мкг/мл наблюдался собственный цитотоксический эффект. Таким образом, существует довольно широкое “окно” в концентрациях (10–100 мкг/мл), когда С-ФЦ проявляет антиоксидантный эффект.

В качестве прооксиданта в экспериментах был выбран t-ВНР. В отличие от традиционно используемого пероксида водорода, чью концентрацию трудно измерить из-за того, что он сам производится клеткой и утилизируется системами антиоксидантной защиты, t-ВНР не имеет выявленных механизмов воздействия на клетку, не связанных с прооксидантным эффектом, хорошо проникает в клетки. При этом сильный прооксидантный эффект t-ВНР объясняется прежде всего ускорением перекисного окисления липидов в митохондриях [37], что является наиболее опасным с точки зрения клеточной биоэнергетики [38]. Кроме того, t-ВНР не является разобщителем и не ингибирует ни комплексы дыхательной цепи митохондрий, ни АТФ-синтазу, что могло бы исказить наблюдаемые эффекты [21]. В [39] было показано, что окислительный стресс, индуцируемый t-ВНР, прежде всего наблюдался в митохондриях и только через некоторое время генерализовался по всей клетке. В связи с этим в качестве контрольного антиоксиданта был выбран митохондриально-направленный катион SKQ1, эффективно снижавший уровень митохондриального окислительного стресса и его генерализации. Таким образом, результаты, показанные на рис. 3б, свидетельствуют именно о дозозависимом прямом антиоксидантном действии С-ФЦ.



**Рис. 3.** Действие С-ФЦ, SkQ1 и t-BHP на окислительный стресс и гибель клеток дрожжей *Y. lipolytica*: а – клетки без инкубации с прооксидантом; б – клетки, подвергшиеся действию 750 мкМ t-BHP в течение 2 ч. Статистический анализ проводился посредством однофакторного ANOVA-теста. \* – значимость разницы распределения среднего против соответствующего контроля (контрольные клетки (а), клетки, инкубированные с 750 мкМ t-BHP (б)). \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*:  $0.01 < p < 0.05$ . # – значимость разницы распределения среднего между контрольными клетками и клетками, экспонированными 750 мкМ t-BHP. ###:  $p < 0.001$ .

Интересно, что окислительный стресс, вызванный высокими концентрациями С-ФЦ, при инкубации с t-BHP номинально снижался. Это объясняется возросшим уровнем клеточной смерти в образцах, которые после преинкубации с С-ФЦ подвергались действию прооксиданта. По-видимому, клетки, которые могли бы выжить с окислительным стрессом при инкубации с С-ФЦ, при дополнительном стрессе погибали.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Противовоспалительное и антиоксидантное действие С-фикоцианина в купе с его безопасностью и природным происхождением делают его перспективным веществом для терапии заболеваний, связанных с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом. На продвинутой клеточной модели на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica* показано, что С-фикоцианин обладает прямым внутриклеточным антиоксидантным действием и частично предотвращает окислительный стресс в дрожжах, индуцирован-

ный прооксидантом трет-бутилгидропероксидом, а также увеличивает выживаемость дрожжевых клеток. Тем не менее значительное увеличение концентрации С-фикоцианина само по себе приводит к окислительному стрессу, что говорит о его цитотоксическом действии в больших дозах и существовании определенного диапазона концентраций, где можно ожидать наибольшего терапевтического эффекта. На основе полученных результатов можно также заключить, что дрожжи аэробного типа обмена *Y. lipolytica* являются отличной системой для оценки действия физиологически активных веществ про- и антиоксидантного действия на клетки и митохондрии.

Авторы выражают благодарность Д.С. Есипову за предоставление SkQ1.

