

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Морозова Ксения Игоревна

РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ  
АСТРОЦИТОВ И НЕЙРОНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЯХ В УСЛОВИЯХ  
*IN VIVO*

Специальность 1.5.2. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Браже Надежда Александровна

Москва  
2025

## Оглавление

Список сокращений .....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	7
Актуальность и степень разработанности темы.....	7
Цели и задачи исследования .....	8
Положения, выносимые на защиту .....	9
Научная новизна работы .....	9
Теоретическая и практическая значимость.....	9
Методология и методы исследования .....	10
Степень достоверности и апробация результатов .....	10
Личный вклад автора .....	11
Объем и структура диссертации.....	11
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	12
1.1. Строение и функционирование ЭТЦ.....	12
1.1.1. Структура ЭТЦ .....	12
1.1.2. Активные формы кислорода: источники в комплексах ЭТЦ и функции в клетке .....	15
1.1.3. Пространственная организация ЭТЦ как фактор активности митохондрий .....	18
1.2. Метаболические особенности астроцитов и нейронов .....	20
1.2.1. Энергетический метаболизм нейронов .....	21
1.2.2. Энергетический метаболизм астроцитов .....	22
1.2.3. Роль астроцитов в регуляции мозгового кровообращения .....	24
1.3. Возрастные изменения и патологии головного мозга и их влияние на клеточный метаболизм.....	26
1.3.1. Влияние старения на катаболизм астроцитов и нейронов .....	26
1.3.2. Влияние болезни Альцгеймера на обмен метаболитов в головном мозге.....	27
1.3.3. Роль окислительного стресса в патогенезе болезни Альцгеймера	29

1.3.4. Токсическое воздействие АФК и их роль в злокачественном перерождении клеток .....	30
1.3.5. Глиомы и особенности их метаболизма .....	31
1.4. Спектроскопия комбинационного рассеяния в биомедицинских исследованиях .....	32
1.4.1. Принципы спектроскопии комбинационного рассеяния.....	33
1.4.2. Исследование биологических образцов при помощи КР-спектроскопии .....	35
1.5. Заключение обзора литературы .....	37
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1. Подготовка препаратов и регистрация спектров КР от фиксированных образцов тканей мозга.....	40
2.1.1. Препараты срезов гиппокампа мышей .....	40
2.1.2. Коронарные срезы мозга мышей с метастазом меланомы в мозг.....	41
2.1.3. Препараты срезов тканей пациентов .....	41
2.1.4. Протокол иммуногистохимического окрашивания фиксированных срезов .....	42
2.1.5. Регистрация спектров КР от срезов тканей мозга.....	44
2.2. Подготовка и методы регистрации спектров КР в условиях <i>in vivo</i> ..	45
2.2.1. Экспериментальные животные .....	45
2.2.2. Имплантация хронических краниальных окон и инъекция вирусных частиц.....	46
2.2.3. Регистрация спектров КР от кровеносных сосудов и клеток мозга в условиях <i>in vivo</i> .....	48
2.2.4. Оценка влияния физиологических стимулов на степень оксигенации крови в сосудах головного мозга и редокс-состояние комплексов ЭТЦ в астроцитах и нейронах.....	49
2.2.5. Индукция острой локальной гипоксии путём фототромбоза кровеносного сосуда в головном мозге .....	50

2.2.6. Индукция системной гипергликемии .....	51
2.3. Анализ данных.....	51
2.3.1. Анализ одиночных спектров КР .....	51
2.3.2. Анализ временных серий спектров КР.....	52
2.3.3. Расчёт степени оксигенации крови по данным спектров КР .....	52
2.3.4. Статистический анализ .....	53
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
3.1. Сравнение редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов головного мозга .....	55
3.1.1. Относительное количество восстановленных цитохромов С и В различается для астроцитов и нейронов в срезах мозга мышей.....	55
3.1.2. Относительное количество восстановленных цитохромов различается в астроцитах и нейронах <i>in vivo</i> .....	60
3.2. Влияние физиологических факторов на редокс-состояние ЭТЦ в митохондриях нейронов и астроцитов .....	63
3.2.1. Ответ ЭТЦ митохондрий нейронов на физиологические нагрузки .....	64
3.2.2. Ответ ЭТЦ митохондрий астроцитов на физиологические нагрузки .....	68
3.2.3. Влияние физиологических нагрузок на степень оксигенации крови и диаметр сосудов в головном мозге животных <i>in vivo</i> .....	73
3.2.4. Эффект повышенного притока глюкозы на редокс-состояние ЭТЦ в митохондриях астроцитов и нейронов в условиях <i>in vivo</i> .....	77
3.2.5. Эффект повышенного притока жирных кислот на состояние астроцитов и нейронов в срезах мозга животных .....	80
3.2.6. Ответ нейронов и астроцитов на острую локальную гипоксию	83
3.3. Влияние возрастных изменений и патологий на редокс-состояние ЭТЦ в клетках головного мозга .....	87

3.3.1. Влияние возрастных изменений на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов.....	88
3.3.2. Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов при болезни Альцгеймера.....	91
3.3.3. Изменения в регуляции диаметра просвета кровеносных сосудов при болезни Альцгеймера.....	95
3.3.4. Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов в срезах мозга животных с метастазом меланомы в мозг.....	97
3.3.5. Метаболические изменения в тканях пациентов с глиомами III-IV степени.....	99
3.3.6. Метаболические изменения в тканях пациентов с неангиогенными опухолями.....	106
3.4. Заключение .....	109
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
Благодарности .....	125

### **Список сокращений**

АФК – активные формы кислорода

БА – болезнь Альцгеймера

ГКР – гигантское комбинационное рассеяние

дГб – дезоксигемоглобин

ЖК – жирные кислоты

КР – комбинационное рассеяние

МРТ – магнитно-резонансная томография

оГб – оксигемоглобин

Цит. А (В, С) – цитохром А (В, С)

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок

NIRFP – near-infrared fluorescent protein, ближне-инфракрасный флуоресцентный белок

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 и др., 2019). Отток электронов с комплекса III на сульфитоксидазу – фермент, присутствующий в межмембранном пространстве митохондрий – приводит к восстановлению оксида азота (NO) из нитрита (Christie и др., 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, 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 и др., 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 (Sergeeva и др., 2025) и (Porov и др., 2023) автор предложила и разработала методический подход для регистрации спектров КР от идентифицированных клеток в условиях *in vivo* и *ex vivo*. В работе (Kotova и др., 2025) автор сравнила редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в мозге бодрствующих животных в норме и в условиях дефицита кислорода. В работах (Kotova и др., 2023) и (Porov и др., 2022) автором было изучено влияние увеличения притока первичных доноров электронов на степень загруженности ЭТЦ электронами в астроцитах и нейронах. В работе (Morozova и др., 2025) 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.

# 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. Строение и функционирование ЭТЦ

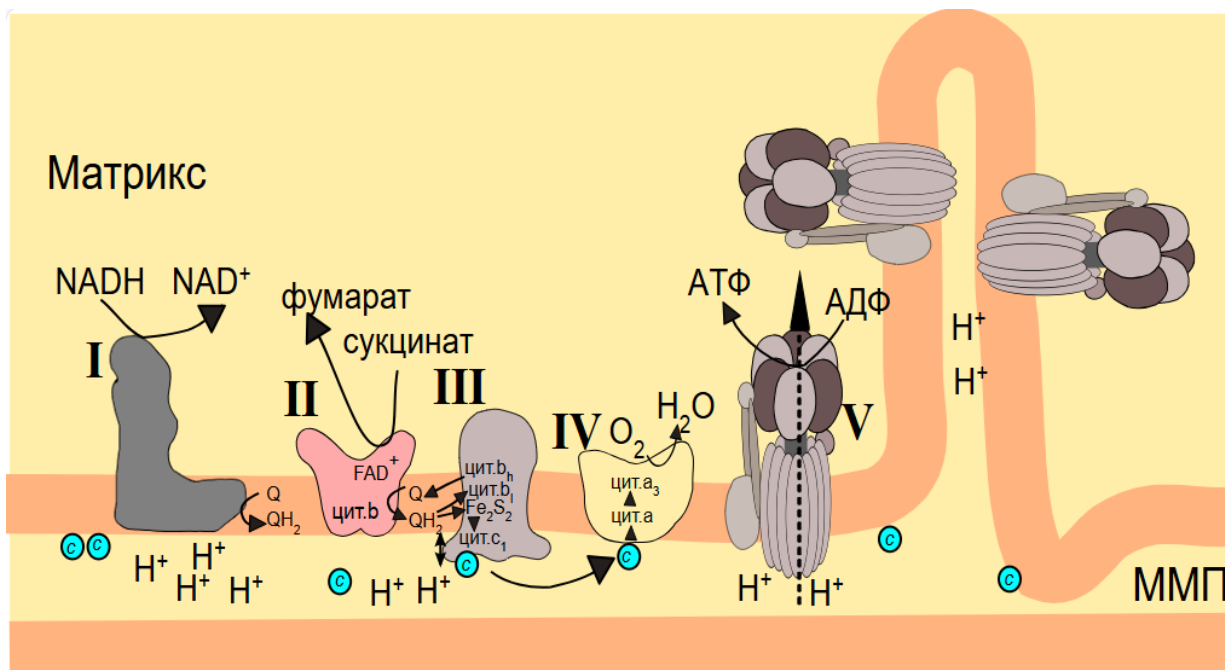
Дыхательная цепь (электрон-транспортная цепь, ЭТЦ) митохондрий – ключевой элемент энергетического метаболизма клетки. В её состав входят крупные белковые комплексы, осуществляющие последовательное окисление восстановленных субстратов, приводящее к конверсии энергии химических связей в энергию протонного градиента на внутренней мембране митохондрий, используемого для синтеза АТФ.

### 1.1.1. Структура ЭТЦ

ЭТЦ митохондрий состоит из четырёх белковых комплексов, встроенных в их внутреннюю мембрану и связанных между собой подвижными молекулами-переносчиками электронов (рис. 1). Иногда к комплексам ЭТЦ также относят АТФ-синтазу, не участвующую напрямую в переносе электронов, но использующую для функционирования генерируемый другими комплексами протонный градиент (Pfanner, Warscheid, Wiedemann, 2019). Количества и соотношения комплексов каждого типа могут различаться в митохондриях разных клеток, как и их пространственная организация внутри мембраны: они могут существовать как индивидуальные единицы или быть собраны в суперкомплексы.

Комплекс I – NADH-дегидрогеназа – осуществляет окисление NADH и восстановление убихинона Q – небольшой молекулы, диффундирующей внутри мембраны. За счёт конформационных изменений, происходящих в процессе передачи электронов, комплекс I также переносит 4 протона из матрикса в межмембранное пространство, внося существенный вклад в создание протонного градиента (Rich, Maréchal, 2010). Окисление NADH происходит в сайте, расположенном на экспонированном в матрикс участке белка, с переносом электронов на кофактор флавинмонопнуклеотид. Далее по цепи железосерных

кластеров электрон транспортируется к сайту, расположенному внутри мембраны, где происходит восстановление убихинона.



**Рисунок 1:** Схема строения ЭТЦ митохондрий. Комплексы ЭТЦ обозначены римскими цифрами, транспорт электронов отмечен чёрными стрелками, с – цитохром С, ММП – межмембранное пространство.

Комплекс II – сукцинатдегидрогеназа – служит связующим звеном между окислительным фосфорилированием и циклом Кребса, осуществляемым в матриксе митохондрий. Он также содержит сайт, содержащий флавинмоноклеотид, в субъединице, экспонированной в матрикс и осуществляющей окисление сукцината до фумарата. Электроны, полученные в ходе этой реакции, также переносятся на убихинон через цепь железосерных кластеров; переноса протонов при этом не происходит. Комплекс II также содержит гем В-типа в качестве кофактора, но он не участвует в транспорте электронов и, по-видимому, играет структурную роль.

Окисление восстановленных хинонов осуществляет комплекс III – цитохром-*bc*<sub>1</sub>-комплекс. Он имеет два сайта связывания хинонов: во внешнем белковом кармане, расположенном ближе к межмембранному пространству, осуществляется окисление хинона, а во внутреннем, расположенном ближе к матриксу –

восстановление. При окислении хинона во внешнем кармане один из пары электронов через белок Рискс и цитохром C1 попадает на цитохром C – небольшой одноэлектронный белок-переносчик, диффундирующий в межмембранном пространстве – а второй через цитохром B переносится на окисленный хинон с формированием радикала – семихинона, стабилизированного во внутреннем кармане. На следующем этапе во внешнем кармане связывается вторая молекула хинона, и снова один из пары электронов переносится на цитохром C, а второй – на семихинон с формированием восстановленного хинона. Этот процесс известен под названием Q-цикла и приводит дополнительно к высвобождению четырёх протонов в межмембранное пространство и связыванию двух протонов из матрикса при восстановлении хинона.

Наконец, комплекс IV – цитохром C оксидаза – последовательно окисляя четыре молекулы цитохрома C, осуществляет восстановление молекулы  $O_2$  до двух молекул  $H_2O$ . При этом происходит связывание четырёх протонов из матрикса и активный перенос ещё четырёх в межмембранное пространство. Перенос электронов осуществляется через центры, содержащие атомы меди, и кофактор цитохром A.

Регуляция активности комплексов ЭТЦ – сложный многофакторный процесс. В него вносит свой вклад величина протонного градиента, количество АТФ и АДФ в клетке, доступность кислорода, количество доноров электронов и многое другое. Все эти факторы влияют на скорость и направление транспорта электронов, долю восстановленных переносчиков, и, в конечном итоге, количество энергетических эквивалентов, которое будет синтезировано АТФ-синтазой. Окислительное фосфорилирование напрямую связано с такими процессами клеточного катаболизма как гликолиз и бета-окисление жирных кислот, поставляющими субстраты для окисления.

Наряду с биохимическими факторами регуляции скорости переноса электронов в ЭТЦ существуют также физические факторы, связанные с конформационными переходами в молекулах, составляющих комплексы. Каждый комплекс состоит из нескольких субъединиц, в состав которых входят различные

кофакторы: примером таких кофакторов могут служить цитохромы – гемсодержащие белки, участвующие в переносе электронов. Было показано, что конформация гемов, входящих в состав цитохромов, влияет на вероятность переноса электронов, модулируя активность комплексов ЭТЦ (Brazhe и др., 2012; Brazhe и др., 2017). Скорость и эффективность транспорта электронов напрямую связана с синтезом АТФ и, следовательно, влияет на множество метаболических процессов в клетке, делая митохондрии не только источником энергии, но и фактором регуляции клеточных процессов.

#### 1.1.2. Активные формы кислорода: источники в комплексах ЭТЦ и функции в клетке

Одним из побочных продуктов работы ЭТЦ являются активные формы кислорода (АФК), синтезирующиеся в результате спонтанных утечек электронов на кислород. В настоящее время в митохондриях известно 11 возможных сайтов генерации АФК, но только 4 из них ассоциированы с комплексами ЭТЦ (Brand, 2010). Тем не менее, они вносят наиболее значительный вклад в продукцию митохондриальных АФК, поэтому мы рассмотрим их подробнее.

Основной первичной АФК является супероксид-анион радикал, который может выделяться как в матрикс, так и в межмембранное пространство. Также существуют данные о том, что перекись водорода ( $H_2O_2$ ) может выступать в качестве первичной АФК в некоторых сайтах ЭТЦ (Grivennikova, Vinogradov, 2013; Perevoshchikova и др., 2013). Долгое время АФК в первую очередь ассоциировались с развитием окислительного стресса, старением организма и прочими повреждающими эффектами, вызванными их высокой окислительной способностью. Изобилие антиоксидантных систем в клетке подтверждает необходимость защиты от их воздействия. Тем не менее, генерируемые в митохондриях АФК также могут быть необходимы для нормального функционирования клетки. Было показано, что перекись, выделяемая митохондриями, может окислять сайты на некоторых фосфатазах, запуская каскады

регуляторных процессов и воздействуя на транскрипционные факторы (Finkel, 2012). Супероксид – заряженная короткоживущая молекула – не может свободно проходить через митохондриальную мембрану, но может транспортироваться через ряд потенциалзависимых анионных каналов, высвобождаясь в цитоплазму и потенциально приводя к окислению мишеней, запускающих клеточные процессы (Нап и др., 2003). Также супероксид может конвертироваться в более долгоживущую перекись водорода при помощи супероксиддисмутаз.

Основным источником АФК в ЭТЦ является комплекс III. Он имеет два сайта возможной генерации АФК, совпадающих с расположением белковых карманов связывания хинонов. Сайт связывания окисленного хинона для его последующего восстановления расположен внутри мембраны ближе к матриксу митохондрий, и его вклад в генерацию АФК считается пренебрежимо малым, в то время как внешний сайт связывания восстановленного хинона для двухэлектронного окисления (сайт  $III_{Qo}$ ), расположенный внутри мембраны ближе к межмембранному пространству, обеспечивает значительные уровни генерации супероксида (Quinlan и др., 2011). Несмотря на близость к межмембранному пространству, около половины генерируемого в сайте  $III_{Qo}$  супероксида выделяется в матрикс (Crochemore и др., 2015). Согласно оценкам, проведённым на изолированных митохондриях, предельная продуктивность генерации АФК в сайте  $III_{Qo}$  максимальна среди всех известных митохондриальных сайтов (Quinlan и др., 2012a). Однако, условия определения предельной продуктивности не совпадают с реальными условиями, возникающими в живых системах, поэтому вопрос о реальных вкладах этого сайта в общую продукцию АФК остаётся открытым. Известно, что вероятность генерации супероксида в сайте  $III_{Qo}$  напрямую коррелирует со степенью восстановления цитохрома  $B_{566}$ , входящего в состав комплекса III, а также с величиной протонного градиента и степенью восстановления пула хинонов, диффундирующих внутри мембраны (Perevoshchikova и др., 2013; Quinlan и др., 2012a).

Ещё два известных сайта генерации АФК расположены на комплексе I ЭТЦ: сайт  $I_F$  на участке белка, осуществляющем окисление NADH, и сайт  $I_Q$ , в котором



связывается окисленный хинон для реакции двухэлектронного восстановления. Как было показано в экспериментах на изолированных митохондриях, в сайтах комплекса I возможна генерация не только супероксида, но и  $H_2O_2$ , но оценить их реальные вклады довольно сложно (Grivennikova, Vinogradov, 2013). Так, например, предельная продуктивность сайта  $I_F$  в изолированных митохондриях по некоторым оценкам в 50 раз ниже, чем продуктивность сайта  $III_{Q_0}$ , но в условиях *in vivo* его вклад считается значительным (Quinlan и др., 2014). Предельная продуктивность сайта  $I_Q$  на этом фоне довольно высока – всего вдвое ниже, чем у сайта  $III_{Q_0}$ , и его вклад в генерацию АФК *in vivo* также оценивается как существенный (Quinlan и др., 2012a). Основным механизмом синтеза АФК в сайте  $I_Q$  является обратный транспорт электронов в комплексе I, ассоциированный с повышенным протонным градиентом и перевосстановлением пула хинонов (Lambert, Brand, 2004).

Ещё один сайт генерации АФК, ассоциированный с комплексами ЭТЦ – это сайт  $II_F$ , связанный со флавиномононуклеотидом, встроенным в комплекс II и участвующим в реакции двухэлектронного окисления сукцината. Этот сайт расположен в матриксе митохондрий, поэтому его АФК почти исключительно высвобождаются в него, а его предельная продуктивность примерно равна продуктивности сайта  $I_Q$  (Quinlan и др., 2012b). Механизм генерации АФК в этом сайте также связан с обратным транспортом электронов, вызванным перевосстановлением пула хинонов: предполагается, что в нормальных условиях вероятность генерации АФК в сайте  $II_F$  невысока и характерна для мутантных форм белка, ассоциированных с рядом заболеваний. В нём может синтезироваться как супероксид, так и  $H_2O_2$  (Quinlan и др., 2012b).

Основная доля митохондриальных АФК высвобождается в матрикс и далее может конвертироваться и транспортироваться в другие компартменты. Установлена прямая корреляция между степенью восстановления переносчиков электронов в ЭТЦ и вероятностью генерации АФК (Quinlan и др., 2012a). При этом исследования по оценке генерации АФК в митохондриях зачастую ограничиваются измерениями, проводимыми на изолированных митохондриях или выделенных белковых комплексах, встроенных в мембрану. Такая постановка эксперимента не

позволяет учитывать физиологические концентрации субстратов окислительно-восстановительных реакций, влияние микроокружения и взаимодействие с другими клеточными системами. Также оценка уровней генерации АФК сильно зависит от типа ткани, из которого были выделены исследуемые митохондрии: предельные продуктивности некоторых сайтов разительно отличаются, например, для мышечной и жировой ткани (Orr и др., 2012).

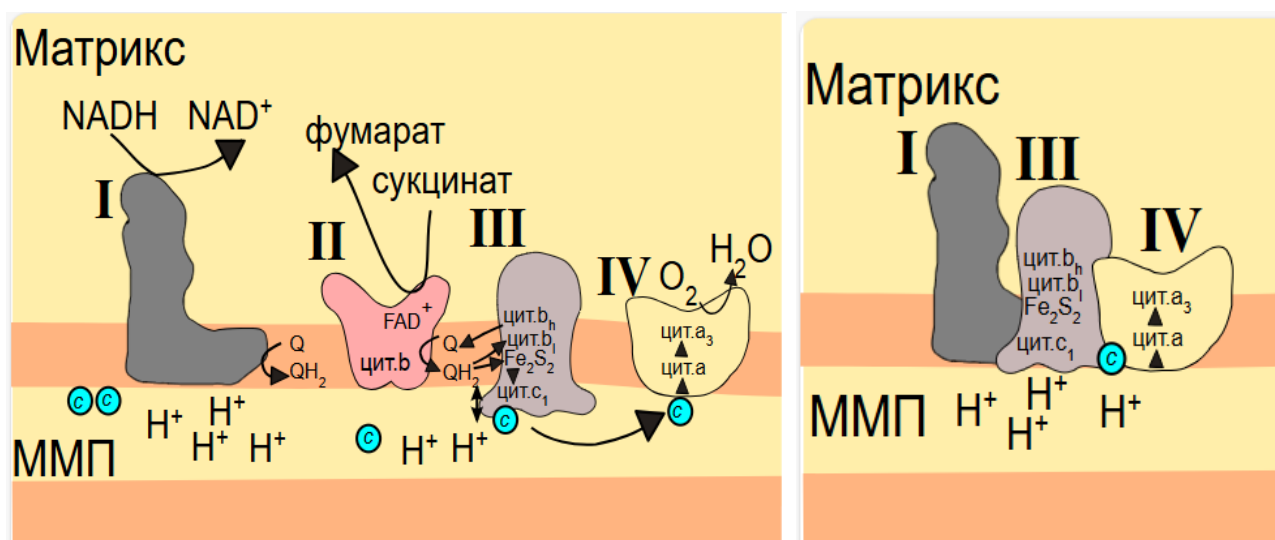
Большой интерес представляет исследование процессов переноса электронов в ЭТЦ в условиях *in vivo* и их связь с генерацией сигнальных молекул. Основной сигнальной АФК считается перекись водорода ввиду своей высокой стабильности и простоты транспортировки через липидные мембраны. Сопоставление редокс-состояния переносчиков в ЭТЦ митохондрий и уровней синтеза перекиси может прояснить её физиологические функции и позволить выявить связь между транспортом электронов в ЭТЦ и регуляцией клеточных процессов.

### 1.1.3. Пространственная организация ЭТЦ как фактор активности митохондрий

Комплексы ЭТЦ могут быть по-разному расположены во внутренней мембране митохондрий (рис. 2). Часто они формируют суперкомплексы в различных комбинациях: комплекс III в виде димеров может формировать суперкомплекс с комплексом IV или комплексом I (Letts, Sazanov, 2017). Особый интерес представляет суперкомплекс из комплекса I, димеризованного комплекса III и комплекса IV, называемый респирасомой и выделяемый из разного типа тканей. Описано два предполагаемых пути формирования респирасом: согласно первому из них, димеризованный комплекс III взаимодействует с фактором SCAF1 — гомологом одной из субъединиц комплекса IV COX7A. Далее к сформировавшемуся кластеру присоединяется комплекс IV, лишённый COX7A, затем формируется связь с комплексом I. Второй путь формирования респирасомы заключается в образовании суперкомплекса из димеризованного комплекса III и комплекса I, который затем присоединяется к комплексу IV, в состав которого

входит субъединица COX72A (Cogliati и др., 2016; Letts, Fiedorczuk, Sazanov, 2016; Pérez-Pérez и др., 2016).

Существование в форме респирасом повышает стабильность отдельных комплексов ЭТЦ (Díaz и др., 2006; Guarás и др., 2016). Предполагается, что при формировании респирасом часть пула подвижных переносчиков также связывается с суперкомплексом, что приводит к повышению эффективности переноса электрона в нём, но факт ограничения диффузии подвижных переносчиков в респирасоме не доказан окончательно (Lapuente-Brun и др., 2013; Waltz и др., 2025). Близость комплекса IV, осуществляющего восстановление кислорода, поддерживает его низкую локальную концентрацию, делая его недоступным для формирования АФК, а высокая эффективность прямого транспорта электронов снижает вероятность перевосстановления пула хинонов и обратного транспорта электронов, приводящего к синтезу АФК в сайтах, ассоциированных с комплексами I и III. Это делает респирасому крайне эффективной системой генерации протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ, и обеспечивает защиту митохондрий от эндогенных АФК, которые могут повреждать их мембраны при повышенной активности.



**Рисунок 2:** Схема пространственной организации комплексов ЭТЦ во внутренней мембране митохондрий: обособленные комплексы ЭТЦ (слева) и респирасома (справа). Комплексы ЭТЦ обозначены римскими цифрами, транспорт

электронов отмечен чёрными стрелками, с – цитохром С, ММП – межмембранное пространство.

Другой вариант пространственной организации заключается в обособлении комплексов ЭТЦ друг от друга. Часто это выражается в отделении комплекса I в свободно существующую форму и понижении потребления кислорода митохондриями, указывающем на пониженную эффективность транспорта электронов в такой системе.

Примером клеток, для которых разница в пространственной организации комплексов ЭТЦ продемонстрирована *in vitro*, являются астроциты и нейроны (Lopez-Fabuel и др., 2016). Это клетки головного мозга, обладающие существенными метаболическими различиями. В нейронах комплексы ЭТЦ собраны в респирасомы, способствующие быстрой и эффективной генерации протонного градиента и снижению уровней синтеза АФК. В астроцитах, напротив, наблюдается значительная фракция обособленно существующих комплексов ЭТЦ, и для них была показана более низкая эффективность работы митохондрий и важность высоких уровней синтеза АФК. Для лучшего понимания значения различий в пространственной организации ЭТЦ рассмотрим метаболические стратегии этих клеток подробнее.

## **1.2. Метаболические особенности астроцитов и нейронов**

Головной мозг практически не имеет запасов питательных веществ, и его работа обеспечивается постоянным их притоком: до 20% поглощаемой организмом глюкозы метаболизируется клетками головного мозга (Kucharska-Newton, Stoner, Meyer, 2019). Энергетические потребности клеток мозга в основном обусловлены необходимостью поддержания градиентов ионов и передачи нервных импульсов нейронами, в то время как астроциты оказывают нейронам метаболическую поддержку и участвуют во многих регуляторных процессах.

### 1.2.1. Энергетический метаболизм нейронов

Нейроны головного мозга отвечают за генерацию и передачу электрических импульсов. Для постоянного поддержания ионных градиентов, отвечающих за формирование потенциала на их мембранах, они нуждаются в быстрой генерации больших количеств АТФ. Это достигается за счёт высокой эффективности окислительного фосфорилирования в их митохондриях: гликолиз в нейронах больше характерен для сом, где активность митохондрий наоборот ингибируется (Magistretti, Allaman, 2018; Wei и др., 2023). Снижение активности митохондрий в сомах необходимо для эндогенной защиты генетического материала от воздействия генерируемых АФК в областях, прилегающих к ядру. В отростках нейронов – аксонах и дендритах – энергетические потребности, наоборот, удовлетворяются за счёт интенсивного окислительного фосфорилирования в митохондриях, а гликолиз активируется во время передачи потенциалов действия. Высокая интенсивность окислительного фосфорилирования поддерживается в том числе за счёт формирования респирасом, приводящего к быстрому и эффективному транспорту электронов в ЭТЦ (Matrella и др., 2024).

Глюкоза, поглощаемая нейронами, преимущественно метаболизируется через пентозофосфатный путь, необходимый для получения восстановительных эквивалентов. Полученный в результате NADPH участвует в реакции восстановления глутатиона, обеспечивающего антиоксидантную защиту нейронов. В экспериментах по активации гликолиза в нейронах наблюдались значительные нарушения работы митохондрий: разрушение респирасом, повышение уровней генерации АФК и повреждения клеток, приводящие к когнитивным нарушениям (Jimenez-Blasco и др., 2024).

Метаболизм жирных кислот в нейронах преимущественно ограничен синтезом фосфолипидов для восстановления мембран: часть из липидов, необходимых для этого они получают от астроцитов (Mahley, 2016). Катаболизм жирных кислот сопряжён с генерацией АФК, токсичных для нейронов, поэтому в норме они не накапливают липидные капли (Schönfeld, Reiser, 2017). Существуют

данные о формировании липидных капель в первичных культурах нейронов, выделенных из различных областей мозга (Ioannou и др., 2019), но исследований, подтверждающих их существование *in vivo*, довольно мало (Yang и др., 2020). Жирные кислоты и липопротеины образуются в нейронах из-за их повышенной активности, приводящей к разрушению органелл из-за повреждений, наносимых АФК: эти продукты могут передаваться астроцитам для деградации (Ioannou и др., 2019).

### 1.2.2. Энергетический метаболизм астроцитов

Астроциты – это глиальные клетки мозга, выполняющие широкий спектр функций. Они формируют архитектуру нервной ткани, оказывают метаболическую поддержку нейронам, участвуют в формировании трёхчастных синапсов, обеспечивая обратный захват глутамата и тем самым модулируя передачу нервных импульсов (Aten и др., 2022; Lalo и др., 2021). Астроциты представляют собой звёздчатые клетки с большим числом отростков, и их концевые ножки также участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера, оборачиваясь вокруг кровеносных сосудов. Это делает их посредниками между защищённой средой головного мозга и остальными системами организма: например, до 70% глюкозы, поступающей в головной мозг, первично поглощается астроцитами (Beard и др., 2022).

