

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Тяглик Алиса Борисовна

**Роль метаболической активности и морфологической
пластичности астроцитов в мозге**

1.5.24. Нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре высшей нервной деятельности биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и в ФГБУН ГНЦ РФ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, отделе метаболизма и редокс-биологии, группе редокс-нейробиологии.

Научный руководитель — **Браже Надежда Александровна** – кандидат биологических наук

Официальные оппоненты — **Салмина Алла Борисовна** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Институт мозга ФГБНУ «Российский центр неврологии и нейронаук», лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией, заместитель директора

Кузьмин Владислав Стефанович – доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, профессор

Брежестовский Петр Дмитриевич – доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Центр изучения молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, лаборатория молекулярной клеточной биологии и оптогенетики, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится «17» ноября 2025 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Email: belka.umarova.msu@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3572>

Автореферат разослан октября 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
МГУ.015.7, доктор биологических наук

Умарова Б.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Астроциты, клетки одного из основных типов глии, являются важным метаболическим элементом в мозге, поскольку они снабжают энергетическими субстратами нейроны, являющиеся главными потребителями энергии в мозге (Magistretti & Allaman, 2015). Астроциты обладают метаболической и морфологической пластичностью. Морфологические и метаболические изменения астроцитов могут возникать в ответ на физиологические и патологические стимулы. Их работа зависит от степени активности нейронов, и может переключаться на разный тип метаболизма в зависимости от доступных энергетических субстратов (Ioannou et al., 2019; Magistretti & Allaman, 2015). Одной из основных характеристик астроцитов является их особенная морфология, которая позволяет осуществлять различные физиологические функции. Тонкие отростки астроцитов – листочки – охватывают синаптические контакты, а концевые ножки регулируют диаметр кровеносных сосудов (Díaz-Castro et al., 2023; Sweeney et al., 2019). Соответственно, изменение функционирования астроцитов может повлечь за собой сбой работы нейронов и нарушение активности мозга. Большинство существующих представлений о биоэнергетике мозга *in vivo* основаны на данных фМРТ – неинвазивной методике, позволяющей оценить изменения сигнала BOLD (blood-oxygen-level-dependent), однако его интерпретация остается нетривиальной задачей из-за нелинейности сигнала и отсутствия клеточного разрешения (E. M. C. Hillman, 2014; Attwell et al., 2010; Logothetis, 2010; Sirotin & Das, 2009; Girouard & Iadecola, 2006). Генетически-кодированные сенсоры позволяют напрямую измерить вклад различных молекул (АТФ, лактат, глюкоза и др.) в биоэнергетические процессы мозга с клеточным разрешением в условиях *in vivo*, однако большинство из них схожи по своим спектральным характеристикам, поэтому такие измерения ограничиваются одним типом молекул. С помощью электронной микроскопии охарактеризована и реконструирована с высокой разрешающей способностью морфология различных типов клеток и органелл, включая митохондрии, однако подготовка образцов и анализ результатов крайне трудоемки, и не позволяет дать динамическую оценку морфологических особенностей в реальном времени. Существующие представления о морфологических и метаболических особенностях астроцитов и их связи с физиологией и поведением важно дополнить данными, полученными в условиях *in vivo* с помощью современных методов регистрации и анализа.

Цель и задачи. Целью данной работы было выявление морфологических и метаболических особенностей астроцитов мозга мышей в условиях *in vivo* в состоянии покоя и при различных функциональных нагрузках.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать методический подход для оценки редокс-состояния дыхательной цепи идентифицированных клеток мозга в условиях *in vivo* и исследовать изменение состояния дыхательной цепи астроцитов и нейронов коры мозга мышей в покое и во время локомоции;
2. Исследовать морфологические особенности митохондрий астроцитов и нейронов в условиях *in vivo*;
3. Сопоставить изменения редокс-состояния дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo* в условиях острой гипергликемии и при избытке жиров;
4. Изучить пространственную неоднородность редокс-состояния дыхательной цепи в митохондриях астроцитов;
5. Исследовать влияние структурного белка эзрина на морфологические особенности астроцитов.

Научная новизна. С помощью разработанного методического подхода мы показали, что в условиях *in vivo* в соматосенсорной коре мозга бодрствующих мышей в состоянии покоя электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий астроцитов демонстрирует большее заполнение электронами, чем ЭТЦ нейронов, при этом во время локомоции ЭТЦ астроцитов дополнительно заполняется электронами, что сопровождается продукцией пероксида водорода, а в нейронах происходит снижение относительного содержания восстановленных переносчиков электронов без образования H_2O_2 . Мы показали повышенную заполненность электронами ЭТЦ в митохондриях концевых ножек по сравнению с телами и толстыми отростками астроцитов в условиях *ex vivo*, что может играть важное значение для генерации оксида азота (II) (NO) – вазодилатора. С помощью адаптированного нами автоматического трекинга митохондрий *in vivo* мы установили сходство морфологии и подвижности этих органелл в астроцитах и нейронах. Мы показали, что в условиях *in vivo* метаболизм глюкозы и жирных кислот оказывает различное влияние на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий нейронов и астроцитов. При помощи разработанного нами анализа морфологии астроцитов было показано, что снижение количества белка эзрина в астроцитах гиппокампа приводит к уменьшению размера астроцитарного домена, что может способствовать менее эффективному охвату синаптической щели.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные расширяют существующие представления об особенностях метаболизма астроцитов при различных воздействиях *in vivo*, демонстрируя важную роль астроцитарных митохондрий в регуляции межклеточных взаимодействий. Разработанный подход, основанный на КР-микроспектроскопии, может быть использован для оценки редокс-состояния клеток мозга и их локального кровоснабжения в доклинических и клинических исследованиях, а также во время хирургических операций или постоперационной биопсии.

Методология и методы исследования. Результаты, представленные в данной работе, получены с использованием современных микро- и спектроскопических методов исследования в сочетании с флуоресцентными генетически-кодируемыми конструкциями.

Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях *in vivo* астроциты обладают особенностями метаболизма, отличающимися от нейронов: редокс-состояние дыхательной цепи митохондрий в астроцитах зависит от метаболизма липидов, в то время, как в нейронах – от метаболизма глюкозы.
2. Накопление электронов в дыхательной цепи астроцитов зависит от участка клетки и используется для реализации H_2O_2 и NO-опосредованных сигнальных процессов.
3. Белок эзрин необходим для формирования тонких отростков астроцитов, снижение его содержания приводит к уменьшению домена астроцитов.

Степень достоверности данных. Данные обработаны с помощью корректных методов оптического и спектрального анализа и статистических тестов, результаты являются воспроизводимыми и достоверными. Обсуждения основаны на данных современной литературы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI, которые входят в Ядро РИНЦ.

Апробация материалов работы. Основные результаты работы были представлены на международном форуме Федерации европейских нейронаучных сообществ FENS Forum 2022 (Франция, Париж, 9-13 июля 2022), международной конференции The XVI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Германия, Берлин, 8-11 июля 2023), на международном форуме Федерации европейских нейронаучных сообществ FENS Forum 2024 (Австрия, Вена, 25-29 июня 2024). Апробация диссертации прошла на заседании кафедры высшей нервной деятельности МГУ имени М.В.Ломоносова 11 сентября 2025 и на открытом семинаре отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН 23 сентября 2025.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя является весомым на всех этапах исследования и заключается в изучении и анализе современной литературы по теме работы, планировании экспериментов и их проведении с использованием всех описанных методических подходов, анализе, обобщении и обсуждении результатов, написании статей и тезисов докладов, а также в представлении полученных данных на международных конференциях. Данные, полученные с помощью метода микроспектроскопии комбинационного рассеяния при функциональной нагрузке, гипергликемии и диете с высоким содержанием жира собраны и проанализированы совместно с К.И. Морозовой.

Структура и объем работы. Работа изложена на 157 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и основных выводов. Список литературы состоит из 192 источников. Работа проиллюстрирована 56 рисунками и 4 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во «Введении» описываются актуальность и степень разработанности темы диссертации, формулируются цель и задачи, обосновываются новизна, теоретическая и практическая значимость, описываются методология и методы исследования и формулируются положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

В разделе «Обзор литературы» рассматриваются метаболическая и редокс-кооперация между нейронами и астроцитами, описываются молекулярные и морфологические особенности астроцитов. Рассматриваются существующие *in vitro* и *ex vivo* данные о морфологических особенностях митохондрий и редокс-состоянии их дыхательной цепи. Описываются основы метода микроспектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и перспективы его применения в живых системах.

Материалы и методы

Животные. Использованы мыши линии C57BL/6 (обоих полов, в возрасте 2-12 месяцев), содержащиеся в группах на 12 ч цикле ночь/день с доступом к стандартному корму и питьевой воде *ad libitum*. Эксперименты проведены в соответствии с этическим протоколом № 353, одобренным комиссией ГНЦ ИБХ РАН.

Диета с высоким содержанием жира (High fat diet, HFD). За 1 месяц до начала проведения экспериментов, мыши группы HFD получали обогащенную жиром пищу (SNIFF, Германия), а контрольные – стандартный корм. Проводился регулярный контроль веса животных.

