

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Морозова Ксения Игоревна

Редокс-состояние дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов в
норме и при патологиях в условиях *in vivo*

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель	Браже Надежда Александровна , кандидат биологических наук
Официальные оппоненты	Лопина Ольга Дмитриевна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии, ведущий научный сотрудник Сурин Александр Михайлович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», главный научный сотрудник Ширманова Марина Вадимовна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, заместитель директора по науке

Защита диссертации состоится «4» декабря 2025 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3624>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы

Перенос электронов по дыхательной цепи (ЭТЦ) митохондрий лежит в основе энергетического обмена в клетке. Комплексы ЭТЦ встроены во внутреннюю мембрану митохондрий и осуществляют транспорт электронов от восстановленных эквивалентов к конечному акцептору электронов – кислороду. Субстраты для окисления комплексами ЭТЦ могут синтезироваться в результате двух основных метаболических путей, осуществляемых в матриксе митохондрий: цикла Кребса и бета-окисления жирных кислот.

Побочным продуктом работы ЭТЦ являются активные формы кислорода (АФК), обладающие высокой окислительной способностью (Brand, 2010). Длительное время считалось, что АФК оказывают преимущественно токсическое воздействие на клетку, но недавние исследования показали, что АФК могут также иметь физиологическое значение. Например, сигнальные функции в клетке может выполнять перекись водорода (H_2O_2) – наиболее стабильная АФК (Vicente-Gutierrez *et al.*, 2019). Отток электронов с комплекса III на сульфитоксидазу – фермент, присутствующий в межмембранном пространстве митохондрий – приводит к восстановлению оксида азота (NO) из нитрита (Christie *et al.*, 2023). Оксид азота, производимый митохондриями, обеспечивает регуляцию диаметра просвета сосудов и артериального давления, влияя на приток кислорода к тканям. Таким образом, степень заполненности ЭТЦ электронами играет роль в выполнении не только биоэнергетических, но и регуляторных и сигнальных функций.

Регуляция процессов переноса электронов по ЭТЦ зависит от многих факторов: в частности, от пространственной организации комплексов во внутренней мембране митохондрий. Комплексы ЭТЦ могут быть обособлены друг от друга, но в клетках с высокой интенсивностью окислительного фосфорилирования комплексы ЭТЦ часто собраны в суперкомплексы – респирасомы, обеспечивающие быстрый и эффективный транспорт электронов наряду с низкой доступностью сайтов генерации АФК (Letts and Sazanov, 2017). Влияние пространственной организации комплексов на степень заполнения ЭТЦ электронами в условиях *in vivo* мало исследовано: основные результаты в этой области получены на клеточных культурах и изолированных митохондриях.

Помимо пространственной организации комплексов на функционирование ЭТЦ также влияет биодоступность первичных доноров электронов и кислорода, которая в условиях *in vivo* может меняться сложным образом в зависимости от условий микроокружения, в котором находятся клетки. Примером клеток, функционирующих в пределах одного органа, но отличающихся пространственной организацией комплексов ЭТЦ, являются астроциты и нейроны головного мозга (Lopez-Fabuel *et al.*, 2016). Исследования *in vitro* показали, что ЭТЦ митохондрий астроцитов характеризуется

обособлением комплексов, а в митохондриях нейронов, напротив, наблюдается сборка комплексов ЭТЦ в респирасомы.

При разной пространственной организации комплексов степень заполненности ЭТЦ электронами может по-разному меняться под воздействием физиолого-биохимических факторов: при действии физиологических нагрузок, изменении биодоступности доноров электронов и кислорода. Изучение редокс-состояния ЭТЦ под воздействием этих факторов необходимо не только для фундаментального понимания процессов транспорта электронов в митохондриях, но и для исследования развития патологических процессов, затрагивающих состояние митохондрий: в частности, болезни Альцгеймера и инвазии злокачественных опухолей.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы было установление роли физиолого-биохимических факторов в регуляции редокс-состояния ЭТЦ в зависимости от пространственной организации в клетках в условиях *in vivo* в норме и при патологиях.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать методический подход для сравнительного исследования редокс-состояния ЭТЦ в митохондриях идентифицированных астроцитов и нейронов в мозге по доле восстановленных цитохромов ЭТЦ в условиях *in vivo*;
2. Исследовать механизмы влияния физиолого-биохимических факторов на изменения редокс-состояния цитохромов ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo*.
3. Изучить редокс-состояние цитохромов ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo* при патологиях.

Положения, выносимые на защиту

Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo* определяется пространственной организацией комплексов и особенностями метаболизма данных клеток.

Снижение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов может являться фактором, приводящим к развитию патологий мозга.

Научная новизна работы

Установлено, что в условиях *in vivo* редокс-состояние ЭТЦ в митохондриях астроцитов, необходимое для обеспечения H_2O_2 -зависимой сигнализации и NO-опосредованной регуляции диаметра просвета сосудов, определяется повышенной заполненностью ЭТЦ электронами. Показано, что при патологиях мозга в митохондриях астроцитов и нейронов изменяется заполненность ЭТЦ электронами, что связано со структурными перестройками в ЭТЦ.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные расширяют имеющиеся представления о роли митохондрий в астроцитах и нейронах, демонстрируя связь между степенью загруженности ЭТЦ

электронами и сигнальной и сенсорной функцией митохондрий. Разработанный подход для регистрации спектров КР в условиях *in vivo* может применяться в экспериментах по изучению функционирования клеток мозга и регуляции локального кровоснабжения в норме и при патологиях. Выявленные особенности, связанные с развитием болезни Альцгеймера и инвазией злокачественных опухолей, могут использоваться для разработки диагностических и терапевтических подходов.

Методология и методы исследования

Для исследования редокс-состояния комплексов ЭТЦ митохондрий в астроцитах и нейронах в условиях *in vivo* и *ex vivo* использовались мыши линии C57Bl/6 и 5xFAD и коронарные срезы мозга мышей линий C57Bl/6 в возрасте 2-3 и 6-12 месяцев. Доступ к клеткам головного мозга у бодрствующих животных осуществлялся посредством имплантации хронических краниальных окон в область соматосенсорной коры с инъекцией вирусных частиц, приводящих к синтезу флуоресцентных белков в астроцитах и нейронах (GFP, NirFP, HyPer7). В работе применялась спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) и двухфотонная лазерная микроскопия.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные в ходе работы результаты являются воспроизводимыми, а их достоверность проверялась с использованием релевантных статистических тестов. Данные получены в ходе корректно поставленных экспериментов.

Основные результаты работы были представлены на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ и семинарах отдела молекулярной нейробиологии и отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН, а также на российских и международных конференциях: FENS Forum 2022 (Париж, Франция, 2022), «Оптогенетика+ 2023» (Санкт-Петербург, Россия, 2023), 29-й международной конференции «Stress and behavior» (Ереван, Армения, 2023), XVI европейском съезде «Glial Cells in Health and Disease» (Берлин, Германия, 2023), FENS Forum 2024 (Вена, Австрия, 2024), русско-китайском форуме наук о жизни (Москва, Россия, 2024), «Оптогенетика+ 2025» (Санкт-Петербург, Россия, 2025) и др. По результатам работы опубликованы 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index».

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя Морозовой К.И. присутствует на всех этапах исследования. В работах [3] и [5] автор предложила и разработала методический подход для регистрации спектров КР от идентифицированных клеток в условиях *in vivo* и *ex vivo*. В работе [1] автор сравнила редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в мозге бодрствующих животных в норме и в условиях дефицита кислорода. В работах [4] и [6] автором было изучено влияние увеличения притока первичных доноров электронов на

степень загрузки ЭТЦ электронами в астроцитах и нейронах. В работе [2] было проанализировано влияние патологических процессов на редокс-состояние ЭТЦ в клетках головного мозга. Серии экспериментов по оценке влияния физиологических стимулов и повышенного притока глюкозы и жирных кислот на ЭТЦ астроцитов и нейронов были выполнены совместно с сотрудницей группы редокс-нейробиологии отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН Тяглик А.Б.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов, выводов и списка литературы. Полный объем диссертации составляет 126 страниц с 51 рисунком и 3 таблицами. Список литературы содержит 98 наименований.

Основное содержание работы

Введение

Во введении дана общая характеристика работы: описана её актуальность и степень проработанности темы, приведены цели, задачи и положения, выносимые на защиту. Описана научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

Обзор литературы

В обзоре рассматриваются данные о функционировании комплексов ЭТЦ митохондрий и сайтах продукции АФК в них, а также об их пространственной организации и связи с метаболизмом клеток. Описываются различия в структуре ЭТЦ в митохондриях астроцитов и нейронов, выявленные *in vitro*. Рассматриваются функции астроцитов и нейронов, особенности их катаболизма и их связь с функционированием митохондрий. Также описываются известные патологические процессы, развивающиеся в клетках головного мозга при болезни Альцгеймера и инвазии злокачественных опухолей. Отдельно рассматриваются примеры применения спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) к биологическим исследованиям, анализу редокс-состояния ЭТЦ митохондрий и белок-липидного состава цитоплазмы клеток в норме и при патологиях.

Материалы и методы

Все описанные манипуляции и эксперименты с использованием лабораторных животных проведены в ГНЦ ИБХ РАН после одобрения комиссией по этике и использованию лабораторных животных (протокол №408, учитывающий этические и юридические нормы Rus-LASA и международные GLP-стандарты).