Астроциты обладают широким спектром хеморецепторов и также чувствительны к механическим стимулам. Они не являются возбудимыми клетками, но многие типы стимулов могут приводить к высвобождению в их цитоплазме ионов кальция, приводящих к активации метаболических каскадов (Bazargani, Attwell, 2016). Эти кальциевые волны могут распространяться между клетками, активируя соседние астроциты.

Потребности астроцитов в энергии удовлетворяются, в первую очередь, за счёт анаэробного гликолиза, осуществляемого в цитоплазме (Magistretti, Allaman, 2018). Его продукт – лактат – передаётся через транспортные системы нейронам,

где он восстанавливается до пирувата и служит субстратом для окислительного фосфорилирования. ЭТЦ митохондрий астроцитов поддерживается в неэффективном состоянии и характеризуется высокими уровнями синтеза  $H_2O_2$  в нормальных условиях (Vicente-Gutierrez и др., 2019). Несмотря на низкую эффективность окислительного фосфорилирования в астроцитах, объёмная доля митохондрий в них сопоставима с объёмной долей митохондрий в нейронах (Aten и др., 2022). Они также равномерно распределены по их отросткам и отсутствуют только в самых тонких концевых веточках. По-видимому, продуцируемая астроцитами перекись имеет физиологическое значение: было показано, что у животных с гиперэкспрессией каталазы – фермента, отвечающего за деградацию перекиси – в астроцитах наблюдались существенные когнитивные нарушения (Vicente-Gutierrez и др., 2019).

Окислительное фосфорилирование играет важную роль на ранних этапах развития астроцитов. Функциональная активность их митохондрий необходима на этапе пролиферации клеток-предшественников, и только при созревании наблюдается переход к активному гликолизу и снижение эффективности ЭТЦ посредством обособления комплекса I (Zehnder и др., 2021).

Астроциты также могут аккумулировать липидные капли, и жирные кислоты (ЖК), входящие в их состав, подвергаются бета-окислению в митохондриях. В нейронах активность бета-окисления ЖК сравнительно невысока, и известно, что в норме они не склонны к накоплению липидов, а липопротеины могут передавать астроцитам для деградации (Ioannou и др., 2019). Окисляя ЖК, астроциты преимущественно конвертируют их в кетоновые тела: образующийся в результате  $FADH_2$  увеличивает приток электронов в ЭТЦ через комплекс III. При этом не происходит притока углеродных остатков в цикл Кребса, являющийся основным источником NADH, поэтому поток электронов через комплекс I не увеличивается. Синтезированные кетоновые тела передаются нейронам и используются ими в качестве субстратов окислительного фосфорилирования.

Ингибирование бета-окисления в астроцитах также приводит к снижению уровней генерируемых АФК и увеличенной респираторной активности

митохондрий, в частности, из-за повышения активности комплекса I. По-видимому, это может происходить из-за формирования респирасом, включающих комплекс I, нехарактерных для митохондрий астроцитов. Этот метаболический переход оказывает существенное влияние на активность нейронов: в них повышаются уровни генерации АФК и снижается респираторная активность митохондрий, что приводит к проявлению когнитивных нарушений у животных с пониженной активностью бета-окисления ЖК в астроцитах (Morant-Ferrando и др., 2023).

В свете существующих данных энергетическая функция не представляется приоритетной для митохондрий астроцитов, но обильное присутствие этих органоидов в клетках говорит об их крайней значимости. Высокие уровни продукции АФК и нарушения, связанные с их дефицитом, позволяют предположить, что митохондрии астроцитов тесно связаны с их сигнальной функцией и могут выступать в роли сенсоров микроокружения. Например, ЭТЦ крайне чувствительна к изменениям в количестве доноров и акцепторов электронов, в частности, кислорода, что может быть необходимо для точной регуляции мозгового кровообращения, в которой астроциты принимают непосредственное участие.

### 1.2.3. Роль астроцитов в регуляции мозгового кровообращения

Концевые ножки астроцитов, обёрнутые вокруг кровеносных сосудов, позволяют им чутко улавливать любые изменения концентрации кислорода в крови. Ряд экспериментов на животных показал, что изменение доли кислорода во вдыхаемом воздухе приводит к активации кальциевых сигналов в астроцитах (Angelova и др., 2015). Вероятно, чувствительность астроцитов к изменениям концентрации кислорода обусловлена их митохондриями: при снижении парциального давления кислорода в крови наблюдалось значительное снижение потенциала на их внутренней мембране и повышение уровня синтеза АФК. Также астроциты обладают чувствительностью к изменениям в концентрации  $\text{CO}_2$ : коннексины Cx26, Cx30, Cx32, экспрессируемые на их поверхности, могут менять



конформацию под воздействием  $\text{CO}_2$  и менять проницаемость их мембран (Nagy и др., 2011; Wiel van de и др., 2020).

Активация нейронов и высвобождение глутамата также может приводить к активации ионотропных рецепторов на поверхности астроцитов, высвобождению кальция в их цитоплазме и опосредованному ими расширению капилляров (Liu и др., 2015). Таким образом, астроциты могут воздействовать на кровеносные сосуды как в ответ на гипоксию, так и в ответ на активацию нейронов и повышение их потребности в кислороде и глюкозе.

Регуляцию диаметра сосудов астроциты могут осуществлять путём высвобождения различных веществ. Высвобождение АТФ может осуществляться в ответ на изменение парциального давления кислорода (Angelova и др., 2015) или при воздействии  $\text{CO}_2$  на коннексин Cx26, приводя к активации нейронных сетей и опосредованному ими кардиореспираторному ответу (Wiel van de и др., 2020). Прямое воздействие астроцитов на кровеносные сосуды может осуществляться путём выделения оксида азота NO, аденозина, простагландинов и производных арахидоновой кислоты (эпоксизйкозатриеновой кислоты) (Christie и др., 2023; Liu и др., 2015; Mikhail Kellawan и др., 2020). Эти вещества могут воздействовать напрямую как на рецепторы в перicyтах в стенках капилляров, так и на гладкомышечные клетки в стенках артериол головного мозга.

Среди всего спектра веществ-вазодилаторов, выделяемых астроцитами, особое место занимает оксид азота (NO). Механизм его синтеза напрямую связан с митохондриями и очень чувствителен к изменениям в концентрации кислорода. Он осуществляется при помощи фермента сульфитоксидазы, экспрессирующегося в межмембранном пространстве митохондрий астроцитов (Christie и др., 2023). Там она может получать электроны от комплекса III и использовать их для синтеза NO из нитрита. Это делает митохондрии астроцитов не только сенсорами микроокружения, но и активными участниками регуляторных процессов.

### **1.3. Возрастные изменения и патологии головного мозга и их влияние на клеточный метаболизм**

Нарушения в функционировании астроцитов и нейронов могут приводить к старению клеток и развитию множества патологий в головном мозге. Многие из них также приводят к нарушениям регуляции мозгового кровоснабжения и метаболических взаимодействий между астроцитами и нейронами. В патогенезе заболеваний, затрагивающих функции головного мозга, важную роль играют АФК: они могут быть причиной повреждений в ДНК, приводящих к злокачественному перерождению клеток, а также способствовать накоплению в клетках повреждённых продуктов их метаболизма и формированию токсичных отложений.

#### **1.3.1. Влияние старения на катаболизм астроцитов и нейронов**

Возрастные изменения ассоциируются со снижением потребления глюкозы в головном мозге, развитием окислительного стресса и рядом других факторов, затрагивающих астроциты и нейроны. Уровни экспрессии транспортеров глюкозы снижаются с возрастом как в астроцитах, так и в нейронах (Peng и др., 2021; Szablewski, 2021). При этом в нейронах с возрастом гликолиз начинает играть всё более важную роль из-за нарушения процессов переноса лактата из астроцитов (Drulis-Fajdasz и др., 2018). Лактат в нейронах не только служит субстратом для энергетического обмена, но и влияет на их возбудимость, необходим для консолидации памяти и участвует в активации многочисленных метаболических процессов (Magistretti, Allaman, 2018).

Одним из важных признаков старения является развитие условий окислительного стресса в клетках. Некоторые исследования демонстрируют, что с возрастом во многих клетках организма наблюдается формирование суперкомплексов в ЭТЦ митохондрий, служащее мерой эндогенной защиты от АФК. Однако, этот процесс может быть крайне вреден для функционирования

астроцитов, нуждающихся в значительных уровнях продукции АФК для поддержания их функциональной активности.

Обмен липидов также нарушается при старении астроцитов в различных областях головного мозга. Снижение эффективности работы митохондрий и их фрагментация в совокупности с недостаточными уровнями митофагии приводит к накоплению повреждённых митохондрий в клетках. Показано, что при здоровом старении митофагия осуществляется достаточно эффективно для обеспечения метаболических функций (Rappe и др., 2024). Поскольку жирные кислоты в основном метаболизируются в матриксе митохондрий, накопление повреждённых митохондрий приводит к аккумуляции липидных капель (Qi и др., 2021), а нарушения метаболизма липидов в астроцитах приводит к деградации синапсов и распространению повреждений мембран в нейронах (Liu и др., 2017). Другим следствием нарушений липидного обмена является деградация миелина из-за отсутствия необходимой продукции жирных кислот (Mi и др., 2023).

Описанные метаболические изменения характерны для нормального старения, но при усугублении могут приводить к развитию патологий, ассоциированных с возрастом.

### 1.3.2. Влияние болезни Альцгеймера на обмен метаболитов в головном мозге

Болезнь Альцгеймера является примером комплексной патологии, затрагивающей не только нейроны, но и другие клетки головного мозга, а также регуляцию мозгового кровообращения. У большинства пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается дефицит мозгового кровоснабжения и амилоидная ангиопатия, приводящая к недостаточному притоку кислорода и метаболитов к тканям головного мозга (la Torre de, 2016). Известно, что с возрастом снижается объём потребления глюкозы клетками мозга: это выражается как в снижении активности ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы, так и в снижении уровней экспрессии глюкозных транспортеров на поверхности мембран астроцитов

и нейронов (López-Otín и др., 2023). Эти процессы усугубляются при развитии болезни Альцгеймера, приводя к недостаточным уровням генерации АТФ.

Компенсировать гипометаболизм глюкозы до некоторой степени позволяет биосинтез кетоновых тел, служащих альтернативным субстратом окислительного фосфорилирования для нейронов головного мозга. В настоящее время исследуется их терапевтический потенциал для поддержания функционирования нейронов при старении и нейродегенеративных процессах (Cunnane и др., 2020). В мозге кетоновые тела могут синтезироваться в митохондриях астроцитов, но из-за нарушений в процессах аутофагии и накопления повреждённых митохондрий биосинтез кетоновых тел может быть существенно снижен.

С повышенной нейротоксичностью также ассоциировано повышение общего содержания свободных жирных кислот в плазме крови, наблюдаемое на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера (Schönfeld, Reiser, 2017). Доля содержания моно- и полиненасыщенных жирных кислот при этом снижается (Fonteh и др., 2014), что приводит к нарушениям структуры липидных рафтов в клеточных мембранах, содержащих необходимые для функционирования клеток каналы и транспортеры (Marín и др., 2016). В норме деградация жирных кислот в головном мозге осуществляется астроцитами, и было показано, что нарушения в регуляции процессов метаболизма липидов приводят к фрагментации митохондрий в астроцитах и снижению эффективности процессов бета-окисления жирных кислот (Qi и др., 2021). Патогенез болезни Альцгеймера также ассоциирован с накоплением липидных капель в клетках глии (Moulton и др., 2021).

Гипометаболизм глюкозы и нарушения в регуляции процессов окисления жирных кислот приводят к развитию дефицита АТФ и ускоренному клеточному старению, выражающемуся в генетических абберациях, нарушениях структуры теломер и митохондриальных дисфункциях, приводящих к развитию окислительного стресса.

### 1.3.3. Роль окислительного стресса в патогенезе болезни Альцгеймера

Согласно современным исследованиям, окислительный стресс, источником которого являются митохондрии, может быть главной причиной развития БА. Признаки повреждений, вызванных окислительным стрессом, детектируются у пациентов с болезнью Альцгеймера на ранних стадиях до формирования амилоидных бляшек в головном мозге (Tabner и др., 2005). Окислительный стресс приводит к нарушению метаболической кооперации между астроцитами и нейронами, деградации синапсов и накоплению токсичных побочных продуктов клеточного метаболизма.

Основным источником АФК в клетке являются митохондрии, которые также сильно подвержены повреждениям, вызванным окислительным стрессом (Almeida de и др., 2022). Повреждённые митохондрии в клетках в норме эффективно удаляются в процессе аутофагии, однако, БА приводит к накоплению остатков повреждённых митохондрий (Rappe и др., 2024). При этом митохондрии не являются единственным источником окислительного стресса при БА: отложения бета-амилоида, характерные для этого заболевания, также могут служить источником АФК (Mrdenovic и др., 2022). Гидрофобные участки бета-амилоида могут встраиваться в липидные мембраны, усугубляя перекисное окисление липидов и повреждение клеточных компонентов (Butterfield, 2020).

Источником отложений бета-амилоида и других неправильно свёрнутых белков в клетке служит эндоплазматический ретикулум (ЭПР): было показано, что ЭПР и митохондрии в клетках находятся в физическом контакте для обеспечения функциональных взаимодействий (Wilson, Metzakopian, 2021). Эти взаимодействия обеспечивают поддержания кальциевого гомеостаза в клетках, а также регуляцию обмена фосфолипидов (Krols, Bultynck, Janssens, 2016; Tubbs, Rieusset, 2017). Однако, сайты контакта митохондрий и ЭПР ассоциированы с первоочередным накоплением бета-амилоида в условиях развития окислительного стресса и усугублением патогенеза болезни Альцгеймера (Schreiner и др., 2015).

Окислительный стресс может приводить к формированию разрывов и мутаций в ДНК клеток, а также к эпигенетическим модификациям и уменьшению длины теломер. При БА воздействие АФК приводит к гипометилированию таких генов как APP и BACE1, усугубляя формирование отложений бета-амилоида (Niu и др., 2015). Окислительный стресс вносит свой вклад в процессы клеточного старения и усугубляет нейродегенерацию, приводя к развитию когнитивных нарушений у пациентов (Martínez-Cué, Rueda, 2020).

#### 1.3.4. Токсическое воздействие АФК и их роль в злокачественном перерождении клеток

Несмотря на важность АФК для сигнальных систем астроцитов, нельзя отрицать их токсичность для многих клеточных компонентов. Воздействию супероксид-анион радикала, генерируемого в ЭТЦ митохондрий, наиболее подвержены полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав их мембран. Супероксид может запускать цепную реакцию перекисного окисления липидов и наносить существенные повреждения структуре мембранных органоидов. Также под воздействием АФК может нарушаться структура ДНК, что может приводить к апоптозу или злокачественному перерождению клеток.

Клетки мозга обладают рядом защитных систем для предотвращения токсических эффектов АФК. Субстратами для окисления могут выступать глутатион и тиоредоксины, а ферменты, участвующие в деградации АФК, включают в себя супероксиддисмутазу, конвертирующую супероксид в перекись, и каталазу, осуществляющую превращение перекиси в воду (Oyewole, Birch-Machin, 2015). Наряду с ними деградация перекиси может осуществляться глутатионпероксидазами, а восстановление окисленного глутатиона — глутатионредуктазой. Несмотря на это, клетки мозга всё же могут быть подвержены окислительному стрессу и злокачественному перерождению. В норме такие клетки

распознаются и удаляются иммунными клетками мозга, однако, в тех случаях, когда этого не происходит, могут развиваться опухоли.

### 1.3.5. Глиомы и особенности их метаболизма

Среди первичных опухолей головного мозга у взрослых пациентов наиболее распространёнными являются глиомы – опухоли, развивающиеся в результате злокачественного перерождения клеток глии. По происхождению они подразделяются на астроцитомы, олигодендроглиомы и комбинированные опухоли, характеризующиеся разными степенями злокачественности (Pisapia, 2017). Глиомам I-II степени присущ более медленный рост и низкая инвазивность, а глиомы III-IV степеней – глиобластомы – являются одними из наиболее агрессивных типов опухолей с высокой долей летальных исходов у пациентов.

Глиомы I-II степени представляют собой плотные скопления клеток, в центре которых развиваются гипоксические условия из-за отсутствия кровеносных сосудов. В результате большинство клеток глиом характеризуются низкой интенсивностью окислительного фосфорилирования и высокой активностью ферментов гликолиза – метаболической адаптации, известной как эффект Варбурга (Chendong и др., 2009; Lewis и др., 2015). Глиомы III-IV степени характеризуются более диффузным строением и широкой зоной инвазии раковых клеток, а также выраженным ангиогенезом в области плотной опухоли, обеспечивающим её оксигенацию (Onishi и др., 2011).

В условиях гипоксии, характерных для опухолей, митохондрии не могут эффективно производить АТФ и с большей вероятностью генерируют АФК. В клетках глиом были отмечены признаки деградации митохондрий: разрушение крист, пониженные уровни экспрессии митохондриальных ферментов, повышенные уровни экспрессии каталазы (Arismendi-morillo, Castellano-ramirez, 2008; Deighton и др., 2014).

На ранних стадиях большинство глиом протекает бессимптомно. Это затрудняет их диагностику и последующее лечение. Золотым стандартом

диагностики глиом является магнитно-резонансная томография (МРТ) и биопсия ткани. Из-за низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера для большинства химиотерапевтических агентов основным способом терапии глиом является их хирургическое удаление. При этом область проведения операции подразделяется на опухолевую (плотность раковых клеток выше 60%) и предопухолевую (плотность раковых клеток ниже 60%) зоны. Границы опухолевой зоны визуализируются на МРТ, но в предопухолевой зоне клетки расположены диффузно, поэтому определение её границ является трудной диагностической задачей: эффективное удаление всех опухолевых клеток необходимо для предотвращения повторного развития заболевания. Иногда при глубоком залегании опухоли также удаляют участки коры, не содержащей раковых клеток, расположенные над ней – так называемую ткань доступа.

После проведения операции, как правило, применяют лучевую и химиотерапию, вводя терапевтические агенты и источники ионизирующего излучения в полость проведения операции. Тем не менее, даже для комбинированной терапии средняя доля выживших среди пациентов с глиобластомой через 5 лет после лечения составляет всего 3,4% (Friedman и др., 2009).

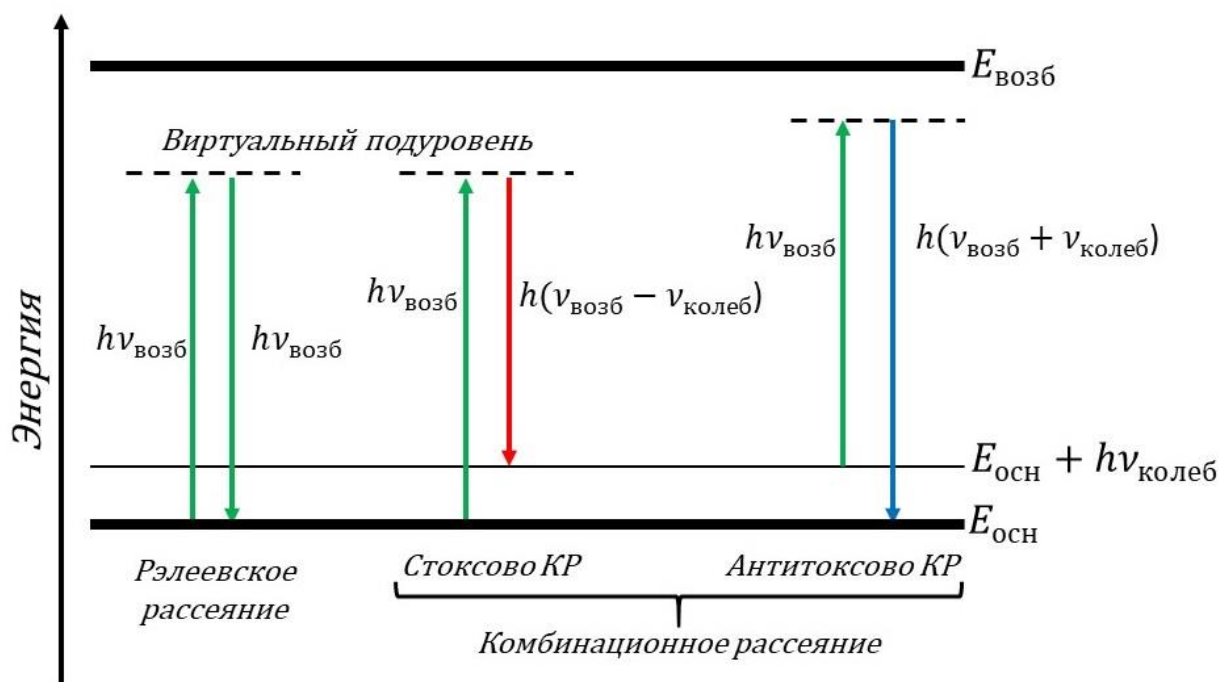
#### **1.4. Спектроскопия комбинационного рассеяния в биомедицинских исследованиях**

Перспективным инструментом исследования редокс-состояния белков ЭТЦ является спектроскопия комбинационного рассеяния (КР). Это неинвазивный метод, позволяющий оценивать конформацию и редокс-состояние молекул, а также влияние на них условий микроокружения. Наибольший потенциал применение спектроскопии КР имеет для оценки состояния гемсодержащих белков, таких как цитохромы ЭТЦ митохондрий и гемоглобин.



### 1.4.1. Принципы спектроскопии комбинационного рассеяния

Явление комбинационного рассеяния впервые независимо друг от друга наблюдали советские учёные Г.С. Ландсберг и Л.И. Мандельштам и индийский физик Ч.В. Раман в 1928 г. При упругом (рэлеевском) рассеянии света фотон, взаимодействуя с молекулой, индуцирует её переход в виртуальное энергетическое состояние с последующей релаксацией и испусканием кванта с той же величиной энергии (рис. 3). Гораздо реже энергия высвечиваемого кванта может меняться: такое рассеяние называется комбинационным (рамановским). Существуют два типа комбинационного рассеяния: стоксово и антистоксово. При стоксовом КР часть энергии кванта передаётся молекуле и, релаксируя, молекула переходит на более высокий колебательный подуровень относительно изначального, а энергия высвечиваемого кванта уменьшается. В случае антистоксова КР энергия высвечиваемого кванта увеличивается за счёт релаксации молекулы, находившейся на некотором колебательном подуровне, до нулевого подуровня.



**Рисунок 3:** Диаграмма Яблонского для энергетических переходов при разных типах рассеяния.

Возбуждение КР осуществляется при помощи монохроматических когерентных источников – лазеров с различными длинами волн испускания. Свет источника направляется на образец, а рассеиваемый свет собирается через линзы объектива, проходит через фильтр, раскладывается в спектр и поступает на детектор. Спектр КР представляет собой суперпозицию пиков, соответствующих энергиям различных типов колебаний связей и групп атомов в молекулах. Эти энергетические состояния обладают высокой специфичностью, связанной с конформацией, редокс-состоянием и микроокружением молекул.

Сигнал комбинационного рассеяния обладает низкой интенсивностью на фоне автофлуоресценции клеток, поэтому в исследованиях часто применяются различные подходы для его усиления. В частности, одной из модификаций метода является применение метода резонансного комбинационного рассеяния (РКР): в этом случае используемая длина волны возбуждения соответствует длине волны поглощения для анализируемой молекулы, что приводит к значительному усилению интенсивности КР. Другим способом усиления КР-сигнала является спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР): применение наноструктур золота или серебра (золей или специально синтезированных подложек) позволяет значительно усиливать интенсивность КР молекул, контактирующих с их поверхностью, за счёт эффекта плазмонного резонанса.

Молекулы, содержащие крупные группы атомов со специфическими типами деформаций, характеризуются высокоселективными пиками на спектрах КР. Примером такой группы может служить порфириновое кольцо, входящее в состав простетических групп гемсодержащих белков: цитохромов А-, В- и С-типа, гемоглобина, миоглобина и т.д. Оно представляет собой систему сопряжённых связей, обладающую интенсивным сигналом КР, причём форма этого сигнала сильно зависит от конформации гема (Berezhna, Wohlrab, Champion, 2003; Bochkova и др., 2025). Конформации гемов, входящих в состав белков ЭТЦ, сильно зависят от редокс-состояния и потенциала на внутренней мембране митохондрий: показано, например, что гем, входящий в состав цитохрома С, может принимать плоскую или

искажённую конформацию в зависимости от величины мембранного потенциала и протонного градиента (Brazhe и др., 2023).

#### 1.4.2. Исследование биологических образцов при помощи КР-спектроскопии

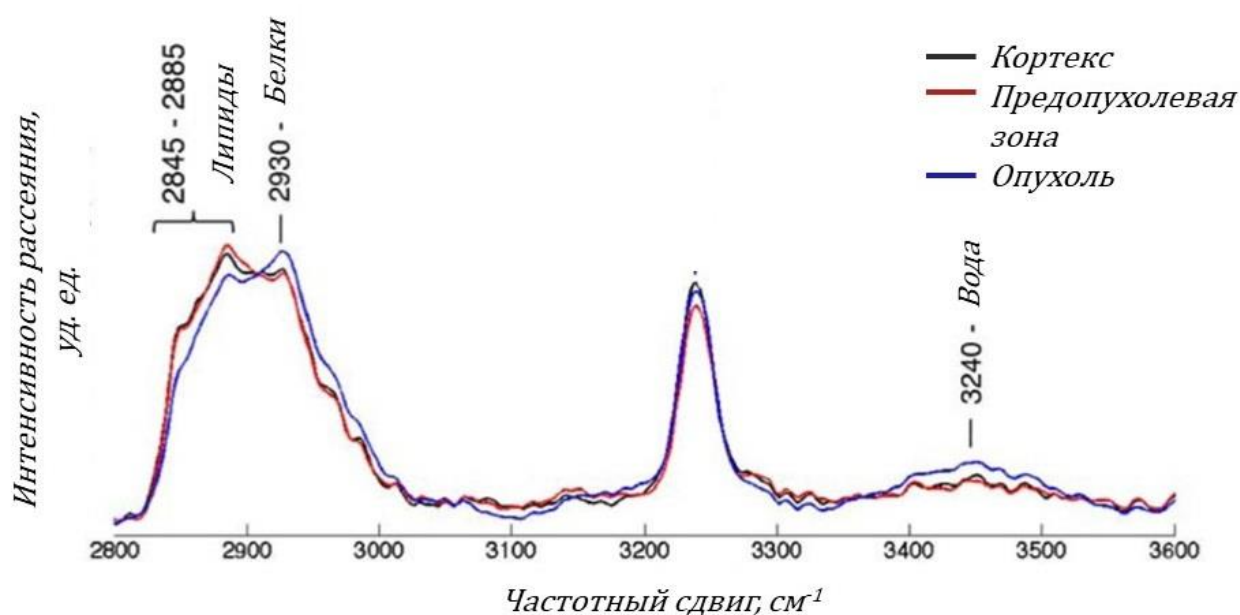
Селективность пиков на спектре КР по отношению к колебаниям определённых типов связей в молекулах позволяет идентифицировать их при анализе биологических образцов *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. В частности, при помощи спектроскопии ГКР установлена связь между конформацией гемов, входящих в состав цитохромов ЭТЦ митохондрий, и их редокс-состоянием, а также оценивается влияние белкового окружения гема на процесс переноса электронов (Bochkova и др., 2025; Brazhe и др., 2023; Kneipp и др., 2010). Метод спектроскопии ГКР также расширяет возможности детекции молекул в изолятах биологических жидкостей: разработанные на его основе сенсоры могут быть успешно использованы для детекции нуклеиновых кислот в пробах после амплификации (Shin и др., 2020; Wang и др., 2023), делая ГКР перспективным методом для молекулярной диагностики. Однако, возможности применения спектроскопии ГКР существенно ограничены из-за необходимости физического контакта между наноструктурой и образцом: такие условия позволяют исследовать процессы в препаратах изолированных белков и митохондрий, а также клеточных культурах.

Спектроскопия комбинационного рассеяния успешно применяется для оценки редокс-состояния различных кофакторов ЭТЦ митохондрий и изучения процессов электронного транспорта. Селективные пики, присутствующие на спектрах КР, относятся к колебаниям связей в молекулах цитохромов (Brazhe и др., 2023), а также железо-серных кластеров (Todorovic, Teixeira, 2018), участвующих в переносе электронов в комплексах ЭТЦ.

Пространственное разрешение спектроскопии КР позволяет получать КР-изображения и оценивать распределение молекул внутри клетки наряду с их конформационным состоянием. Визуализация распределения цитохромов различных типов в клетке даёт информацию о действии воспалительных агентов на

митохондрии и динамику апоптоза (Love и др., 2020; Okada и др., 2012). Другим объектом исследования могут быть липидные капли и нуклеиновые кислоты: в отличие от других методов визуализации, при помощи спектроскопии КР можно получить не только разрешённое изображение, но и оценить молекулярный состав липидных капель, конформацию и степень насыщенности липидов в них (Brazhe и др., 2017; Czamara и др., 2017)

Спектроскопия КР также применяется для развития инструментов медицинской диагностики. На её основе был разработан зонд для интраоперационной диагностики глиом, позволяющий отличить опухолевую область от ткани доступа (Jermyn и др., 2015). Его работа основана на анализе высокочастотной области спектра КР, характеризующейся сравнительно простой формой. Было показано, что в этой области наблюдается увеличение интенсивности пика, ассоциируемого с колебаниями метильных радикалов  $-CH_3$  в молекулах белков ( $2930\text{ см}^{-1}$ ), в спектрах, зарегистрированных от клеток опухоли (рис. 4). При этом выраженных отличий между спектрами, зарегистрированными от ткани доступа и предопухолевой области, выявлено не было.



**Рисунок 4:** Спектры КР, зарегистрированные от здоровой, предопухолевой и опухолевой зон коры головного мозга пациентов с глиомой II степени (по Desroches *et al*, 2018).