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (Тематический план исследований 1.8. “Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McCarty M.F.* // *J. Med. Food.* 2007. V. 10. № 4. P. 566.  
<https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>
2. *Li Y.* // *J. Immunol. Res.* 2022. V. 2022. P. 4008991.  
<https://doi.org/10.1155/2022/4008991>
3. *Pentón-Rol G., Lagumersindez-Denis N., Muzio L. et al.* // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2016. V. 11. № 1. P. 153.  
<https://doi.org/10.1007/s11481-015-9642-9>
4. *Wang C., Zhao Y., Wang L. et al.* // *Neurochem. Res.* 2021. V. 46. № 2. P. 149.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03164-2>
5. *Li Y.J., Han Z., Ge L. et al.* // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 14. P. 17393.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8165>
6. *Dong X., Yang F., Xu X. et al.* // *Environ. Toxicol.* 2022.  
<https://doi.org/10.1002/tox.23482>
7. *Ould Amara-Leffad L., Ramdane H., Nekhoul K. et al.* // *Arch. Physiol. Biochem.* 2019. V. 125. № 2. P. 184.  
<https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1444059>
8. *ElFar O.A., Billa N., Lim H.R. et al.* // *Bioengineered.* 2022. V. 13. № 6. P. 14681.  
<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2100863>
9. *Matamoros B.P., Prida J.M., Rol G.P.* // *J. Biosci.* 2021. V. 46. P. 42.
10. *Agrawal M., Bansal S., Chopra K.* // *J. Food. Sci. Technol.* 2021. V. 58. № 11. P. 4382.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04922-4>
11. *Wen X., Han Z., Liu S.J. et al.* // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 595373.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.595373>
12. *Pentón-Rol G., Marín-Prida J., Falcón-Cama V.* // *Behav. Sci. (Basel).* 2018. V. 8. № 1.  
<https://doi.org/10.3390/bs8010015>
13. *Osman A., Salama A., Emam Mahmoud K., Sitohy M.* // *J. Food. Biochem.* 2021. V. 45. № 1. P. e13562.  
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13562>
14. *García-Pliego E., Franco-Colin M., Rojas-Franco P. et al.* // *Food. Funct.* 2021. V. 12. № 7. P. 2985.  
<https://doi.org/10.1039/d0fo03294h>
15. *Zheng J., Inoguchi T., Sasaki S. et al.* // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013. V. 304. № 2. P. R110.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00648.2011>
16. *Liu Q., Li W., Qin S.* // *Biomed. Pharmacother.* 2020. V. 130. P. 110553.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110553>
17. *Liu R., Qin S., Li W.* // *Biomed. Pharmacotherapy.* 2022. V. 153. P. 113362.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113362>
18. *Thines L., Deschamps A., Stribny J., Morsomme P.* // *Genes.* 2019. V. 10. № 7. P. 545.
19. *Polčič P., Mentel M.* // *Genes.* 2020. V. 11. № 2. P. 145.
20. *Schleit J., Wasko B.M., Kaerberlein M.* // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. № 18. P. 2868.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.038>
21. *Rogov A.G., Ovchenkova A.P., Goleva T.N. et al.* // *Anal. Biochem.* 2018. V. 552. P. 24.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.04.003>
22. *Kerscher S., Dröse S., Zwicker K. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1555. № 1–3. P. 83.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00259-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00259-1)
23. *Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova G.A. et al.* // *Mitochondrion.* 2019. V. 49. P. 206.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.09.001>
24. *Epremyan K.K., Goleva T.N., Rogov A.G. et al.* // *Microorganisms.* 2022. V. 10. № 9. P. 1817.
25. *Trendeleva T.A., Sukhanova E.I., Rogov A.G. et al.* // *Mitochondrion.* 2013. V. 13. № 5. P. 500.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.10.006>
26. *Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Severina I.I. et al.* // *Mitochondrion.* 2013. V. 13. № 5. P. 520.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.09.006>
27. *Trendeleva T.A., Rogov A.G., Cherepanov D.A. et al.* // *Biochemistry (Mosc).* 2012. V. 77. № 9. P. 1021.  
<https://doi.org/10.1134/s000629791209009x>
28. *Chernyak B.V., Antonenko Y.N., Galimov E.R. et al.* // *Biochemistry (Mosc).* 2012. V. 77. № 9. P. 983.  
<https://doi.org/10.1134/s0006297912090040>
29. *Aiba S., Ogawa T.* // *J. General Microbiology.* 1977. V. 102. № 1. P. 179.
30. *Bennett A., Bogorad L.* // *J. Cell. Biol.* 1973. V. 58. № 2. P. 419.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
31. *Jakubowski W., Bartosz G.* // *Cell. Biol. Int.* 2000. V. 24. № 10. P. 757.  
<https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0556>
32. *Murphy M.P.* // *Biochem J.* 2009. V. 417. № 1. P. 1.  
<https://doi.org/10.1042/bj20081386>
33. *Lopez-Lluch G.* // *Mech. Ageing. Dev.* 2017. V. 162. P. 108.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.12.005>
34. *Li Q.O.Y., Soro-Arnaiz I., Aragonés J.* // *Adipocyte.* 2017. V. 6. № 2. P. 161.  
<https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1297346>
35. *Oliveira A.V., Vilaca R., Santos C.N. et al.* // *Biogerontology.* 2017. V. 18. № 1. P. 3.  
<https://doi.org/10.1007/s10522-016-9666-4>
36. *Feniouk B.A., Skulachev V.P.* // *Curr Aging Sci.* 2017. V. 10. № 1. P. 41.
37. *Wang Z., Wei D., Xiao H.* // *Methods. Mol. Biol.* 2013. V. 1048. P. 135.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_11)
38. *Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E. et al.* // *Biochemistry (Mosc).* 2008. V. 73. № 12. P. 1273.  
<https://doi.org/10.1134/s0006297908120018>
39. *Rogov A.G., Goleva T.N., Epremyan K.K. et al.* // *Antioxidants (Basel).* 2021. V. 10. № 1. P. 120.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10010120>