Препараты срезов тканей мозга животных. Коронарные срезы были изготовлены из мозга мышей линии C57Bl/6. В работе были использованы животные в возрасте 2-3 месяцев, содержащиеся на стандартном комбинированном корме и на корме, обогащённом жирами (SNIFF, Германия). Срезы мозга мышей с метастазом меланомы

были получены из Испанского национального центра по исследованию рака. Все растворы, используемые для интракардиальной перфузии и изготовления срезов были предварительно оксигенированы для сохранения редокс-состояния комплексов ЭТЦ митохондрий в нативном состоянии, а для фиксации использовался 4% раствор ПФА, приготовленный на оксигенированном растворе для инкубации. После фиксации срезы подвергались иммуногистохимическому окрашиванию на белки-маркеры астроцитов (GFAP) и нейронов (NeuN) по протоколу, совместимому с КР-исследованиями, помещались на предметные стёкла и высушивались при комнатной температуре в темноте.

Имплантация хронических краниальных окон и инъекция вирусных частиц. Для обеспечения доступа к тканям мозга животных в условиях *in vivo* производилась имплантация хронических краниальных окон над областью проекции передней лапы соматосенсорной коры мышей линии C57BL/6f в возрасте 7-8 месяцев (для животных линии 5xFAD – в возрасте 6 месяцев) под газовым наркозом. В ходе операций осуществлялась инъекция аденоассоциированных вирусов, приводящих к синтезу флуоресцентных белков, необходимых для идентификации клеток: GFP в цитоплазме астроцитов, NirFP в цитоплазме нейронов и HyPer7 (сенсор H₂O₂) в матриксе митохондрий астроцитов и нейронов. Над областью проведения операции размещалось крепление для фиксации животного под объективом микроспектрометра. Регистрация спектров КР осуществлялась через 3 недели после проведения операции после визуальной оценки состояния клеток при помощи двухфотонной микроскопии.

Регистрация спектров КР от срезов тканей мозга. Для регистрации спектров использовали КР-микроспектрометр NTEGRA SPECTRA (НТ-МДТ, Зеленоград), представляющий собой конфокальный КР-спектрометр, соединенный с инвертированным микроскопом (Leica, Германия). Регистрация спектров от срезов тканей мозга животных осуществлялась с использованием объектива x20, NA 0.45, мощность лазера на выходе из объектива составляла 1.5 мВт на область регистрации, время накопления сигнала – 30-60 с.

Регистрация спектров КР от тканей мозга бодрствующих животных. Животных фиксировали на моторизированной беговой дорожке (НТЦ УП РАН, Россия) на предметном столике прямого микроскопа FSM (Leica, Германия), совмещённого с конфокальным микроспектрометром (Renishaw, Великобритания). Регистрация спектров флуоресценции и КР производилась с использованием объектива x20, NA 0,4 (Olympus, Япония) и лазерного возбуждения с длинами волн 473, 532 и 633 нм и мощностью, не превышающей 1мВт на область регистрации. Кровеносные сосуды и клетки в головном мозге идентифицировались по оптическим изображениям, получаемым камерой микроспектрометра, или по спектрам флуоресценции экспрессируемых в них белков: GFP и HyPer7 (возб. 473 нм) или NirFP (возб. 633 нм). Время накопления КР-сигнала для клеток мозга составляло 10-20 с, для кровеносных сосудов – 1 с. Для оценки влияния

физиологической стимуляции производилась регистрация спектров в покое, при беге, вызванном активацией беговой дорожки, и последующем отдыхе. Системная гипергликемия индуцировалась внутрибрюшинной инъекцией глюкозы (20 мг/кг веса животного), локальная гипоксия – инъекцией бенгальского розового (20 мг/кг веса животного) и его последующей фотоактивацией.

Обработка данных и статистический анализ. Коррекция фона в спектрах КР осуществлялась вручную при помощи пакета Rугаmap и при помощи полуавтоматического алгоритма локальной аппроксимации базовой линии линейной функцией. Далее определяли интенсивности пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов С-типов (750 см^{-1}), В-типов (1126, 1338 см^{-1}), липидов (1440 см^{-1}), фенилаланина (1003 см^{-1}) и белков (1660 см^{-1}). По соотношению их интенсивностей определялось относительное содержание молекул интересующего типа в клетке: I_{750}/I_{1440} , I_{1126}/I_{1440} (относительное содержание восстановленных цитохромов С- и В-типов по сравнению с липидами, соответственно). Программный код, необходимый для анализа и визуализации данных, создавался и редактировался с использованием веб-интерфейса Jupyter Notebook для Python3. Для сравнения групп использовался U-тест Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Из экспериментов, проведённых *in vitro* известно, что ЭТЦ в митохондриях астроцитов характеризуется обособленными комплексами и преимущественно использует бета-окисление жирных кислот как источник электронов, в то время как в митохондриях нейронов комплексы ЭТЦ собраны в респирасомы и в основном получают электроны из цикла Кребса (рис. 1). При этом неизвестно, наблюдаются ли различия в редокс-состоянии ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в условиях *in vivo* при различных стимулах, могут ли они иметь сигнальное значение и меняются ли при патологиях. В связи с этим в последующих сериях экспериментов мы исследовали изменение загрузки ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов и нейронов в нормальном состоянии и при ответе на физиологический стимул, увеличение притока доноров электронов и локальный дефицит кислорода, а также при различных патологиях, связанных с нарушением функций митохондрий. Для проведения данных исследований нами был предложен и разработан методический подход, основанный на микроспектроскопии КР, совмещенной с регистрацией спектров флуоресценции от биосенсора HyPer7 или флуоресцентных белков-маркеров (GFP или NirFP), экспрессированных под тканеспецифичным промотором в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры мышей с установленным хроническим стеклянным краниальным окном. Для проведения экспериментов при естественных стимулах на бодрствующих мышах использовали специально разработанную беговую дорожку с П-образным мостиком для фиксации металлического параплана, закрепленного вокруг краниального окна на голове мыши. Регистрацию

спектров флуоресценции с использованием лазерного возбуждения 473 или 633 нм проводили для идентификации клеток, после чего регистрировали спектры КР от астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов головного мозга при лазерном возбуждении 532 нм.

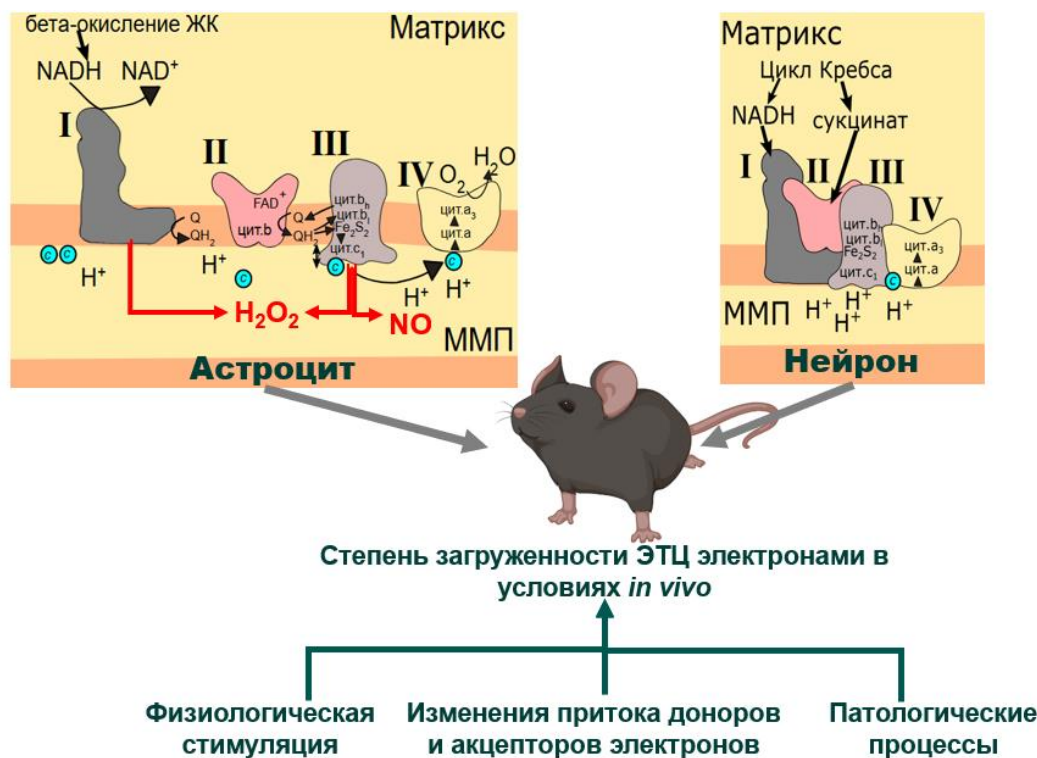


Рисунок 1: Схема строения ЭТЦ в митохондриях астроцитов и нейронов. Зелеными стрелками показаны воздействия, использованные в данной работе для сопоставления редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo*.

Относительное количество восстановленных цитохромов различается в астроцитах и нейронах *in vivo**

*Автор диссертации проводила регистрацию спектров КР от идентифицированных астроцитов и нейронов в головном мозге животных, их обработку и анализ полученных данных.

Были проанализированы спектры, зарегистрированные от нейронов и астроцитов в соматосенсорной коре мозга бодрствующих мышей в условиях *in vivo*. Клетки были идентифицированы по спектрам флуоресценции белков-маркеров: GFP в астроцитах и NirFP в нейронах (рис. 2А). Их фоновая флуоресценция не препятствовала регистрации спектров КР с использованием лазерного возбуждения с длиной волны 532 нм. В спектрах КР присутствуют пики, ассоциированные с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов С- и В-типов, липидов и белков (рис. 2Б). Интенсивность пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов ($750, 1126 \text{ см}^{-1}$), была выше в спектрах, зарегистрированных от астроцитов, чем от нейронов.