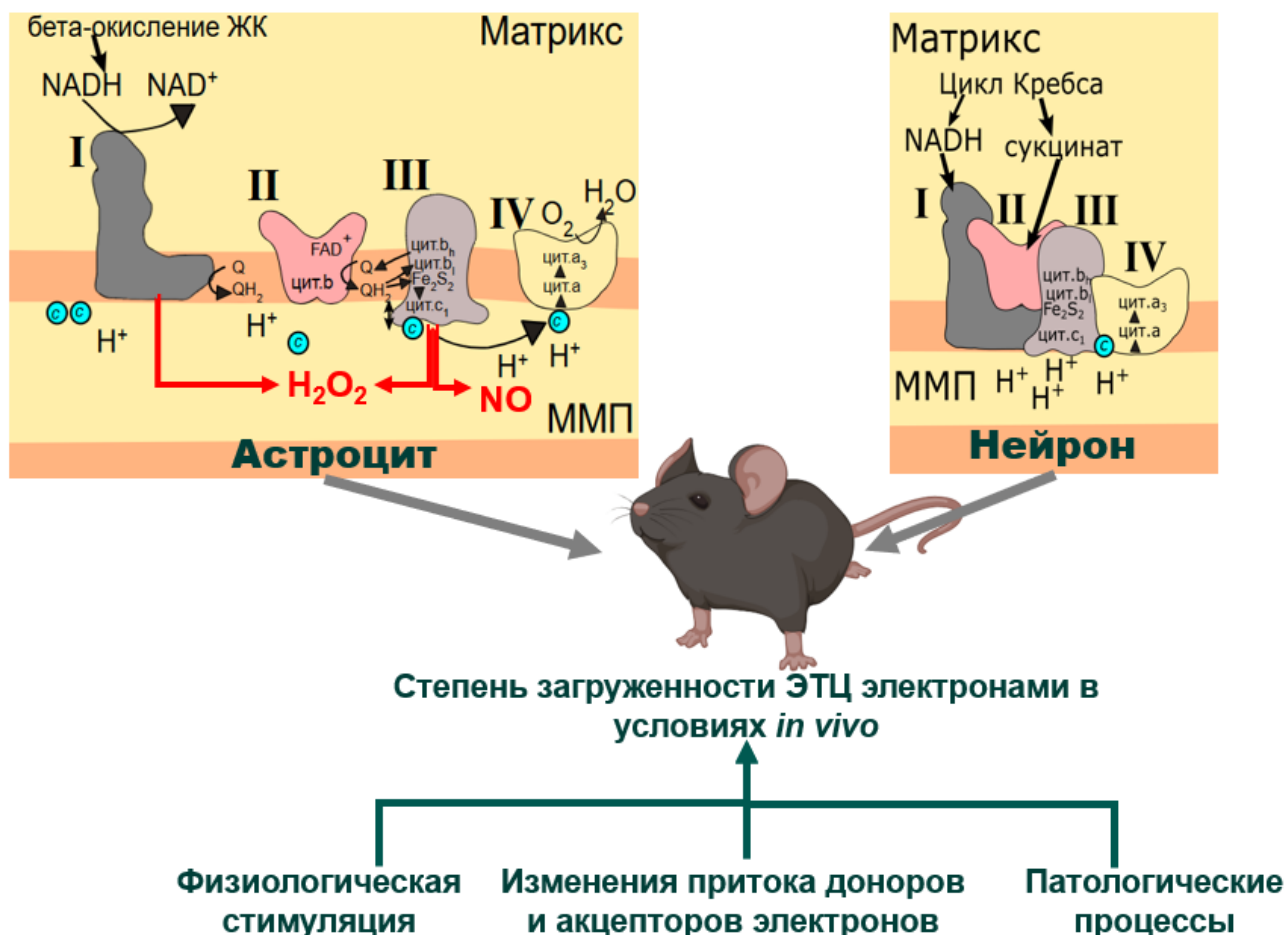
Низкочастотная область спектра от тканей мозга не была детально проанализирована. Она имеет значительно более сложную структуру и может дать больше информации о метаболическом состоянии объекта: в ней наблюдаются пики, соотносимые с колебаниями в молекулах белков, липидов, аминокислот, азотистых оснований и восстановленных гемов, входящих в состав цитохромов. Анализ наблюдаемого сигнала может позволить выявить комплексный параметр, позволяющий отличить не только опухолевую, но и предопухолевую зону от здоровой.

Из анализа низкочастотной области спектров КР, зарегистрированных при длине волны 532 нм, можно получать информацию о соотношении белков и липидов, липидном составе мембран, редокс-состоянии цитохромов В- и С-типов. Этот метод имеет большой потенциал для применения в условиях *ex vivo* и *in vivo* из-за низкой инвазивности и высокой чувствительности к молекулярному составу образца, позволяющей получать уникальную информацию о состоянии комплексов ЭТЦ. Сравнивая астроциты и нейроны в различных условиях, можно определить физиологическое значение транспорта электронов по ЭТЦ в их метаболизме и установить его связь с регуляторными процессами, а также выявить новые параметры для диагностики патологий головного мозга.

### **1.5. Заключение обзора литературы**

Метаболические стратегии астроцитов и нейронов имеют ряд принципиальных различий. Постоянная потребность нейронов в больших количествах АТФ удовлетворяется за счёт высокой интенсивности окислительного фосфорилирования, обеспечиваемого митохондриями, в то время как большое количество митохондрий астроцитов служит в качестве сенсоров микроокружения и участвует в запуске сигнальных каскадов реакций. Эти кардинальные различия отражаются в структуре ЭТЦ: обособленные комплексы, присутствующие в

астроцитах, в нейронах собираются в суперкомплексы – респирасомы – для более быстрой и эффективной передачи электронов (рис. 5).



**Рисунок 5:** 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*.

Физиологическая роль этих различий и особенности функционирования ЭТЦ в условиях разной пространственной организации изучены не до конца. Установлена их связь с синтезом АФК, необходимых для обеспечения сигнальных функций, однако, особенности ответа ЭТЦ на различные воздействия и его зависимость от пространственной организации до сих пор не были описаны. Процессы клеточного дыхания в условиях *in vivo* оказываются под воздействием множества факторов, таких как доступность кислорода и питательных веществ, а также влияние патологий. Для лучшего понимания механизмов функционирования

ЭТЦ и его влияния на другие системы необходимо рассматривать его с учётом микроокружения, характерного для полноценной живой системы.

Для этого хорошо подходит спектроскопия комбинационного рассеяния – чувствительный неинвазивный метод анализа молекулярного состава образца, который может применяться как для фиксированных образцов и клеточных культур, так и для целых организмов. Она позволяет оценивать как белок-липидный состав цитоплазмы клеток, так и редокс-состояние комплексов ЭТЦ в их митохондриях и сопоставлять его со степенью оксигенации крови в прилежащих сосудах. Наконец, спектроскопия КР может стать чувствительным диагностическим инструментом для оценки патологических процессов, происходящих в головном мозге.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Подготовка препаратов и регистрация спектров КР от фиксированных образцов тканей мозга

#### 2.1.1. Препараты срезов гиппокампа мышей

В экспериментах по сравнительному исследованию окислительно-восстановительного состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов использовали самцов линии C57BL/6f в возрасте 2-3 мес. Мыши были анестезированы при помощи изофлурана, затем была проведена интракардиальная перфузия (скорость перфузии 5 мл/мин в течение 10 мин) с использованием оксигенированного физиологического раствора с составом, mM: 92 N-methyl-D-glucamine (NMDG), 2,5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 NaHCO<sub>3</sub>, 20 HEPES, 25 glucose, 2 thiourea, 5 Na-ascorbate, 3 Na-pyruvate, 0,5 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 10 MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, pH 7,4. После перфузии мозг изолировали и помещали в раствор того же состава, который использовали для интракардиальной перфузии. После этого изолировали гиппокамп, помещали в агаровый блок и выполняли поперечное нарезание на срезы с толщиной 250 мкм на вибрирующем микротоме (Microm HM650 V; Thermo Fisher Scientific). После этого срезы гиппокампа переносили в оксигенированный физиологический раствор с составом, mM: 127 NaCl; 2,5 KCl; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 MgCl<sub>2</sub>; 1 CaCl<sub>2</sub>; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 25 D-глюкоза, pH 7,4. Первые 30 минут срезы находились при температуре 32-34 С, затем – 2 ч при температуре 25 С. После периода восстановления срезы переносили на 60 мин в 4% р-р параформальдегида (ПФА), приготовленный на оксигенированном растворе, используемом для инкубации срезов. Затем срезы отмывали в растворе стандартного фосфатного буфера PBS (pH 7,4) (2 раза по 10 мин при постоянном перемешивании), переносили в чистый раствор PBS (pH 7,4) и хранили при 4 С до проведения иммунохимического окрашивания.



Все эксперименты были выполнены в соответствии с требованиями этического комитета Института биоорганической химии ИБХ РАН. Приготовление препаратов фиксированных срезов мозга выполняли в лаборатории внесинаптической передачи отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН.

#### 2.1.2. Коронарные срезы мозга мышей с метастазом меланомы в мозг

Фиксированные коронарные срезы мозга мышей с метастазами меланомы в мозг получали из Испанского национального центра по исследованию рака, группы по исследованию метастазов в мозге (зав. лабораторией Dr. Manuel Valiente (Brain Metastasis Group, Spanish National Cancer Research Center CNIO, Madrid, Spain), приготовление срезов мозга выполнено Dr. Mariam Al-Masmudi). Индукцию метастазов в мозг у мышей выполняли в соответствии с протоколом, описанным в работе Priego *et al*, 2018, получение срезов мозга и их фиксацию в 4% ПФА выполняли в соответствии с протоколом, описанным выше. Протокол иммунохимического окрашивания срезов мозга, совместимого с регистрацией спектров КР, был разработан нашей группой и описан в разделе 3 данной главы. Спектры КР регистрировали со срезов в течение месяца после их приготовления. Срезы мозга хранили в темноте при температуре 25С.

#### 2.1.3. Препараты срезов тканей пациентов

Ткани мозга были получены в ходе операции по удалению глиом у пациентов с их добровольного информированного согласия после согласования проводимых исследований с Комитетом по Этике ФГБОУ ВО «Приволжский государственный медицинский университет» Минздрава России и ННГУ имени Н.И. Лобачевского (решение Комитета по Этике от 25.06.2019, предоставленное главному ответственному исследователю нейрохирургу д.м.н. Медянику И.А.). В ходе операции проводилось удаление плотной опухоли, а также предопухолевой зоны и области кортекса в случае их локализации поверх опухоли при невозможности

удаления плотной опухоли без затрагивания околоопухолевых областей. Сразу после удаления ткань мозга помещали в оксигенированный ледяной физиологический раствор (состав, mM: 92 NaCl; 2,5 KCl; 30 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 Glucose; 2 HEPES; 5 Na-ascorbate; 3 Na-pyruvate; 2 thiourea; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgSO<sub>4</sub>; pH 7,4) в специальном контейнере для транспортировки и перевозили в лабораторию в ННГУ. В лаборатории ткань переносили в оксигенированный физиологический раствор состава, mM 85 NaCl, 2,5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 Sucrose, 10 Glucose, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgSO<sub>4</sub>, pH 7,4 и осуществляли нарезание ткани на срезы с толщиной 250 мкм (при использовании вибрирующего микротомы Microm HM650 V; Thermo Fisher Scientific). После этого срезы тканей мозга выдерживали в оксигенированном физиологическом растворе при температуре 32-34 °C в течение 50 мин, а затем переносили на 60 мин в 4% раствор параформальдегида (ПФА), приготовленный на оксигенированном физиологическом растворе, используемом для инкубации срезов. Через 60 мин срезы отмывали в растворе стандартного фосфатного буфера PBS (pH 7,4) (2 раза по 10 мин при постоянном перемешивании) и очищенной воде MilliQ (3 раза по 15 мин при постоянном перемешивании), после чего срезы переносили на очищенные предметные стекла и высушивали при температуре 25 °C в темноте. Приготовление препаратов срезов тканей головного мозга выполнялось к.т.н., н.с. Поповым А.В. Готовые препараты срезов мозга хранили при комнатной температуре в темноте. Регистрацию КР-спектров проводили в течение месяца после приготовления препаратов.

#### 2.1.4. Протокол иммуногистохимического окрашивания фиксированных срезов

Для идентификации астроцитов и нейронов в препаратах срезов тканей мозга был использован разработанный ранее протокол иммуногистохимического окрашивания, совместимого с регистрацией спектров КР и не приводящий к их искажению. Для этого были использованы первичные антитела на глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКП, glial fibrillary acidic protein, GFAP), являющийся биомаркером астроцитов, и гексарибонуклеотид-связывающий белок

3 (Hexaribonucleotide Binding Protein-3, Rbfox3 или NeuN), и вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами Cy2, Cy5, AlexaFluor488 и AlexaFluor700. После фиксации срезов тканей мозга окрашивание производилось следующим образом:

1. Подготовка срезов (инкубация срезов, предварительно зафиксированных в 4% ПФА, в растворе PBS+0.3% Triton-X100, 20 мин; последующая инкубация в растворе PBS+0.1% Tween 20+5% BSA, 1.5 ч, при температуре 25 C);
2. Инкубация срезов в растворе первичных антитела (антитела кролика к мышинному белку GFAP, титр 1:50, и антитела курицы к мышинному белку NeuN, титр 1:1000) в PBS+0.01% Tween 20 (48 ч, при температуре 25 C);
3. Троекратная отмывка срезов в PBS по 15 мин на итерацию;
4. Инкубация срезов со вторичными антителами осла к белкам кролика, конъюгированным с флуорофором Cy2, и к белкам курицы, конъюгированным с флуорофором Cy5, титр 1:500 – 2.5 ч при температуре 25 C;
5. Двукратная отмывка срезов в PBS по 10 мин;
6. Двукратная отмывка срезов в очищенной воде MilliQ по 10 минут и последующий перенос срезов на предметные стекла для высушивания в темном месте.

В данном протоколе, в отличие от традиционных протоколов иммуногистохимического окрашивания, вместо Triton X-100 был использован Tween 20, который не обладает детергирующим действием и, следовательно, не приводит к экстракции липидов. Также было показано, что флуоресцентный зонд Cy2 может быть заменен на флуорофор AlexaFluor488, обладающий такими же спектральными свойствами.

Флуоресцентные зонды AlexaFluor488 и Cy2 были выбраны из-за спектральных свойств: максимум возбуждения их флуоресценции лежит в области

460-490 нм, а максимум излучения – 502-520 нм. При регистрации спектров КР с длиной волны возбуждающего излучения 532 нм не происходит возбуждения флуоресценции зондов и, следовательно, фоновый сигнал не препятствует регистрации низкоинтенсивного сигнала КР.

В экспериментах по сравнению редокс-состояния цитохромов митохондрий в астроцитах в срезах мозга здоровых мышей вторичные антитела были конъюгированы с флуорофором Cy2, а в экспериментах по сравнительному исследованию редокс-состояния цитохромов митохондрий в астроцитах в здоровом полушарии мозга и вблизи метастаза меланомы вторичные антитела были конъюгированы с флуорофором AlexaFluor700.

#### 2.1.5. Регистрация спектров КР от срезов тканей мозга

Для регистрации спектров использовали конфокальный КР-микроспектрометр NTEGRA SPECTRA (НТ-МДТ, Зеленоград), представляющий собой конфокальный КР-спектрометр, соединенный с инвертированным микроскопом Leica. 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. В срезах мозга животных с иммуногистохимически окрашенными астроцитами и нейронами спектры КР регистрировали от идентифицированных по флуоресценции клеток в области нейропиля, CA1 или CA3 гиппокампа. Регистрация спектров производилась в режиме накопления сигнала по 30-60 спектров, каждый из которых записывался в течение 1 секунды. В срезах мозга мышей с метастазом меланомы сигнал регистрировался от астроцитов, расположенных в разной степени удаления от метастаза, границы которого определялись по выраженной пигментации опухолевых клеток. Для каждого образца регистрировались спектры от 5-10 клеток каждого исследуемого типа.

Регистрация спектров от образцов тканей мозга пациентов с глиомами осуществлялась с использованием двух волн возбуждения: 532 и 633 нм.

Регистрация спектров от образцов осуществлялась в режиме накопления сигнала по 60 спектров, каждый из которых записывался по 1 секунде, с использованием объектива x100, NA 0,9. Мощность лазера на выходе из объектива для зеленого лазера была не более 1 мВт на область регистрации, для красного лазера — не более 3 мВт на область регистрации. При длине волны возбуждения 633 нм амплитуда пиков КР, связанных с колебаниями связей в молекулах белков и липидов, выше и они лучше разрешены, а также присутствуют пики, ассоциируемые с колебаниями связей в молекулах восстановленных гемов типа А. Пики, ассоциированные с колебаниями в молекулах восстановленных гемов типов В и С присутствуют только на спектрах, зарегистрированных при длине волны возбуждения 532 нм, но вместе с тем пики липидов и белков на этих спектрах хуже разрешены. В связи с этим, амплитуды для анализа колебаний в разных молекулах сравнивали на основании данных различных спектров. Для каждого пациента регистрировали по 20-30 спектров от неидентифицированных участков ткани в области ткани доступа, предопухолевой и опухолевой зон.

## **2.2. Подготовка и методы регистрации спектров КР в условиях *in vivo***

### **2.2.1. Экспериментальные животные**

Все описанные манипуляции и эксперименты с использованием лабораторных животных проведены в ГНЦ ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН в соответствии с Директивой 2010/63/EU после одобрения комиссией по этике и использованию лабораторных животных (протокол №353, учитывающий этические и юридические нормы Rus-LASA и международные GLP-стандарты).

В работе использовались самцы и самки мышей линии C57Bl/6 в возрасте 6-12 месяцев. Животные содержались в группах с доступом к воде и корму *ad libitum* при цикле день/ночь в стандартных лабораторных условиях в конвенциональном отделении вивария ИБХ РАН. В экспериментах по влиянию развития болезни

Альцгеймера использовались животные линии 5xFAD в возрасте 3-4 месяца и 6-8 месяцев, содержащиеся в аналогичных условиях.

Для изучения эффектов диеты с повышенным содержанием жиров самцы мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2 месяцев были разделены на две группы. Одна группа в течение 1 месяца получала стандартный комбинированный корм, другая – корм, обогащённый жирами (SNIFF, Германия). После этого животные эвтаназировались для приготовления препаратов срезов гиппокампа (см. раздел 3.1.1.).

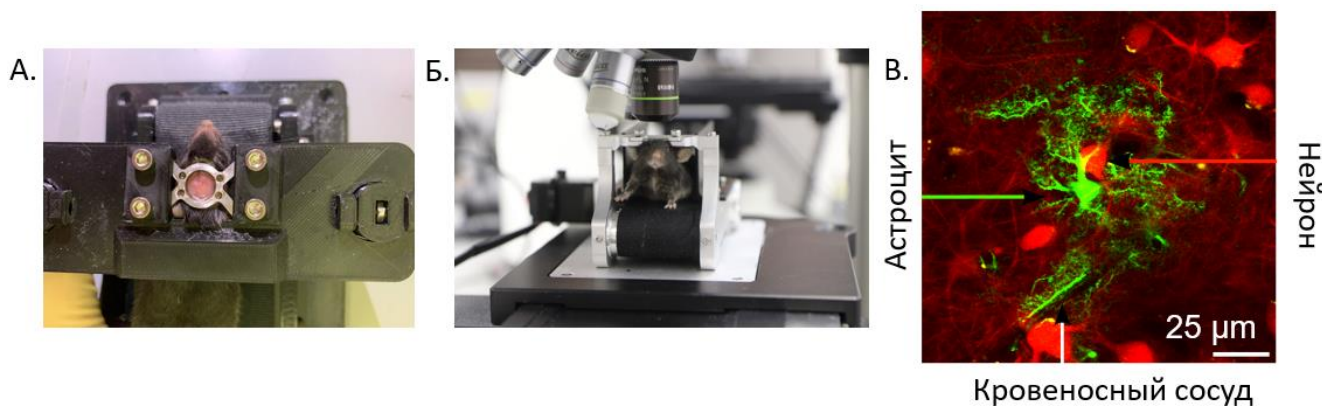
#### 2.2.2. Имплантация хронических краниальных окон и инъекция вирусных частиц

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 3 и 6 месяцев) – рис. 6А. Для идентификации клеток использовались флуоресцентные белки, гены которых были доставлены в клетки при помощи инъекции аденоассоциированных вирусов в область соматосенсорной коры. Животных анестезировали при помощи газового наркоза (изофлуран с концентрацией 1,5% во вдыхаемом воздухе), после чего закрепляли в стереотаксической установке (RWD, Китай). Для местной анестезии перед началом операции под кожу черепа вводили раствор новокаина, после чего удаляли фрагменты кожи головы и осуществляли краниотомию диаметром 3-4 мм при помощи стоматологического сверла (RWD, Китай). Вирусные частицы вводили при помощи стеклянного капилляра в область соматосенсорной коры по координатам AP +2,3, ML +0,5, DV -0,6 для астроцитов и AP +2,3, ML +0,5, DV -1 для нейронов, объём введения составлял 1 мкл.

В данной работе были использованы несколько типов вирусных частиц в зависимости от целей эксперимента:

1. AAV-php.B-gfaABC1D-PI-Lck-GFP, титр  $4,2 \cdot 10^{11}$  вир.ген./мл для экспрессии гена, кодирующего зелёный флуоресцентный белок в цитоплазме астроцитов.
2. AAV-php.B-hSyn-NirFP-WPRE-hGHpolyA, титр  $5,2 \cdot 10^{11}$  вир.ген./мл для экспрессии гена, кодирующего ближне-инфракрасный флуоресцентный белок в цитоплазме нейронов.
3. AAV9.CaMKII-eGFP, титр  $1,1 \cdot 10^{11}$  вир.ген./мл для экспрессии гена, кодирующего зелёный флуоресцентный белок в цитоплазме нейронов.
4. AAV9-gfaABC1D-m7HyPer7-WPRE-SV40, титр  $6,25 \cdot 10^{11}$  вир.ген./мл для экспрессии гена, кодирующего флуоресцентный сенсор HyPer7 на  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий астроцитов.
5. AAV9-CaMKII-m7-HyPer7-WPRE-SV40, титр  $3,31 \cdot 10^{12}$  вир.ген./мл. для экспрессии гена, кодирующего флуоресцентный сенсор HyPer7 на  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий нейронов.

Кончик капилляра до и после инъекции оставляли в ткани мозга на 5 минут для обеспечения диффузии вирусных частиц в области интереса. Далее область проведения операции покрывали стеклом диаметром 5 мм и толщиной 0,1 мм (Thomas Scientific, США), приклеиваемым при помощи цианоакрилатного клея (Cosmofen Ca-12, Германия). Поверх краниального окна на смесь стоматологического цемента (Simplex rapid powder, Kemdent, Великобритания) и цианоакрилатного клея фиксировали металлическое крепление для последующей фиксации животного под объективом микроспектрометра. Послеоперационная анестезия осуществлялась посредством внутрибрюшинной инъекции кетопрофена.



**Рисунок 6:** А – имплантированное хроническое краниальное окно над областью соматосенсорной коры мыши, Б – мышь на беговой дорожке под объективом микроскопа, В – совмещённое флуоресцентное изображение для зелёного флуоресцентного белка, экспрессированного в астроцитах, и ближне-инфракрасного флуоресцентного белка, экспрессированного в нейронах.

Необходимые для идентификации клеток уровни экспрессии флуоресцентных белков достигались через 3-4 недели после проведения операций (рис. 6В). Контроль за состоянием клеток и уровнем экспрессии флуоресцентных белков осуществлялся при помощи визуальной оценки с использованием флуоресцентного микроскопа (Leica, Германия).

### 2.2.3. Регистрация спектров КР от кровеносных сосудов и клеток мозга в условиях *in vivo*

Для исследования редокс-состояния комплексов ЭТЦ митохондрий в астроцитах и нейронах в условиях *in vivo* была проведена серия экспериментов на бодрствующих мышах с хроническими краниальными окнами, имплантированными над областью проекции передней лапы соматосенсорной коры. Животных кратковременно наркотизировали изофлураном в герметичной камере, после чего фиксировали на моторизированной беговой дорожке (НТЦ УП РАН, Россия) при помощи имплантированного металлического крепления на голове (рис. 6Б). Беговая дорожка монтировалась в предметный столик прямого



микроскопа FSM (free space microscope, Leica, Германия), совмещённого с конфокальным микроспектрометром (Renishaw, Великобритания). После пробуждения животного производилась регистрация спектров флуоресценции и КР 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 в головном мозге идентифицировались по оптическим изображениям, получаемым камерой микроспектрометра в отражённом свете. Идентификация клеток производилась по оптическим изображениям, полученным в эпифлуоресцентном канале, или по спектрам флуоресценции экспрессируемых в них белков: для GFP и HyPer7 использовалась длина волны возбуждения 473 нм, для NirFP – 633 нм, время регистрации – 1 с. Спектр флуоресценции записывался в течение 1 с, после чего прибор переводился в режим регистрации спектров КР: время накопления одиночного КР-спектра составляло 10-20 с для астроцитов и нейронов и 1 с для кровеносных сосудов. Общая продолжительность однократного эксперимента для одного животного не превышала 2 часов.

#### 2.2.4. Оценка влияния физиологических стимулов на степень оксигенации крови в сосудах головного мозга и редокс-состояние комплексов ЭТЦ в астроцитах и нейронах

Для оценки влияния физиологических нагрузок на функционирование ЭТЦ в астроцитах и нейронах производилась регистрация серий спектров КР от идентифицированных клеток мозга мышей в состоянии покоя, при беге и последующем отдыхе. После закрепления животного на беговой дорожке под объективом микроспектрометра и идентификации клетки или кровеносного сосуда прибор переводился в режим непрерывной регистрации временных серий спектров КР, после чего последовательно записывались спектры от объекта в состоянии покоя (1 мин), бега, вызванного активацией мотора в беговой дорожке, (1 мин) и последующего отдыха (1 мин). Уровни синтеза  $H_2O_2$  в покое и при

физиологических нагрузках оценивались по изменениям флуоресценции сенсора HyPer7, экспрессированного в митохондриях астроцитов и нейронов, при длине волны возбуждения 473 нм. Для этого регистрировались аналогичные серии спектров флуоресценции.

Видеофиксация движений животного велась при помощи инфракрасной камеры. Эпизоды спонтанной активности (груминга) выделялись в ходе анализа поведения в программе Bonsai по сохранённым видеозаписям и синхронизации временных отметок с отметками о времени регистрации соответствующих спектров КР или флуоресценции. Полученные данные представляли собой наборы одиночных спектров КР, сгруппированные по типам поведения животного, методы их анализа описаны ниже.

#### 2.2.5. Индукция острой локальной гипоксии путём фототромбоза кровеносного сосуда в головном мозге

В экспериментах по индукции локальной острой гипоксии у бодрствующих мышей линии C57BL/6f выбирался участок головного мозга с артериолой и прилегающими к ней астроцитами или нейронами, идентифицируемыми по флуоресценции GFP. Артериола определялась по присутствию в спектре КР выраженных пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах оксигемоглобина. Спектры от артериолы и прилегающих клеток записывались в состоянии покоя животного, после чего выполнялась внутрибрюшинная инъекция бенгальского розового объёмом 200 мкл с концентрацией 20 мг/кг веса животного. Раствор бенгальского розового приготавливался в день эксперимента путём растворения сухого красителя в стерильном растворе NaCl (концентрация 0,9%) и хранился в темноте во избежание фотоактивации. Через 30 мин после инъекции осуществлялась локальная фотоактивация красителя в выбранной артериоле облучением лазером с длиной волны 532 нм и мощностью 3-4 мВт на регистрируемый объём в течение 5 минут. Это приводило к прекращению кровотока в выбранном участке сосуда (здесь и далее – к локальному

фототромбозу). Далее спектры от прилегающих идентифицированных клеток регистрировались в течение 60 минут. Повторные измерения производились через 20 и 40 часов после фототромбоза. Контроль состояния кровотока в выбранном участке осуществлялся через оптические изображения в отражённом свете и оценку степени оксигенации крови по спектрам КР.

Контрольные эксперименты выполнялись аналогичным образом с введением 200 мкл стерильного NaCl (концентрация 0,9%). Последующее облучение, приводившее при инъекции бенгальского розового к фототромбозу, не оказывало повреждающего действия на сосуд и прилегающие ткани.

#### 2.2.6. Индукция системной гипергликемии

Для оценки влияния гипергликемии на редокс-состояние комплексов ЭТЦ в астроцитах и нейронах регистрировались спектры от клеток, идентифицированных по флуоресценции GFP, в мозге мышей линии C57BL/6f после 24 ч диеты. Далее осуществлялась внутрибрюшинная инъекция раствора глюкозы из расчёта дозы 20 мг/кг веса животного (объём введения составлял 200-250 мкл в зависимости от веса). Спектры от идентифицированных клеток регистрировались в течение 60 мин с момента инъекции с интервалами в 5-7 мин. Для контрольных измерений животным после 24-часового голодания осуществляли инъекцию раствора NaCl (концентрация 0,9%).

### 2.3. Анализ данных

#### 2.3.1. Анализ одиночных спектров КР

Спектры КР обладают низкой интенсивностью, поэтому для точного расчёта соотношений амплитуд интересующих пиков необходимо осуществлять математическую коррекцию фона, обусловленного автофлуоресценцией и остаточной флуоресценцией белков, использованных для идентификации клеток в

образце. Обработка спектров осуществлялась при помощи пакета Pygaman, разработанного для Python3: он позволяет аппроксимировать базовую линию в спектре полиномом пятой степени при ручном подборе узловых точек. Далее в спектре с вычтенной базовой линией определялись положения максимумов интересующих пиков, рассчитывались их амплитуды и соотношения.

### 2.3.2. Анализ временных серий спектров КР

Ручная коррекция фона в спектре занимает много времени, поэтому для анализа временных серий спектров была разработана библиотека для языка Python3, позволяющая локально аппроксимировать базовую линию линейной функцией. Для этого в узких областях спектра, непосредственно прилегающих к интересующему пику КР (группе пиков), но не содержащей значимого КР-сигнала, выбирались точки, соответствующие локальным минимумам интенсивности фоновой автофлуоресценции, после чего через них строилась прямая, аппроксимирующая фон в интересующей области. Такой способ коррекции применялся для пиков, положение которых точно определялось для спектров с нескорректированным фоном, в частности, для оценки степени оксигенации крови по спектрам, зарегистрированным от кровеносных сосудов, и позволял значительно ускорить процесс обработки данных.