Индукция гипергликемии у мышей. Кратковременное повышение уровня сахара в крови индуцировали внутрибрюшинной инъекцией раствора стерильной глюкозы (4.0 г/кг), в контроле вводили равный объем стерильного физ. раствора после 18-24 ч голодания (Hu et al., 2019).

Стереотаксическое введение вируса в область соматосенсорной коры (S1) и имплантация краниального окна. Мышей анестезировали смесью кислорода и изофлурана и помещали в стереотаксическую установку. Кожу головы обеззараживали и удаляли после местной анестезии, чтобы определить координаты области интереса соматосенсорной коры S1 (AP -2.3, ML +0.5). Проводили 3-миллиметровую краниотомию и инъекцию аденоассоциированных вирусов (AAV) объемом 1 мкл (DV = -0.6/-1.0), после мозг накрывали круглым покровным стеклом диаметром 5 мм и герметично фиксировали с помощью цианакрилатного клея. Далее фиксировали металлическое крепление к черепу смесью стоматологического цемента и клея. Сразу после операции и на следующие сутки, осуществляли послеоперационную анестезию. Через 4 недели после операции проводили эксперименты.

Стереотаксическое введение вируса в гиппокамп для изменения морфологии астроцитов. Проводили билатеральную краниотомию над областью поля CA1 гиппокампа (AP =

-1.94, ML = ± 1.5 , DV = -1.30) диаметром 0.5 мм и вводили AAV8-gfaABC1D-miRNAi(Ezrin)-BFP, снижающий экспрессию белка эзрин по механизму микро-РНК интерференции в листочках астроцитов, и соответствующий контроль, перемешанную микро-РНК последовательность AAV8-gfaABC1D-BFP-miRNAi(Non-Coding). Кожу головы заклеивали с помощью медицинского клея в месте разреза, через 4 недели проводили эксперименты.

Приучение животных к экспериментальным установкам и регистрация поведения. Мышей приучали к рукам и к закреплению за голову в экспериментальных установках (беговая дорожка, вращающийся диск “граммофон”), далее проводились сессии ознакомления. Все эксперименты сопровождалась видеозаписью поведения, определяли состояние покоя (базовое состояние животного без видимого движения), стимулированную локомоцию (бег по ленте беговой дорожки со скоростью 15 см/с) и постлокомоторный покой.

КР-микроспектроскопия *in vivo*. Измерения проводились с помощью конфокального КР-микроспектрометра (InVia Qontor, Renishaw, Великобритания), соединенного с прямым микроскопом (FSM, Leica) с объективом 20x NA 0.4. Идентификация NirFP⁺ нейронов (после экспрессии AAV-PHP.B-hSyn-NirFP) проводилась при возбуждении флуоресценции с лазером 633 нм, а GFP⁺ астроцитов (после экспрессии AAV.PHP.B-gfaABC1D-eGFP) — при возбуждении флуоресценции лазером 473 нм, спектральные свойства этих флуоресцентных белков не мешают регистрации КР-спектров клеток. После идентификации типа клетки использовали лазер 532 нм для регистрации КР-спектров клеток, представляющих собой пики, связанные с колебаниями связей в гемах восстановленных цитохромов с- и b-типа (в комплексе ЭТЦ III и цитохроме с) (Love et al., 2020), фенилаланинового остатка и пептидных связей в белках, C–C и H–C–H связей в липидах. Мощность лазера 532 нм на пятно регистрации (в латеральной плоскости около 700 нм, высота — около 1.52 мкм) составляла не более 0.5 мВт, время накопления спектра — от 15 до 60 с.

КР-микроспектроскопия степени оксигенации и диаметра просвета кровеносных сосудов *in vivo*. Идентификация сосудов проводилась с помощью визуальной детекции, КР регистрация — при 532 нм со временем накопления 1 с. КР пики с положением максимумов 1357, 1547 и 1604 см⁻¹ соответствуют дезоксигемоглобину (дГб); 1375, 1585 и 1638 см⁻¹ — оксигемоглобину (оГб) (Brazhe et al., 2018; Torres Filho et al., 2008). После линейной коррекции базовой линии пики дГб и оГб использовались для расчета степени оксигенации (sO₂) по формуле:

$$sO_2 = \frac{I_{1585} * 1.44}{I_{1585} * 1.44 + I_{1547}} * 100\%, \quad \text{где } I_{1585} \text{ и } I_{1547} \text{ — интенсивности пиков оГб и дГб, 1.44 множитель, рассчитанный с помощью калибровочных экспериментов.}$$

Диаметры просвета кровеносных сосудов получены с помощью поперечного линейного сканирования, границы определялись, когда sO₂ падал ниже 10% от уровня sO₂ в центре сосудов.

Анализ КР-спектров астроцитов и нейронов. Спектры КР анализировались с помощью разработанного в лаборатории программного обеспечения Pygaman (<https://github.com/abrazhe/pygaman>). Базовую линию вычитали из каждого спектра КР и получали

интенсивность пиков с положением максимумов при 750, 700, 720, 1126, 1003, 1440 и 1660 см^{-1} : пик 750 см^{-1} соответствует колебаниям связей в восстановленных цитохромах c,b (Fe^{2+}), с основным вкладом цит. c-типа, 1126 см^{-1} – соответствует колебаниям связей в восст. цит. c,b (Fe^{2+}), с основным вкладом цит. b-типа, пик 1003 см^{-1} соответствует остаткам фенилаланина в белках, пик 1440 см^{-1} соответствует колебаниям C–C и H-C-H связей в липидах (Love et al., 2020; Brazhe et al., 2012; Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012). Пик 700 см^{-1} – соответствуют колебаниям связей в холестерине, 720 см^{-1} – в фосфатидилхолине, 1660 см^{-1} – в белках (Love et al., 2020; Perry et al., 2017; Brazhe et al., 2012; Harkness et al., 2012; Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012). Для определения относительного содержания восст. цит. типа c или b рассчитывали соотношения интенсивностей пиков (I_{750} или I_{1126}) по отношению к интенсивности КР-пиков липидов (I_{1440}) или фенилаланина (I_{1003}): I_{750}/I_{1440} , I_{750}/I_{1003} , I_{1126}/I_{1440} . По соотношениям I_{1440}/I_{1660} , I_{700}/I_{720} оценивали относительное содержание липидов по сравнению с белками и относительное содержание холестерина по отношению к фосфатидилхолину.

Измерение продукции H_2O_2 в митохондриях астроцитов и нейронов *in vivo*. Клетки идентифицировали с помощью КР-микроспектрометра по флуоресценции HyPer7, экспрессируемого в матриксе митохондрий астроцитов (AAV9-GFAP-HyPer7-mito) или нейронов S1 (AAV9-hSyn-HyPer7-mito) при возбуждении 473 нм, 1с, мощность 0.1 мВт. После коррекции базовой линии максимальную интенсивность флуоресценции каждого спектра оценивали при 515 нм.

Визуализация двойного флуоресцентного мечения астроцитов и нейронов в условиях *in vivo*. Использовался многофотонный флуоресцентный микроскоп (Femtonics FemtoSmart Dual, Венгрия) с объективом 20x NA 1.0. Для возбуждения флуоресценции GFP в астроцитах и NirFP в нейронах области S1 использовали длину волны 820 нм, флуоресценция детектировалась фотоумножителями после прохождения через полосовые фильтры (520/60 нм для GFP и 600/100 нм для NirFP).

Морфологический имиджинг митохондрий *in vivo*. Для регистрации использовался многофотонный флуоресцентный микроскоп, возбуждение флуоресценции HyPer7, экспрессированного внутри митохондриального матрикса астроцитов или нейронов S1, проводили при 980 нм, излучение детектировалось фотоумножителем после полосового фильтра 520/60 нм. Мыши находились в установке на вращающемся диске “граммофона”, каждая запись составляла 5 мин с частотой 30 кадров/с и разрешением 512×512 пикселей, в анализе использовались данные в состоянии покоя животных.

Анализ распределения и морфологии митохондрий *in vivo*. После предварительной обработки записей флуоресцентного имиджинга, автоматическую сегментацию морфологии митохондрий проводили с помощью программного обеспечения Nellie (Lefebvre et al., 2025), основанного на нейросетевых подходах. Статистический анализ осуществляли в программе R.

Поведенческий тест «Открытое поле». Мышей помещали в центр белой арены «Открытое поле» размером 40×40×40 см в течение 10 минут, и записывали видео поведения. Арену очищали между каждой сессией 70% этанолом и дистиллированной водой. Поведенческие видео анализировали с помощью протокола созданного в программе визуального программирования Bonsai (Lopes et al., 2015). Локомоторная активность животных регистрировалась при пороге скорости выше 0.5 см/с. Статистический анализ выполнен в программе OriginPro.

Транскардиальная перфузия и изготовление фиксированных срезов. Животных анестезировали внутрибрюшинной инъекцией раствора золетил-ксилазин и проводили транскардиальную перфузию с помощью раствора фосфатного буфера (PBS) и 4% раствора параформальдегида (PFA) для фиксации тканей. Мозг извлекали и помещали для последующей постфиксации в 4% PFA на сутки при 4°C. Коронарные срезы толщиной 60 мкм или 200 мкм изготавливали с помощью вибратома.