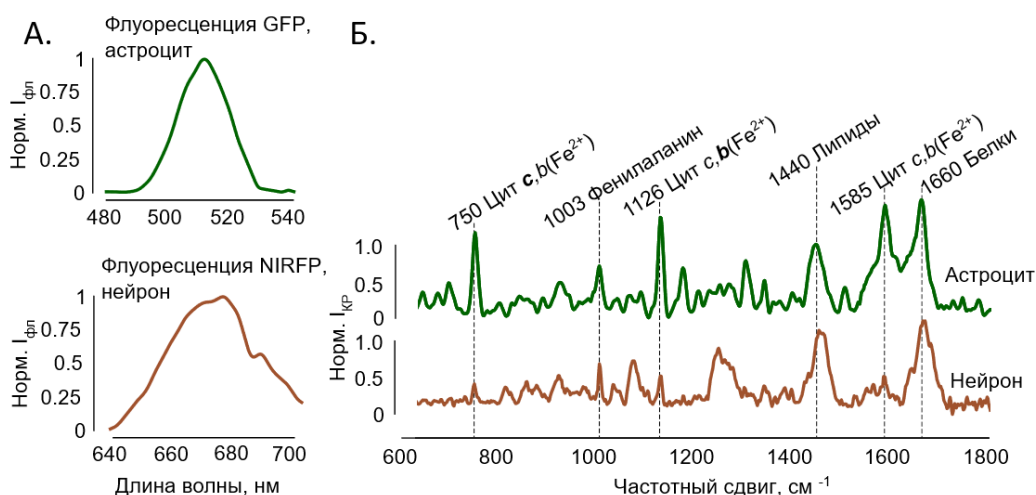


Рисунок 2: Идентификация клеток по флуоресценции маркеров для последующей регистрации спектров КР. А – спектры флуоресценции, зарегистрированные от белка GFP в цитоплазме астроцитов (зелёный спектр, возб. 473 нм) и NirFP в цитоплазме нейронов (коричневый спектр, возб. 633 нм), спектры нормированы на максимальную интенсивность флуоресценции; Б – спектры КР, зарегистрированные от идентифицированных астроцита (зелёный спектр) и нейрона (коричневый спектр, возб. 532 нм, спектр нормирован на интенсивность пика с положением максимума 1440 см⁻¹ (колебания Н-С-Н связей в липидах).

Относительное количество восстановленных цитохромов С- и В-типов по отношению к общему количеству липидов, рассчитанное как соотношение интенсивностей пиков с положением максимумов 750 и 1440 см⁻¹ (I_{750}/I_{1440}), также было выше в астроцитах, чем в нейронах (рис. 3). Это говорит о различиях в степени загруженности ЭТЦ электронами в астроцитах и нейронах в условиях *in vivo*, что связано со строением ЭТЦ в этих клетках. Обособление комплексов ЭТЦ в митохондриях астроцитов способствует более низкой эффективности транспорта электронов и выражается в более высокой доле восстановленных переносчиков, в то время как более эффективная ЭТЦ нейронов с комплексами, собранными в респирасомы, характеризуется более низкой степенью заполненности электронами.

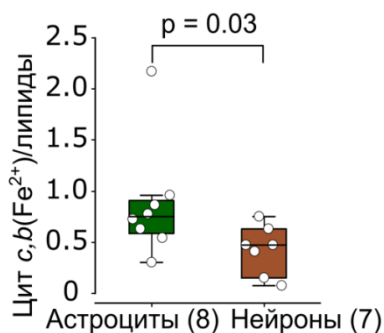


Рисунок 3: Митохондрии астроцитов и нейронов *in vivo* отличаются по относительному содержанию цит. С, В (Fe²⁺). Диаграмма размаха для относительного количества восстановленных цитохромов С- и В-типов в ЭТЦ митохондрий по сравнению с липидами в астроцитах и нейронах *in vivo*. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни.

Изменение редокс-состояния ЭТЦ митохондрий нейронов при ответе на физиологический стимул*

*Автор диссертации проводила регистрацию спектров КР от идентифицированных нейронов в головном мозге животных, их обработку и анализ полученных данных.

Различия в пространственной организации комплексов ЭТЦ в астроцитах и нейронах могут приводить к различиям в функционировании митохондрий в этих клетках и их ответе на физиологические стимулы. Для оценки влияния активации клеток на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в мозге бодрствующих животных была проведена серия экспериментов по сравнению степени загрузки ЭТЦ электронами в покое, при беге и последующем отдыхе. Бег (физиологический стимул) вызывает активацию нейронов в области соматосенсорной коры, что приводит к ответной активации астроцитов.

В спектрах, зарегистрированных от нейронов, относительная интенсивность пиков, ассоциированных с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов, снижалась при физиологическом стимуле и восстанавливалась во время отдыха (рис. 4, 5А).

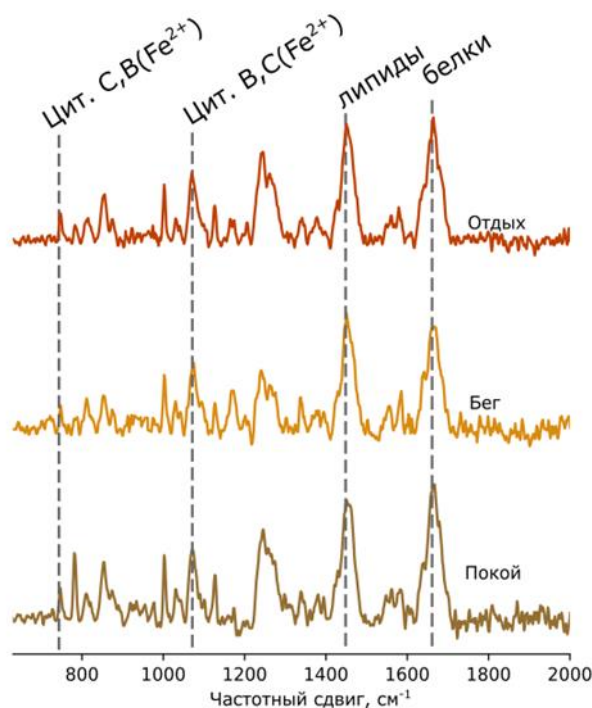


Рисунок 4: Изменение спектров КР нейронов при физиологическом стимуле свидетельствует об уменьшении относительного количества восстановленных цитохромов. Спектры КР, зарегистрированные от нейронов в области соматосенсорной коры головного мозга бодрствующих животных в покое (снизу), при физиологическом стимуле (посередине) и последующем отдыхе (сверху). Интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на интенсивность пика с положением максимума 1440 см^{-1} .

Для сравнения редокс-состояния ЭТЦ митохондрий в нейронах в покое, при физиологическом стимуле и последующем отдыхе рассчитанные по спектрам соотношения амплитуд пиков I_{750}/I_{1440} для состояния покоя были приняты за 100%, после чего были рассчитаны изменения этих соотношений для бега и отдыха (рис. 5Б): при физиологическом стимуле наблюдалось снижение относительного количества восстановленных цитохромов С- и В-типов (I_{750}/I_{1440}).

Активация нейронов при физиологическом стимуле приводит к усиленному синтезу и расходу АТФ, а снижение доли восстановленных цитохромов говорит об ускорении электронного транспорта в ЭТЦ в ответ на возросшие энергетические потребности. Активация ЭТЦ может приводить к генерации супероксид-анион радикала, O_2^- , преобразуемого в H_2O_2 . Однако, при физиологическом стимуле не наблюдалось значимых изменений во флуоресценции HyPer7 (сенсор H_2O_2), что позволяет заключить, что

активация ЭТЦ в митохондриях нейронов соматосенсорной коры не приводит к увеличению генерации АФК (рис. 6).

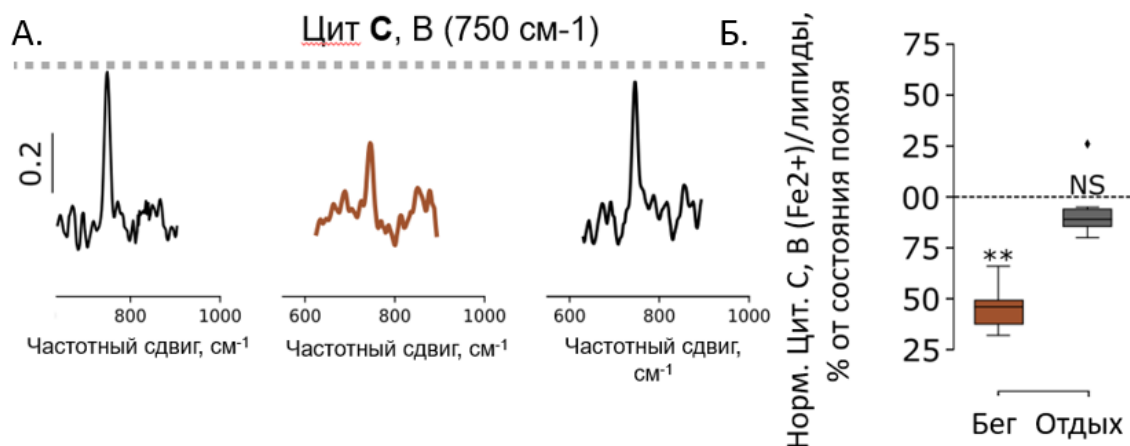


Рисунок 5: Снижение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях нейронов при физиологическом стимуле. А – изменение амплитуды пика в положении 750 см^{-1} , ассоциированного с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов С- и В-типов, в спектрах, зарегистрированных от нейрона в покое (чёрный) и при физиологическом стимуле (коричневый). Б - диаграмма размаха для соотношений амплитуд пиков с положениями максимумов 750 и 1440 см^{-1} в спектрах, зарегистрированных от нейронов в головном мозге бодрствующих животных при физиологическом стимуле и отдыхе. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, ** - $p < 0,01$, NS – not significant (значимых различий нет).