### 2.3.3. Расчёт степени оксигенации крови по данным спектров КР

Оценка степени оксигенации крови осуществлялась путём расчёта соотношений амплитуд пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах окси- и дезоксигемоглобина по следующей формуле:

$$sO_2 = \frac{1,44 * I_{1585}}{1,44 * I_{1585} + I_{1547}} * 100\%,$$

где  $I_{1585}$  – интенсивность максимума пика КР в положении  $1585\text{ см}^{-1}$ ,  $I_{1547}$  – интенсивность максимума пика в положении  $1547\text{ см}^{-1}$  (соотнесение пиков с колебаниями связей в молекулах представлено в таблице 1). Коэффициент 1,44 был подобран в ходе калибровочного эксперимента и обусловлен неодинаковым КР-сечением молекул дезокси- и оксигемоглобина. Для анализа изменений в степени оксигенации крови в сосудах головного мозга сосуды были разделены на артериолы (степень оксигенации крови выше 95%) и вены (степень оксигенации крови ниже 85%).

**Таблица 1:** Положения пиков, используемых для расчёта степени оксигенации крови, и связи, с которыми они ассоциируются

Положение пика, см-1	Молекула	Связь или группа
1547	Дезоксигемоглобин	Пиррольные кольца и метиновые мостики
1585	Оксигемоглобин	Пиррольные кольца и метиновые мостики

#### 2.3.4. Статистический анализ

Программный код, необходимый для анализа и визуализации данных создавался и редактировался с использованием веб-интерфейса Jupyter Notebook. Статистический анализ осуществлялся при помощи программных пакетов Numpy и Scipy для Python3. Для сравнения двух групп использовался U-тест Манна-Уитни, для сравнения 3 и более групп – тест Краскела-Уоллиса с попарным сравнением по критерию Данна. Для визуализации данных использовали пакеты Matplotlib и Seaborn для Python3. Данные представлены в виде диаграмм размаха (усатых

ящиков) с медианами, квантилями 25 и 75% и усами 5 и 95% и столбцов, соответствующих средним значениям параметров со стандартной ошибкой среднего.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1. Сравнение редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов головного мозга**

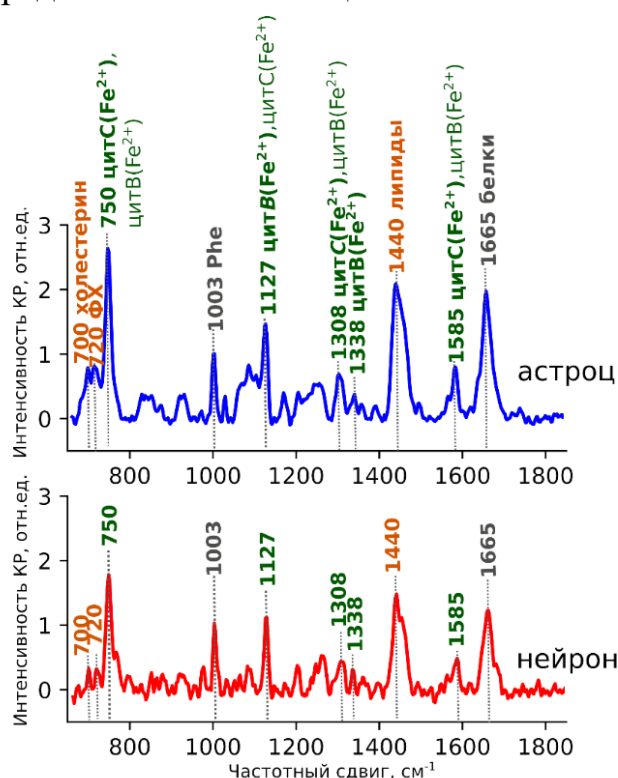
Ввиду различий в строении ЭТЦ и метаболических особенностей, подробно рассмотренных в разделах 1.1.3, 1.2.1 и 1.2.2 был проведён анализ спектров КР, зарегистрированных от идентифицированных астроцитов и нейронов в срезах тканей головного мозга животных. Впервые были получены спектры КР от идентифицированных клеток в головном мозге бодрствующих животных, а также проведена оценка доли восстановленных цитохромов, входящих в состав ЭТЦ митохондрий в этих клетках. Были выявлены различия в редокс-состоянии комплексов ЭТЦ митохондрий, связанные с разницей в их пространственной организации во внутренней мембране.

##### **3.1.1. Относительное количество восстановленных цитохромов С и В различается для астроцитов и нейронов в срезах мозга мышей**

Спектры, зарегистрированные от астроцитов и нейронов в фиксированных срезах мозга мышей (рис. 7), характеризовались присутствием пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах липидов (700, 720, 1440  $\text{см}^{-1}$ ), белков (1003, 1665  $\text{см}^{-1}$ ), а также восстановленных гемов цитохромов С- и В-типов (750, 1126, 1308, 1338  $\text{см}^{-1}$ ) – рис. 7. Подробное описание анализируемых в настоящей работе пиков в спектрах КР, регистрируемых от тканей мозга, представлено в таблице 2.

В срезах мозга мышей клетки были идентифицированы по флуоресценции белков, использованных для ИГХ. Интенсивность флуоресценции маркеров не препятствовала регистрации спектров КР, а используемые условия окрашивания способствовали сохранению липидного состава образцов. Анализ спектров КР, зарегистрированных от идентифицированных астроцитов и нейронов в

фиксированных срезах мозга мышей показал, что в спектрах, зарегистрированных от астроцитов, интенсивность пиков, ассоциированных с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов, выше, чем в спектрах, зарегистрированных от нейронов. Соотношения амплитуд различных пиков на спектре КР коррелируют с относительными количествами молекул различных типов в клетках: соотношения, проанализированные в данной работе, представлены в таблице 3.



**Рисунок 7:** Спектры,

зарегистрированные от идентифицированных астроцитов и нейронов в фиксированных срезах мозга мышей с иммуногистохимическим окрашиванием на GFAP (маркер астроцитов) и NeuN (маркер нейронов) при длине волны возбуждения 532 нм. Над пиками, ассоциированными с колебаниями связей в разных

молекулах, указаны положения максимумов: зеленым цветом – в молекулах восстановленных цитохромов С- и В-типов, коричневым – липидов, серым – белков.

**Таблица 2:** Положения рассматриваемых в данной работе пиков и связи, с колебаниями которых они ассоциируются

Положение пика, см-1	Молекула	Связь или группа
Длина волны возбуждающего света 532 нм		
700	Холестерин	Связи в молекуле холестерина



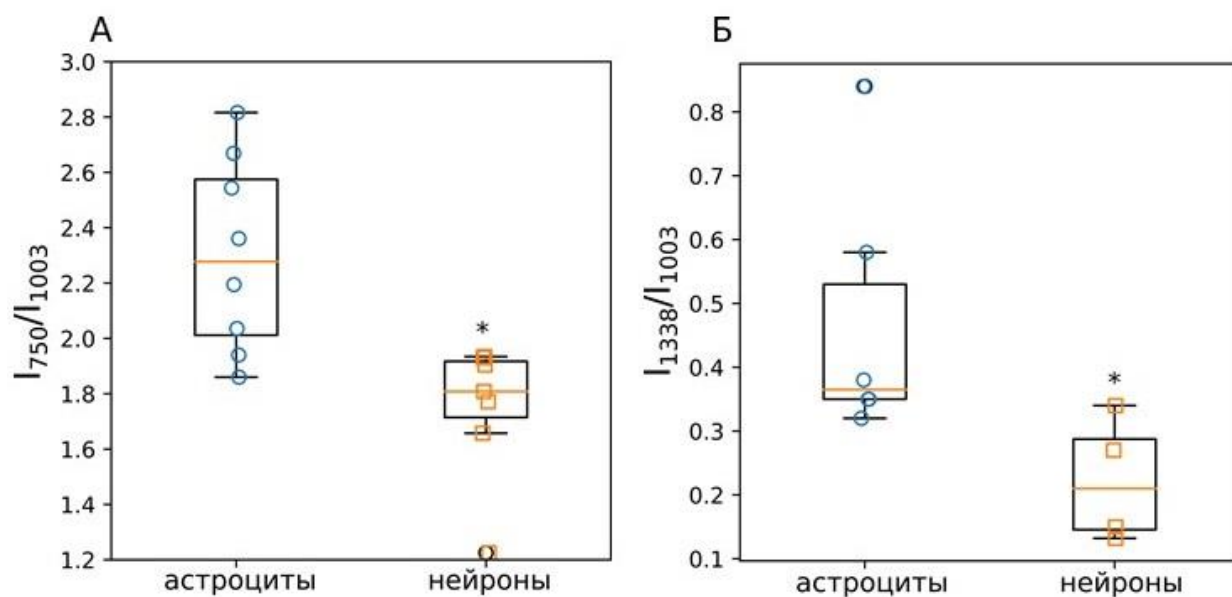
720	Фосфатидилхолин	Связи в молекуле фосфатидилхолина
750	Цитохром С (Fe <sup>2+</sup> )	Пиррольные кольца гема С в восстановленных цитохромах типов С и С1
1003	Фенилаланин	Фенилаланин
1126, 1338	Цитохром В (Fe <sup>2+</sup> )	Пиррольные кольца гема В в восстановленных цитохромах типа В комплекса III ЭТЦ митохондрий
1440	Липиды	С-С и СН <sub>2</sub>
1660	Белки	Пептидные связи, радикалы СН <sub>3</sub>
2850	Липиды	С-С и СН <sub>2</sub>
2885	Липиды	С-С и СН <sub>2</sub>
2925	Белки	Пептидные связи, радикалы СН <sub>3</sub>
Длина волны возбуждающего света 633 нм		
1003	Фенилаланин	Фенилаланин
1440	Липиды	С-С и СН <sub>2</sub>
1580	Цитохром А (Fe <sup>2+</sup> )	Пиррольные кольца гема А и А <sub>3</sub> в восстановленных цитохромах типа А
1660	Белки	Пептидные связи, радикалы СН <sub>3</sub>
2850	Липиды	С-С и СН <sub>2</sub>
2885	Липиды	С-С и СН <sub>2</sub>
2925	Белки	Пептидные связи, радикалы СН <sub>3</sub>

**Таблица 3:** Анализируемые соотношения амплитуд пиков и их значения

Соотношение	Значение
$I_{700}/I_{720}$	Соотношение холестерина и фосфатидилхолина
$I_{750}/I_{1003}$	Относительное количество восстановленных цитохромов С-типа по отношению к общему количеству фенилаланина в клетке
$I_{750}/I_{1126}, I_{750}/I_{1338}$	Соотношение количеств восстановленных цитохромов типов С и В
$I_{750}/I_{1440}$	Относительное количество восстановленных цитохромов С-типа по отношению к общему количеству липидов в клетке
$I_{1338}(I_{1126})/I_{1003}$	Относительное количество восстановленных цитохромов В-типа по отношению к общему количеству фенилаланина в клетке
$I_{1338}(I_{1126})/I_{1440}$	Относительное количество восстановленных цитохромов В-типа по отношению к общему количеству липидов в клетке
$I_{750}/I_{1660}$	Относительное количество восстановленных цитохромов С-типа по отношению к общему количеству белка в клетке
$I_{1126}/I_{1660}$	Относительное количество восстановленных цитохромов В-типа по отношению к общему количеству белка в клетке
$I_{1660}/I_{1440}, I_{2925}/I_{2850}$	Соотношение белков и липидов
$I_{1580}/I_{1003} (633 \text{ нм})$	Относительное количество восстановленных цитохромов А-типа по отношению к общему количеству фенилаланина в клетке

$I_{1580}/I_{1440}$ (633 нм)	Относительное количество восстановленных цитохромов А-типа по отношению к общему количеству липидов в клетке
$(I_{1338}/I_{1003})/(I_{1580}/I_{1003})$	Соотношение количеств восстановленных цитохромов типов В (532 нм) и А (633 нм)
$(I_{1580}/I_{1003})/(I_{750}/I_{1003})$	Соотношение количеств восстановленных цитохромов типов А (633 нм) и С (532 нм)
$(I_{1580}/I_{1003})/(I_{1338}/I_{1003})$	Соотношение количеств восстановленных цитохромов типов А (633 нм) и В (532 нм)

Относительное количество восстановленных цитохромов В- и С- типов по отношению к общему количеству липидов в клетке также было выше в астроцитах, чем в нейронах (рис. 8). Этот параметр отражает степень загруженности ЭТЦ электронами на разных участках: на уровне комплекса III и цитохрома С. Большая степень загруженности ЭТЦ соотносится с более медленным переносом электронов в ней.



**Рисунок 8:** Диаграмма размаха для соотношений амплитуд пиков 750 см<sup>-1</sup>(А) и 1338 см<sup>-1</sup> (Б), ассоциированного с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типа С, и пика 1003 см<sup>-1</sup>, ассоциированного с

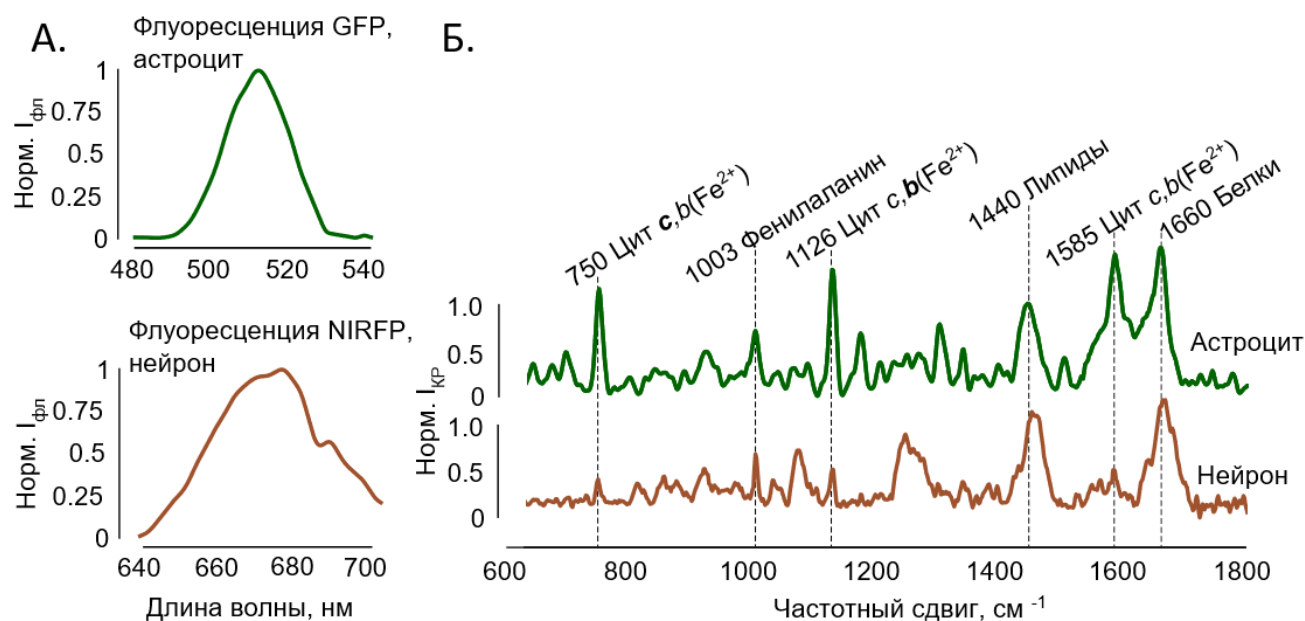
колебаниями связей в молекулах фенилаланина, в спектрах, зарегистрированных от астроцитов и нейронов в срезах мозга контрольных животных. \* -  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

В астроцитах комплексы ЭТЦ обособлены друг от друга, и скорость переноса электронов между ними определяется скоростью диффузии подвижных переносчиков между комплексами. В ЭТЦ нейронов, собранных в суперкомплекс – респирасому – транспорт электронов осуществляется быстрее за счёт связывания молекул подвижных переносчиков в сайтах их окисления и восстановления. Таким образом, структура ЭТЦ определяет скорость транспорта электронов, что подтверждается данными, полученными на фиксированных образцах. При этом ранее не было показано, сохраняется ли пространственная организация комплексов ЭТЦ в митохондриях астроцитов и нейронов в условиях *in vivo* в интактном мозге.

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

В мозге бодрствующих животных в условиях *in vivo* идентификация клеток осуществлялась при помощи регистрации спектров флуоресценции белков-маркеров, синтезировавшихся в их цитоплазме после инъекции аденоассоциированных вирусов: зелёного флуоресцентного белка в астроцитах и ближне-инфракрасного флуоресцентного белка в нейронах (рис. 9А). Тит вирусов был подобран таким образом, чтобы синтез белка-маркера не приводил к апоптозу или иным повреждениям тканей мозга, а его фоновая флуоресценция не препятствовала регистрации спектров КР. Форма спектров КР, зарегистрированных в условиях *in vivo*, была аналогична форме спектров, зарегистрированных в условиях *ex vivo*, и в них наблюдались пики, ассоциированные с колебаниями связей, упомянутых в таблице 2 (рис. 9Б). Интенсивность пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов (750,

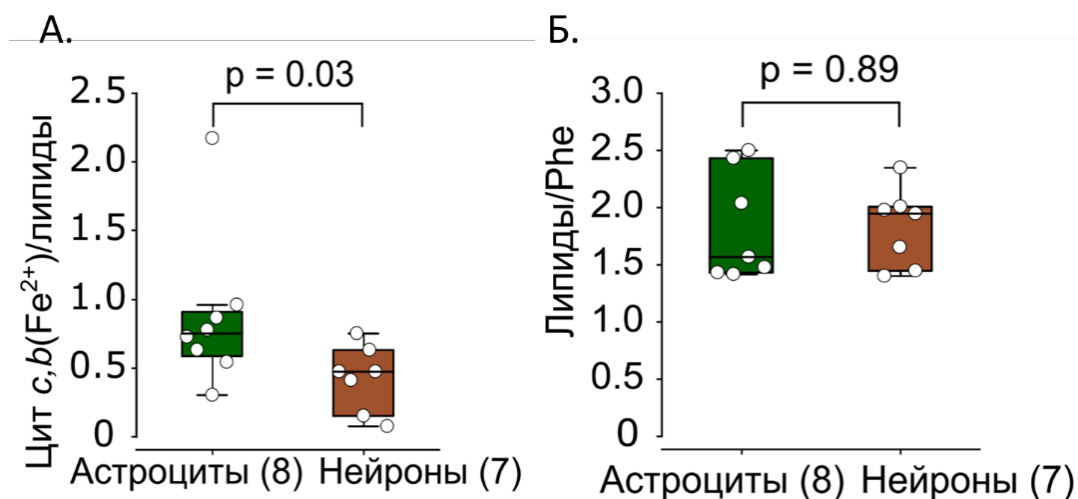
1126  $\text{см}^{-1}$ ), была выше в спектрах, зарегистрированных от астроцитов, чем в спектрах, зарегистрированных от нейронов.



**Рисунок 9:** А – спектры флуоресценции, зарегистрированные от астроцитов при длине волны возбуждающего излучения 473 нм (зелёный спектр) и нейронов при длине волны возбуждающего излучения 633 нм (коричневый спектр), интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на максимальную интенсивность флуоресценции; Б – спектры КР, зарегистрированные от астроцитов (зелёный спектр) и нейронов (коричневый спектр) при длине волны возбуждающего излучения 532 нм, интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на интенсивность пика в положении 1440  $\text{см}^{-1}$ . Над пиками, ассоциированными с колебаниями связей в различных молекулах, указаны положения максимумов.

Относительное количество восстановленных цитохромов С- и В-типов по отношению к общему количеству липидов также было выше в астроцитах, чем в нейронах (рис. 10А). Соотношение липидов и фенилаланина в астроцитах и нейронах в мозге бодрствующих животных не отличалось, что позволяло использовать пик, ассоциированный с колебаниями в молекулах липидов (положение максимума 1440  $\text{см}^{-1}$ ) для нормирования интенсивностей других пиков

в спектре и оценки различий (рис. 10Б). Таким образом, было показано, что степени загрузки ЭТЦ электронами в астроцитах и нейронах одинаковым образом различаются в условиях *ex vivo* и *in vivo*, что согласуется с данными о строении ЭТЦ в митохондриях этих клеток, полученными в условиях *in vitro*.



**Рисунок 10:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков в положениях 750 и 1440 см<sup>-1</sup> (А) и 1440 и 1003 см<sup>-1</sup> (Б), соответствующих соотношениям восстановленных цитохромов С- и В-типов и липидов (А) и липидов и фенилаланина (Б) в астроцитах и нейронах в головном мозге бодрствующих животных. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни.

Организация комплексов ЭТЦ в респирасомы в митохондриях нейронов необходима для более эффективной работы ЭТЦ, приводящей к быстрой генерации больших количеств АТФ, в то время как физиологическое значение обособления комплексов ЭТЦ в митохондриях астроцитов ранее не было изучено. Мы предположили, что различия в пространственной организации комплексов ЭТЦ необходимы для осуществления функций астроцитов и нейронов и будут приводить к различиям в ответах этих клеток на физиологические стимулы: в частности, активацию клеток. Также различия в структуре ЭТЦ в астроцитах и нейронах сопряжены с различиями в их катаболизме и процессах окислительного фосфорилирования в матриксе митохондрий. Показано, что для астроцитов большое значение играет метаболизм жирных кислот, однако, основным

источником энергии для головного мозга является глюкоза. Также клетки головного мозга крайне чувствительны к дефициту кислорода, являющегося конечным акцептором электронов в ЭТЦ. В дальнейших главах настоящей работы были изучены механизмы регуляции транспорта электронов в ЭТЦ с разной пространственной организацией в зависимости от физиологической активации клеток, повышенного притока первичных доноров электронов и дефицита кислорода.

### **3.2. Влияние физиологических факторов на редокс-состояние ЭТЦ в митохондриях нейронов и астроцитов**

Перенос электронов по ЭТЦ напрямую связан с генерацией АФК в клетке и интенсивностью окислительного фосфорилирования, приводящего к синтезу АТФ. Активация клеток сопряжена с увеличением их потребности в АТФ и, соответственно, с интенсивной работой митохондрий. Наблюдаемые различия в редокс-состоянии комплексов ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в невозбуждённом состоянии позволяют предположить, что их ответ на физиологическую стимуляцию будет различаться. Причём факторы, влияющие на этот ответ, включают в себя изменения в притоках доноров электронов и локальной концентрации кислорода, расходуемого при интенсивном окислительном фосфорилировании.

Для оценки влияния активации клеток на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в мозге бодрствующих животных была проведена серия экспериментов по сравнению степени загруженности ЭТЦ электронами в покое, при беге и последующем отдыхе. Бег вызывает активацию нейронов в области соматосенсорной коры, что приводит к ответной активации астроцитов. Доступность кислорода при этом оценивалась по изменениям в степени оксигенации крови и диаметре кровеносных сосудов головного мозга.

Далее для исследования влияния увеличения притока первичных доноров электронов в ЭТЦ было проведено сравнение состояния астроцитов и нейронов в

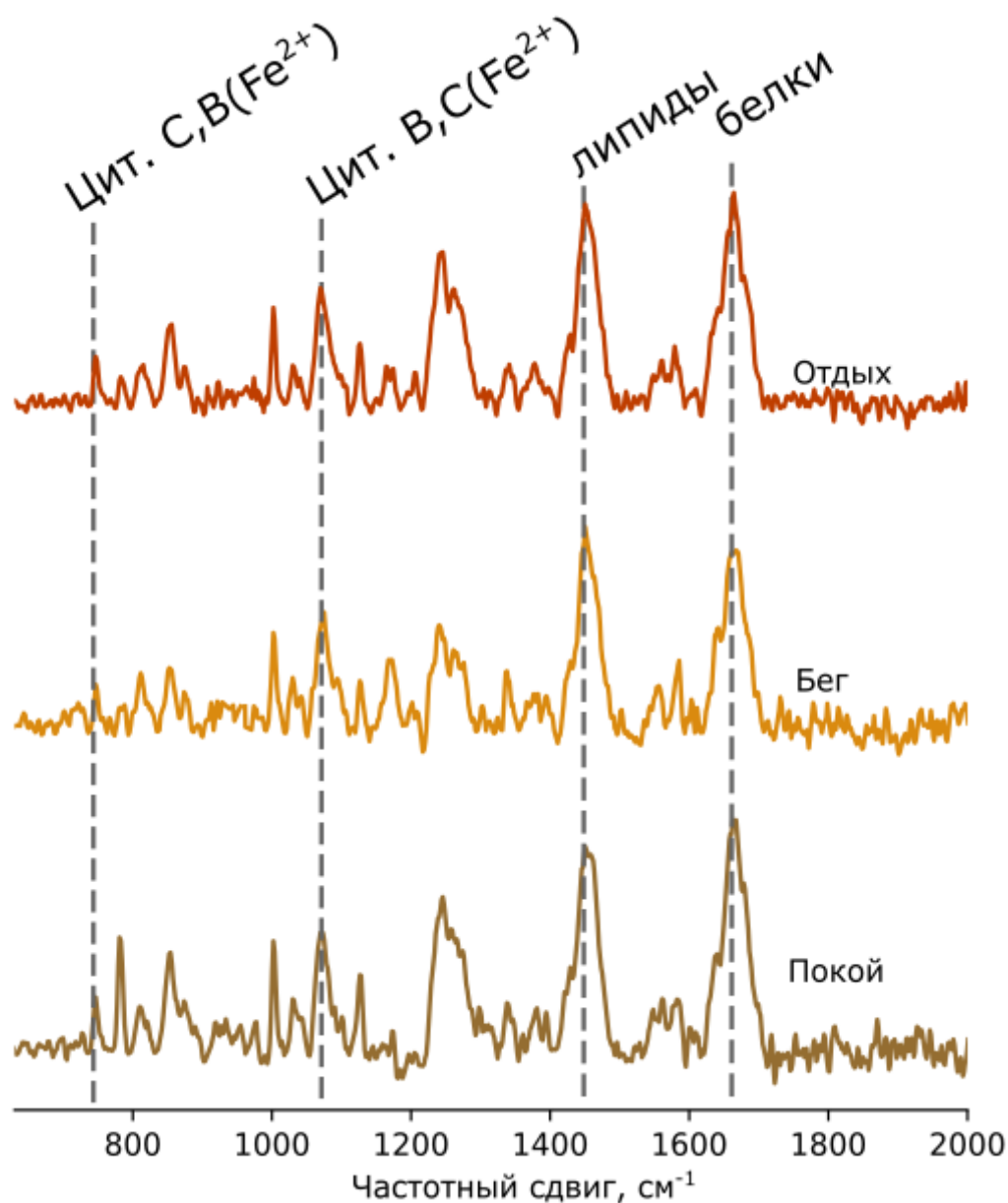
условиях гипергликемии и под влиянием повышенного притока жирных кислот. Глюкоза, концентрация которой повышается при гипергликемии, метаболизируется в астроцитах путём анаэробного гликолиза, а полученный в результате лактат передаётся нейронам для окислительного фосфорилирования, в то время как жирные кислоты преимущественно метаболизируются митохондриями астроцитов в ходе бета-окисления. Наконец, чувствительность ЭТЦ астроцитов и нейронов к условиям дефицита конечного акцептора электронов – кислорода – была проверена в ходе экспериментов по индукции острой локальной гипоксии.

### 3.2.1. Ответ ЭТЦ митохондрий нейронов на физиологические нагрузки

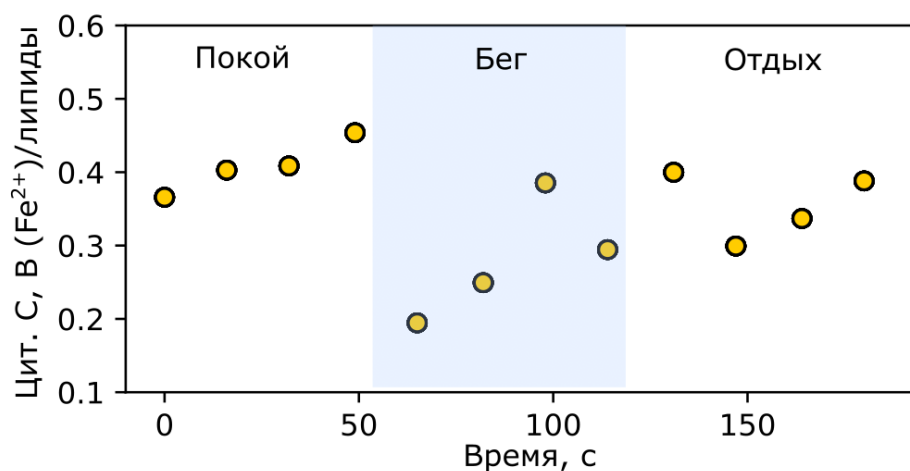
Для исследования изменений в активности электронного транспорта в нейронах головного мозга бодрствующих мышей в ответ на активацию клеток было проведено сравнение степени загруженности ЭТЦ электронами в покое и при физиологическом стимуле – вызванной локомоции. Регистрация сигнала производилась от нейронов в области соматосенсорной коры животных: известно, что вызванная локомоция приводит к активации нейронов в этом участке. Спектры от клеток регистрировались в состоянии покоя, при беге продолжительностью 1 минуту и последующем отдыхе.

В спектрах, зарегистрированных от нейронов, относительная интенсивность пиков, ассоциированных с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов, снижалась при вызванной локомоции и восстанавливалась при последующем отдыхе (рис. 11). Рассчитанное по соотношениям интенсивностей пиков относительное количество восстановленных цитохромов С- и В-типов относительно общего количества липидов в клетке ( $I_{750}/I_{1440}$ ) резко снижалось в начале эпизода локомоции и постепенно восстанавливалось до исходного уровня к его концу (рис. 12).



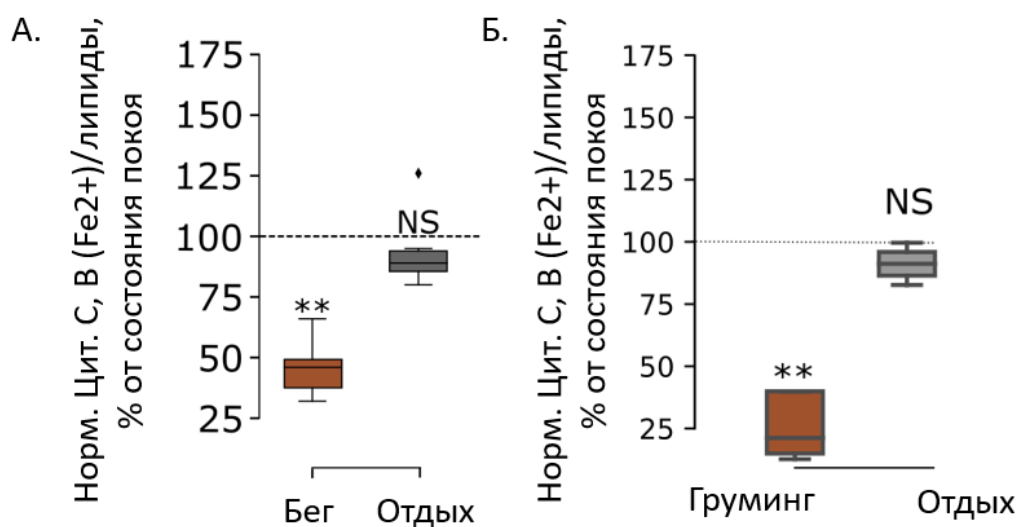


**Рисунок 11:** спектры, зарегистрированные от нейронов в области соматосенсорной коры головного мозга бодрствующих животных в покое (снизу), при вызванной локомоции (посередине) и последующем отдыхе (сверху) при длине волны возбуждающего излучения 532 нм. интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на интенсивность пика в положении 1440 см<sup>-1</sup>. Над пиками, ассоциированными с колебаниями связей в различных молекулах, указаны положения максимумов.