Иммуногистохимическое окрашивание и КР-микроспектроскопии *ex vivo*. Фиксированные 200 мкм срезы переносили в раствор PBS + 0.3% Triton-X100 на 20 мин, а затем в раствор PBS + 0.1% Tween 20 + 5% бычьего сывороточного альбумина на 90 мин. Затем срезы инкубировали в растворе первичных антител в разведении 1:1000 (против GFAP и против NeuN для идентификации астроцитов и нейронов, соответственно) в течение 60 ч. Срезы отмывали и проводили инкубацию в растворе вторичных антител в разведении 1:800 (Alexa Fluor 488 и Cy-5, для окрашивания астроцитов и нейронов, соответственно) в течение 2 ч. Срезы промывали и монтировали на предметное стекло и высушивали в темноте. Для идентификации клеток, флуоресценция вторичных антител возбуждалась галогенной лампой КР-микроспектрометра (ИНТЕГРА СПЕКТРА, НТ-МДТ, Зеленоград, Россия) с объективом x40 NA 0.45 и не мешала регистрации КР спектров восстановленных цитохромов, белков и различных липидов при 532 нм.

Флуоресцентная визуализация морфологии астроцитов гиппокампа. Регистрация сигнала проводилась с помощью мультифотонного флуоресцентного микроскопа, для возбуждения флуоресценции репортерного белка BFP (после экспрессии AAV8-gfaABC1D-miRNAi(Ezrin)-BFP или AAV8-gfaABC1D-BFP-miRNAi(Non-Coding)) в 60 мкм срезах гиппокампа использовали длину волны 750 нм. Эмиссию регистрировали с помощью фотоумножителя после прохождения через полосовой фильтр 520/60 нм. Каждый z-стек состоял из 60-80 оптических срезов с разрешением 512 x 512 пикселей, толщиной в 1 мкм.

Анализ морфологии астроцитов. Для анализа был использован разработанный нами подход, основанный на методе быстрого марша (Kriuchehnikova et al., 2025). Данный подход позволяет реконструировать сложную морфологию астроцитов с учетом их нелинейной геометрии и неоднородности формы. После реконструкции морфологии астроцитов была рассчитана длина и объемная доля флуоресценции толстых отростков в области всего z-стека.

Результаты и обсуждение

Разработка метода КР микроспектроскопии *in vivo* для оценки редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов и мониторинга локальной оксигенации крови в сосудах коры мозга бодрствующих мышей*

**Исследование проводили совместно с сотрудницей кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова м.н.с. К.И. Морозовой: автор диссертации выполнила операции по доставке вирусных частиц и имплантации краниальных окон, приучение животных к бегу на беговой дорожке, анализ поведения и регистрацию генерации H_2O_2 ; К.И. Морозова проводила регистрацию КР-спектров ЭТЦ астроцитов и нейронов, кровеносных сосудов, и их анализ.*

Мы разработали новый подход, основанный на КР-микроспектроскопии, позволяющий оценить без дополнительного окрашивания редокс-состояние ЭТЦ, степень оксигенации сосудов и белково-липидный состав идентифицированных клеток мозга у животных во время поведения. КР света происходит на атомах молекул в зависимости от их колебательных и вращательных состояний, что позволяет оценивать их концентрацию, конформацию и редокс-состояние. Лазерный свет с длиной волны 532 нм поглощается гемами с- и b-типов и рассеивается по механизму резонансного комбинационного рассеяния, селективно усиливая КР сигнал восстановленных цит. с, b (Fe^{2+}), оГб и дГб по сравнению с другими молекулами в мозге (Porov et al., 2023; Brazhe et al., 2018; Okada et al., 2012).

Для идентификации типа клеток в области S1 была проведена доставка двух AAV, кодирующих флуоресцентные белки зеленый (GFP) – в астроцитах и ближний инфракрасный (NirFP) – в нейронах, соответственно (Рис. 1, а). Перед регистрацией КР сигнала астроциты и нейроны идентифицировали по спектрам флуоресценции при возбуждении лазерами с длинами волн 473 или 633 нм (Рис. 1, б), далее переключались в режим КР и проводили регистрацию при 532 нм (Рис. 1, в).

У животных в состоянии покоя в астроцитах уровень цит. с, b (Fe^{2+}) значительно выше, чем в нейронах (Рис. 2, слева). Эти различия не связаны с типом нормировки для нейронов и астроцитов (Рис. 2, справа). Полученный результат согласуется с данными о разнице строения ЭТЦ в астроцитах и нейронах. В астроцитах комплексы ЭТЦ имеют разобщенную организацию, что может приводить к накоплению электронов, в нейронах комплексы ЭТЦ собираются в суперкомплексы, что увеличивает эффективность переноса электронов, при этом количество восстановленных цитохромов снижается (Lopez-Fabuel et al., 2016).

Спектры КР от кровеносных сосудов обладают характерным положением и формой пиков, соответствующих колебаниям гемовых связей в оГб и дГб (Рис. 3) (Brazhe et al., 2018), соотношение интенсивностей пиков было использовано для расчета степени насыщения крови

кислородом (sO_2). Таким образом, наш подход позволяет определить тип сосудов – артериолы и венулы (Рис. 3) – и провести количественную оценку степени их оксигенации.

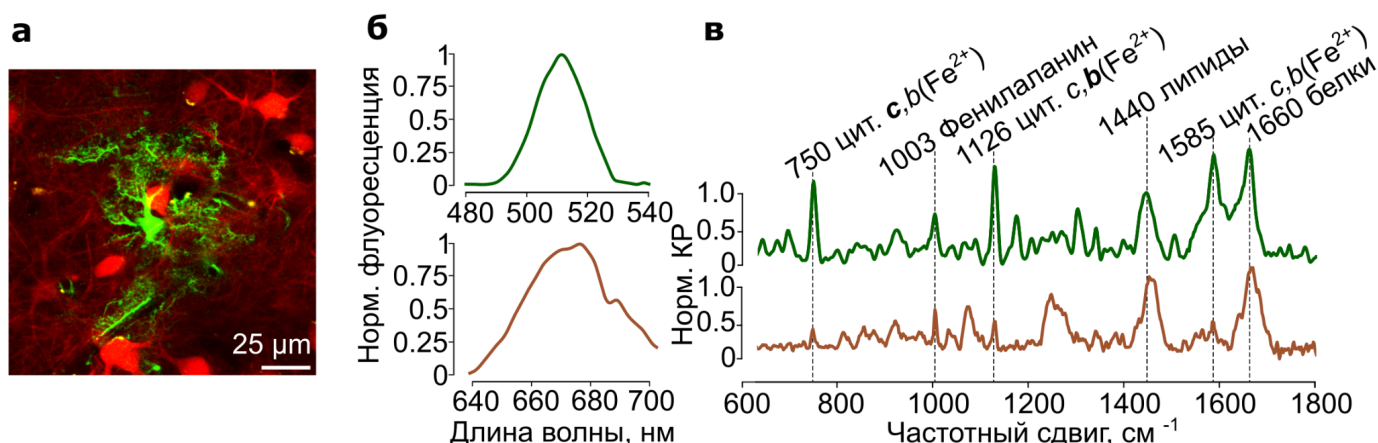


Рисунок 1. (а) – Флуоресцентное изображение астроцита и нейронов в S1 бодрствующей мыши. Астроцит экспрессирует зеленый флуоресцентный белок GFP, нейроны – ближний инфракрасный белок, NirFP. Кровеносные сосуды – темные области без флуоресценции, окруженные зелеными астроцитарными отростками. (б) – Спектры флуоресценции GFP в астроците (зеленый спектр) при возбуждении 473 нм, и NirFP в нейроне (коричневый спектр) при возбуждении 633 нм. (в) – Спектры КР астроцита (зеленый спектр) и нейрона (коричневый спектр) при возбуждении 532 нм. Пики КР, использованные в анализе, отмечены вертикальными пунктирными линиями с названиями молекул и значениями положения их максимумов (частотного сдвига, cm^{-1}).