Организация комплексов ЭТЦ в респирасомы в митохондриях нейронов способствует быстрому и эффективному синтезу большого количества АТФ. Ускорение транспорта электронов при возбуждении нейронов и последующее восстановление этого параметра говорит о способности их митохондрий быстро компенсировать потребности клетки в АТФ. Доступность сайтов генерации АФК в респирасомах снижена, что может служить мерой эндогенной защиты от их токсического воздействия.

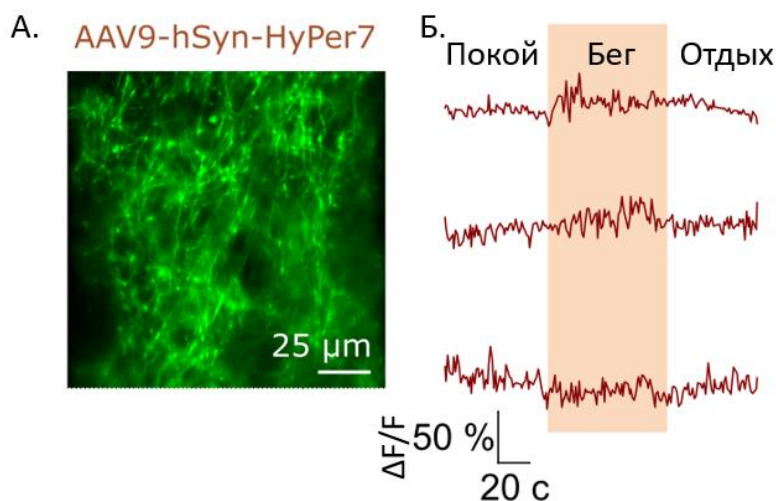


Рисунок 6: Митохондрии нейронов демонстрируют отсутствие изменений в генерации H_2O_2 при физиологическом стимуле. Флуоресцентное изображение H_2O_2 -чувствительного сенсора HyPer7 в митохондриях нейронов соматосенсорной коры мышей (А) и зависимость относительного изменения интенсивности флуоресценции HyPer7 $\Delta F/F\%$ от времени при физиологическом стимуле (Б).

Изменение редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов при физиологическом стимуле*

**Автор диссертации проводила регистрацию спектров КР от идентифицированных астроцитов в головном мозге животных, их обработку и анализ полученных данных.*

Нейрон-опосредованная активация астроцитов вследствие физиологического стимула приводила к увеличению относительной интенсивности пиков, ассоциированных с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов (рис. 7, 8А) по сравнению с пиком, ассоциируемым с колебаниями связей в молекулах липидов что соответствует увеличению относительного содержания восстановленных цитохромов (рис. 8Б). Повышение этого параметра отражает увеличение степени загруженности ЭТЦ электронами: комплексы ЭТЦ в астроцитах обособлены друг от друга и транспорт электронов между ними ограничен скоростью диффузии подвижных переносчиков. Повышение доли восстановленных молекул в пуле подвижных переносчиков может свидетельствовать о снижении скорости электронного транспорта вследствие замедления АТФ-синтазы. Также при нейрон-зависимой активации астроцитов происходит Ca^{2+} -зависимое усиление процессов бета-окисления жирных кислот: увеличенный вследствие этого приток доноров электронов вносит вклад в увеличение степени загруженности ЭТЦ электронами.

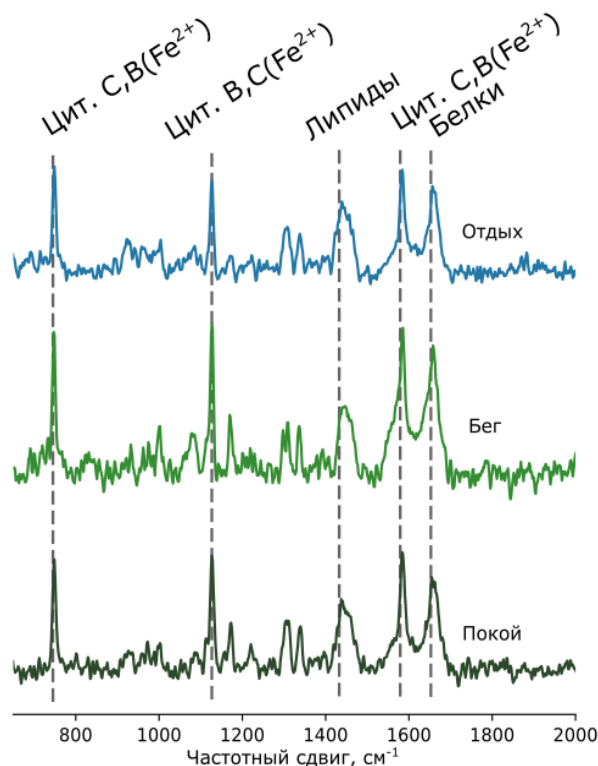


Рисунок 7: Изменение спектров КР астроцитов при физиологическом стимуле свидетельствует об увеличении относительного содержания цит. С- и В-типов (Fe^{2+}). Спектры, зарегистрированные от астроцитов в области соматосенсорной коры головного мозга бодрствующих животных в покое (снизу), при физиологическом стимуле (посередине) и последующем отдыхе (сверху). интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на интенсивность пика с положением максимума 1440 см^{-1} .

Далее была исследована генерация H_2O_2 в матриксе митохондрий астроцитов. При физиологическом стимуле наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции зонда HyPer7, свидетельствующее о значимом повышении уровней генерации H_2O_2 в астроцитах (рис. 9).

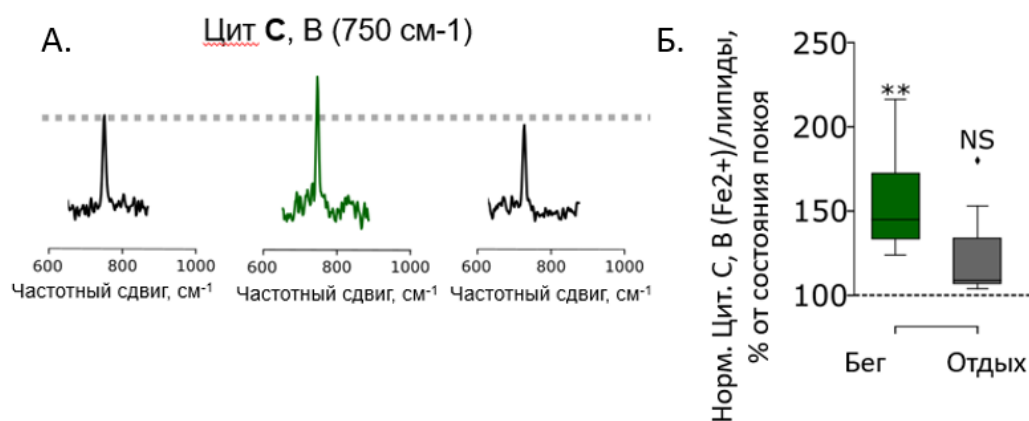


Рисунок 8: Повышение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов при физиологическом стимуле. А – изменение интенсивности пика с положением максимума 750 см^{-1} , ассоциированного с колебаниями атомов в гемах восстановленных цитохромов С- и В-типов, в спектрах, зарегистрированных от астроцита в покое (чёрный) и при физиологическом стимуле (зелёный). Б - диаграмма размаха для соотношений амплитуд пиков с положениями максимумов 750 и 1440 см^{-1} в спектрах, зарегистрированных от астроцитов в головном мозге бодрствующих животных при физиологическом стимуле и отдыхе. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, ** - $p < 0,01$, NS – not significant (значимых различий нет).

H_2O_2 – наиболее стабильная из АФК, выполняющая сигнальную функцию во многих метаболических путях. Известно, что астроциты в норме продуцируют достаточно большие количества H_2O_2 *in vitro*. Полученные результаты позволяют связать транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий и синтез H_2O_2 в астроцитах: увеличение степени загруженности ЭТЦ электронами приводит к повышению вероятности спонтанного переноса электрона на кислород с образованием супероксид-анион радикала (O_2^-) и затем H_2O_2 . Этому способствует структура ЭТЦ с обособленными комплексами. Таким образом, полученные результаты подтверждают физиологическое значение различных форм организации комплексов ЭТЦ *in vivo*.

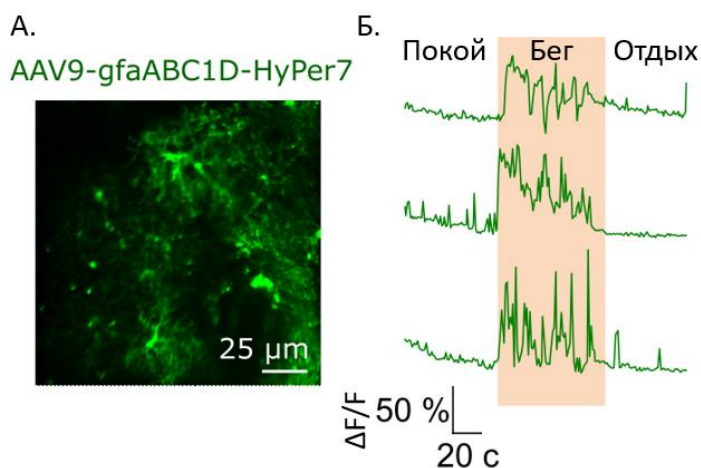


Рисунок 9: Митохондрии астроцитов демонстрируют увеличение генерации H_2O_2 при физиологическом стимуле. Флуоресцентное изображение H_2O_2 -чувствительного сенсора HyPer7 в митохондриях астроцитов соматосенсорной коры мышей (А) и зависимость относительного изменения интенсивности флуоресценции HyPer7 $\Delta F/F$ от времени при физиологическом стимуле (Б).