**Рисунок 12:** Зависимость относительного количества восстановленных цитохромов С- и В-типов относительно общего количества липидов в клетке ( $I_{750}/I_{1440}$ ) в митохондриях нейронов от времени при вызванной локомоции. Голубой фон соответствует эпизоду локомоции.

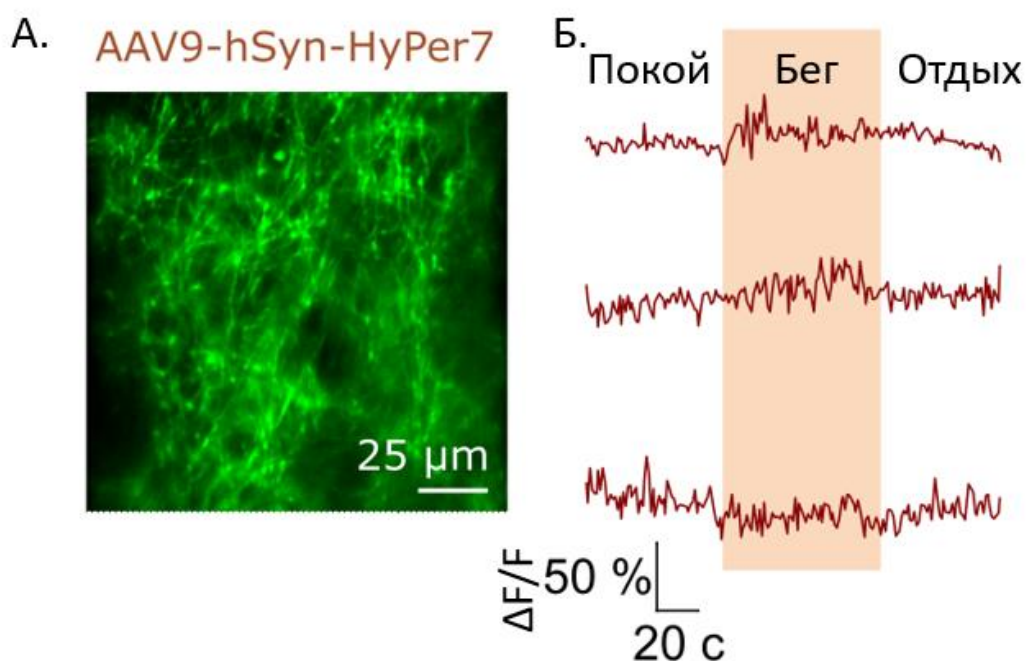
Для сравнения редокс-состояния ЭТЦ митохондрий в нейронах в покое, при физиологической нагрузке и последующем отдыхе, рассчитанные по спектрам соотношения амплитуд пиков  $I_{750}/I_{1440}$  для состояния покоя были приняты за 100%, после чего были рассчитаны изменения этих соотношений для бега и отдыха.



**Рисунок 13:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков в положениях 750 и 1440  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношениям восстановленных цитохромов С- и В-типов и липидов в нейронах в головном мозге бодрствующих

животных при вызванной локомоции (А) и груминге (Б). Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, \*\* -  $p < 0,01$ , NS – not significant (значимых различий нет).

Активация нейронов при локомоции приводит к усиленному синтезу и расходу АТФ, а снижение доли восстановленных цитохромов говорит о кратковременном ускорении электронного транспорта в ЭТЦ (рис. 13А). Это свидетельствует о быстром ответе митохондрий нейронов на возросшие энергетические потребности. Аналогичный ответ ЭТЦ наблюдался при груминге – спонтанном поведении, при котором животное начинало чистить мордочку передними лапами (рис. 13Б). Таким образом, ответ митохондрий в нейронах был одинаков вне зависимости от того, было движение спонтанным или вызванным.



**Рисунок 14:** Флуоресценция сенсора HyPer7, экспрессированного в митохондриях нейронов соматосенсорной коры мышей (А) и зависимость относительного изменения интенсивности флуоресценции  $\Delta F/F$  от времени при вызванной локомоции (Б). Красный фон соответствует эпизоду локомоции.

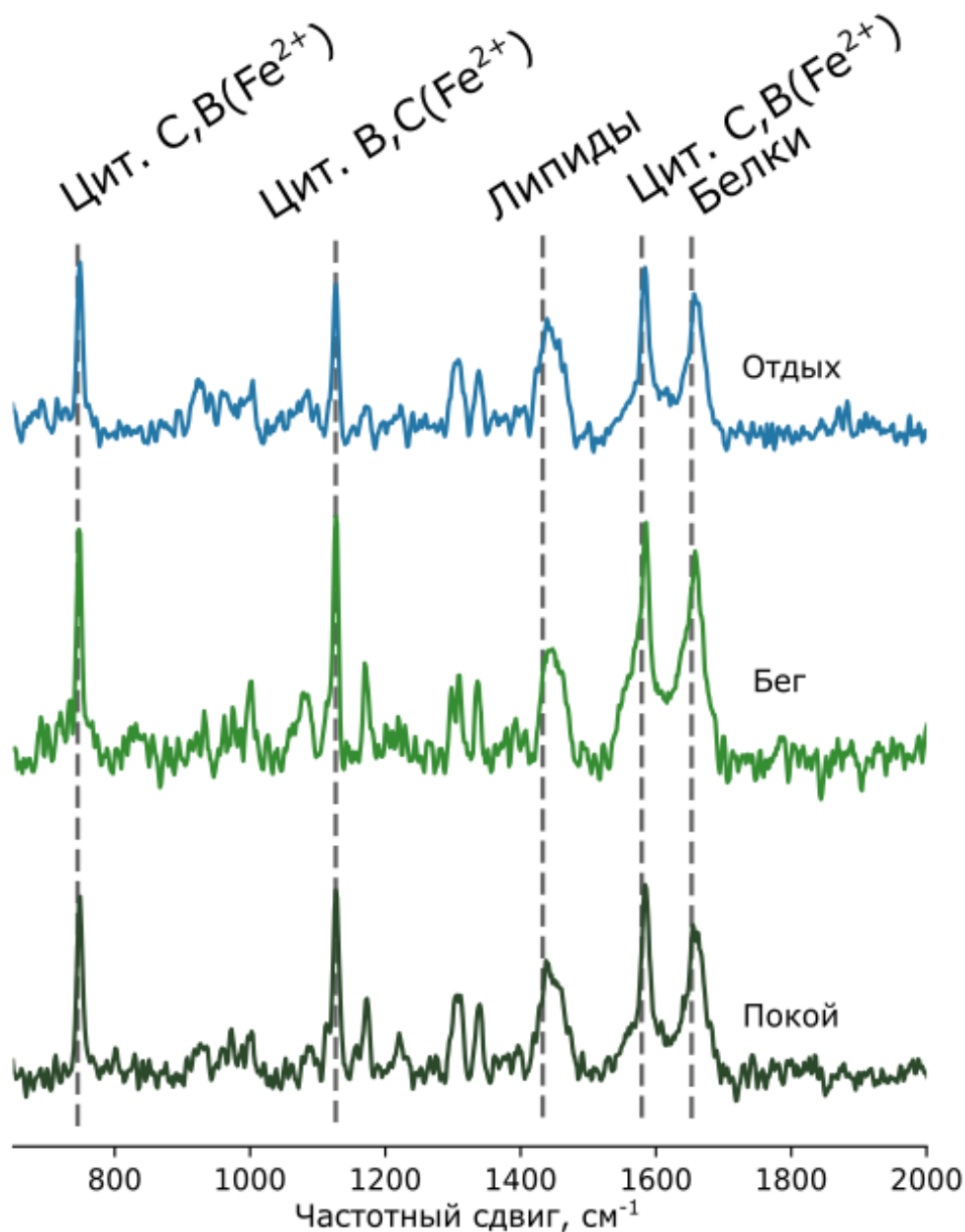
Активация ЭТЦ может приводить к усиленному синтезу активных форм кислорода, в частности,  $H_2O_2$ . Чтобы проверить, происходит ли это в нейронах при локомоции, была проанализирована флуоресценция сенсора HyPer7, экспрессированного в матриксе митохондрий нейронов (рис. 14А). При вызванной локомоции значимых изменений во флуоресценции сенсора не наблюдалось, что позволяет заключить, что активация ЭТЦ в митохондриях нейронов соматосенсорной коры не приводит к активации синтеза активных форм кислорода (рис. 14Б).

Организация комплексов ЭТЦ в респирасомы в митохондриях нейронов способствует быстрому и эффективному синтезу большого количества АТФ. При физиологической активации клеток происходит генерация потенциалов действия, и поддержание клеточной активности требует больших энергетических затрат. Наблюдаемое в начале эпизода физиологической активности ускорение транспорта электронов стимулируется спонтанным повышением концентрации АДФ, вызванным расходом АТФ, которое, по всей видимости, приводит к быстрой адаптации работы митохондрий под изменившиеся энергетические нужды. Наряду с этим, усиленная активность митохондрий не приводила к повышенной генерации перекиси водорода в матриксе, что говорит об эффективности экранирования сайтов генерации АФК в респирасоме. Таким образом, пространственная организация ЭТЦ в виде суперкомплексов не только способствует интенсивным процессам окислительного фосфорилирования в митохондриях, но и служит мерой эндогенной защиты от токсического воздействия АФК.

### 3.2.2. Ответ ЭТЦ митохондрий астроцитов на физиологические нагрузки

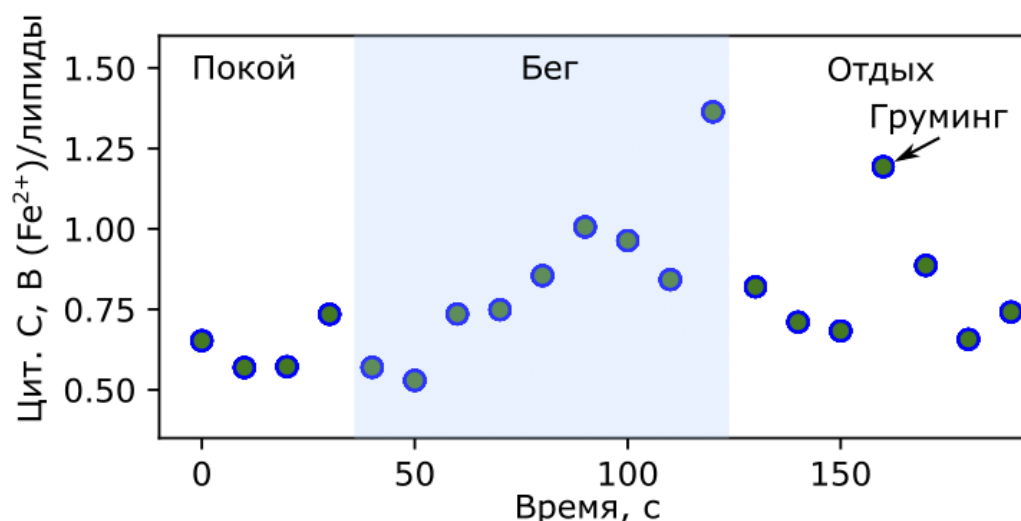
Аналогичным образом было исследовано влияние физиологической стимуляции на функционирование ЭТЦ с обособленными комплексами в митохондриях астроцитов. Активация астроцитов вследствие вызванной локомоции приводила к увеличению относительной интенсивности пиков,

ассоциированных с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов В- и С-типов (рис.15).



**Рисунок 15:** спектры, зарегистрированные от астроцитов в области соматосенсорной коры головного мозга бодрствующих животных в покое (снизу), при вызванной локомоции (посередине) и последующем отдыхе (сверху) при длине волны возбуждающего излучения 532 нм. интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на интенсивность пика в положении 1440  $\text{см}^{-1}$ . Над пиками, ассоциированными с колебаниями связей в различных молекулах, указаны положения максимумов.

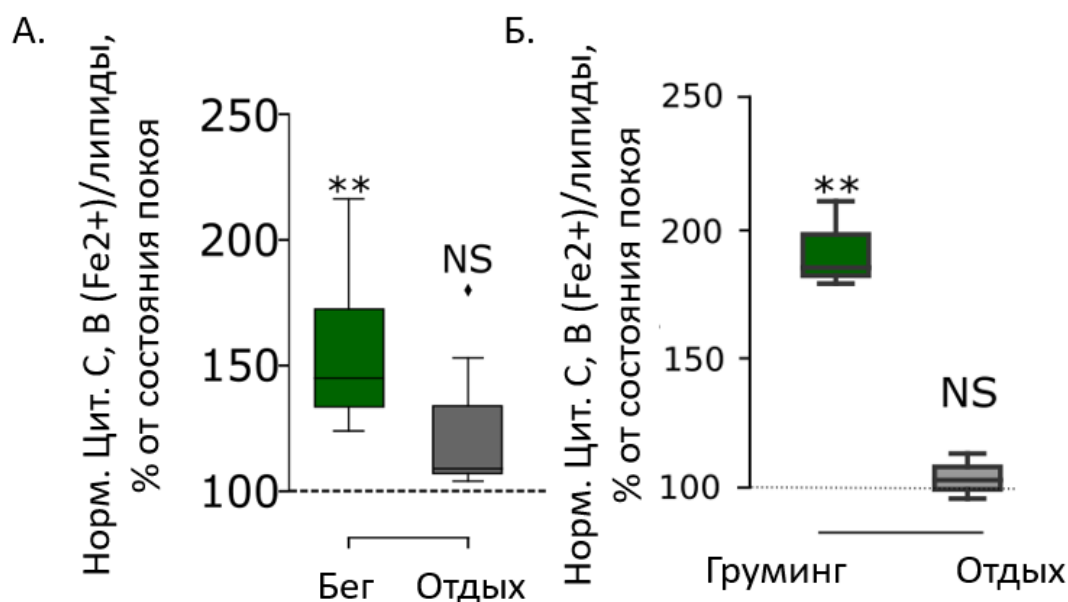
Относительное количество восстановленных цитохромов С- и В-типов с началом локомоции постепенно повышалось, а затем плавно снижалось, возвращаясь к исходному состоянию во время последующего отдыха (рис.16). Повышение этого параметра отражает увеличение степени загрузки ЭТЦ электронами и снижение скорости их транспорта: комплексы ЭТЦ в астроцитах обособлены друг от друга и транспорт электронов между ними ограничен скоростью диффузии подвижных переносчиков. Повышения доли восстановленных молекул в пуле подвижных переносчиков говорит о снижении скорости электронного транспорта.



**Рисунок 16:** Зависимость относительного количества восстановленных цитохромов С- и В-типов относительно общего количества липидов в клетке ( $I_{750}/I_{1440}$ ) в митохондриях астроцитов от времени при вызванной локомоции. Голубой фон соответствует эпизоду локомоции, чёрной стрелкой отмечена точка, соответствующая эпизоду спонтанного груминга.

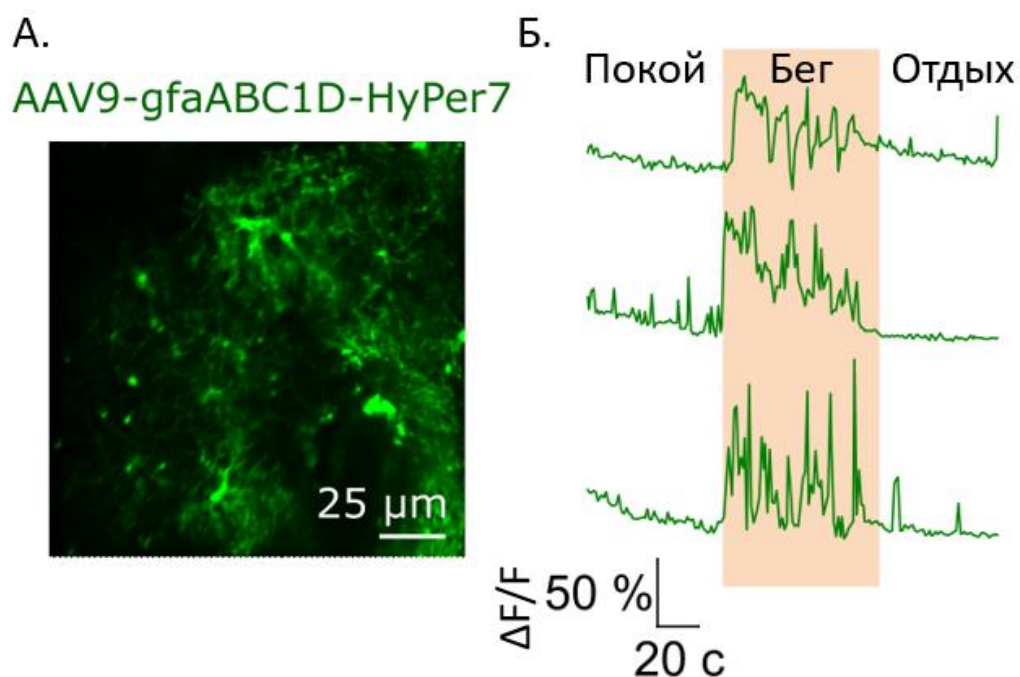
Значимое повышение относительного количества восстановленных цитохромов С- и В-типов наблюдалось как для вызванного бега, так и для спонтанного груминга, то есть ответ астроцитов, также как и нейронов, не зависел от типа движения (рис. 17).

Далее были проанализированы уровни синтеза  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий астроцитов. При вызванной локомоции наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции зонда HyPer7, свидетельствующее о значимом повышении уровней синтеза  $H_2O_2$  в астроцитах (рис. 18).



**Рисунок 17:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков в положениях  $750$  и  $1440\text{ см}^{-1}$ , соответствующих соотношениям восстановленных цитохромов С- и В-типов и липидов в астроцитах в головном мозге бодрствующих животных при вызванной локомоции (А) и груминге (Б). Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, \*\* -  $p < 0,01$ , NS – not significant (значимых различий нет).

Активация астроцитов приводит к интенсификации процессов бета-окисления жирных кислот и постепенному повышению притока электронов в ЭТЦ через комплекс I, отражающемся в плавном увеличении степени загруженности ЭТЦ электронами вследствие физиологической активации клеток. Наряду с этим мы наблюдали усиленную генерацию перекиси водорода в матриксе их митохондрий.



**Рисунок 18:** Флуоресценция сенсора HyPer7, экспрессированного в митохондриях астроцитов соматосенсорной коры мышей (А) и зависимость относительного изменения интенсивности флуоресценции  $\Delta F/F$  от времени при вызванной локомоции (Б). Красный фон соответствует эпизоду локомоции.

$H_2O_2$  – наиболее стабильная из активных форм кислорода, выполняющая сигнальную функцию во многих метаболических путях и взаимодействиях клеток. Известно также, что астроциты в норме продуцируют достаточно большие количества  $H_2O_2$ , что имеет физиологическое значение, а искусственное снижение уровней синтеза  $H_2O_2$  астроцитами в мозге мышей приводит к когнитивным нарушениям (Vicente-Gutierrez и др., 2019). Полученные результаты позволяют связать транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий и синтез  $H_2O_2$  в астроцитах: увеличение степени загрузки ЭТЦ электронами приводит к повышению вероятности спонтанного переноса электрона на кислород с образованием АФК. Также этому способствует структура ЭТЦ с обособленными комплексами, при которой обеспечивается доступность сайтов генерации АФК. Таким образом, полученные результаты подтверждают физиологическое значение различных форм организации комплексов ЭТЦ.

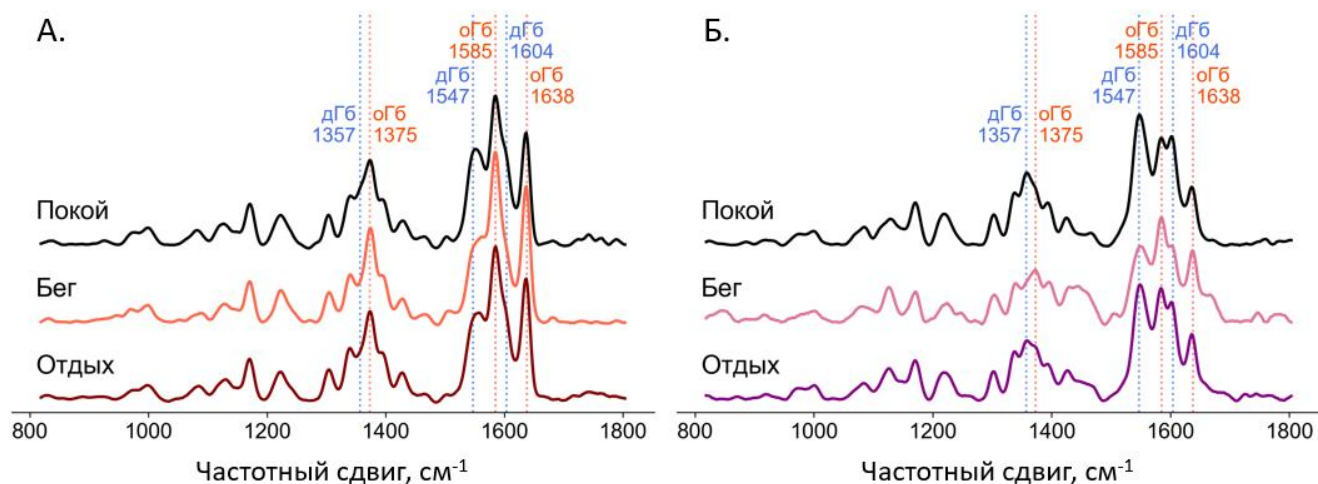


Также повышенная доля восстановленных цитохромов В-типа, входящих в состав комплекса III, способствует повышенной вероятности переноса электронов на сульфитоксидазу – фермент, который в астроцитах может участвовать в генерации NO, необходимого для регуляции вазодинамики. Поэтому далее было проанализировано кровоснабжение тканей головного мозга.

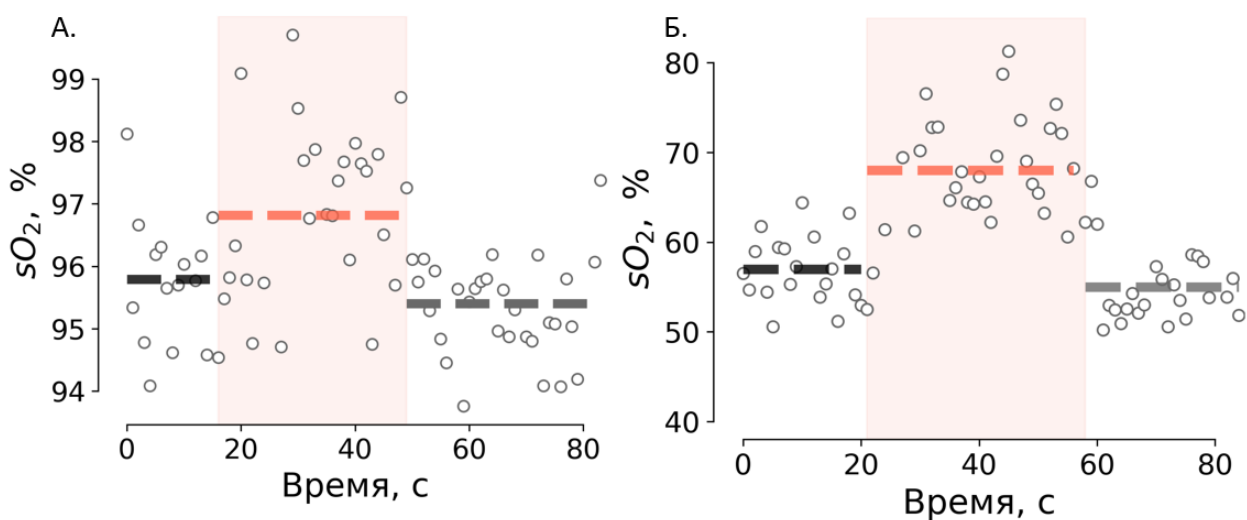
### 3.2.3. Влияние физиологических нагрузок на степень оксигенации крови и диаметр сосудов в головном мозге животных *in vivo*

Концевые ножки астроцитов участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера и регуляции диаметра просвета сосудов и мозгового кровообращения. Наблюдаемые выше изменения в степени загруженности ЭТЦ митохондрий клеток мозга могут быть связаны с изменениями в доступности кислорода или питательных веществ в тканях, поэтому было проанализировано влияние физиологической стимуляции на степень оксигенации крови и диаметр просвета сосудов головного мозга. Для анализа сосуды были разделены по степени оксигенации крови на артериолы ( $sO_2 > 95\%$ ) и венулы ( $sO_2 < 85\%$ ), оценка степени оксигенации производилась при помощи расчёта соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах окси- и дезоксигемоглобина.

Спектры, зарегистрированные от артериол и венул в покое, при вызванной локомоции и последующем отдыхе, представлены на рис 19: из них видно, что относительная интенсивность пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах оксигемоглобина, повышается при вызванной локомоции в спектрах, зарегистрированных от сосудов обоих типов.

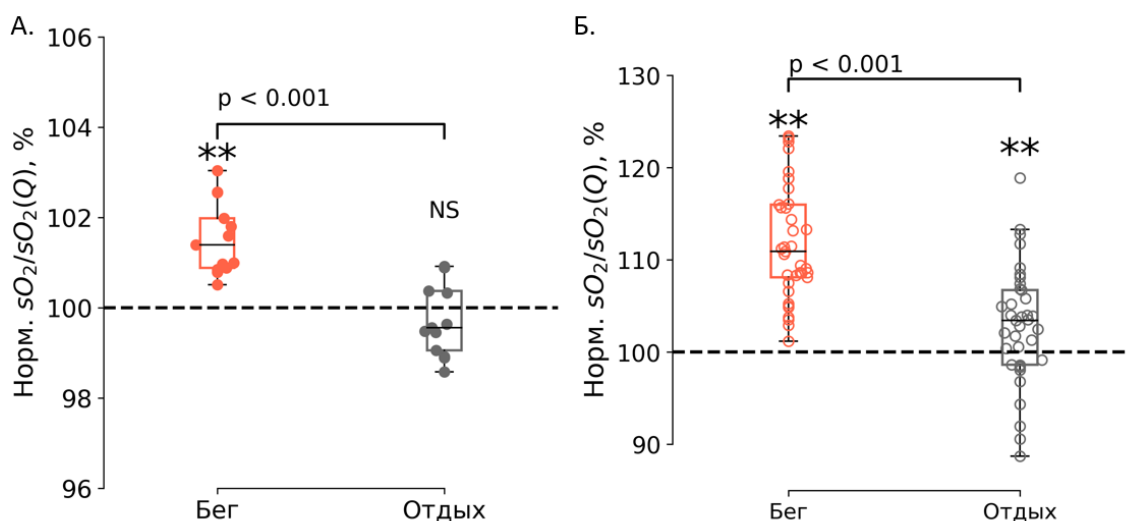


**Рисунок 19:** спектры, зарегистрированные от артериол (А) и венул (Б) в области соматосенсорной коры головного мозга бодрствующих животных в покое (сверху), при вызванной локомоции (посередине) и последующем отдыхе (снизу) при длине волны возбуждающего излучения 532 нм. интенсивность сигнала в каждой точке нормирована на суммарную интенсивность сигнала в области 1500-1650  $\text{см}^{-1}$ . Над пиками, ассоциированными с колебаниями связей в молекулах окси- и дезоксигемоглобина, указаны положения максимумов.



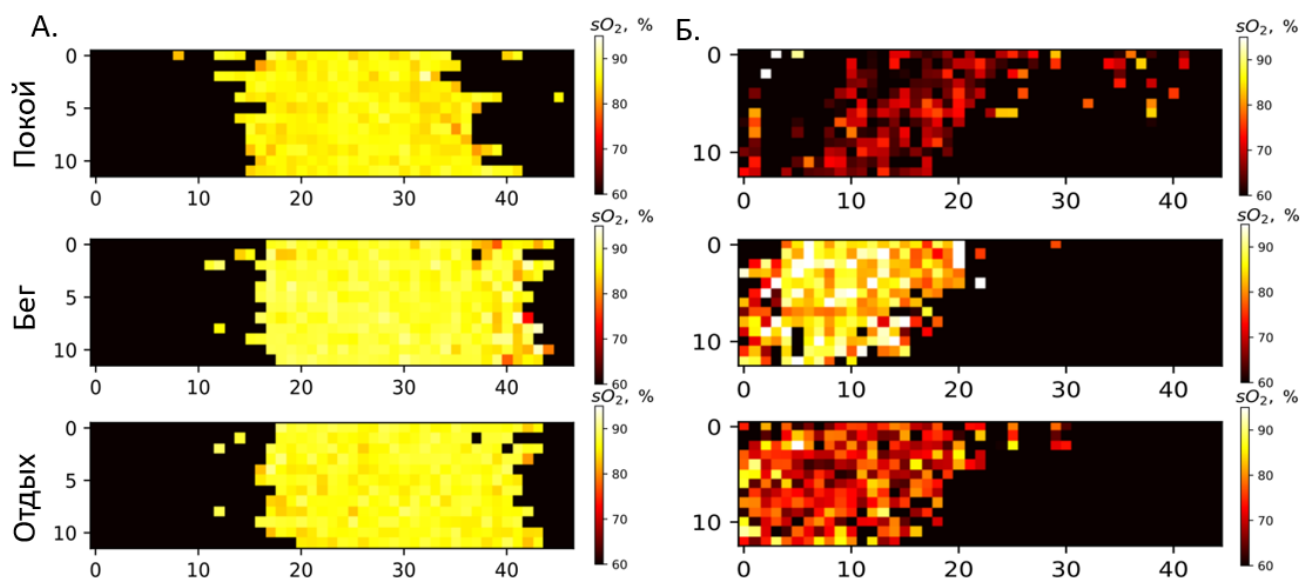
**Рисунок 20:** Зависимость степени оксигенации крови в артериолах (А) и венулах (Б) головного мозга в области соматосенсорной коры у мышей от времени при вызванной локомоции. Красный фон соответствует эпизоду локомоции.