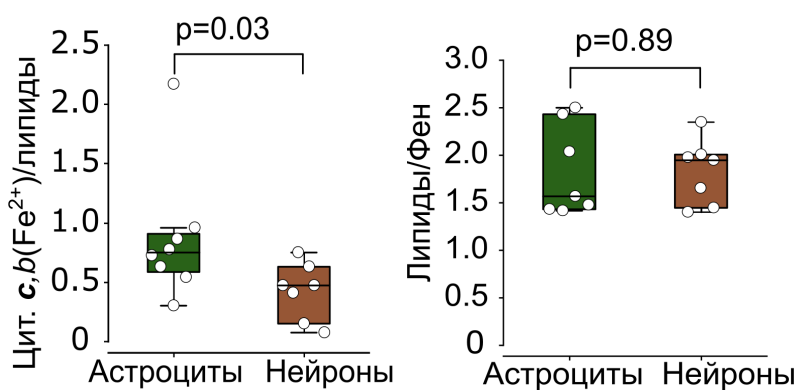


Рисунок 2. Слева – Диаграмма размаха, показывающая относительное количество цитохромов $c,b(Fe^{2+})$ в состоянии покоя для астроцитов (зеленый цвет) и нейронов (коричневый цвет). Справа – диаграмма размаха, показывающая соотношение интенсивностей КР-пика липидов к КР-пику фенилаланина (фен) в состоянии покоя для астроцитов (зеленый цвет) и нейронов

(коричневый цвет). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни между астроцитами ($n=7$) и нейронами ($n=7$). У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

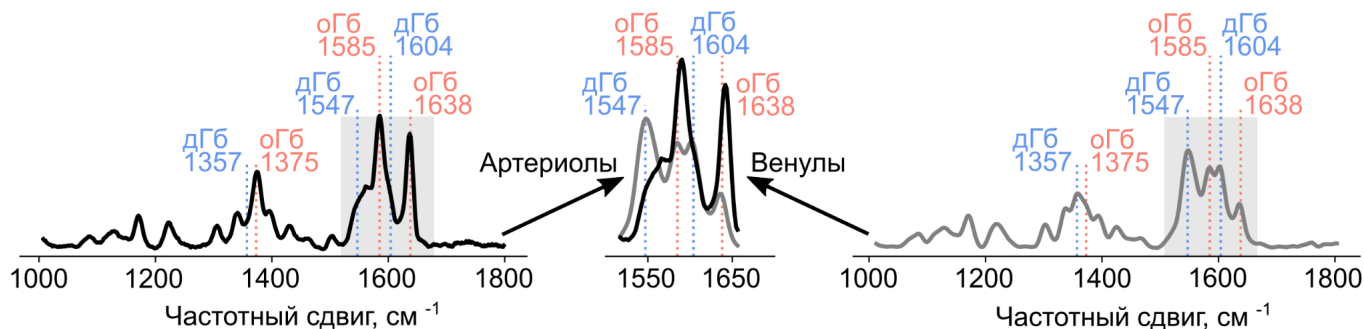


Рисунок 3. Спектры КР, зарегистрированные от артериолы (слева, черная кривая) и венулы (справа, серая кривая). Посередине показана область спектра, использованная в анализе. Пунктирными линиями отмечены пики КР, с соответствующими названиями молекул, сверху показаны значения частотного сдвига для положений максимумов пиков оГб и дГб.

Влияние функциональной нагрузки на sO_2 и диаметр кровеносных сосудов в соматосенсорной коре мышей

Степень оксигенации в венулах во время бега достоверно выше по сравнению с артериолами (Рис. 4, слева). Изменение диаметра артериол во время функциональной нагрузки было значительно больше, чем у венул (Рис. 4, справа), что, вероятно, связано с особенностями строения артериол и их физиологической ролью по доставке в мозг оГб.

Таким образом, во время локомоции, область S1 снабжается кислородом, и питательными веществами за счет усиления кровоснабжения, опосредованного расширением артериол в большей степени, чем венул. При этом, значительное увеличение sO_2 в венулах свидетельствует о том, что приток крови в активные области, превышает необходимые потребности клеток мозга во время функциональной нагрузки (Beinlich et al., 2024; Fox & Raichle, 1986). Мы полагаем, что расширение артериол во многом связано с выделением из астроцитов оксида азота, который может образовываться как в цитоплазме астроцитов посредством NO-синтазы, так и в ЭТЦ митохондрий вследствие восстановления NO из нитрита натрия в ЭТЦ (Christie et al., 2023).

Редокс-состояние ЭТЦ астроцитов и нейронов при функциональной нагрузке

В астроцитах уровень восст. цит. с,b (Fe^{2+}) постепенно и обратимо увеличивался в течение периода локомоции (Рис. 5, а). Напротив, в нейронах относительное содержание восст. цит. с,b (Fe^{2+}) резко снижалось в начале локомоции и медленно восстанавливалось до исходного уровня (Рис. 5, б). Таким образом, в среднем относительное содержание восст. цит. с,b (Fe^{2+}) в митохондриях астроцитов увеличивалось во время локомоции, тогда как в митохондриях нейронов снижалось (Рис. 5, в).

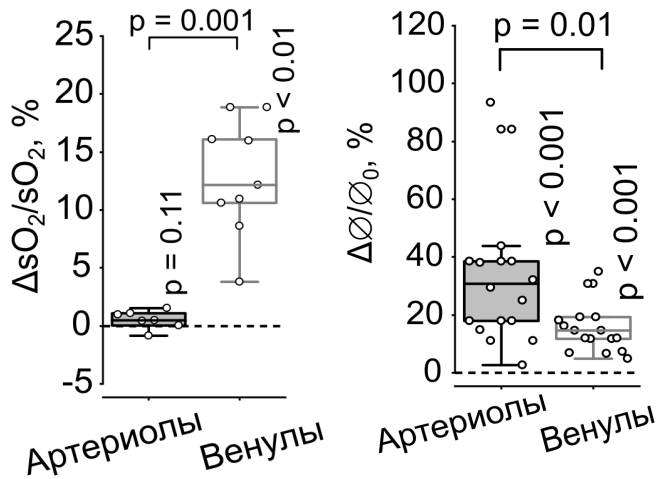


Рисунок 4. Слева – Диаграммы размаха, показывающие изменения степени оксигенации крови артериол и венул во время локомоции относительно уровня sO_2 в состоянии покоя до локомоции ($\Delta sO_2/sO_2$) в артериолах (серый) и венулах (белый). Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между артериол ($n=7$) и венул ($n=9$); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений в венулах и в артериолах. Справа – диаграммы размаха, представляющие изменения

просвета артериол (серый) и венул (белый) во время функциональной нагрузки, сравнение диаметра просвета сосуда во время локомоции ($\Delta \varnothing$) проводилось относительно диаметра в покое до локомоции ($\varnothing_0$) в артериолах и венулах. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между артериол ($n=18$) и венул ($n=17$); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений в венулах и в артериолах. Количество животных $N = 7$. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения.

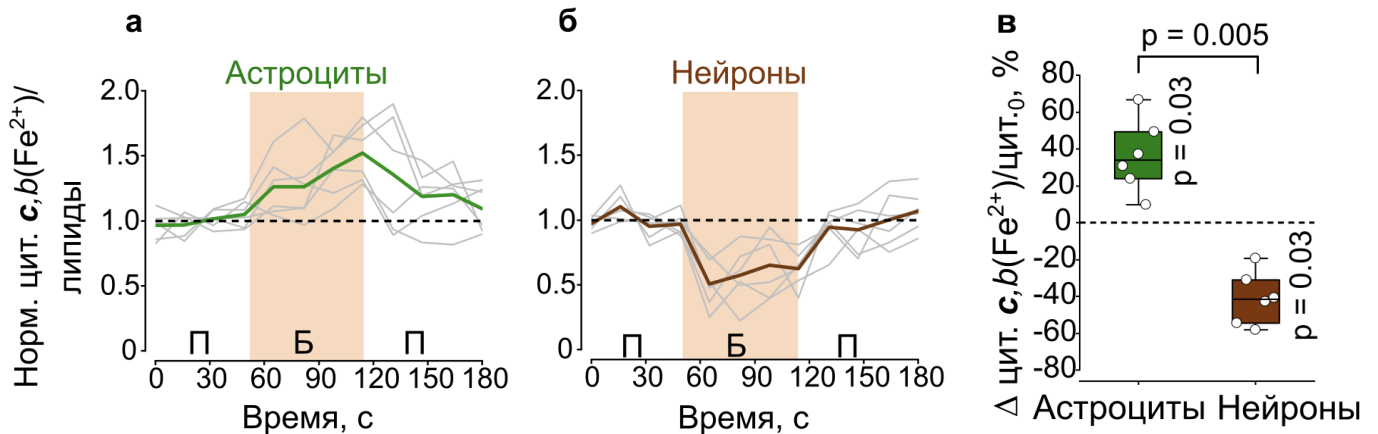


Рисунок 5. Изменение относительного количества цит. с, b (Fe^{2+}) в астроцитах (а) и нейронах (б), нормированное на относительное количество цит. с, b (Fe^{2+}) в состоянии покоя перед локомоцией. Тонкие серые линии показывают записи, сделанные для отдельных клеток, толстые цветные линии – средние значения для астроцитов (зеленый) и нейронов (коричневый). Покой (П), бег (Б), покой после функциональной нагрузки (П). (в) – Диаграммы размаха, показывающие изменения относительного количества цит. с, b (Fe^{2+}) во время локомоции относительно состояния покоя перед локомоцией ($\Delta \text{цит.с, b}(Fe^{2+})/\text{цит.}_0$) для астроцитов (зеленый цвет) и нейронов (коричневый цвет). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между астроцитами ($n=6$) и нейронами ($n=6$); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений $\Delta \text{цит.с, b}(Fe^{2+})/\text{цит.}_0$ в астроцитах и нейронах. У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

Мы полагаем, что активация нейронов при локомоции приводит к Ca^{2+} - опосредованному усилению гликолиза в астроцитах и образованию в них лактата (Horvat et al., 2021; Fedotova et al., 2023), который переходит в нейроны и превращается в пируват для цикла Кребса, повышая синтез НАДН для ЭТЦ. Увеличение энергетических потребностей нейронов приводит к активации электронного транспорта в ЭТЦ и усилению синтеза АТФ. При этом в астроцитах, нейрон-опосредованная активация гликолиза вызывает подавление окислительного фосфорилирования (ОФ) и замедление ЭТЦ с накоплением электронов.