Влияние избытка глюкозы на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий нейронов и астроцитов*

*Автор диссертации выполнила операции по имплантации хронических краниальных окон, приучение животных к экспериментальной установке и проведение экспериментов по индукции острой гипергликемии.

Для создания условий повышенного притока субстратов окислительного фосфорилирования для митохондрий нейронов была проведена серия экспериментов по индукции гипергликемии у животных после голодания в течение 24 ч. В таких условиях внутрибрюшинная инъекция глюкозы приводила к быстрому и сильному повышению уровня сахара в крови, обеспечивая системную метаболическую нагрузку.

В нейронах головного мозга бодрствующих животных рост уровня глюкозы в крови вызывал повышение степени загруженности ЭТЦ электронами, выражавшееся в увеличении относительного количества восстановленных цитохромов В- и С-типов по сравнению с общим количеством липидов в клетке (рис. 10А, Б). В астроцитах же, напротив, повышенное содержание глюкозы в крови не вызывало значимых изменений в степени загруженности ЭТЦ электронами (рис. 10В, Г).

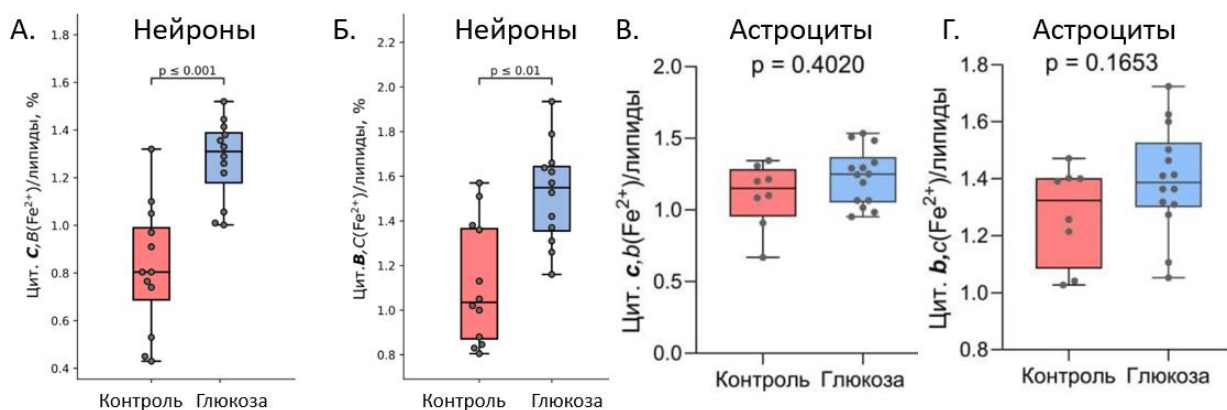


Рисунок 10: Изменение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов и нейронов при повышенном притоке глюкозы *in vivo*. Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков с положениями максимумов 750 и 1440 см⁻¹ (цит. С, В (Fe²⁺)/липиды, диаграммы А, В) и 1126 и 1440 см⁻¹ (цит. В, С (Fe²⁺)/липиды, диаграммы Б, Г) в спектрах, зарегистрированных от нейронов (А, Б) и астроцитов (В, Г) в головном мозге бодрствующих животных при нормальных условиях и гипергликемии. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни.

Известно, что астроциты удовлетворяют свои потребности в АТФ в основном за счёт гликолиза, конечным продуктом которого является лактат. Обособленность комплексов ЭТЦ в митохондриях астроцитов затрудняет быстрый синтез больших количеств АТФ в митохондриях: как было показано ранее, такая неэффективная пространственная организация ЭТЦ имеет важное значение для синтеза АФК.

Митохондрии астроцитов в меньшей степени вовлечены в энергетический метаболизм, чем митохондрии нейронов, а вырабатываемый астроцитами в результате гликолиза лактат передаётся нейронам через лактатный шаттл для поддержания их

активности. Для нейронов митохондрии служат основным источником АТФ для большинства метаболических процессов, поэтому увеличение притока доноров электронов приводит к повышенной загруженности ЭТЦ, в то время как в астроцитах таких изменений не происходит.

Влияние избытка жирных кислот на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий нейронов и астроцитов*

**Автор диссертации проводила ИГХ окрашивание и регистрацию спектров КР астроцитов и нейронов и их анализ.*

Из экспериментов, проведенных *in vitro*, известно, что митохондрии астроцитов получают субстраты для окислительного фосфорилирования преимущественно в результате бета-окисления жирных кислот. Астроциты также способны накапливать липиды, активируя их расщепление в случае дефицита питательных веществ. Чтобы оценить влияние повышенного количества жирных кислот как потенциально одного из основных субстратов окислительного фосфорилирования на редокс-состояние ЭТЦ астроцитов, использовались срезы мозга мышей, содержащихся на диете, обогащённой жирами.

Для нейронов повышенный приток жирных кислот не оказывал значительного влияния на редокс-состояние комплексов ЭТЦ митохондрий (рис. 11А, Б). В редокс-состоянии митохондрий астроцитов наблюдались изменения, выражавшиеся в значимом увеличении относительного количества восстановленных цитохромов С-типов (рис. 11В), но не В-типов (рис. 11Г).

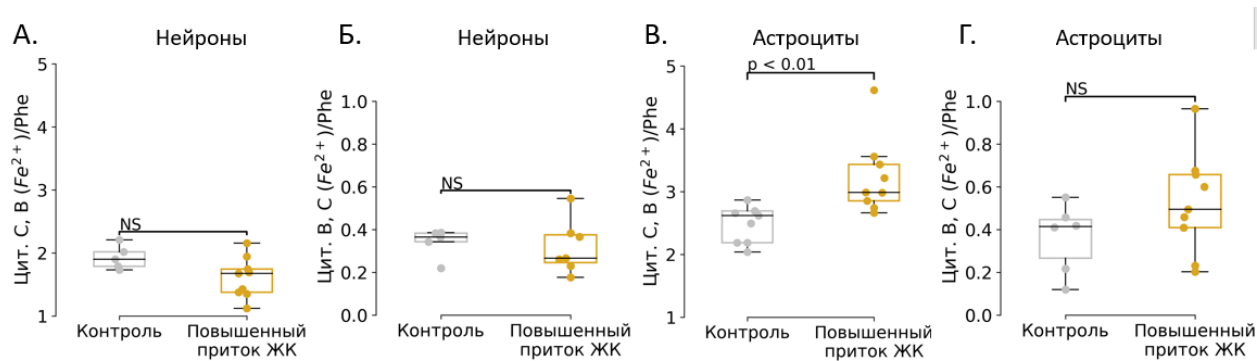


Рисунок 11: Изменение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов и нейронов при повышенном притоке жирных кислот. Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков с положениями максимумов 750 и 1003 см⁻¹ (цит. С, В (Fe²⁺)/фенилаланин, диаграммы А, В) и 1338 и 1003 см⁻¹ (цит. В (Fe²⁺)/фенилаланин, диаграммы Б, Г) в спектрах, зарегистрированных от нейронов (А, Б) и астроцитов (В, Г) в головном мозге бодрствующих животных при нормальных условиях и при содержании на диете с повышенным содержанием жиров. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, NS – not significant (нет различий).

Увеличение относительного количества восстановленных цитохромов С- типа в ЭТЦ митохондрий астроцитов отражает неоднородное увеличение степени загруженности ЭТЦ электронами: в условиях увеличенного содержания жирных кислот активируется их бета-окисление в матриксе митохондрий, в результате чего увеличивается приток электронов в

ЭТЦ. В силу разрозненного расположения комплексов ЭТЦ и медленного электронного транспорта возникает неравномерное переполнение ЭТЦ электронами — в «узком месте» на участке переноса электронов от комплекса III и комплексу IV (на цитохроме С). Ожидается, избыток жирных кислот не оказывает метаболической нагрузки на ЭТЦ митохондрий в нейронах, так как основным источником доноров электронов в них является цикл Кребса.

Таким образом, по результатам экспериментов по исследованию влияния избытка первичных доноров электронов на редокс-состояние митохондрий было установлено, что в условиях *in vivo* в случае нейронов происходит равномерное увеличение степени заполненности ЭТЦ электронами, в то время, как в астроцитах наблюдается увеличенное количество восстановленного цитохрома С, что связано с разрозненной структурой ЭТЦ и замедленным транспортом электронов от комплекса III к комплексу IV.

Изменение редокс-состояния митохондрий нейронов и астроцитов в ответ на локальный дефицит кислорода

Для моделирования условий, в которых возникает дефицит кислорода — конечного акцептора электронов в ЭТЦ — была проведена серия экспериментов по индукции локального дефицита кислорода посредством фотоиндуцированного тромбирования артериолы. После фотоактивации красителя ток крови в сосуде нарушался, и КР-спектры регистрировали от идентифицированных нейронов и астроцитов, расположенных в непосредственной близости от тромбированной артериолы, в течение часа после нарушения кровотока. Повторные измерения проводили через 20 часов — за это время локальный кровоток восстанавливался.

При сравнении спектров, зарегистрированных от астроцитов и нейронов до фотоиндуцированного тромбирования артериолы и через час после него, было показано, что увеличение относительной интенсивности пиков, ассоциированных с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов, наблюдается только в спектрах, зарегистрированных от астроцитов, но не нейронов (рис. 12).