Степень оксигенации крови при локомоции резко возрастала и снижалась до исходного значения во время последующего отдыха как в артериолах, так и в венах (рис. 20). В артериолах степень выраженности этих изменений была меньше, так как кровь в них изначально сильно насыщена кислородом, но в венах величина изменений составляла до 30% (рис.21).

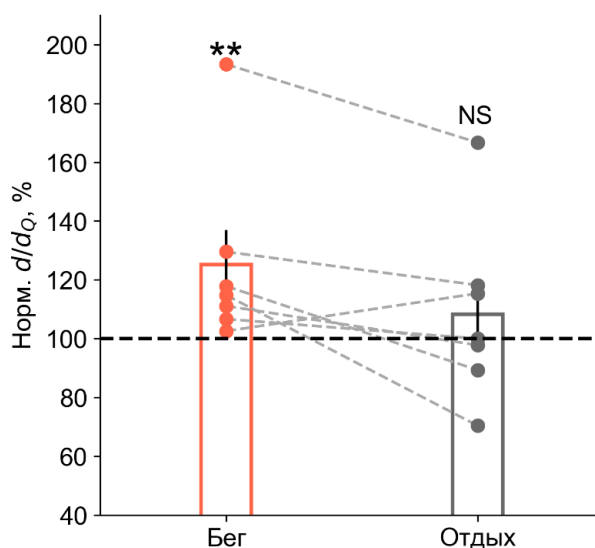


**Рисунок 21:** Диаграммы размаха для степени оксигенации крови в артериолах (А) и венах (Б) в головном мозге бодрствующих животных при вызванной локомоции. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, \*\* -  $p < 0,001$ , NS – not significant (значимых различий нет).

Наряду с этим диаметр просвета артериол увеличивался при локомоции и снижался при последующем отдыхе (рис. 22А, 23). Одновременное повышение степени оксигенации крови и диаметра просвета артериол говорит об усилении кровоснабжения мозга и достаточном притоке кислорода и питательных веществ в ответ на возрастающие вследствие локальной активации клеток энергетические потребности (рис. 22). Таким образом, наблюдаемые изменения, затрагивающие состояние ЭТЦ астроцитов и нейронов при локомоции, не обусловлены недостатком оксигенации тканей или притоком питательных веществ.



**Рисунок 22:** Карты артериолы (А) и венулы (Б) в области соматосенсорной коры головного мозга, построенные по степени оксигенации крови, рассчитанной по КР-спектрам.



**Рисунок 23:** Относительные изменения диаметра просвета артериол при беге и последующем отдыхе относительно исходного диаметра в состоянии покоя. Каждый столбец соответствует среднему значению со стандартной ошибкой, \*\* -  $p < 0,01$ , NS – not significant (нет различий) по критерию Манна-Уитни.

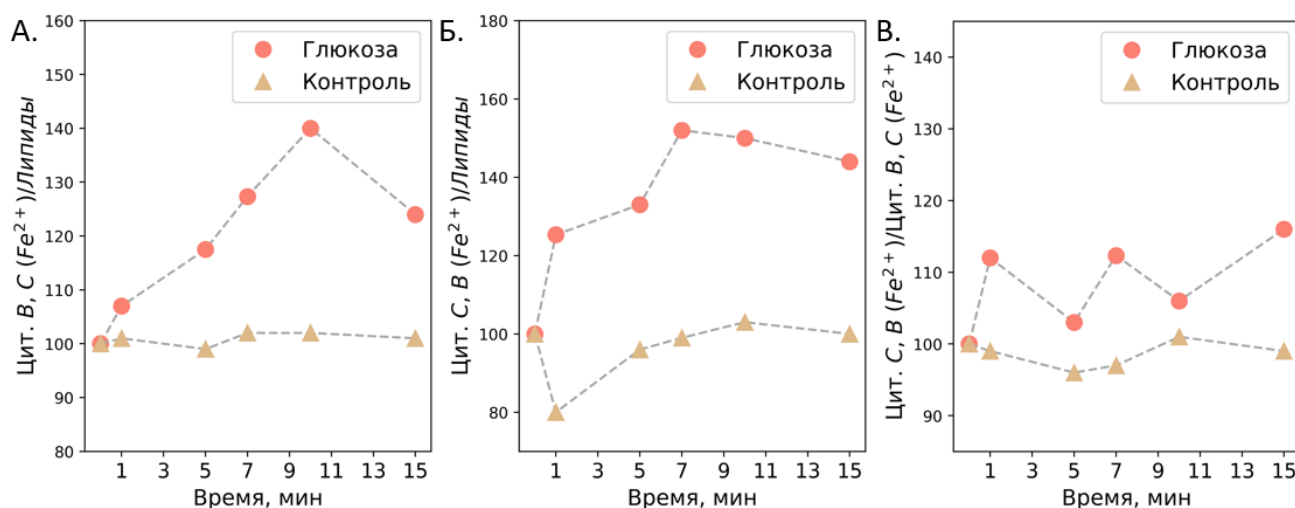
Увеличение притока кислорода к тканям при физической активности (беге) носит системный характер. Однако, в регуляции диаметра просвета сосудов важную роль играет оксид азота NO. Полученные нами результаты позволяют

связать повышение степени загруженности ЭТЦ астроцитов при их физиологической активации с расширением артериол в головном мозге, способствующим повышенному притоку метаболитов. Возможной причиной такого ответа является NO-опосредованная сигнализация, осуществляемая митохондриями астроцитов в условиях повышения потребностей тканей в кислороде. Наши данные подкрепляют предположение о том, что митохондрии астроцитов, в первую очередь, выполняют не биоэнергетические, а сенсорные и регуляторные функции за счёт повышенной загруженности ЭТЦ электронами.

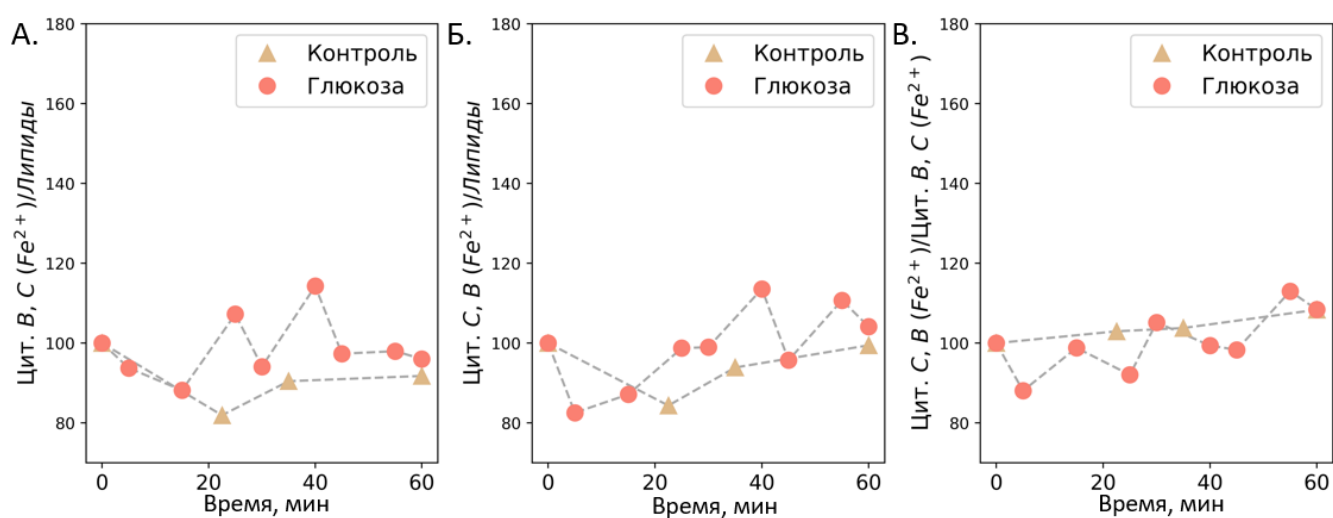
#### 3.2.4. Эффект повышенного притока глюкозы на редокс-состояние ЭТЦ в митохондриях астроцитов и нейронов в условиях *in vivo*

Основным источником энергии для клеток головного мозга является глюкоза. Для создания условий повышенного притока субстратов окислительного фосфорилирования для митохондрий клеток головного мозга 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.

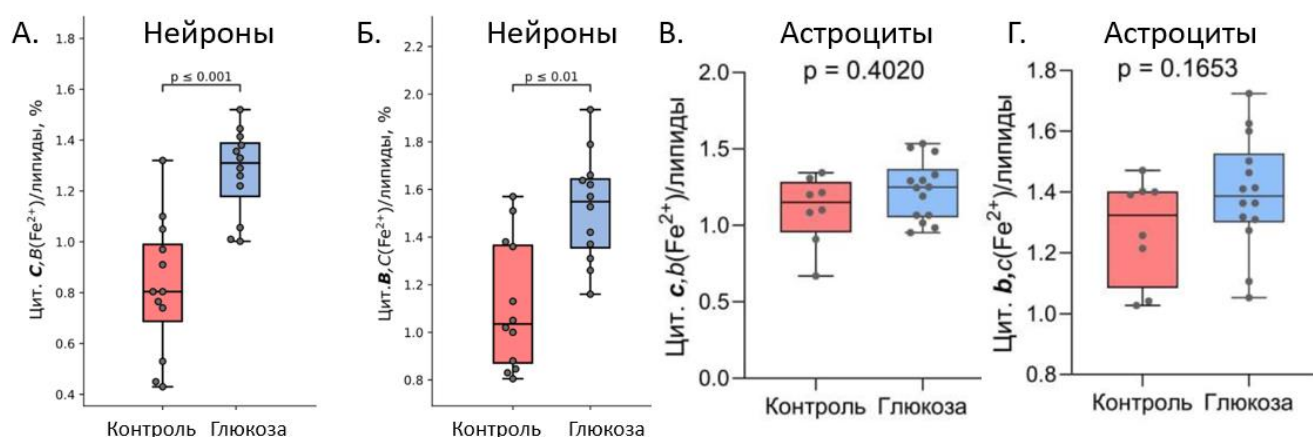
В нейронах головного мозга бодрствующих животных рост уровня глюкозы в крови вызывал повышение степени загруженности ЭТЦ электронами, выражавшееся в увеличении относительного количества восстановленных цитохромов В- и С-типов относительно общего количества липидов в клетке (рис. 24, рис. 26А, Б). Повышение наблюдалось уже через 5 минут после инъекции. В астроцитах же, напротив, повышенное содержание глюкозы в крови не вызывало значимых изменений в степени загруженности ЭТЦ электронами (рис. 25, рис. 26В, Г).



**Рисунок 24:** Зависимость относительного количества восстановленных цитохромов С-типа ( $I_{750}/I_{1440}$ , А), относительного количества восстановленных цитохромов В-типа ( $I_{1126}/I_{1440}$ , А) и соотношения восстановленных цитохромов С- и В-типов ( $I_{750}/I_{1126}$ , В) для нейронов головного мозга бодрствующей мыши после инъекции NaCl (контроль, жёлтые треугольники) и глюкозы (оранжевые кружки). Адаптировано из (Kotova и др., 2023).



**Рисунок 25:** Зависимость относительного количества восстановленных цитохромов С-типа ( $I_{750}/I_{1440}$ , А), относительного количества восстановленных цитохромов В-типа ( $I_{1126}/I_{1440}$ , А) и соотношения восстановленных цитохромов С- и В-типов ( $I_{750}/I_{1126}$ , В) от времени для астроцитов головного мозга бодрствующей мыши после инъекции NaCl (контроль, жёлтые треугольники) и глюкозы (оранжевые кружки).



**Рисунок 26:** 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<sup>-1</sup> (цит. C, B (Fe<sup>2+</sup>)/липиды, диаграммы A, B) и 1126 и 1440 см<sup>-1</sup> (цит. B, C (Fe<sup>2+</sup>)/липиды, диаграммы Б, Г) в спектрах, зарегистрированных от нейронов (A, Б) и астроцитов (B, Г) в головном мозге бодрствующих животных при нормальных условиях и гипергликемии. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни.

Отсутствие значимого увеличения степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов при повышенном притоке глюкозы свидетельствует о том, что глюкоза не приводит к активации окислительного фосфорилирования в них. Известно, что астроциты удовлетворяют свои потребности в АТФ в основном за счёт анаэробного гликолиза, конечным продуктом которого является лактат. Их митохондрии в меньшей степени вовлечены в энергетический метаболизм, а синтезируемый лактат передаётся через лактатный шаттл нейронам, которые используют его в качестве субстрата для окислительного фосфорилирования.

Полученные результаты позволяют предположить, что повышенный уровень глюкозы в крови приводит к активации ферментов гликолиза в астроцитах, и, вероятно, повышенным уровням синтеза лактата, передаваемого нейронам в качестве субстрата для окислительного фосфорилирования. 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, несмотря на то, что порядка 70% глюкозы, поступающей в головной мозг, поглощается их концевыми ножками, формирующими гематоэнцефалический барьер.

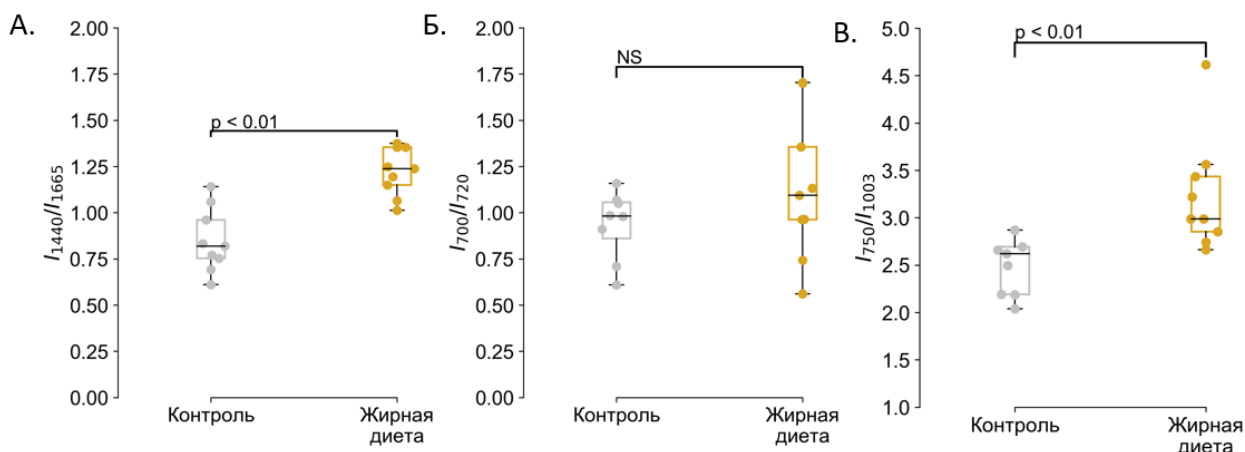
### 3.2.5. Эффект повышенного притока жирных кислот на состояние астроцитов и нейронов в срезах мозга животных

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 липидные капли, активируя их расщепление в случае дефицита питательных веществ. Однако, накопление и метаболизм жирных кислот – процесс более медленный, чем метаболизм глюкозы. Таким образом, для исследования влияния повышенного притока жирных кислот на степень загруженности ЭТЦ в астроцитах и нейронах головного мозга животных, были использованы срезы мозга мышей, содержащихся на диете, обогащённой жирами, в течение месяца. В таких условиях наблюдалось увеличение массы тела животных и накопление липидов, не приводящее, тем не менее, к ожирению и развитию патологических процессов.

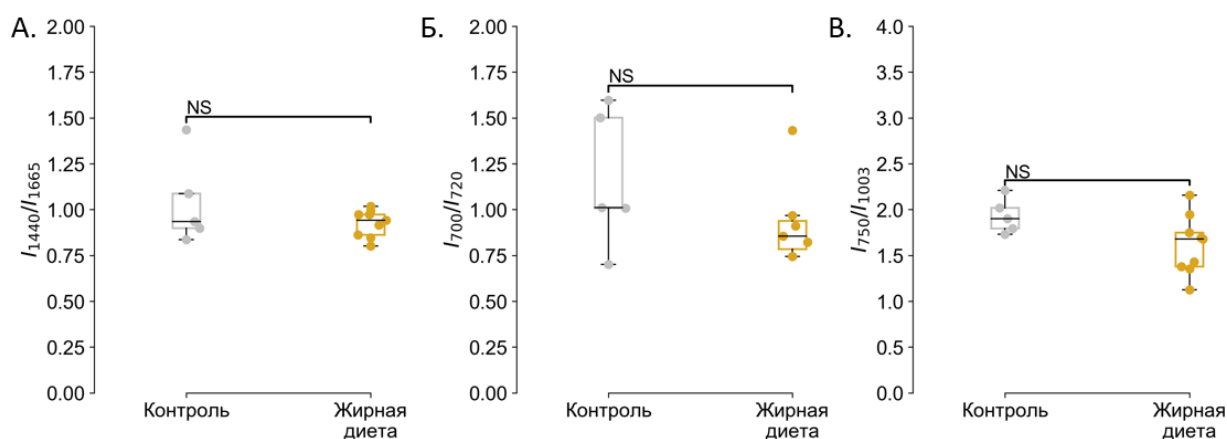
Повышенное содержание жиров в пище приводило к увеличению относительного количества липидов в астроцитах, но не в нейронах (рис. 27А и 28А). Это связано со способностью астроцитов аккумулировать липидные капли, нехарактерные для нейронов. Накопление липидных капель и липопротеинов в нейронах является признаком развития патологических процессов и может приводить к нейродегенерации, но при кратковременном содержании на жирной диете этого не происходило. Также соотношение холестерина и фосфатидилхолина



не менялось ни в астроцитах, ни в нейронах у животных, получавших обогащённый жирами корм.



**Рисунок 27:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков в положениях  $1440$  и  $1665\text{ см}^{-1}$ , соответствующих соотношениям липидов и белков (А),  $700$  и  $720\text{ см}^{-1}$ , соответствующих соотношению холестерина и фосфатидилхолина (Б) и  $750$  и  $1003\text{ см}^{-1}$ , соответствующих соотношению восстановленных цитохромов С-типа и фенилаланина, в астроцитах головного мозга мышей контрольной группы и мышей, содержащихся на диете, обогащённой жирами. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, NS – not significant (значимых различий нет). Адаптировано из (Роров и др., 2022).



**Рисунок 28:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков в положениях  $1440$  и  $1665\text{ см}^{-1}$ , соответствующих соотношениям липидов и белков (А),  $700$  и  $720\text{ см}^{-1}$ , соответствующих соотношению холестерина и

фосфатидилхолина (Б) и 750 и 1003  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношению восстановленных цитохромов С-типа и фенилаланина, в нейронах головного мозга мышей контрольной группы и мышей, содержащихся на диете, обогащённой жирами. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, NS – not significant (значимых различий нет). Адаптировано из (Porov и др., 2022).

В редокс-состоянии митохондрий астроцитов наблюдались изменения, выражавшиеся в значимом увеличении относительного количества восстановленных цитохромов С- и В-типов (рис. 27Б, В). Это увеличение было преимущественно обусловлено вкладом сигнала от восстановленного цитохрома С-типа, в то время как в селективном сигнале от восстановленного цитохрома В-типа изменений не наблюдалось. Для нейронов обогащённая жирами диета не оказывала значительного влияния на редокс-состояние комплексов ЭТЦ митохондрий (рис. 28Б, В).

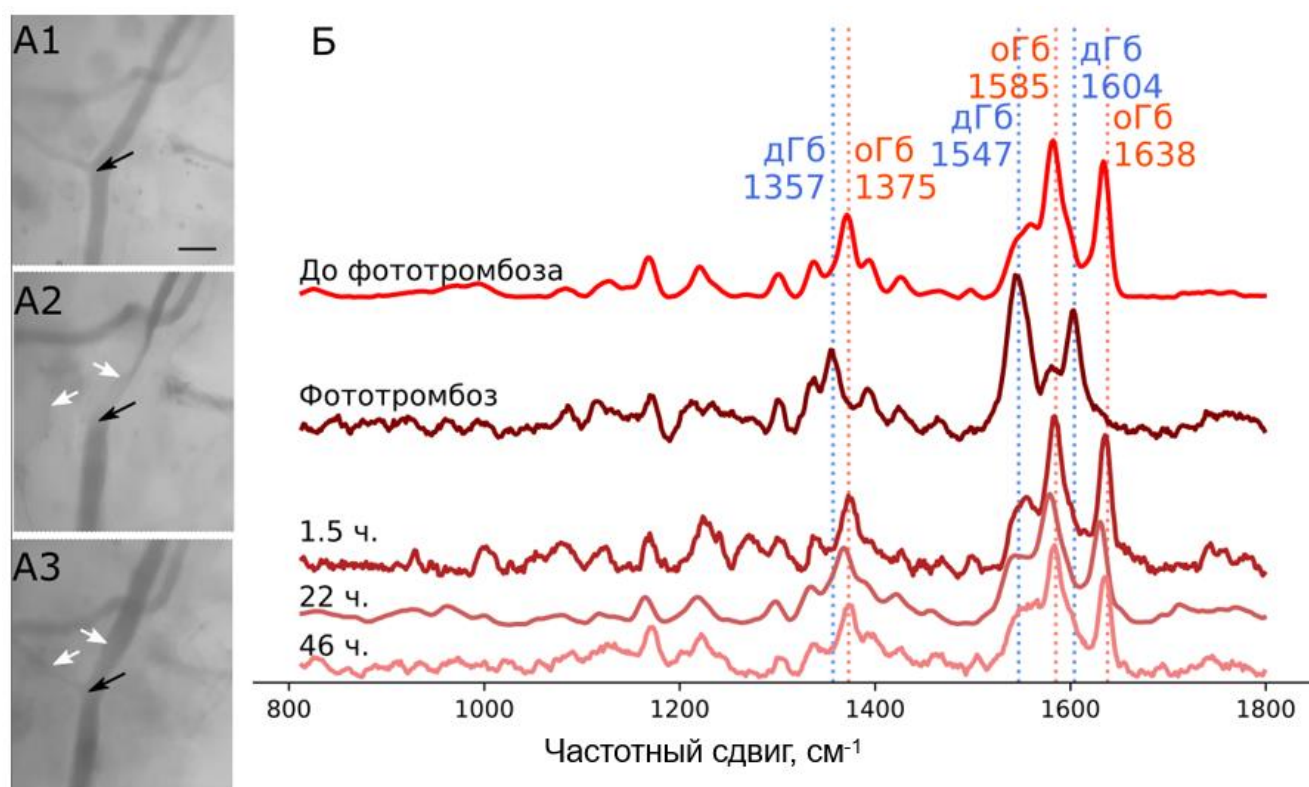
Увеличение относительного количества восстановленных цитохромов в ЭТЦ митохондрий астроцитов отражает увеличение степени загруженности ЭТЦ электронами. В условиях обогащённой жирами диеты оно отражает активацию бета-окисления жирных кислот в астроцитах и повышение уровней субстратов окислительного фосфорилирования, приводящее к активной работе ЭТЦ митохондрий. При этом жирные кислоты не оказывали метаболической нагрузки на ЭТЦ митохондрий в нейронах, так как основным субстратом для окислительного фосфорилирования в них является пируват, часть которого конвертируется из лактата, получаемого от астроцитов, а часть является результатом гликолиза. Метаболизм жирных кислот в нейронах преимущественно заключается в их использовании для биосинтеза липидов, необходимых для репарации мембран, повреждающихся под действием окислительного стресса. Липиды, не участвующие в построении мембран, передаются астроцитам в виде АроЕ-содержащих липопротеинов для деградации. В ряде работ продемонстрирована нейротоксичность жирных кислот, ассоциируемая со старением и развитием различных заболеваний (Schönfeld, Reiser, 2017).

Мы впервые в условиях *in vivo* показали, что астроциты и нейроны используют различные субстраты в качестве преимущественного источника электронов в ЭТЦ. Для нейронов первостепенную роль играет приток электронов в результате метаболизма продуктов окисления глюкозы, в то время как астроциты преимущественно используют жирные кислоты.

### 3.2.6. Ответ нейронов и астроцитов на острую локальную гипоксию

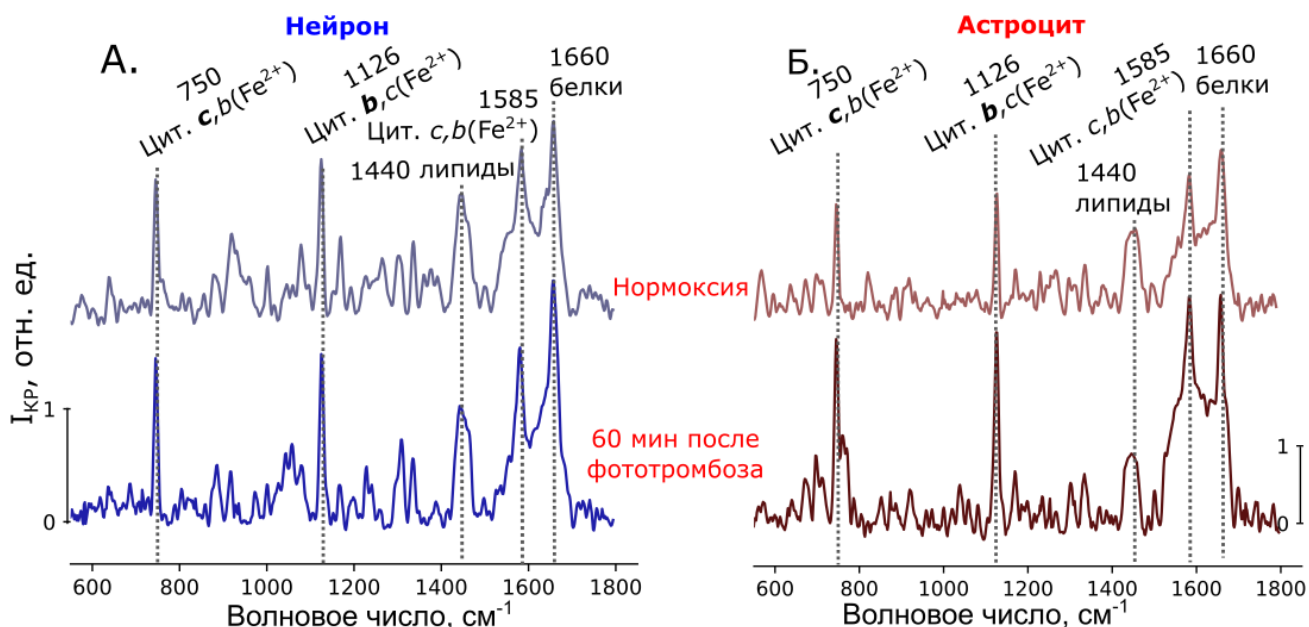
Для моделирования условий, в которых возникает дефицит кислорода – конечного акцептора электронов в ЭТЦ – была проведена серия экспериментов по индукции острой локальной гипоксии посредством фототромбоза. После фотоактивации красителя ток крови в сосуде нарушался, и сигнал регистрировался от клеток, расположенных в прилежащих к нему областях, в течение часа после нарушения проводимости. В спектрах, зарегистрированных от места локального нарушения кровотока, наблюдалось увеличение интенсивности сигнала от дезоксигемоглобина, что подтверждает развитие локальной гипоксии (рис. 29). Повторные измерения проводили через 20 часов – за это время локальный кровоток восстанавливался. Фототромбоз служит примером локального развития ишемического инсульта и последующей реперфузии тканей.

При сравнении спектров, зарегистрированных от астроцитов и нейронов до индукции фототромбоза и через час после неё, 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. 30). Относительная интенсивность сигнала от восстановленных цитохромов ЭТЦ митохондрий связана с уровнем её загрузки электронами, и её повышение характерно для отсутствия конечного акцептора в условиях гипоксии. Тем не менее, ЭТЦ в астроцитах и нейронах по-разному реагировала на гипоксические условия.

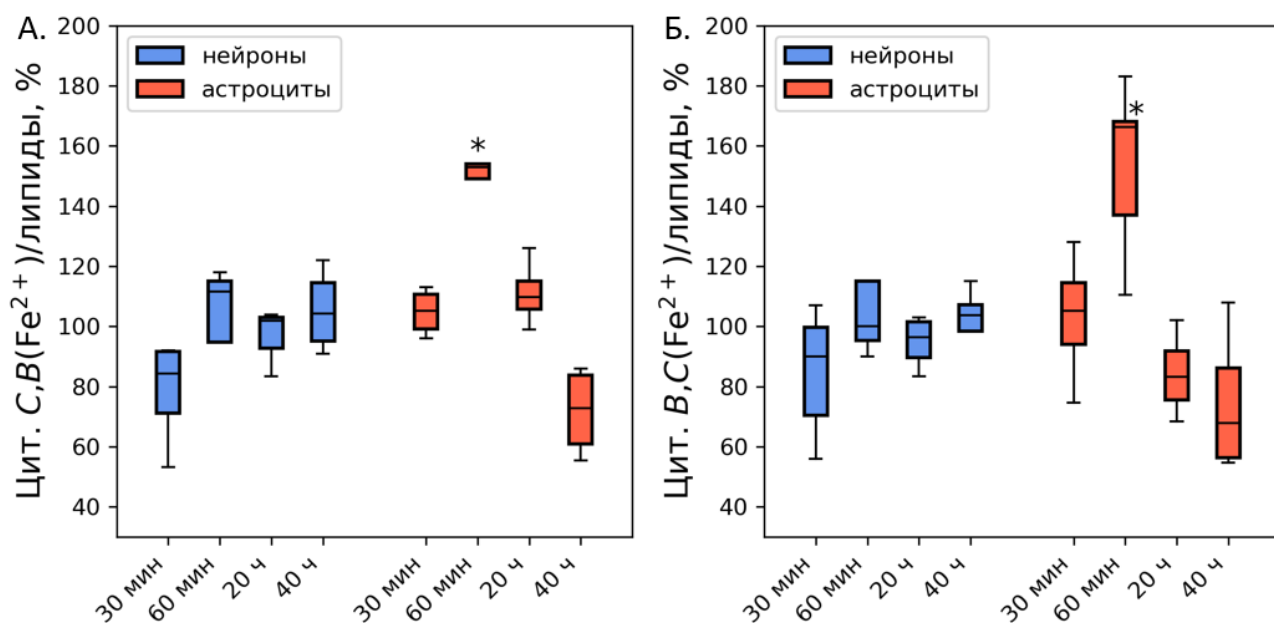


**Рисунок 29:** Оптические изображения кровеносного сосуда в головном мозге бодрствующей мыши до фототромбоза (A1), сразу после фототромбоза (A2) и через 46 ч после фототромбоза (A3) и спектры, зарегистрированные от сосуда в области фототромбоза (Б). Голубым и красным пунктиром отмечены положения максимумов пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах дезоксигемоглобина (дГб) и оксигемоглобина (оГб) соответственно). Адаптировано из (Kotova и др., 2025).