Заполнение ЭТЦ электронами наряду с увеличением оксигенации кровеносных сосудов может приводить к генерации активных форм кислорода (АФК) (Bochkova et al., 2025; Bolaños, 2016). Мы измерили продукцию H_2O_2 в митохондриях астроцитов и нейронов с помощью генетически-кодируемого сенсора HyPer7, локализованного в матриксе митохондрий астроцитов (Рис. 6, а) или нейронов (Рис. 6, б). При взаимодействии этого сенсора с эндогенным H_2O_2 происходит увеличение флуоресцентного сигнала окисленной формы HyPer7 (Kotova et al., 2025). Во время локомоции в митохондриях астроцитов происходит значительное увеличение генерации пероксида водорода, но не в нейронах (Рис. 6, в). Эти данные согласуются с работами, в которых показана связь между продукцией H_2O_2 в митохондриях астроцитов и эффективностью процесса обучения у мышей (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019). Наши результаты указывают на генерацию H_2O_2 в митохондриях астроцитов соматосенсорной коры при функциональных нагрузках, что также может играть сигнальную роль в астро-нейрональных взаимодействиях.

Распределение митохондрий в астроцитах и нейронах *in vivo*

Мы оценили возможный вклад морфологии митохондрий и их перемещения в описанные выше различия редокс-состояний ЭТЦ астроцитов и нейронов у мышей в покое. Мы оптимизировали протокол анализа флуоресцентных изображений митохондрий *in vivo*. В ходе автоматической сегментации митохондрий (Lefebvre et al., 2025) определяются отдельные органеллы и точки ветвления внутри них в виде отдельных ветвей (Рис. 7).

Мы не обнаружили достоверных различий общей площади ветвей митохондрий в нейронах и астроцитах *in vivo* (Рис.8).

Мы не обнаружили достоверных изменений площади ветвей митохондрий внутри экспериментальной сессии, указывающих на перестройки или движение в сети митохондрий астроцитов (Рис. 9, слева) и нейронов (Рис. 9, справа). Можно заключить, что полученные различия в редокс-состоянии ЭТЦ астроцитов и нейронов *in vivo* не связаны с морфологическими особенностями или мобильностью митохондриальной сети, а свидетельствуют о различной организации ЭТЦ астроцитов и нейронов, и особенностях их метаболизма.

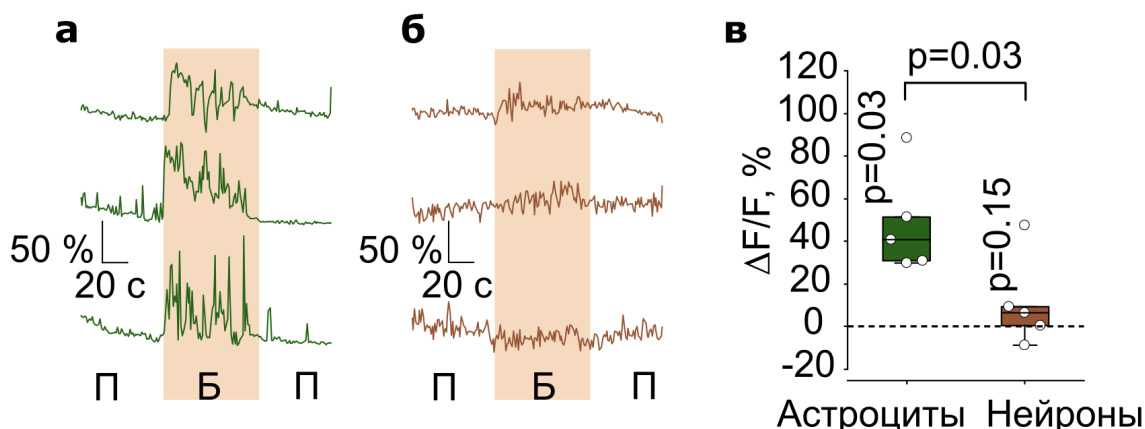


Рисунок 6. Локомоция сопровождается генерацией H_2O_2 в митохондриях астроцитов, но не нейронов. **(а)** – Примеры изменения флуоресценции сенсора HyPer7 (AAV9-GFAP-HyPer7-mito) в митохондриях трех астроцитов во время покоя (П), бега (Б) и постлокомоторного покоя (П), измеренные с помощью флуоресцентного режима КР-микроспектрметра; **(б)** – примеры изменения флуоресценции сенсора HyPer7 (AAV9-hSyn-HyPer7-mito) в митохондриях трех нейронов в аналогичных условиях. **(в)** – Диаграммы размаха, показывающие изменения флуоресценции HyPer7 во время локомоции по сравнению с ее уровнем во время покоя перед локомоцией ($\Delta F/F$) для астроцитов (зеленый) и нейронов (коричневый). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между астроцитами (n=5) и нейронами (n=5); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений $\Delta F/F$ в астроцитах и нейронах. У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

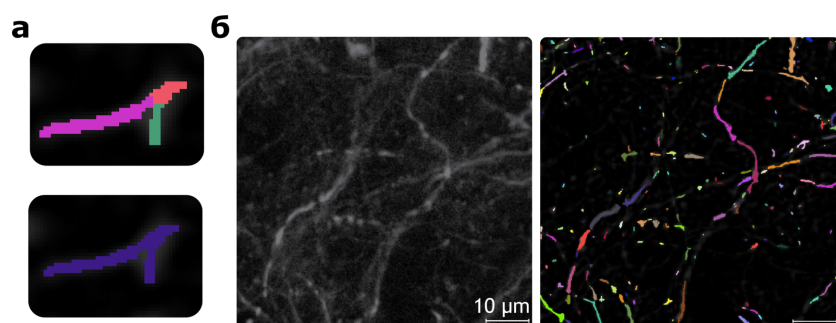


Рисунок 7. Типы сегментации **(а)** флуоресцентных изображений митохондрий с помощью Nellie. Разным цветом обозначены отдельные ветви митохондрий (сверху), которые принадлежат выделенной органелле (снизу). **(б)** – Результаты автоматической сегментации, слева изображение

астроцитарных митохондрий без обработки, справа – после сегментации.

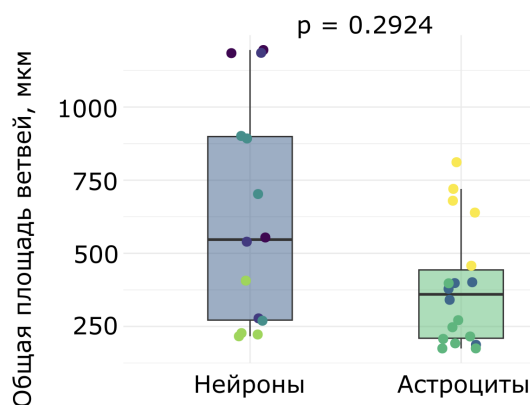


Рисунок 8. Общая площадь ветвей митохондрий астроцитов и нейронов в соматосенсорной коре мозга бодрствующих мышей. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов (N = 3), нейронов (N=4).

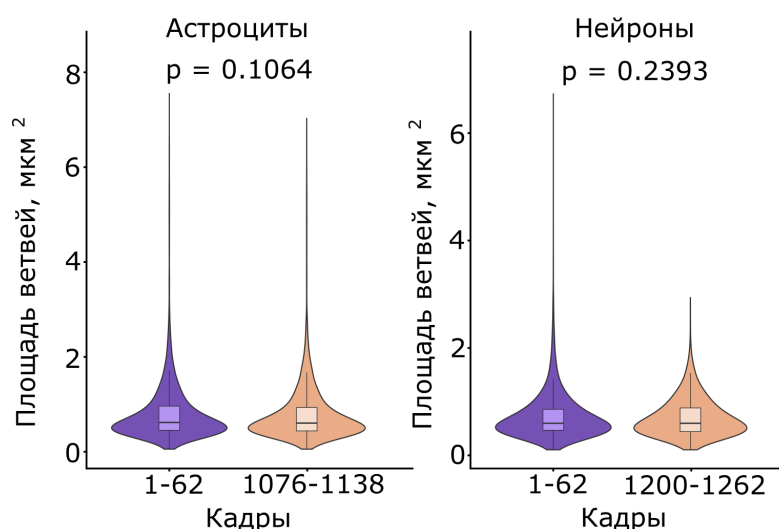


Рисунок 9. Сравнение распределения площади ветвей митохондрий астроцитов (слева) и нейронов (справа) внутри одной экспериментальной записи. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью парного критерия Вилкоксона. На графике представлены значения распределения площади ветвей митохондрий в промежутках

определенных кадров, сравнивали начало сессии 1-62 кадры и ее конец 1076-1138/1200-1262.

Редокс-состояние ЭТЦ нейронов и астроцитов при острой гипергликемии *in vivo**

*Исследование проводили совместно с сотрудницей кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова м.н.с. К.И. Морозовой: автор диссертации проводила регистрацию КР-спектров ЭТЦ астроцитов и нейронов и их анализ. К.И. Морозова выполнила операции по доставке вирусных частиц и имплантации краниальных окон, приучение животных к экспериментальной установке, и индукцию гипергликемии.