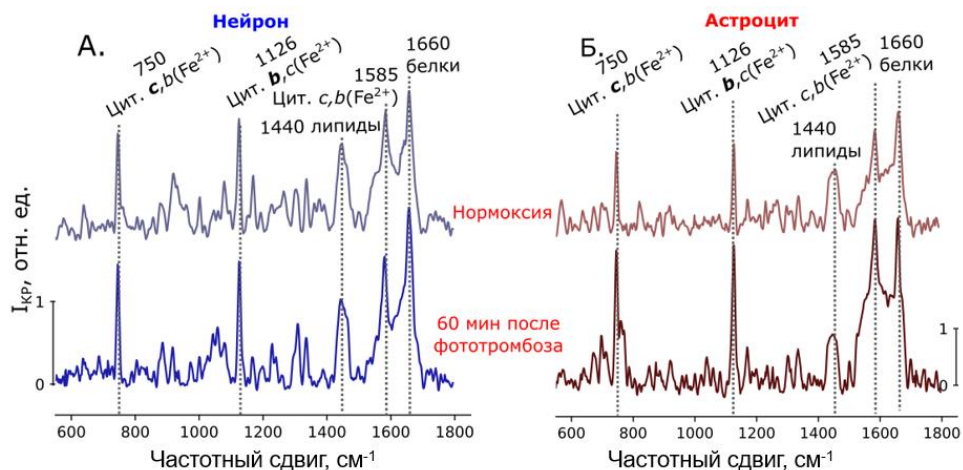


Рисунок 12: При локальном дефиците кислорода *in vivo* изменяются спектры КР астроцитов, но не нейронов. Спектры, зарегистрированные от нейронов (А) и астроцитов (Б) в головном мозге бодрствующей мыши в условиях нормоксии и через час после фотоиндуцированного тромбирования.

Относительная интенсивность сигнала от восстановленных цитохромов ЭТЦ митохондрий связана с уровнем её загрузки электронами, и её повышение характерно для дефицита конечного акцептора электронов в условиях гипоксии. Тем не менее, ЭТЦ в астроцитах и нейронах по-разному реагировала на локальный дефицит кислорода. Относительное количество восстановленных цитохромов В- и С-типов существенно возросло в астроцитах через час после фотоиндуцированного тромбирования, в то время как в нейронах изменений в этом параметре не наблюдалось (рис. 13), что связано с более эффективным транспортом электронов в ЭТЦ с респирасомами (в нейронах) по сравнению с разрозненными комплексами ЭТЦ (в астроцитах).

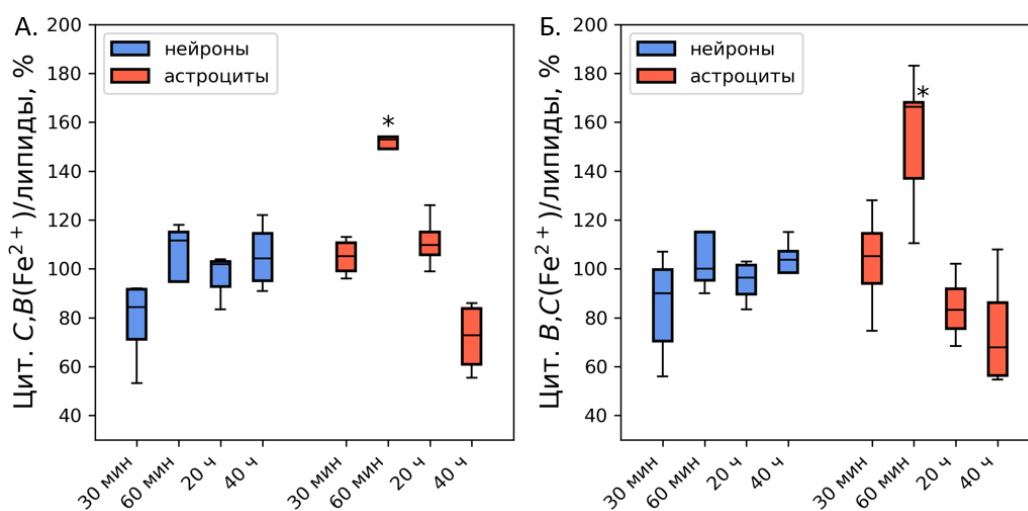


Рисунок 13: В условиях локального дефицита кислорода *in vivo* увеличивается загрузка ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов, но не нейронов. Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков с положениями максимумов 750 и 1440 см⁻¹ (цит. С, В (Fe²⁺)/липиды, А) и 1126 и 1440 см⁻¹ (цит. В, С (Fe²⁺)/липиды, Б) в спектрах, зарегистрированных от нейронов и астроцитов соматосенсорной коры бодрствующих животных в области локальной гипоксии через 30 мин, 60 мин, 20 и 40 ч после её индукции, * - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Известно, что важной сигнальной молекулой для регуляции вазодинамики является NO, который может синтезироваться в митохондриях ферментом сульфитоксидазой (SOX) из нитрита. Этот фермент получает электроны, необходимые для осуществления реакции восстановления нитрита, напрямую от комплекса III ЭТЦ митохондрий. Таким образом, мы полагаем, что при развитии локального дефицита кислорода повышающаяся степень загрузки ЭТЦ электронами в астроцитах играет физиологическую роль и необходима для повышения синтеза NO с последующим компенсаторным NO-зависимым увеличением диаметра артериол для улучшения локального кислородоснабжения мозга.

Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов и изменения в регуляции диаметра просвета сосудов при болезни Альцгеймера

В настоящее время известно, что многие патологии, в том числе нейродегенерации, связаны с нарушением функционирования митохондрий. Для того, чтобы установить, изменяется ли редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов при болезни

Альцгеймера (БА) и могут ли эти изменения быть причиной других нарушений в мозге при данном заболевании, мы исследовали заполненность ЭТЦ электронами в данных клетках, а также изучали локальную вазодинамику в соматосенсорной коре мозга бодрствующих мышей дикого типа и трансгенных мышей линии 5xFAD, созданной путем введения в их геном 5 мутированных генов человека, приводящих к формированию амилоидных отложений и накоплению тау-белка в мозге. Данная модель является общепринятой для изучения развития БА и характеризуется проявлением клеточных и поведенческих признаков заболевания у мышей в возрасте 6-8 месяцев.

У трансгенных животных наблюдалось значительное увеличение относительного количества восстановленных цитохромов В- и С-типов в ЭТЦ митохондриях нейронов (I_{1126}/I_{1440} , рис. 14). Это говорит об увеличении степени загруженности ЭТЦ электронами, что может объясняться снижением стабильности респирасомы при неправильном встраивании комплекса I, замедлением электронного транспорта и повышению генерации АФК. Эндогенные АФК оказывают существенное повреждающее действие на нейроны, что может быть одной из причин нейродегенерации при БА.

Для астроцитов при БА наблюдалось значимое снижение относительного количества восстановленных цитохромов В-типа (I_{1126}/I_{1440} , рис. 14). Комплекс III ЭТЦ, в состав которого входит цитохром В-типа, является важным источником АФК в клетке, и снижение его загруженности электронами может приводить к нарушениям генерации АФК, необходимых для нормального функционирования астроцитов. Также это может приводить к изменениям в регуляции диаметра просвета сосудов и ухудшению мозгового кровоснабжения, поэтому полученные данные были сопоставлены с данными о состоянии артериол головного мозга у животных линии 5xFAD.

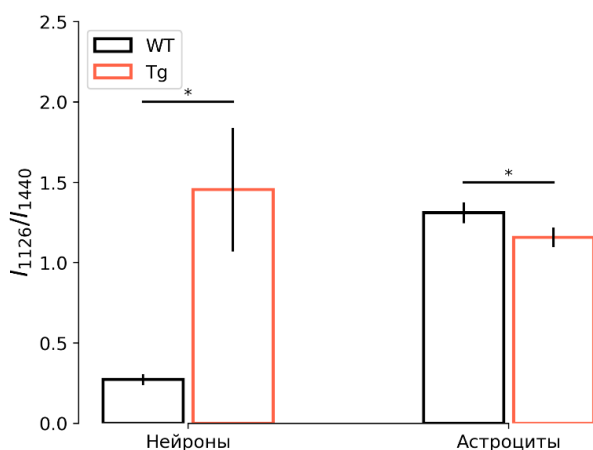


Рисунок 14: Изменение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях нейронов и астроцитов *in vivo* при БА. Относительное количество восстановленных цитохромов В, С-типа (I_{1126}/I_{1440}) в нейронах и астроцитах животных линии 5xFAD и дикого типа. Данные представлены в виде средних со стандартной ошибкой среднего, * - $p < 0,05$; (критерий Манна-Уитни).

Для оценки изменений в регуляции кровотока были проведены измерения диаметра просвета артериол в мозге трансгенных мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа того же возраста в покое, при беге и последующем отдыхе (рис. 15). Диаметр сосудов определяли по сигналу КР от гемоглобина крови в артериолах. Увеличение диаметра

просвета артериол в ответ на физиологический стимул наблюдалось у животных дикого типа, но не у трансгенных животных (рис. 16).