Относительное количество восстановленных цитохромов В- и С-типов существенно возрастало в астроцитах через час после индукции фототромбоза, в то время как в нейронах изменений в этом параметре не наблюдалось (рис. 31). Повышенная степень загруженности ЭТЦ электронами может приводить к усиленному синтезу АФК, однако, значимое усиление продукции  $H_2O_2$  наблюдалось только через 12 часов реперфузии в астроцитах и 20 – в нейронах (рис. 32). Значимого повышения степени загруженности ЭТЦ электронами в эти временные отрезки выявлено не было.

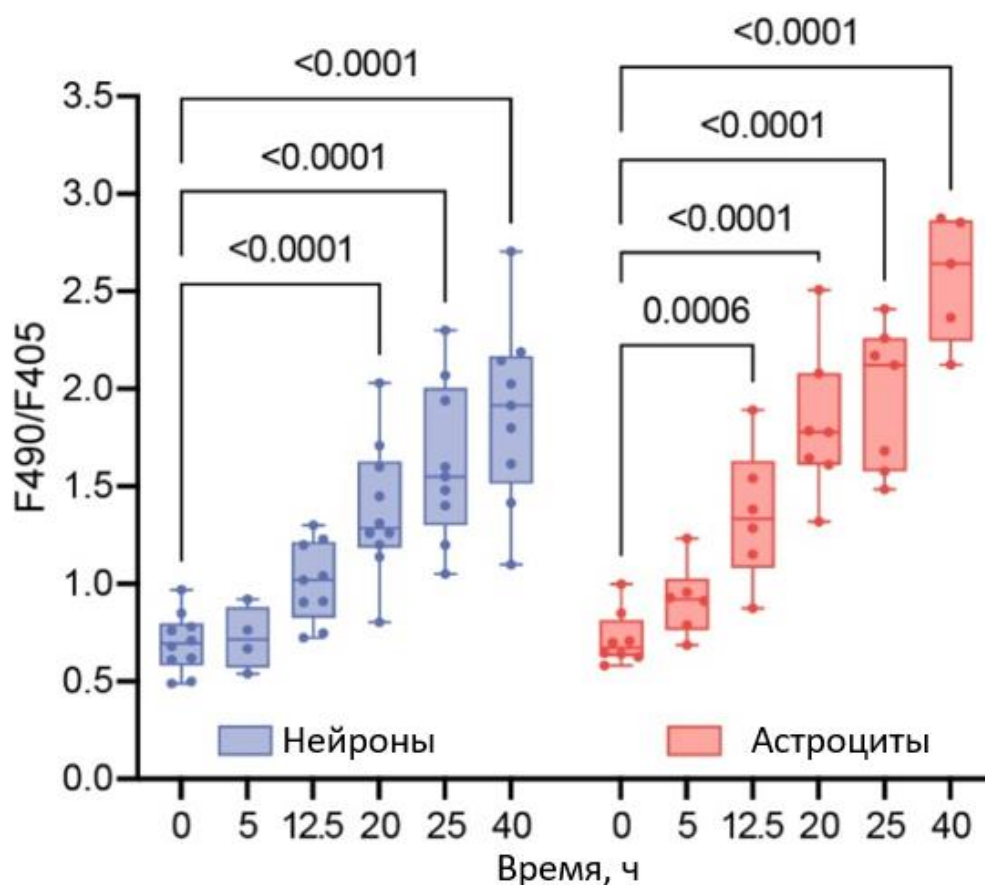


**Рисунок 30:** Спектры, зарегистрированные от нейронов (А) и астроцитов (Б) в головном мозге бодрствующей мыши в условиях нормоксии и через час после фототромбоза, при длине волны возбуждающего излучения 532 нм. Серым пунктиром обозначены пики, ассоциированные с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов, липидов и белков, положения их максимумов указаны в подписях над пиками. Адаптировано из (Kotova и др., 2025).



**Рисунок 31:** В условиях локального дефицита кислорода *in vivo* увеличивается загруженность ЭТЦ электронами в митохондриях астроцитов, но не

нейронов. Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков с положениями максимумов 750 и 1440 см<sup>-1</sup> (цит. С, В (Fe<sup>2+</sup>)/липиды, А) и 1126 и 1440 см<sup>-1</sup> (цит. В, С (Fe<sup>2+</sup>)/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). Адаптировано из (Kotova и др., 2025).



**Рисунок 32:** Диаграммы размаха для изменений во флуоресцентном сигнале сенсора Нурег7 в нейронах (синий) и астроцитах (красный) после острой гипоксии и последующей реперфузии. Скобками отмечены значимые различия (модель смешанных эффектов). Адаптировано из (Kotova и др., 2025).

Известно, что важной сигнальной молекулой для регуляции вазодинамики является NO, который может синтезироваться в митохондриях ферментом сульфитоксидазой (SOX). Этот фермент может получать электроны, необходимы для осуществления реакции восстановления, напрямую от комплекса III ЭТЦ

митохондрий. Таким образом, при развитии острой локальной гипоксии повышающаяся степень загруженности ЭТЦ электронами может приводить к повышенному синтезу NO и компенсаторной регуляции вазодинамики. Повышение продукции  $H_2O_2$  при этом наблюдается значительно позднее после восстановления кровообращения.

### **3.3. Влияние возрастных изменений и патологий на редокс-состояние ЭТЦ в клетках головного мозга**

Постоянная интенсивная работа митохондрий и генерация АФК приводит к развитию признаков окислительного стресса и повреждению многих клеточных компартментов. Окислительный стресс напрямую связан с процессами старения, а также развития многих патологических процессов: он может выступать как причиной некоторых патологий, так и одним из симптомов развивающихся нарушений, имеющих иную природу. Несмотря на развитые антиоксидантные системы в астроцитах и нейронах, эти клетки также подвержены токсическому действию АФК и его последствиям.

В современных исследованиях прослеживается связь между генерацией АФК и злокачественным перерождением клеток. При развитии опухоли в ткани клетки претерпевают метаболический переход, затрагивающий все метаболические пути, включая окислительное фосфорилирование. Раковые клетки характеризуются специфическими особенностями клеточного дыхания и адаптациями к гипоксическим условиям, развивающимся в опухоли: эти изменения затрагивают ЭТЦ и перенос электронов в ней. Клетки в микроокружении опухоли испытывают дополнительный механический и биохимический стресс, под действием которого их метаболизм также может существенно изменяться, способствуя прогрессу заболевания.

Другим примером патологии нервной системы, затрагивающей митохондрии, служит болезнь Альцгеймера (БА), приводящая к системным последствиям для всего организма. Известно, что при БА значительно снижаются уровни

потребления глюкозы клетками головного мозга, вследствие чего нарушается их функционирование и процессы деградации многих токсичных метаболитов. Накопление липопротеинов и неправильно свёрнутых белков в нейронах головного мозга оказывает значительное воздействие на процессы катаболизма, а также ведёт к нарушению баланса между астроцитами и нейронами.

Выявленные особенности транспорта электронов в ЭТЦ астроцитов и нейронов в нормальных условиях и при различных метаболических нагрузках подчёркивают разницу в функции митохондрий в этих клетках. Для нейронов важную роль играет энергетическая функция митохондрий, в то время как астроциты, вероятно, используют комплексы ЭТЦ как сенсоры микроокружения, чувствительные к изменениям в концентрациях метаболитов и кислорода, а также как источники сигнальных молекул. Некоторые повреждения затрагивают астроциты раньше, чем нейроны, ввиду их чувствительности к изменениям гомеостаза головного мозга. Под действием этих повреждений эффективность метаболической поддержки нейронов нарушается, что ведёт к нейродегенерации и развитию когнитивных симптомов патологий. Далее будут рассмотрены примеры воздействия возрастных изменений и патологических процессов на транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий клеток головного мозга.

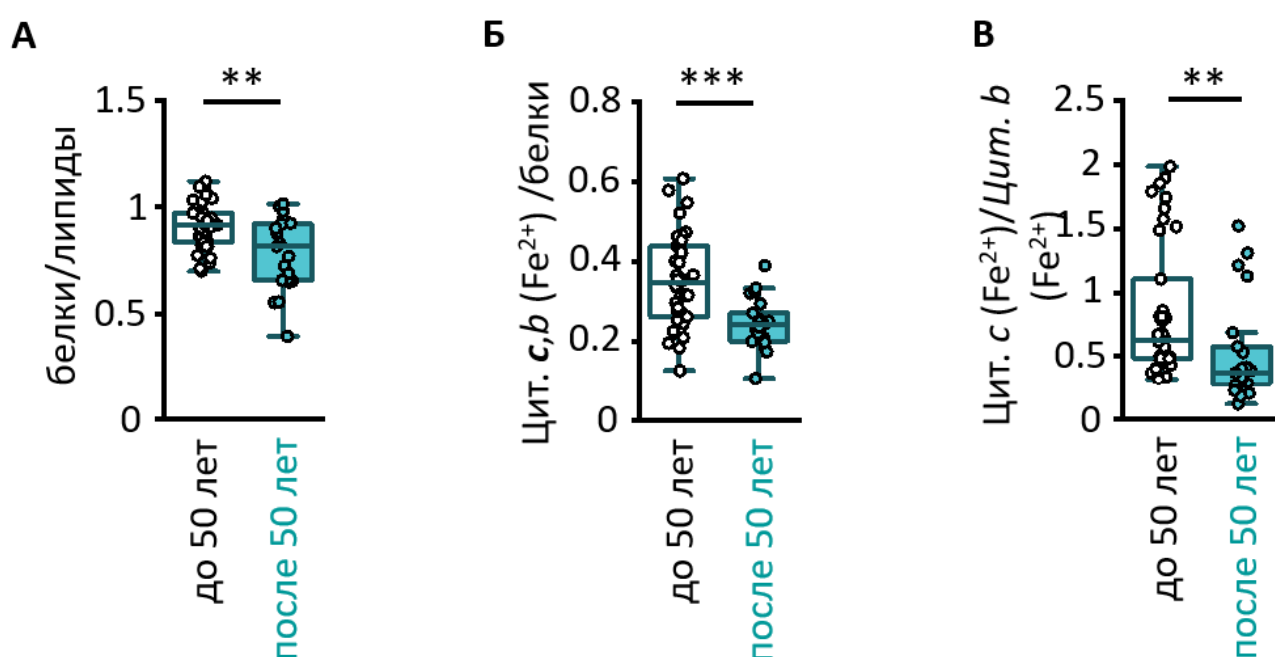
### 3.3.1. Влияние возрастных изменений на редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов

Для исследования влияния возрастных изменений на метаболизм астроцитов и нейронов были использованы образцы ткани доступа, удалённые у пациентов с глиомами. Ткань доступа представляет собой участок тканей головного мозга, расположенный над опухолью и подлежащий удалению для обеспечения хирургического доступа к очагу заболевания. Ткань доступа, как правило, не содержит опухолевых клеток и в меньшей степени подвержена влиянию инвазии злокачественной опухоли, что позволяет считать её метаболизм по функциональным характеристикам приближенным к нормальному.



Диапазон возрастов пациентов в рамках данного исследования составлял 22-72 года, вследствие чего они были разделены на две равных группы одинакового полового состава – младше 50 лет и старше 50 лет. Для идентификации клеток было произведено ИГХ-окрашивание на GFAP (белок-маркер астроцитов) и NeuN (белок-маркер нейронов), после чего производилась регистрация спектров КР от идентифицированных астроцитов и нейронов в фиксированных срезах.

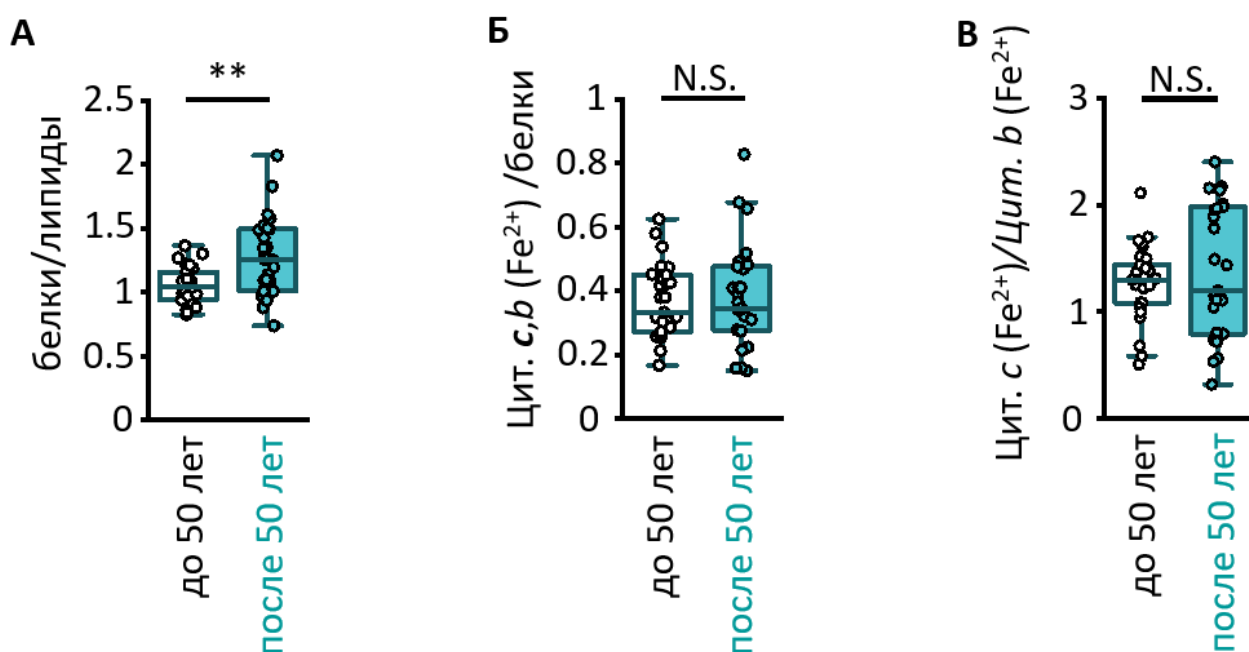
Мы показали, что в исследованных возрастных группах наблюдаются изменения в редокс-состоянии ЭТЦ астроцитов, но не нейронов. В астроцитах пациентов старшей возрастной группы наблюдалось снижение степени загруженности ЭТЦ электронами, выразившееся в уменьшении относительного количества восстановленного цитохрома С-типа по отношению к общему количеству белка в клетке (рис. 33Б). Относительное количества белка по отношению к общему количеству липидов в астроцитах также уменьшалось с возрастом (рис. 33А). При этом соотношение восстановленных цитохромов С- и В-типов в митохондриях астроцитов также уменьшалось, что говорит об ускорении переноса электронов с комплекса III на цитохром С, наблюдаемом в старшей возрастной группе (рис. 33В).



**Рисунок 33:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков с положениями максимумов 1440 и 1665 см<sup>-1</sup>, соответствующих соотношениям

липидов и белков (А), 750 и 1665  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношению восстановленных цитохромов С-типа и белков (Б) и 750 и 1126  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношению восстановленных цитохромов С- и В-типа, в астроцитах образцов ткани доступа пациентов с глиомами в возрасте младше и старше 50 лет. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ . Адаптировано из (Роров и др., 2023).

В нейронах наблюдалось увеличение относительного количества белка по отношению к общему количеству липидов в клетке (рис. 34А). При этом в их митохондриях не изменялось относительное количество восстановленных цитохромов С-типов и соотношение восстановленных цитохромов С- и В-типов (рис. 34Б, В).



**Рисунок 34:** Диаграммы размаха для соотношений амплитуд пиков с положениями максимумов 1440 и 1665  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношениям липидов и белков (А), 750 и 1665  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношению восстановленных цитохромов С-типа и белков (Б) и 750 и 1126  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих соотношению восстановленных цитохромов С- и В-типа, в нейронах образцов ткани доступа пациентов с глиомами в возрасте младше и

старше 50 лет. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, \*\* –  $p < 0,01$ , NS – not significant (значимых различий нет). Адаптировано из (Porov и др., 2023).

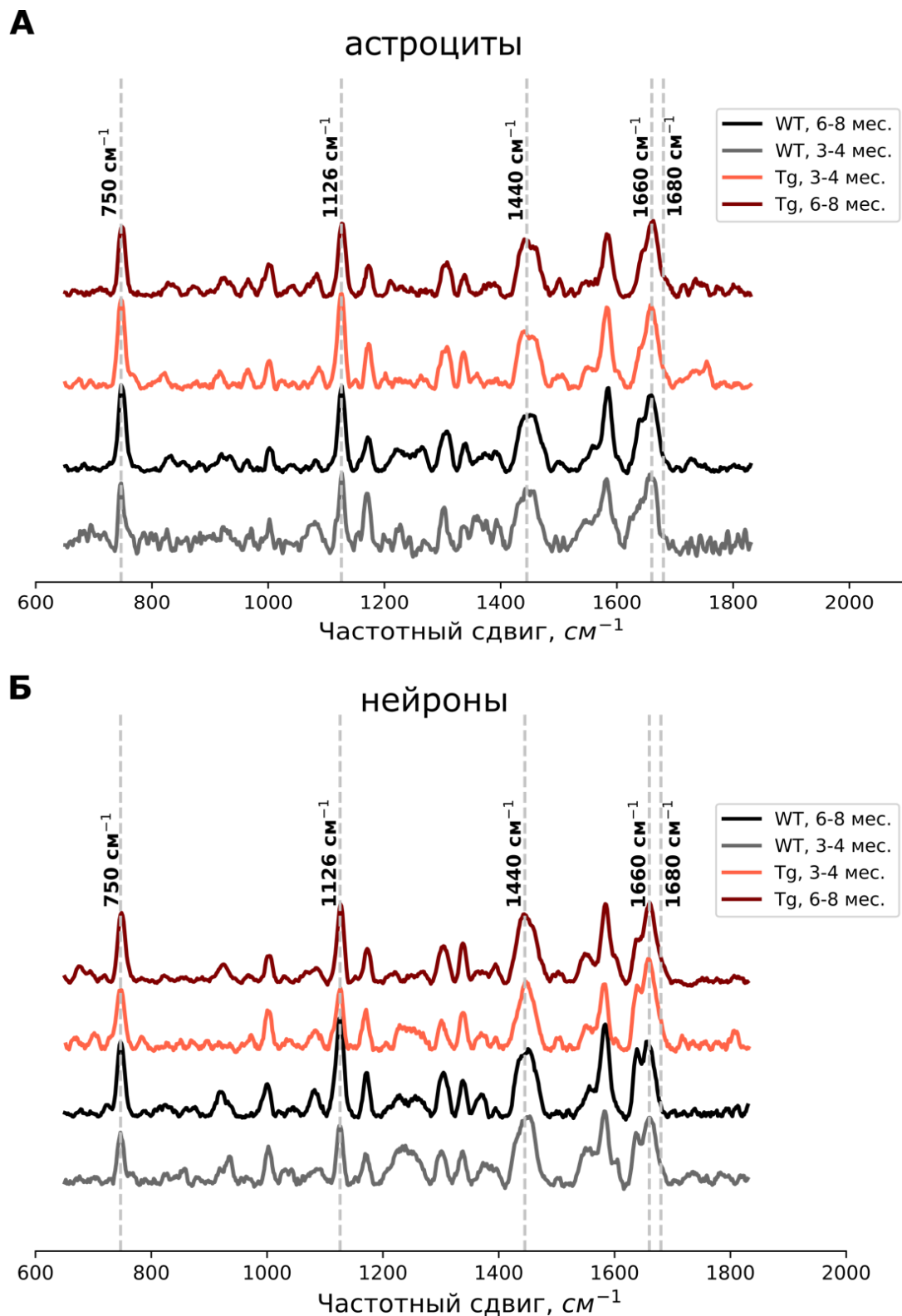
Мы показали, что возрастные изменения затрагивают митохондрии астроцитов раньше, чем митохондрии нейронов. Наблюдаемое снижение степени загруженности ЭТЦ астроцитов электронами связано с ускорением их транспорта. Об этом свидетельствует изменение соотношения восстановленных цитохромов С- и В-типов в ЭТЦ митохондрий астроцитов: ускорение переноса электронов может быть обусловлено формированием суперкомплекса из комплексов III и IV и цитохрома С. В современных исследованиях высказывается предположение о необходимости такого перехода в различных типах клеток для обеспечения эндогенной защиты от АФК, однако, для астроцитов такой переход может приводить к неэффективному выполнению сенсорной и регуляторной функций митохондрий.

Мы не наблюдали значимых различий в редокс-состоянии ЭТЦ митохондрий нейронов: возможно, возрастные изменения затрагивают катаболизм нейронов позднее, чем функционирование астроцитов в условиях нормального старения.

### 3.3.2. Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов при болезни Альцгеймера

Гипометаболизм глюкозы характерен для возрастных изменений в головном мозге, но усугубляется при патологиях, ассоциированных с возрастом. Примером такой патологии служит болезнь Альцгеймера (БА). В данной работе эффект её развития на состояние клеток головного мозга оценивался на примере сравнения трансгенных животных линии 5xFAD и животных дикого типа. Мутации 5xFAD приводят к формированию отложений амилоида у трансгенных животных в возрасте 6-8 месяцев, при этом в возрасте 3-4 месяцев амилоидных бляшек ещё не

наблюдается, но фрагменты бета-амилоида уже детектируются в плазме крови, что позволяет считать эту стадию заболевания досимптоматической.



**Рисунок 35.** Спектры КР, зарегистрированные от астроцитов (А) и нейронов (Б) соматосенсорной коры мышей линии 5xFAD на досимптоматической и симптоматической стадиях БА. WT – контрольные животные, Tg –

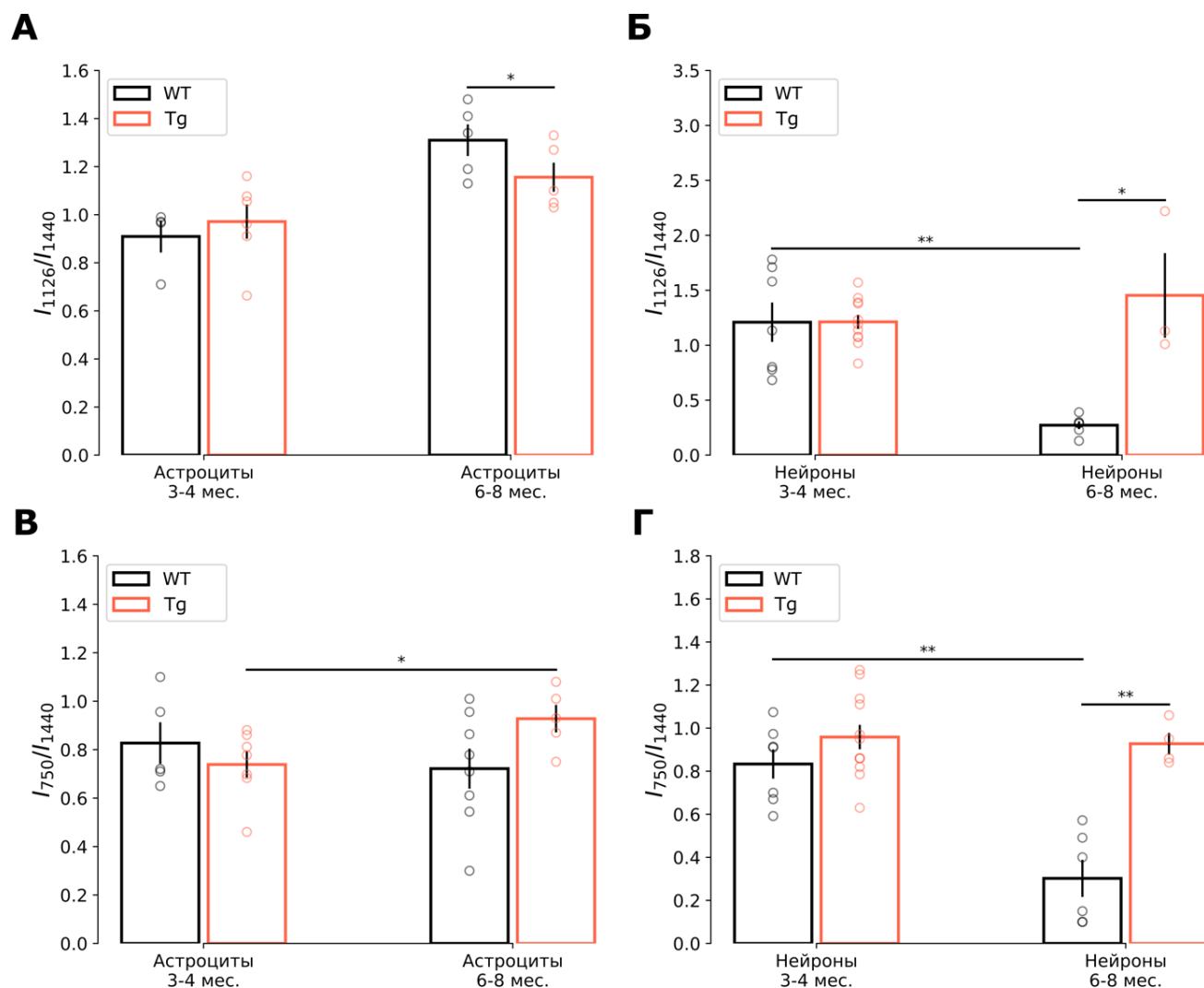
экспериментальные трансгенные мыши. Пунктиром обозначены положения максимумов пиков, амплитуды которых были проанализированы.

Спектры, зарегистрированные от нейронов и астроцитов в головном мозге животных с болезнью Альцгеймера, представлены на рис. 35. На досимптоматической стадии в астроцитах и нейронах у животных не наблюдалось различий между группами трансгенов (5xFAD) и животных дикого типа (WT) по относительным количествам восстановленных цитохромов В- и С-типов относительно общего количества липидов в клетке (рис. 36). По-видимому, на досимптоматической стадии развития заболевания патологические процессы ещё не затрагивают транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий и процессы клеточного дыхания.

На симптоматической стадии у животных наблюдалось значительное увеличение относительного количества восстановленных цитохромов В- и С-типов в ЭТЦ митохондрий нейронов (рис. 36). Этот параметр связан с увеличением загруженности ЭТЦ электронами, которое приводит к повышенным уровням генерации АФК. Эндогенные АФК оказывают существенное повреждающее действие на нейроны, что может быть одной из причин нейродегенерации при БА.

Для астроцитов на симптоматической стадии БА наблюдалось значимое снижение относительного количества восстановленных цитохромов В-типа ( $I_{1126}/I_{1440}$ ), но не С-типа ( $I_{750}/I_{1440}$ ) у трансгенных животных. В рамках совместного исследования, проводимого в сотрудничестве с группой под руководством профессора Dan Liu (Huazhong University of Science and Technology) было показано, что при болезни Альцгеймера снижается уровень синтеза NDUFБ10 – субъединицы комплекса I ЭТЦ, влияющей на его стабильность и встраивание во внутреннюю мембрану митохондрий (Rui и др., 2025). Это приводит к нарушению сборки комплекса I, обеспечивающего перенос электронов от первичного донора – NADH – на убихинон. При отсутствии комплекса I в митохондриях нейронов может нарушаться структура респирасомы, что приводит к снижению скорости транспорта электронов, наблюдаемой нами через увеличение загруженности ЭТЦ

электронами, и повышению доступности сайтов генерации АФК, усугубляющем окислительный стресс. В астроцитах дефицит комплекса I может приводить к снижению притока электронов в ЭТЦ из-за недостаточного окисления NADH, генерируемого в результате бета-окисления жирных кислот, что выражается в снижении степени загрузки ЭТЦ электронами.



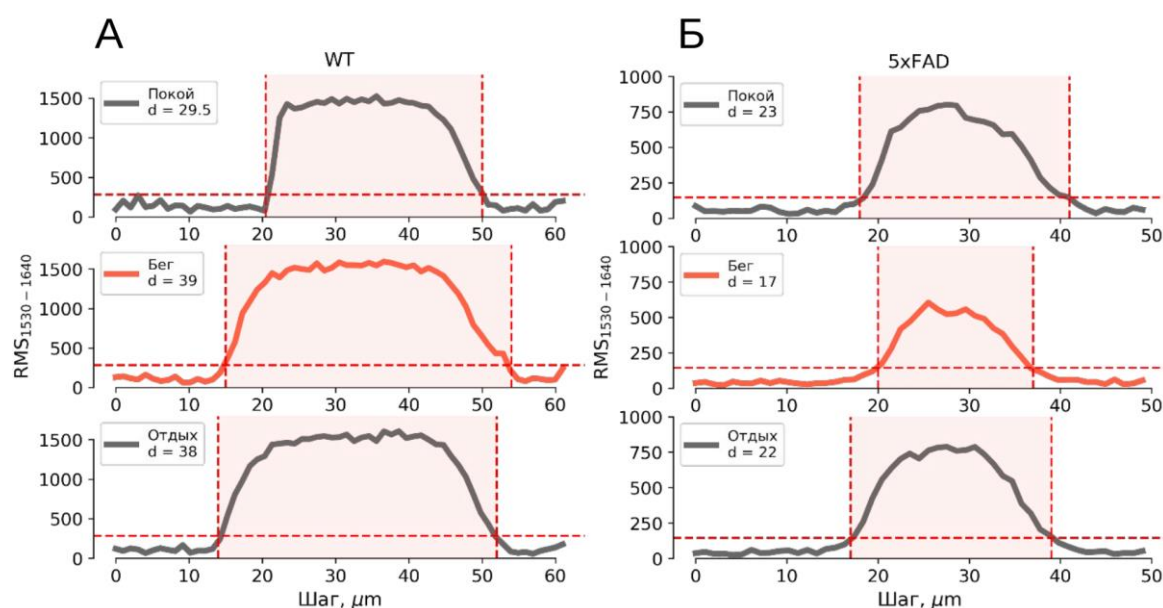
**Рисунок 36:** Относительное количество восстановленных цитохромов В-типа ( $I_{1126}/I_{1440}$ ) и С-типа ( $I_{750}/I_{1440}$ ) в астроцитах и нейронах животных линии 5xFAD и дикого типа на разных стадиях БА. Данные представлены в виде средних со стандартной ошибкой среднего, \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  (критерий Манна-Уитни).