В нейронах основным источником АТФ является ОФ, зависящее от работы ЭТЦ митохондрий, при этом в астроцитах, напротив, большая часть АТФ синтезируется в процессе гликолиза (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009). Мы показали, что внутрибрюшинная инъекция глюкозы приводит к увеличению относительного количества цит. с (Fe^{2+}) (Рис. 10, а) и цит. b (Fe^{2+}) (Рис. 10, б) в ЭТЦ нейронов (Kotova et al., 2023). Анализ астроцитов в условиях гипергликемии не показал достоверных различий в редокс-состоянии цит. с- (Рис. 11, а) и b-типа (Рис. 11, б). Мы предполагаем, что в астроцитах гипергликемия усиливает захват глюкозы и гликолиз с образованием лактата, который затем транспортируется в нейроны, превращается в пируват и в виде кофермента А входит в цикл Кребса. В результате, в митохондриях нейронов образуется избыток НАДН и сукцината, и в ЭТЦ поступает количество электронов сверх нормы, приводя к увеличению содержания восст. цит. При этом астроциты не получают избытка субстратов цикла Кребса и поэтому астроцитарная ЭТЦ не заполняется электронами.

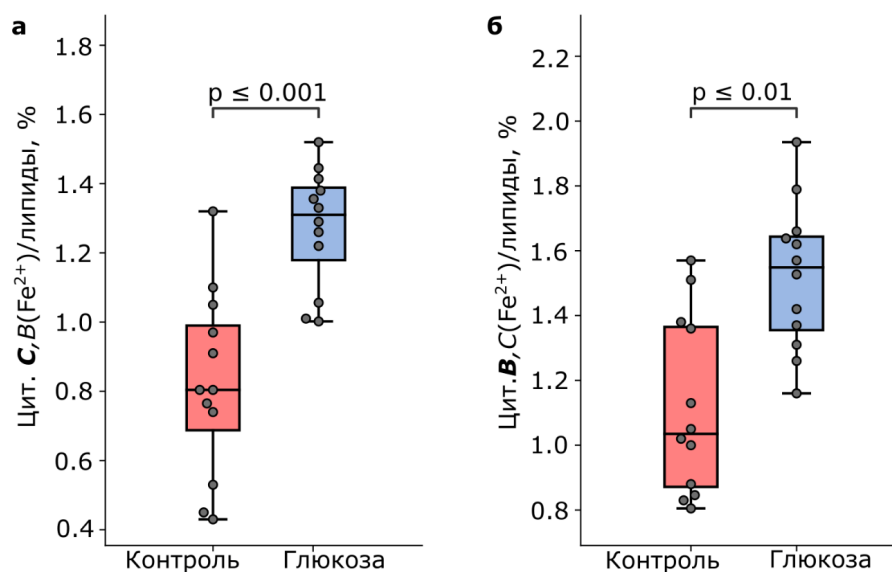


Рисунок 10. Относительное количество восстановленных цитохромов с- (а) и b-типов (б) в митохондриях ЭТЦ нейронов *in vivo* через 20–50 мин после инъекции глюкозы или раствора NaCl (контроль). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Серые точки показывают индивидуальные экспериментальные значения.

Количество мышей в каждой группе (N = 4), количество зарегистрированных клеток в каждой группе (n = 12). Статистическая значимость определялась с помощью непараметрического t-критерия Стьюдента. NS $p > 0.05$.

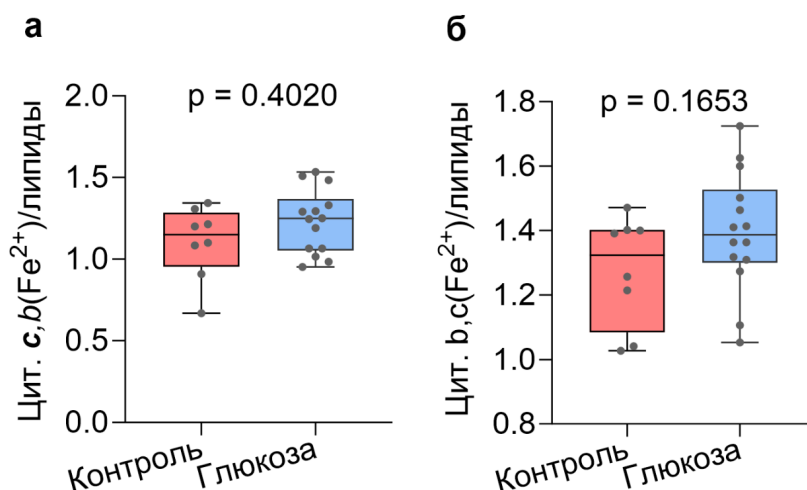


Рисунок 11. Относительное количество восстановленных цитохромов с- (а) и b-типов (б) в митохондриях ЭТЦ астроцитов *in vivo* через 20–50 мин после инъекции глюкозы или раствора NaCl (контроль). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Серые точки показывают индивидуальные экспериментальные значения.

Количество мышей в каждой группе (N = 3), количество зарегистрированных клеток в контрольной группе (n = 8), в группе с инъекцией глюкозы (n = 14). Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни.

Редокс-состояние ЭТЦ нейронов и астроцитов и особенности поведения животных на диете с высоким содержанием жира*

*Исследование проводили совместно с сотрудницей кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова м.н.с. К.И. Морозовой: автор диссертации организовывала диету и отслеживание веса животных, приучение мышей и проведение поведенческих экспериментов, и их анализ; К.И. Морозова проводила ИГХ окрашивание и регистрацию КР-спектров астроцитов и нейронов, и их анализ.

Мы оценили воздействие диеты с высоким содержанием жира (high fat diet, HFD) на метаболический статус астроцитов и нейронов области гиппокампа, с помощью КР-микроспектроскопии *ex vivo* (Porov et al., 2022). В условиях HFD значительно увеличивается относительное количество липидов в астроцитах (Рис. 12, слева). Относительное количество восст. цит. с- и b-типов было значительно выше в астроцитах после HFD по сравнению с контролем (Рис. 12, справа). Напротив в нейронах, HFD существенно не повлияла на относительное количество липидов (Рис. 13, слева), и на относительное содержание восст. цит. с,b-типа (Рис. 13, справа).

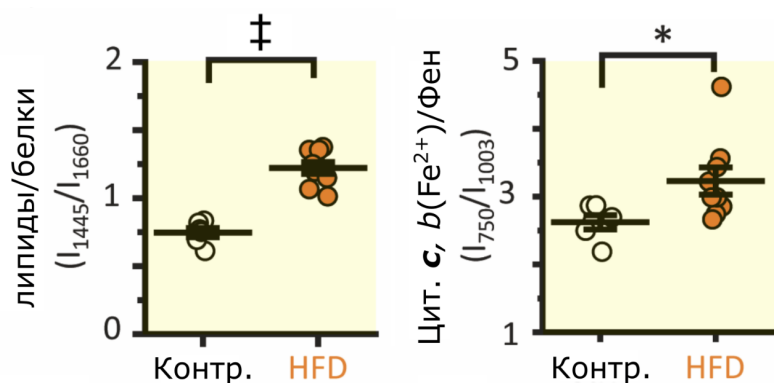


Рисунок 12. Справа – относительное количество липидов; слева – относительное количество восст. цит. с,b-типа в астроцитах в контроле и после HFD. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 6) и HFD (оранжевые кружки, N = 9) группах.

* $p < 0.05$, ‡ $p < 0.001$, двухвыборочный t-критерий.

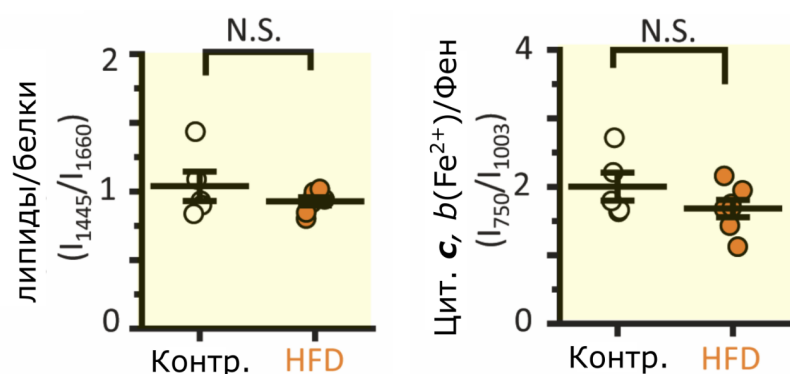


Рисунок 13. Справа – относительное количество липидов; слева – и восст. цит. с,b-типа в нейронах в контроле и после HFD. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 6) и HFD (оранжевые кружки, N = 6) группах.

NS $p > 0.05$, двухвыборочный t-критерий.

Мы не обнаружили различий в локомоторной активности между двумя группами животных в тесте “Открытое поле” (Рис. 14, а). Однако животные с HFD проводили значительно больше времени в центре арены (Рис. 14, б), что указывает на низкий уровень тревожности. Количество побегов животных с HFD через открытое центральное пространство арены, может быть связано с активным исследовательским поведением (Рис. 14, в, г). Было показано, что при β -окислении жирных кислот происходит образование сигнальных АФК в астроцитах, имеющих важное значение в различных когнитивных процессах, включая исследовательское поведение, обучение и память (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019).