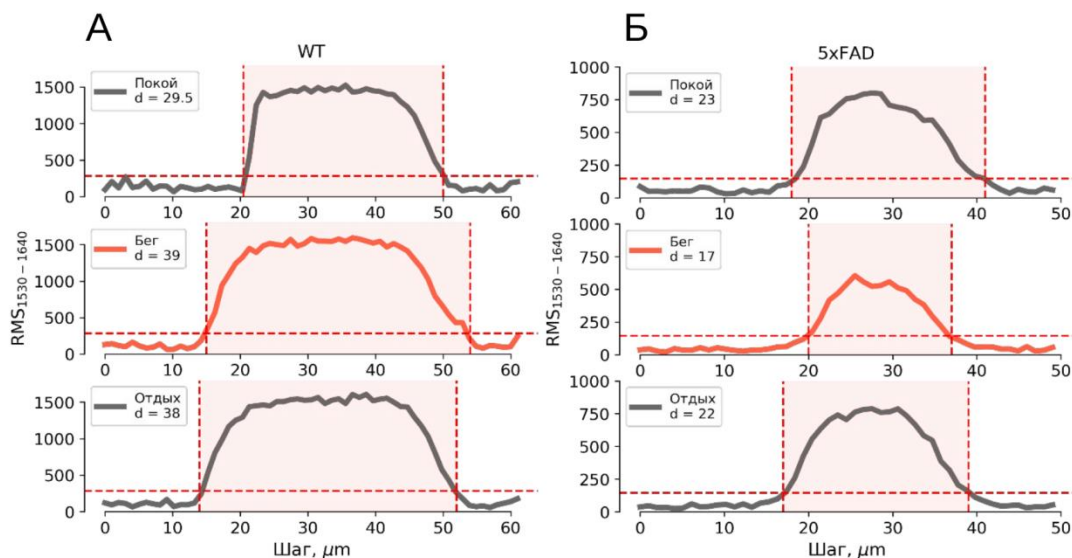


Рисунок 15: Изменения диаметра просвета артериол в головном мозге мышей *in vivo* норме и при БА. Скан-линии для оценки диаметра просвета артериол в области соматосенсорной коры бодрствующих мышей дикого типа (А) и трансгенных мышей линии 5xFAD (Б). Красный фон соответствует диаметру сосуда, RMS₁₅₃₀₋₁₆₄₀ – среднеквадратичная интенсивность КР-сигнала в области 1530-1640 см⁻¹, где присутствуют пики, ассоциированные с колебаниями связей в молекулах гемоглобина. По оси абсцисс указана пространственная координата, мкм.

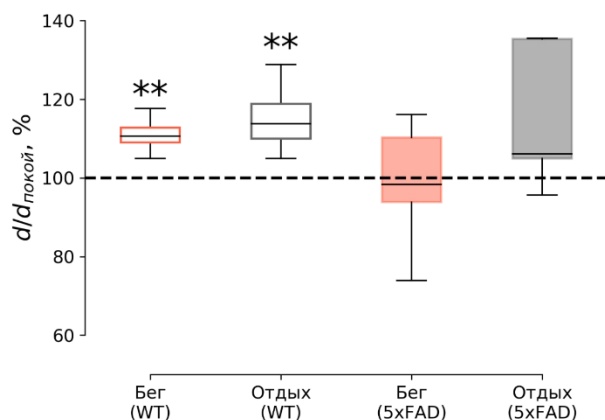


Рисунок 16: Нарушение регуляции диаметра просвета артериол *in vivo* при БА. Диаграммы размаха для относительного диаметра просвета артериол в головном мозге бодрствующих животных дикого типа (WT) и трансгенных животных линии 5xFAD при физиологической активности. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, ** - $p < 0,01$

Отсутствие увеличения диаметра просвета артериол в ответ на физиологический стимул говорит о недостаточном притоке кислорода и питательных веществ при усиленной активности клетки головного мозга.

В регуляции увеличения просвета артериол играет роль NO, который синтезируется в митохондриях астроцитов. Сульфитоксидаза, осуществляющая его биосинтез, может получать электроны для восстановления нитрита напрямую от комплексов ЭТЦ митохондрий астроцитов. Наблюдаемое снижение относительного количества восстановленных цитохромов В-типов в митохондриях астроцитов мозга трансгенных мышей при БА напрямую связано с вероятностью передачи электронов сульфитоксидазе и

синтезом NO. Таким образом, значимую роль в патогенезе БА играют изменения в транспорте электронов в ЭТЦ митохондрий астроцитов, которые могут приводить к ухудшению локального кислородоснабжения тканей мозга.

Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов в срезах мозга животных с метастазом меланомы в мозг

Другим примером комплексной патологии, затрагивающей многие аспекты метаболизма астроцитов и нейронов и, в частности, состояние митохондрий, являются опухоли головного мозга различного генеза. В настоящее время обсуждается, что нарушение свойств и редокс-состояния митохондрий астроцитов может являться важной причиной развития опухолей головного мозга. В связи с этим в заключительной серии экспериментов мы оценили редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов в микроокружении опухоли в срезах гиппокампа мышей с метастазом меланомы в мозг.

Было показано, что состояние ЭТЦ в митохондриях астроцитов вблизи метастаза и в здоровом полушарии различалось: в астроцитах в окружении метастаза относительное количество восстановленных цитохромов С- и В-типов было значительно ниже (рис. 17А). Притом, чем ближе клетка располагалась к метастазу, тем меньше было относительное количество восстановленных цитохромов в её митохондриях (рис. 17Б). Это свидетельствует о более низком уровне загруженности ЭТЦ электронами, что может приводить к нарушениям синтеза сигнальных АФК и снижению активации микроглии астроцитами. Неэффективное удаление опухолевых клеток клетками микроглии облегчает инвазию злокачественных опухолей.

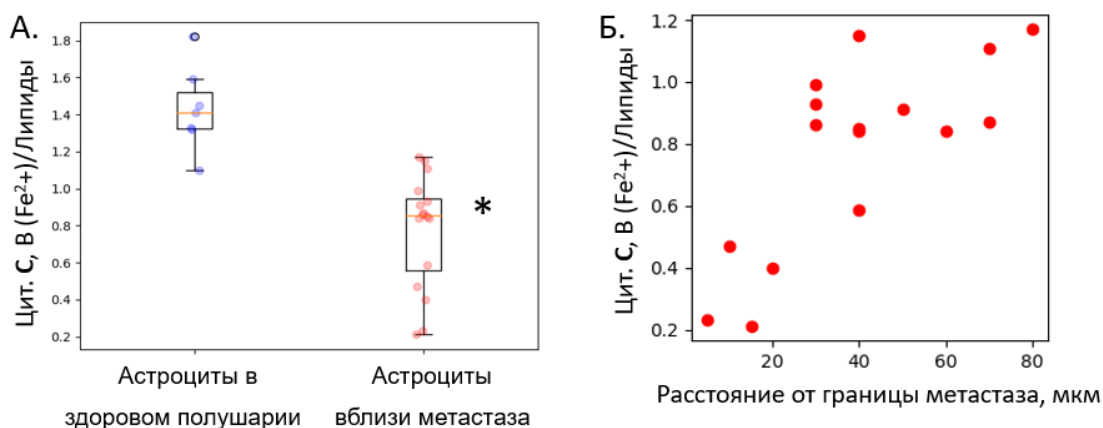


Рисунок 17: Снижение степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов в микроокружении злокачественной опухоли. А - сравнение относительного количества восстановленных цитохромов С-типа относительно общего количества липидов в клетке (I_{750}/I_{1440}) в митохондриях астроцитов в здоровом полушарии и в окружении метастаза меланомы в мозг (* - $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни); Б – зависимость относительного количества восстановленных цитохромов С-типа относительно общего количества липидов в клетке (I_{750}/I_{1440}) в митохондриях астроцитов от расстояния до метастаза меланомы в мозг.

Заключение

Благодаря разработанному нами методическому подходу на основе микроспектроскопии КР в настоящем исследовании были изучены механизмы регуляции ЭТЦ с разной пространственной организацией комплексов в митохондриях астроцитов и нейронов в условиях *in vivo*. Мы показали, что ЭТЦ с обособленными комплексами в митохондриях астроцитов обладает более высокой степенью заполненности электронами, связанной с менее эффективным электронным транспортом по сравнению с респирасомой – суперкомплексом ЭТЦ в митохондриях нейронов. Обнаруженные различия в эффективности электронного транспорта имеют физиологическое значение (рис. 18). При физиологической активации клеток мозга *in vivo* степень загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов возрастает, что сопряжено с повышенной генерацией H_2O_2 – стабильной АФК, выполняющей в мозге сигнальную роль. Активация нейронов, напротив, приводит к ускорению транспорта электронов в их митохондриях, что способствует усиленному синтезу АТФ в ответ на возросшие энергетические потребности клетки.