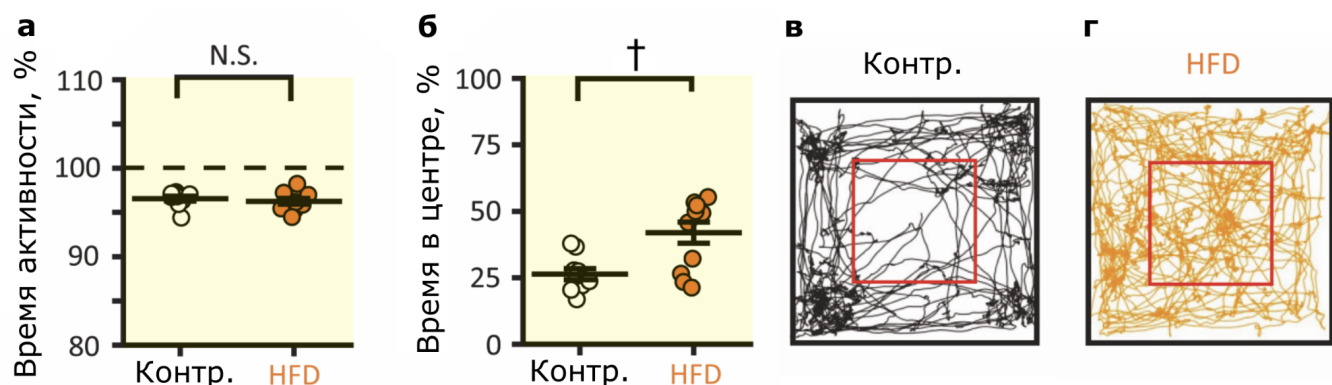


Рисунок 14. Общее время активности (а) и время проведенное в центре арены (б) теста “Открытое поле” мышей в контрольной и HFD-группах. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 10) и HFD (оранжевые кружки, N = 11) группах. NS $p > 0.05$, $\dagger p < 0.01$, двухвыборочный t-критерий. Репрезентативные траектории перемещения мышей в тесте “Открытое поле”, полученные для контрольного (в) и HFD (г) животного. Красный прямоугольник обозначает центр арены.

Связь морфологических особенностей астроцитов и редокс-состояние их ЭТЦ

Мы предположили, что состояние ЭТЦ в разных компартментах астроцита может отличаться в зависимости от их физиологической роли. В концевых ножках астроцитов (Рис. 15, слева) снижено относительное содержание белков по сравнению с липидами, при этом увеличено относительное содержание восст. цит. с- и b-типов по сравнению с телами астроцитов (Рис. 15, справа). Различия в относительном содержании восст. цит. может указывать на неоднородную продукцию АФК и NO в митохондриях разных компартментов клетки. Действительно, ранее было показано, что митохондрии в концевых ножках в условиях переполнения ЭТЦ электронами, в частности, при гипоксии, генерируют вторичный мессенджер NO, который является эффективным вазодилататором (Christie et al., 2023).

Структурные перестройки астроцитов

Эффективная доставка энергетических субстратов и регуляция синаптической передачи зависит от морфологической пластичности мелких отростков астроцитов – листочков. Основным структурным элементом листочков является белок эзрин, он связывает клеточный цитоскелет с плазматической мембраной (Derouiche & Geiger, 2019). Мы использовали билатеральную доставку AAV в поле CA1 области гиппокампа (AAV8-gfaABC1D-miRNAi(Ezrin)-BFP (Эзрин $\downarrow$), снижающего экспрессию белка эзрин по механизму микро-РНК интерференции в астроцитах, и соответствующий контроль, где была использована перемешанная микро-РНК последовательность AAV8-gfaABC1D-BFP-miRNAi (Non-Coding) (Zhou et al., 2019). Мы использовали флуоресцентный имиджинг репортерного белка BFP (blue fluorescent protein) и применили

разработанный в лаборатории морфологический анализ астроцитов (Kriuchehnikova et al., 2025) (Рис. 16, а). Объемная доля отростков астроцитов в группе (Эзрин ↓) достоверно ниже, чем в контроле (Рис. 16, б), что косвенно указывает на уменьшение общего размера астроцитов в экспериментальной группе.

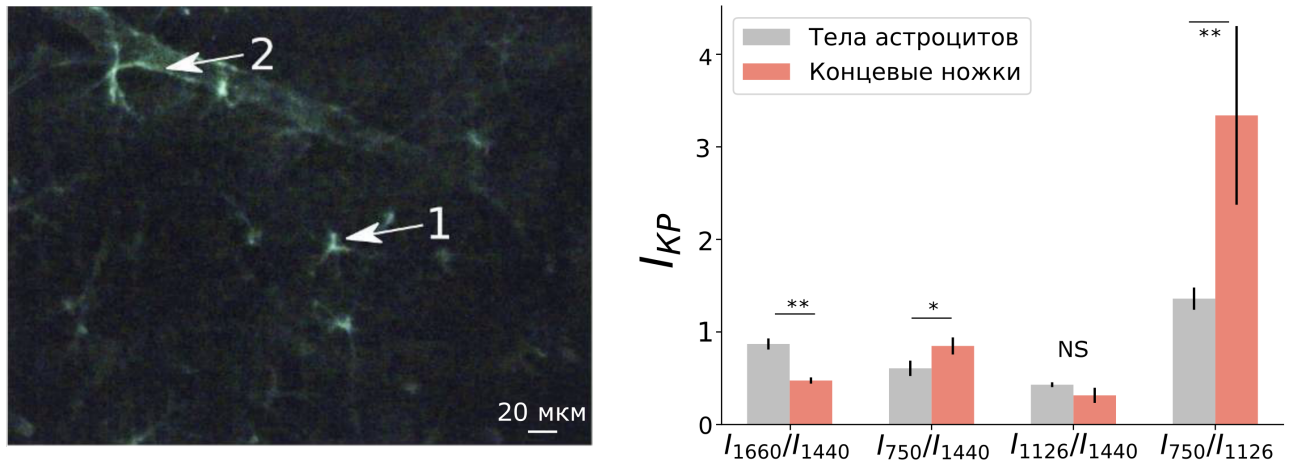


Рисунок 15. Слева – Флуоресцентное изображение среза гиппокампа мыши с иммуногистохимическим окрашиванием. Светло-зеленые клетки и отростки – астроциты, окрашенные первичными антителами на GFAP и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488. Стрелками указаны: тело астроцита – 1, концевая ножка астроцита вокруг кровеносного сосуда – 2. Справа – относительное содержание белков/липидов и редокс-состояние цитохромов ЭТЦ митохондрий в телах и концевых ножках астроцитов гиппокампа мышей. Гистограммы показаны для тел и концевых ножек астроцитов для относительного содержания белков, нормированного на общее количество липидов (соотношение пиков I_{1660}/I_{1440}), относительное содержание восст. цит. с-типа и b-типа, нормированных на липиды (соотношения I_{750}/I_{1440} и I_{1126}/I_{1440} , соответственно), а также содержание восст. цит. с-типа относительно восст. цит. b-типа (соотношение I_{750}/I_{1126}). По осям ординат указано значение соотношений интенсивностей указанных КР-пиков. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни, $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$, NS $p > 0.05$.

В группе (Эзрин ↓) есть тренд к увеличению средней длины веточек, однако он не достигает статистической достоверности (Рис. 16, в). Таким образом, генетическая модификация астроцитов за счет снижения количества структурного белка листочков – эзрина, приводит к достоверным морфологическим перестройкам астроцитов, происходит существенное уменьшение размера клеток, но не за счет изменения длины толстых отростков, а по всей видимости, за счет тонких отростков – листочков. Обнаруженные изменения могут влиять на эффективность синаптической передачи.

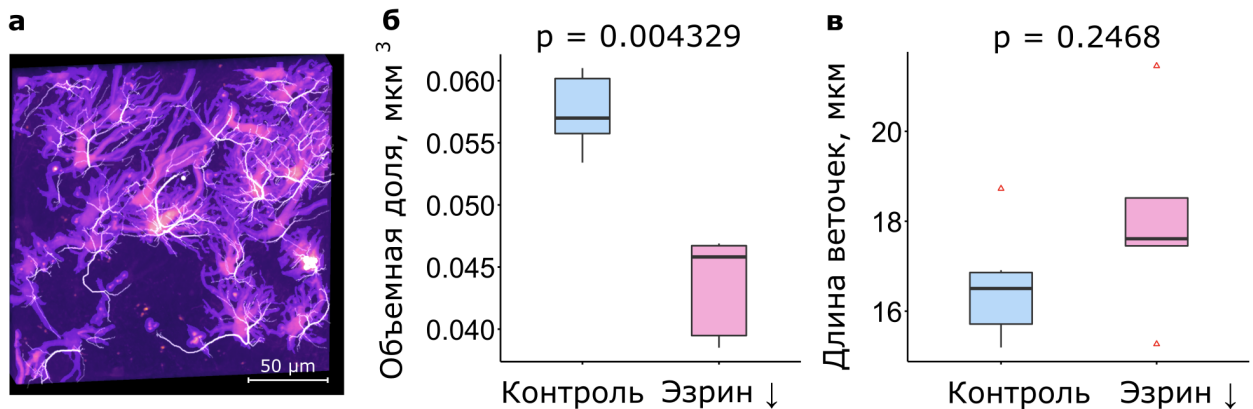


Рисунок 16. (а) – Флуоресцентное изображение морфологии астроцитов после построения масок (светло-фиолетовый) и скелетов (белый) клеток, (б) – Распределение объемной доли веточек астроцитов контрольной группы и группы со сниженной экспрессией белка эзрин (Эзрин ↓). (в) – Сравнение длины веточек астроцитов контрольной группы (голубой) и группы со сниженной экспрессией белка эзрин (Эзрин ↓). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Для оценки статистических различий был использован U-критерий Манна-Уитни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы разработали новый методический подход, основанный на КР-микроспектроскопии, который впервые позволил оценить метаболические особенности глио-нейро-васкулярных взаимодействий в мозге во время функциональных нагрузок. Степень оксигенации кровеносных сосудов области S1 увеличивается во время локомоции, и сопровождается вазодилатацией артериол, и в меньшей степени, венул. Различия в заполненности ЭТЦ наблюдались для концевых ножек астроцитов, это указывает на неравномерную продукцию АФК, которые служат источником вторичного мессенджера NO, индуцирующего вазодилатацию.