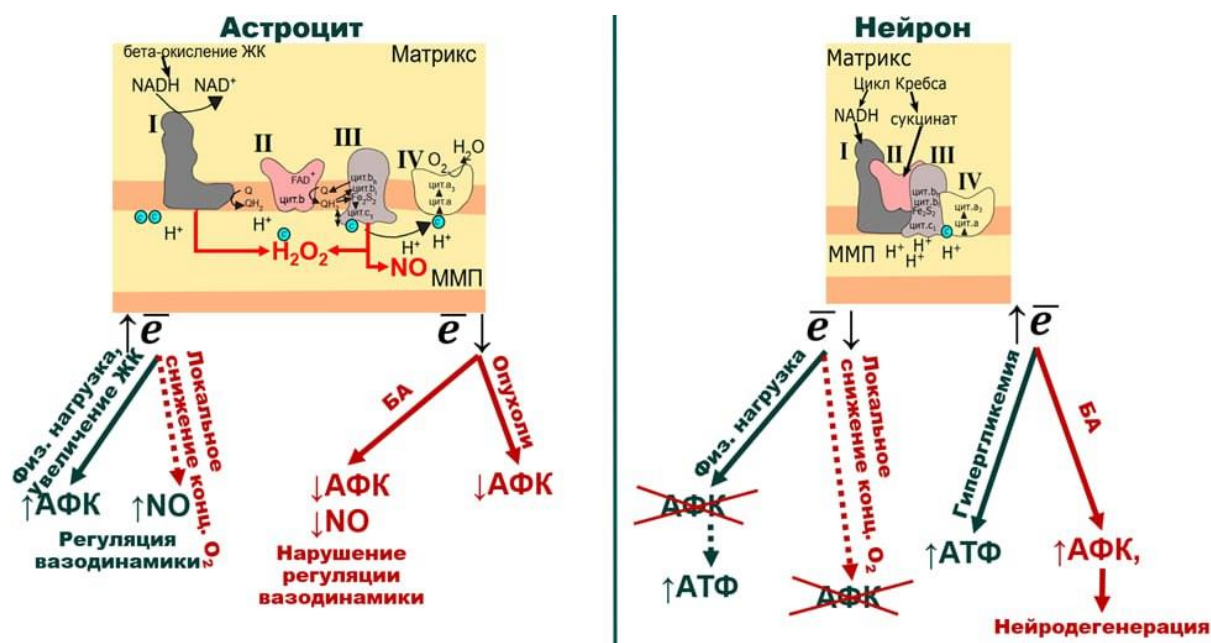


Рисунок 18: Схема факторов, влияющих на редокс-состояние ЭТЦ астроцитов и нейронов, рассмотренных в данной работе в условиях *in vivo*. Физ. нагрузка – физиологическая нагрузка, БА – болезнь Альцгеймера, АФК – активные формы кислорода.

Повышенный приток первичных доноров электронов приводил к увеличению степени заполненности ЭТЦ в митохондриях нейронов и астроцитов. При этом мы впервые продемонстрировали, что в условиях *in vivo* в митохондриях нейронов преимущественно осуществляется окисление пирувата в ходе цикла Кребса, а в митохондриях астроцитов – бета-окисление жирных кислот. Также степень заполненности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов при повышенном притоке доноров повышалась неравномерно, в отличие от нейронов, что может объясняться обособленным

расположением комплексов ЭТЦ в митохондриях астроцитов и замедлением переноса электронов на участке между комплексами III и IV. Митохондрии астроцитов также более чувствительны к дефициту O_2 , демонстрируя повышенную загруженность ЭТЦ электронами в условиях локальной гипоксии, в отличие от нейронов. Повышенная загруженность ЭТЦ электронами способствует более высокой вероятности активации побочных путей транспорта электронов и, в частности, генерации NO в митохондриях астроцитов, необходимого для обеспечения регуляции диаметра просвета сосудов.

Впервые в условиях *in vivo* мы показали, что изменение заполненности ЭТЦ электронами в нейронах и, особенно астроцитах может быть причиной развития различных патологий. Так, мы обнаружили, что при болезни Альцгеймера в астроцитах наблюдается снижение степени загруженности ЭТЦ электронами, что может приводить к снижению генерации H_2O_2 и NO. Наряду с этим был нарушен ответ кровеносных сосудов на физиологическую нагрузку: расширения сосудов в ответ на усиленную клеточную активность не наблюдалось, что может приводить к ухудшению кислородоснабжения тканей. Аналогично снижение заполненности ЭТЦ электронами наблюдалось для астроцитов около опухоли, что может быть причиной снижения образования в ЭТЦ астроцитов различных АФК, необходимых для астро-микроглиальной сигнализации и активации микроглии необходимой для удаления раковых клеток.

Суммируя, метаболические взаимодействия астроцитов и нейронов обеспечивают нормальное функционирование головного мозга. В данной работе были выявлены особенности транспорта электронов в ЭТЦ этих клеток *in vivo*, описаны особенности функционирования высокоэффективной ЭТЦ, организованной в виде респирасомы в нейронах, и низкоэффективной ЭТЦ с обособленными комплексами, необходимой для осуществления сенсорных и регуляторных функций астроцитов. Также были выявлены особенности болезни Альцгеймера и инвазии злокачественных опухолей, связанные с изменением редокс-состояния ЭТЦ астроцитов. Обнаруженные особенности митохондрий астроцитов, а также разработанный подход для *in vivo* исследования редокс-состояния ЭТЦ нейронов и глиальных клеток, мониторинга оксигенации крови и диаметра сосудов в мозге в дальнейшем могут быть использованы для разработки подходов к диагностике и терапии ишемических нарушений и различных нейропатологий.

Выводы

По результатам данной работы были сделаны следующие **выводы**:

1. Разработан методический подход для исследования редокс-состояния ЭТЦ митохондрий идентифицированных нейронов и астроцитов *in vivo* с использованием микроспектроскопии КР.
2. Установлено, что в мозге в состоянии покоя относительное содержание восстановленных цитохромов С- и В-типов в митохондриях астроцитов на 50% выше,

- чем в митохондриях нейронов, что свидетельствует о большей загруженности электронами астроцитарной ЭТЦ по сравнению с нейрональной.
3. Показано, что при физиологической стимуляции *in vivo* в астроцитах наблюдается увеличение загруженности ЭТЦ митохондрий электронами на 40-70%, а также генерация H_2O_2 . В нейронах физиологическая стимуляция приводит к обратимому ускорению транспорта электронов в ЭТЦ митохондрий без образования H_2O_2 .
 4. Установлено, что при избытке первичных доноров электронов увеличивается загруженность ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов и нейронов, но при этом в нейронах происходит равномерное заполнение ЭТЦ электронами, а в астроцитах наблюдается накопление восстановленного цитохрома С, что свидетельствует о более медленном переносе электронов между комплексами III и IV в астроцитах по сравнению с нейронами.
 5. При локальной гипоксии, вызванной фотоиндуцированным тромбированием артериолы, увеличивается относительное содержание восстановленных цитохромов С- и В-типов в ЭТЦ митохондрий астроцитов на 60%. При этом редокс-состояние ЭТЦ митохондрий нейронов не изменяется, что указывает на большую чувствительность ЭТЦ митохондрий астроцитов к локальному содержанию кислорода по сравнению с нейронами.
 6. При болезни Альцгеймера уменьшается относительное содержание восстановленных цитохромов В-типов в митохондриях астроцитов и нарушается регуляция диаметра просвета артериол при физиологической нагрузке. При этом в ЭТЦ митохондрий нейронов повышается относительное содержание восстановленных цитохромов С- и В-типов.
 7. Установлено, что с уменьшением расстояния до границы метастаза меланомы в мозг от 80 до 20 мкм у мышей в астроцитах снижается относительное количество восстановленных цитохромов С и В-типов, что может приводить к уменьшению генерации $O_2^{\cdot -}$ вблизи метастаза.

Основные публикации Морозовой Ксении Игоревны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index», рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала; объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

[1] Kotova D.A., Ivanova A.D., Kelmanson I.V., **Morozova K.I.**, Khramova Y.V., Solotenzov 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 and Redox Signaling*. — 2025. — Vol. 43, no. 4-6. — P. 272–287, doi: 10.1089/ars.2024.0876. Импакт-фактор 6,1 (JIF); (объём 1,733/вклад 0,8)

[2] **Морозова К.И.**, Паршина Е.Ю., Казакова Т.А., Юсипович А.И., Слатинская О.В., Браже А.Р., Гривенников И.А., Браже Н.А., Максимов Г.В. Изучение клеток мозга при нейродегенеративных заболеваниях: микроспектроскопия комбинационного рассеяния и сканирующая ион-проводящая микроскопия // *Современные технологии в медицине*. — 2025. — Vol. 17, no. 1. — P. 27–39, EDN: QNDSTY. Импакт-фактор 1,539 (ИФ РИНЦ); (объём 1,271/вклад 0,6)

[3] Sergeeva A.D., Panova A.S., Ivanova A.D., Khramova Y.V., **Morozova K.I.**, Kotova D.A., Guryleva A.V., Khokhlov D.D., Kelmanson I.V., Vasilev A.V., Kostyuk A.I., Semyanov A.V., Oleinikov V.A., Belousov V.V., Machikhin A.S., Brazhe N.A., Bilan D.S. Where in the tissues of danio rerio is more h2o2 produced during acute hypoxia? // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2025. — Vol. 42, no. 4-6. — P. 292–300, EDN: LRGGMG. Импакт-фактор 6,1 (JIF); (объём 0,924/вклад 0,3)

[4] 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., Solotenko M.A., Stepanov E.A., Tsopina A.S., Moshchenko A.A., Shestopalova M.S., Zalygin A.V., Fedotov I.V., Fedotov A.B., Oleinikov V.A., Belousov V.V., Semyanov A.V., Brazhe N.A., Zheltikov A.M., Bilan D.S. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2023. — Vol. 208. — P. 153–164, EDN: ZRUPLE. Импакт-фактор 8,2 (JIF); (объём 1,386/вклад 0,6)

[5] Popov A., Brazhe N., **Morozova K.**, Yashin K., Bychkov M., Nosova O., Sutyagina O., Brazhe A., Parshina E., Li L., Medyanik I., Korzhevskii D., Shenkarev Z., Lyukmanova E., Verkhatsky A., Semyanov A. Mitochondrial malfunction and atrophy of astrocytes in the aged human cerebral cortex // *Nature communications*. — 2023. — Vol. 14. — P. 8380, EDN: EDSUZH. Импакт-фактор 15,7 (JIF); (объём 1,386/вклад 0,65)

[6] Popov A., Brazhe N., Fedotova A.A., Tiaglik A., Bychkov M.L., **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. - P. 13847., EDN: FRIQFV. Импакт-фактор 5,6 (JIF); (объём 1,617/вклад 0,5)