Увеличение заполненности ЭТЦ в митохондриях астроцитов во время локомоции приводит к продукции сигнальной молекулы H_2O_2 , которая играет важное значение в процессах обучения и памяти (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019), и вероятно, при функциональных нагрузках. В нейронах во время локомоции уровень восст. цит. снижается, что свидетельствует об ускорении переноса электронов и усилении ОФ в ответ на увеличение энергетических потребностей. В астроцитах при локомоции в ЭТЦ увеличивается количество электронов, это может быть связано с замедлением их транспорта из-за подавления ОФ в силу активации гликолиза и β -окисления жирных кислот. Активация гликолиза в астроцитах используется для продукции большего количества лактата, который транспортируется в нейроны для поддержания их активного метаболизма, а именно, цикла Кребса и ОФ. Активация β -окисления жирных кислот в астроцитах увеличивает заполненность ЭТЦ электронами.

Функциональные отличия ответа ЭТЦ астроцитов и нейронов не опосредованы морфологическими перестройками или различием в распределении и морфологии митохондрий этих типов клеток *in vivo*.

Мы показали, что гипергликемия увеличивает относительное количество восст. цит. в ЭТЦ нейронов, но не в астроцитах *in vivo* (Kotova et al., 2023). Нейроны предпочтительно метаболизируют глюкозу через пентозофосфатный путь для обеспечения антиоксидантной защиты и клеточного выживания (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009; Vaughn & Deshmukh, 2008) и используют лактат из астроцитов в качестве основного источника энергии для ОФ (Bolaños, 2016; Kasparov, 2016; Mächler et al., 2016). В астроцитах в ответ на гипергликемию происходит усиление гликолиза, а образующийся избыточный лактат транспортируется в нейроны, переводится в пируват и в виде кофермента А входит в цикла Кребса, в конечном счете увеличивая загрузку ЭТЦ электронами. При этом, судя по нашим данным, работа астроцитарной ЭТЦ при гипергликемии не меняется, поскольку гликолиз практически не поставляет пируват для цикла Кребса астроцитарных митохондрий.

Мы показали, что HFD способствует возникновению ряда метаболических изменений в астроцитах гиппокампа, но не в нейронах (Popov et al., 2022). В астроцитах наблюдается увеличение относительного содержания липидов, которые могут метаболизироваться за счет β -окисления жирных кислот и последующего ОФ в астроцитах (Ioannou et al., 2019). Увеличение относительного количества восст. цит. c- и b-типов в астроцитах после HFD указывает на перегрузку ЭТЦ электронами, вероятно связанную с увеличением поступления первичных доноров электронов, образующихся в результате β -окисления жирных кислот (Ioannou et al., 2019). Усиление катаболизма жирных кислот в астроцитах может способствовать продукции АФК, которые играют важную сигнальную роль в различных когнитивных процессах (Morant-Ferrando et al., 2023) и вероятно связаны с отмеченным улучшением исследовательского поведения мышей при HFD.

Эффективная доставка энергетических субстратов и регуляция нейропередачи зависит от морфологической пластичности мелких отростков астроцитов – листочков. Основным структурным элементом листочков астроцитов является белок эзрин (Derouiche & Geiger, 2019). Мы разработали новый подход для анализа морфологии астроцитов на основе метода быстрого марша и показали, что снижение количества эзрина в астроцитах гиппокампа приводит к уменьшению астроцитарного домена, вероятно это способствует менее эффективному охвату синаптической щели и влияет на нейропередачу.

Выводы

1. Установлено, что в условиях *in vivo* в соматосенсорной коре мозга бодрствующих мышей в состоянии покоя ЭТЦ митохондрий астроцитов демонстрирует большее заполнение электронами, чем ЭТЦ нейронов, при этом во время локомоции ЭТЦ астроцитов дополнительно заполняется электронами, что сопровождается продукцией пероксида водорода, а в нейронах происходит снижение относительного содержания восстановленных переносчиков электронов без образования H_2O_2 .

2. Морфология, распределение и подвижность митохондрий одинаковы для астроцитов и нейронов коры бодрствующих мышей.

3. Острая гипергликемия приводит к заполнению электронами ЭТЦ нейронов, но не астроцитов, что свидетельствует о преимущественном поступлении электронов в ЭТЦ нейронов от НАДН и сукцината, образующихся в цикле Кребса, и о незначительном влиянии гликолиза в астроцитах на их окислительное фосфорилирование.

4. Диета с высоким содержанием жира приводит к метаболическим перестройкам астроцитов, но не нейронов: накоплению липидов в цитоплазме астроцитов и накоплению электронов в астроцитарной ЭТЦ, без изменений в редокс-состоянии митохондрий и белок-липидном составе цитоплазмы нейронов, что свидетельствует о существенном влиянии на ОФ астроцитов β -окисления жирных кислот.

5. ЭТЦ концевых ножек астроцитов больше заполнена электронами по сравнению с сомой и толстыми отростками, что может играть важное значение для генерации NO – вазодилататора.

6. Снижение количества структурного белка листочков астроцитов – эзрина – приводит к уменьшению площади астроцитарного домена, что может способствовать менее эффективному охвату синапса и влиять на нейротрансмиссию.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.24.

Нейробиология:

1. Bochkova Z.V., Baizhumanov A.A., Yusipovich A.I., Morozova K.I., Nikelshparg E.I., Fedotova A.A., **Tiaglik A.B.**, Xu Y., Brazhe A.R., Maksimov G.V., Bilan D.S., Khramova Yu. V., Parshina, E. Yu. & Brazhe N.A. The flexible chain: Regulation of structure and activity of ETC complexes defines rate of ATP synthesis and sites of superoxide generation // *Biophysical Reviews*. – 2025. – V. 17. – № 1. – P. 55–88. EDN: GLQACU. Импакт-фактор 3,7 (JIF). Ядро РИНЦ. (3.927/0.5)*
2. Kotova D.A., Ivanova A.D., Kelmanson I.V., Morozova K.I., Khramova Y.V., Solotenkov M.A., Stepanov E.A., Moshchenko A.A., **Tiaglik A.B.**, Fedotova A.A., Zalygin A.V., Oleinikov V.A., Katrukha A.G., Semyanov A., Belousov V.V., Fedotov A.B., Fedotov I.V., Brazhe, N.A. & Bilan D.S. Redox Differences Between Neurons and Astrocytes In Vivo in Ischemic Brain Tissues of Rodents // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2025. – V. 43. – № 4–6. – P. 272–287. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2024.0876>. Импакт-фактор 6,1 (JIF). Ядро РИНЦ. (1.733/0.7)*
3. Kotova D.A., Ivanova A.D., Pochechuev M.S., Kelmanson I.V., Khramova Y.V., **Tiaglik A.B.**, Sudoplatov M.A., Trifonova A.P., Fedotova A.A., Morozova K.I., Katrukha V. A., Sergeeva A. D., Raevskii R. I., Pestriakova M. P., Solotenkov M. A., Stepanov E. A., Tsopina A. S., Moshchenko A. A., Shestopalova M., Zalygin A., Fedotov I. V., Fedotov A. B., Oleinikov V., Belousov V. V., Semyanov A., Brazhe, N. A., Zheltikov A. M., Bilan D.S. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide // *Free radical biology & medicine*. – 2023. – V. 208. – P. 153–164. EDN: ZRUPLE. Импакт-фактор 8,2 (JIF). Ядро РИНЦ. (1.386/0.5)*
4. Popov A., Brazhe N., Fedotova A., **Tiaglik A.**, Bychkov M., Morozova K., Brazhe A., Aronov D., Lyukmanova E., Lazareva N., Li L., Ponimaskin E., Verkhatsky A., Semyanov A. A high-fat diet changes astrocytic metabolism to promote synaptic plasticity and behavior // *Acta physiologica*. – 2022. – Vol. 236, no. 1. – e13847. EDN: FRIQFV. Импакт-фактор 5,6 (JIF). Ядро РИНЦ. (1.617/0.82)*

* – Объем в усл. печ. л./вклад автора в усл. печ. л.