Комплекс III ЭТЦ, в состав которого входит цитохром В-типа, является важным источником АФК в клетке, и снижение его загрузки электронами в митохондриях астроцитов 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.

### 3.3.3. Изменения в регуляции диаметра просвета кровеносных сосудов при болезни Альцгеймера

Развитие БА сопровождается целым рядом системных изменений, затрагивающих не только клетки головного мозга, но и другие системы организма. Фрагменты бета-амилоида детектируются в крови пациентов уже на ранних стадиях заболевания, ещё до проявления когнитивных симптомов. В головном мозге изменяется метаболизм питательных веществ: например, снижается доля поглощаемой клетками глюкозы, что может быть связано не только с изменениями во внутриклеточных катаболических процессах, но и с недостаточным притоком питательных веществ, вызванным нарушением кровоснабжения.



**Рисунок 37:** Скан-линии для оценки диаметра просвета артериол в области соматосенсорной коры бодрствующих мышей дикого типа (А) и трансгенных мышей линии 5xFAD (Б) в состоянии покоя, при вызванной локомоции и

последующем отдыхе. Красный фон соответствует диаметру сосуда,  $RMS_{1530-1640}$  — среднеквадратичная интенсивность КР-сигнала в области 1530-1640  $cm^{-1}$ , где присутствуют пики, ассоциированные с колебаниями связей в молекулах гемоглобина.

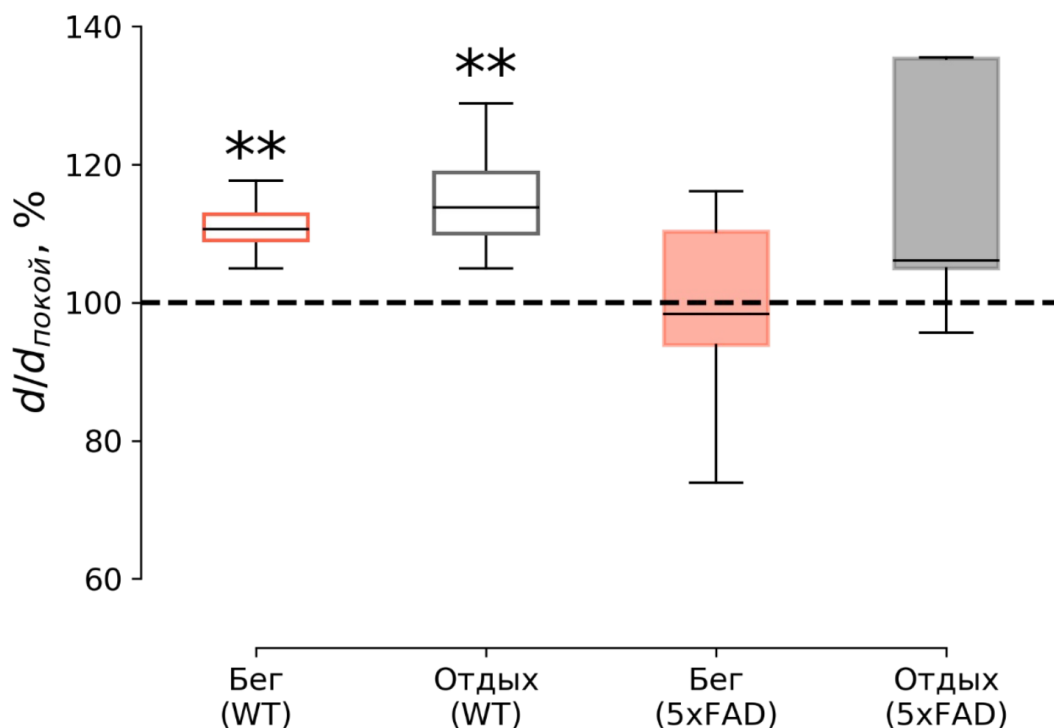
Для оценки изменений в регуляции кровотока были проведены измерения диаметра просвета артериол в мозге трансгенных мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа того же возраста в покое, при беге и последующем отдыхе (рис. 37). У животных дикого типа в ответ на вызванную локомоцию наблюдалось увеличение диаметра просвета артериол, как и у мышей линии C57Bl/6, что было показано в части 3.2.3 настоящей работы. При этом у трансгенных животных линии 5xFAD во время вызванной локомоции увеличения диаметра просвета сосуда по сравнению с состоянием покоя не наблюдалось (рис. 38).

Отсутствие увеличения диаметра просвета артериол во время локомоции свидетельствует о том, что при усиленной активности клетки головного мозга не получают достаточного притока кислорода и питательных веществ и испытывают метаболический стресс. Это согласуется с описанными в части 3.3.2 результатами об увеличении степени загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях нейронов трансгенных животных линии 5xFAD на симптоматической стадии. При активации, вызванной локомоцией, нейроны нуждаются в больших количествах АТФ и быстро расходуют кислород в результате интенсивного клеточного дыхания. Отсутствие адекватного ответа кровеносных сосудов на клеточную активность приводит к недостаточному снабжению тканей необходимыми метаболитами и развитию окислительного стресса, усугубляющего патогенез БА.

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. Как было показано в части 3.3.2 настоящей работы, на симптоматической стадии БА у трансгенных мышей наблюдается снижение относительного количества восстановленных цитохромов



В-типов в митохондриях астроцитов, что 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.

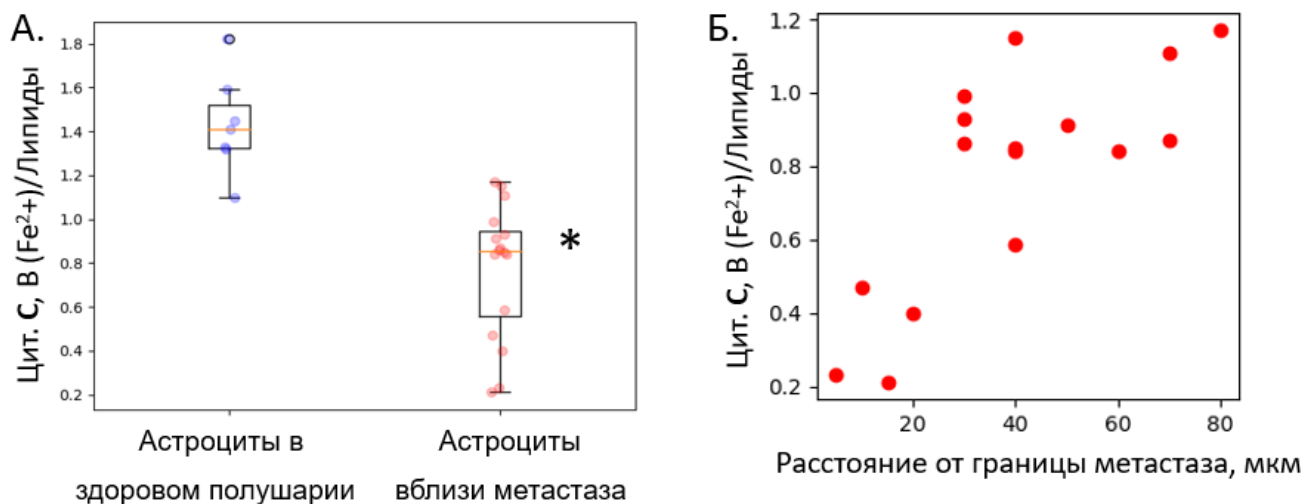


**Рисунок 38:** Диаграммы размаха для относительного диаметра просвета артериол в головном мозге бодрствующих животных дикого типа (WT) и трансгенных животных линии 5xFAD при вызванной локомоции. Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни, \*\* -  $p < 0,01$

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

Примером комплексной патологии, затрагивающей многие аспекты метаболизма астроцитов и нейронов и, в частности, состояние митохондрий, являются опухоли головного мозга различного генеза. Астроциты часто оказываются более чувствительными к инвазии опухолевых клеток, поэтому было

проанализировано их метаболическое состояние в микроокружении опухоли в срезах гиппокампа мышей с метастазом меланомы в мозг.



**Рисунок 39:** 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.

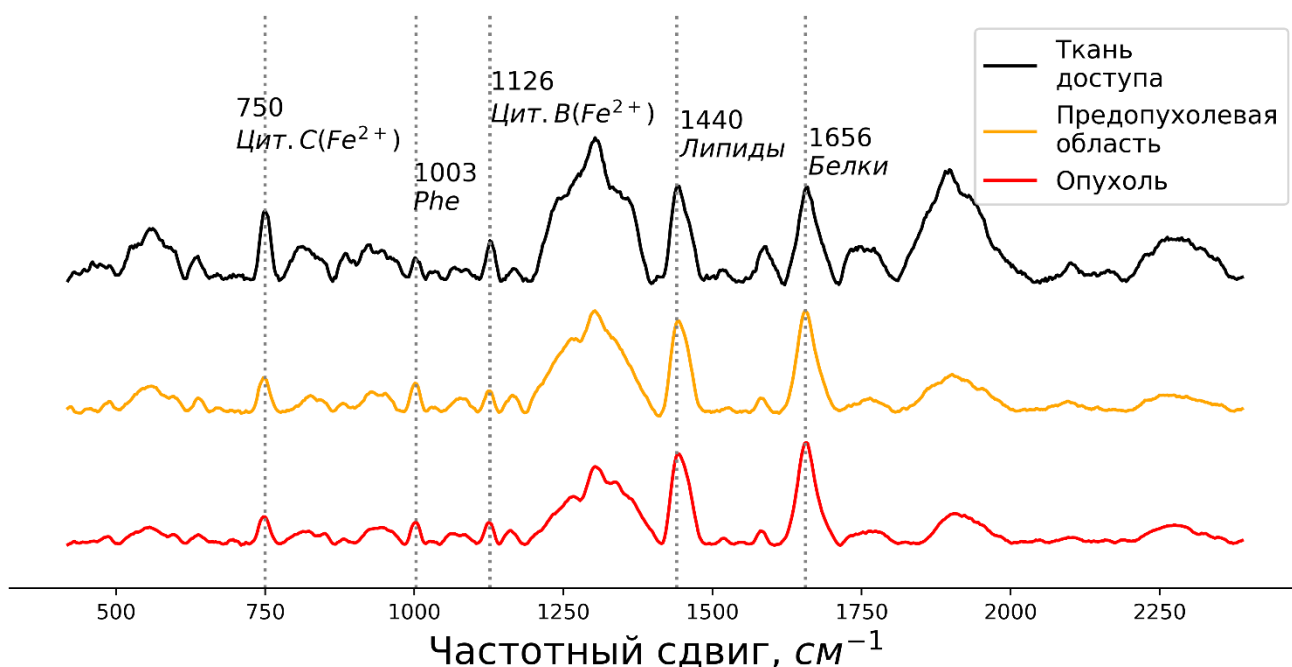
Было показано, что состояние ЭТЦ в митохондриях астроцитов вблизи метастаза и в здоровом полушарии различалось: в астроцитах в окружении метастаза относительное количество восстановленных цитохромов С- и В-типов было значительно ниже (рис. 39А). Притом чем ближе клетка располагалась к метастазу, тем меньше было относительное количество восстановленных цитохромов в её митохондриях (рис. 39Б). Это свидетельствует о более низком уровне загруженности ЭТЦ электронами и об увеличении скорости транспорта электронов. Структура ЭТЦ с обособленными комплексами, присущая астроцитам, характеризуется высокой степенью загруженности электронами в отличие от суперкомплексных, наблюдающихся в нейронах. Это позволяет предположить, что под влиянием инвазии опухолевых клеток в ЭТЦ астроцитов в их окружении могут

происходить метаболические изменения, затрагивающие пространственную организацию комплексов ЭТЦ митохондрий и приводящие к образованию суперкомплекса. Утрата структурной обособленности комплексов ЭТЦ в митохондриях астроцитов может приводить к нарушениям синтеза сигнальных АФК и облегчению инвазии опухолевых клеток.

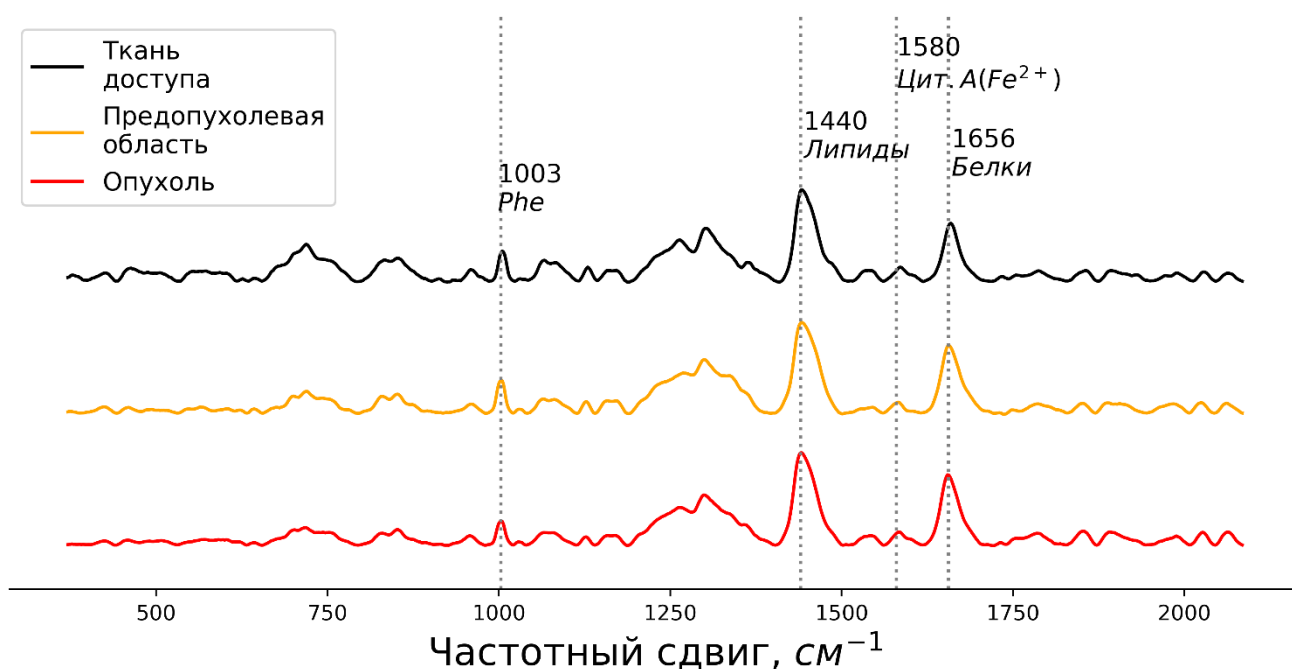
### 3.3.5. Метаболические изменения в тканях пациентов с глиомами III-IV степени

Примером наиболее злокачественной опухоли головного мозга у человека являются глиомы III-IV степени (глиобластомы) – агрессивные ангиогенные опухоли. Для них характерно активное прорастание сосудов в области плотной опухоли и высокая инвазивность. При анализе низкочастотной области спектров, зарегистрированных от образцов тканей мозга пациентов с глиобластомами при длине волны возбуждающего излучения 532 нм, наблюдались пики, ассоциируемые с колебаниями связей в молекулах белков, липидов и восстановленных цитохромов В- и С-типов, описанные ранее (рис. 40). Также для образцов тканей пациентов была проанализирована высокочастотная область спектра, регистрируемого при длине волны возбуждения 532 нм: в ней были выделены пики, ассоциируемые с колебаниями связей в молекулах белков и липидов (таблица 2) – рис. 42.

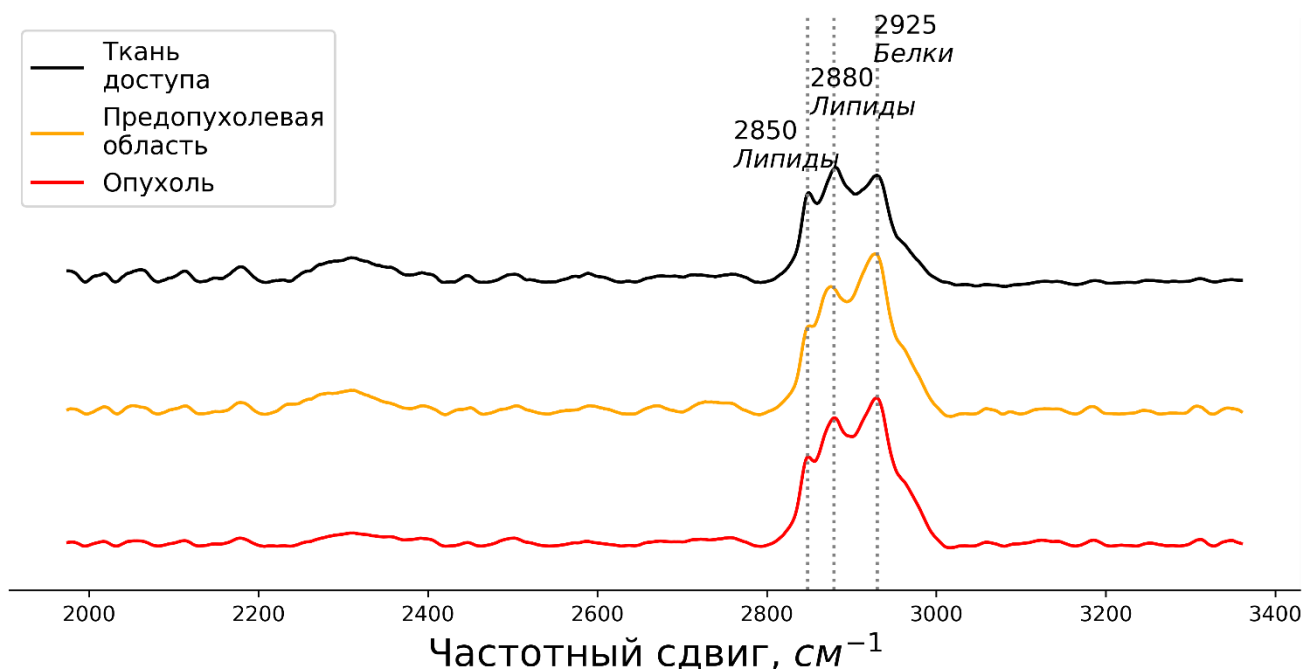
Наряду с этим, были проанализированы спектры, зарегистрированные при длине волны возбуждения 633 нм (рис. 41). Помимо сигнала, обусловленного колебаниями связей в молекулах липидов и белков, на этих спектрах присутствуют пики, ассоциируемые с колебаниями связей в гемах восстановленных цитохромов А-типа. Это позволяет оценить степень загруженности ЭТЦ электронами на уровне комплекса IV, на котором осуществляется восстановление кислорода до воды.



**Рисунок 40:** Низкочастотная область спектров КР, зарегистрированных от ткани доступа (чёрный), предопухоловой области (жёлтый) и опухоли (красный) в тканях пациента с глиобластомой при длине волны возбуждения 532 нм.

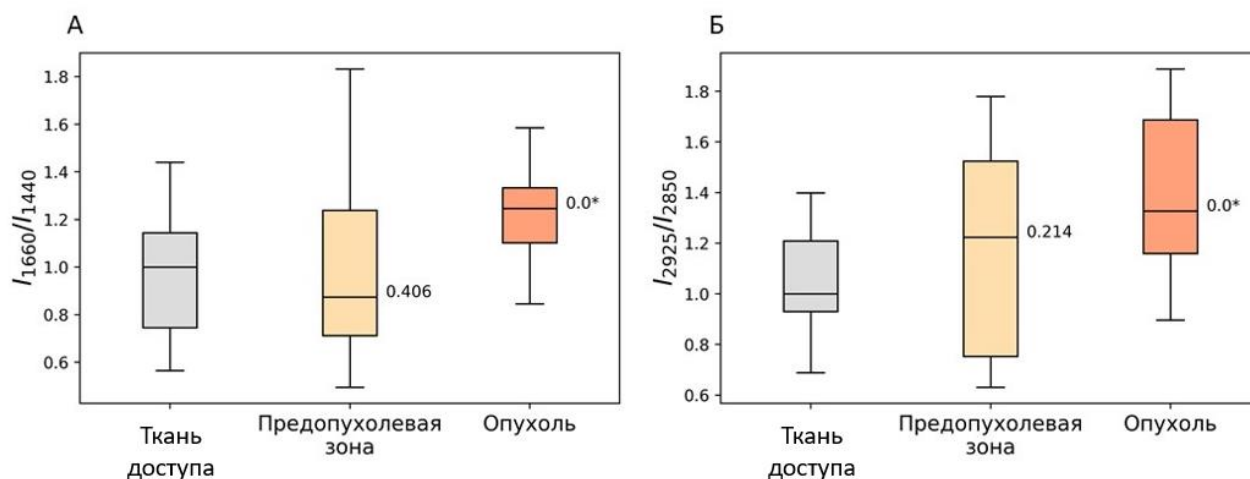


**Рисунок 41:** Низкочастотная область спектров КР, зарегистрированных от ткани доступа (чёрный), предопухоловой области (жёлтый) и опухоли (красный) в тканях пациента с глиобластомой при длине волны возбуждения 633 нм.



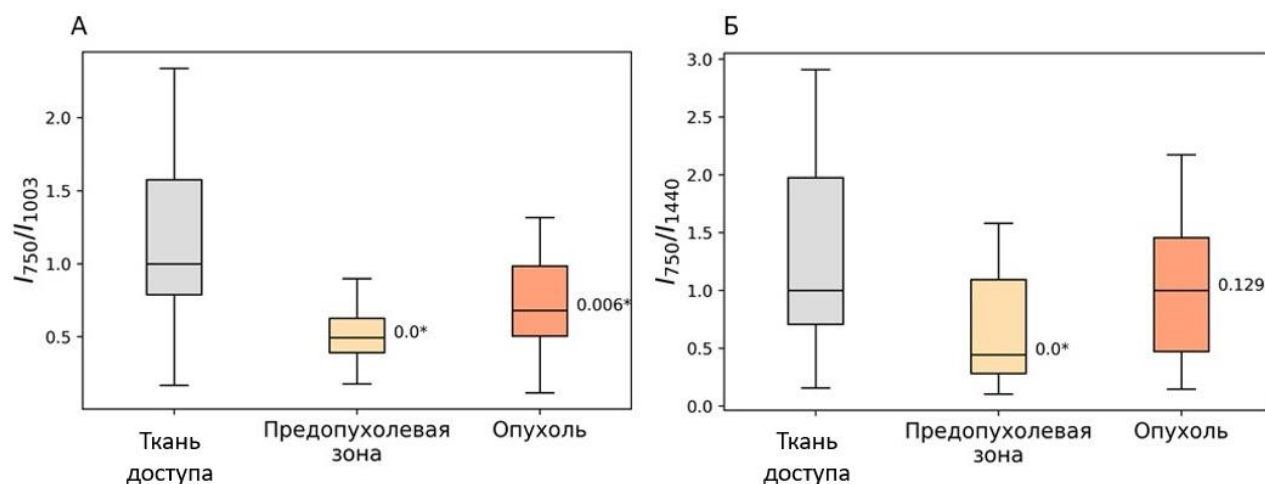
**Рисунок 42:** Высокочастотная область спектров КР, зарегистрированных от ткани доступа (чёрный), предопухолевой области (жёлтый) и опухоли (красный) в тканях пациента с глиобластомой при длине волны возбуждения 532 нм.

По сравнению со спектрами, зарегистрированными от ткани доступа, в спектрах, зарегистрированных от опухолевой области, относительная интенсивность пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах белков ( $1660$  и  $2925\text{ см}^{-1}$ ), была выше, чем относительная интенсивность пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах липидов ( $1440$  и  $2850\text{ см}^{-1}$ ) – рис. 43. Этот параметр связан с относительным количеством белка по отношению к общему количеству липидов в клетке. Увеличение этого параметра может быть связано с уменьшением размера клеток в опухолевой области и их активным делением, сопровождающимся интенсивным синтезом белков. В более ранних работах, посвящённых изучению КР-спектров опухолей головного мозга, эти изменения наблюдали только при анализе высокочастотной области спектра, в то время как низкочастотная область не анализировалась.

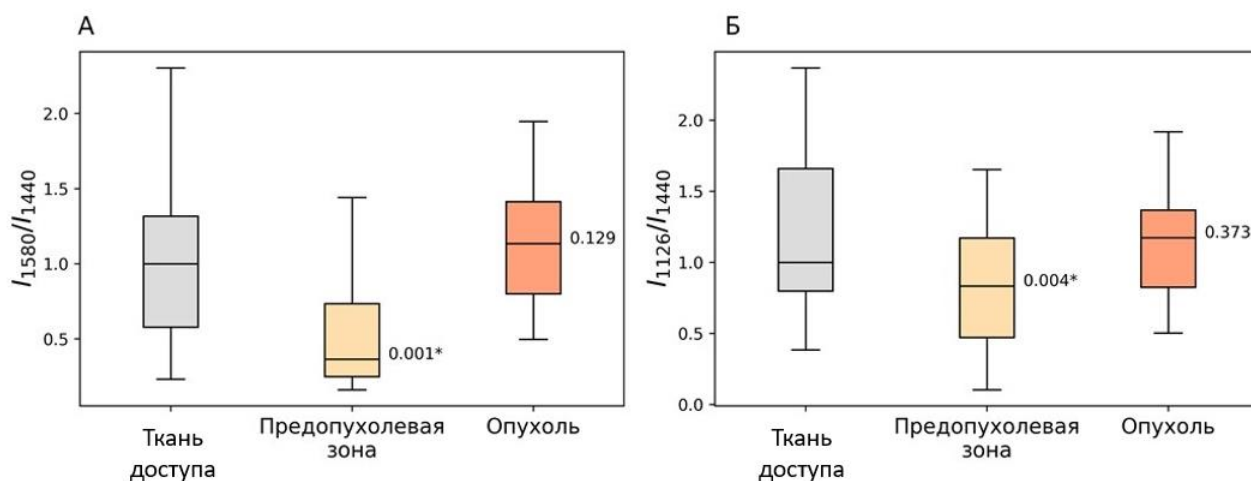


**Рисунок 43:** Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах белков ( $1660\text{ см}^{-1}$ ,  $2925\text{ см}^{-1}$ ) и липидов ( $1440\text{ см}^{-1}$ ,  $2850\text{ см}^{-1}$ ), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с глиобластомой. Соотношения рассчитаны как для пиков, расположенных в низкочастотной области (А), так и для пиков, расположенных в высокочастотной области (Б).

Изменения в спектрах, зарегистрированных от клеток предопухолевой области, касались относительной интенсивности пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов. По сравнению со спектрами, зарегистрированными от клеток ткани доступа, относительная интенсивность пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов С-, В- и А-типов, в них была ниже. Относительное количество восстановленных цитохромов С-, В- и А-типов относительно общего количества липидов в клетке, оцениваемое по соотношениям пиков в положениях  $750\text{ и }1440\text{ см}^{-1}$ ,  $1126\text{ и }1440\text{ см}^{-1}$  (возб.  $532\text{ нм}$ ) и  $1580\text{ и }1440\text{ см}^{-1}$  (возб.  $633\text{ нм}$ ) соответственно, в клетках предопухолевой области было ниже, чем в ткани доступа (рис. 44, 45). Снижение этого параметра говорит о пониженных уровнях загруженности ЭТЦ электронами на всех участках, что может быть связано как с метаболическим стрессом, который испытывают клетки в микроокружении опухоли, так и с пониженным притоком доноров через I и II комплексы.

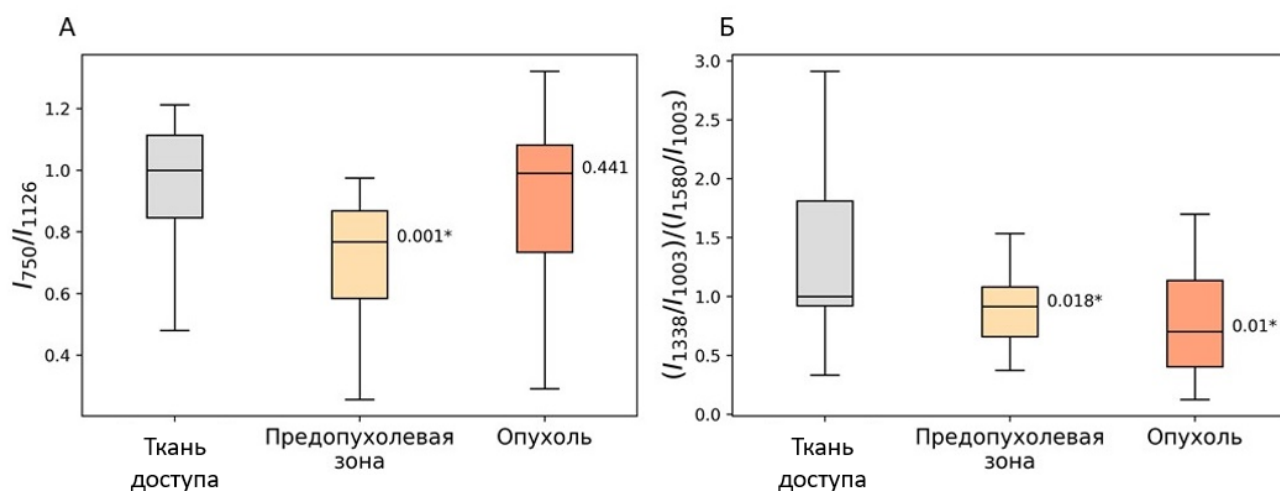


**Рисунок 44:** Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типа С ( $750\text{ см}^{-1}$ ) и фенилаланина ( $1003\text{ см}^{-1}$ , диаграмма А) и липидов ( $1440\text{ см}^{-1}$ , диаграмма Б), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с глиобластомой.



**Рисунок 45:** Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типов А ( $1580\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения  $633\text{ нм}$ , диаграмма А) и В ( $1126\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения  $532\text{ нм}$ , диаграмма Б) и липидов ( $1440\text{ см}^{-1}$ ), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с глиобластомой.

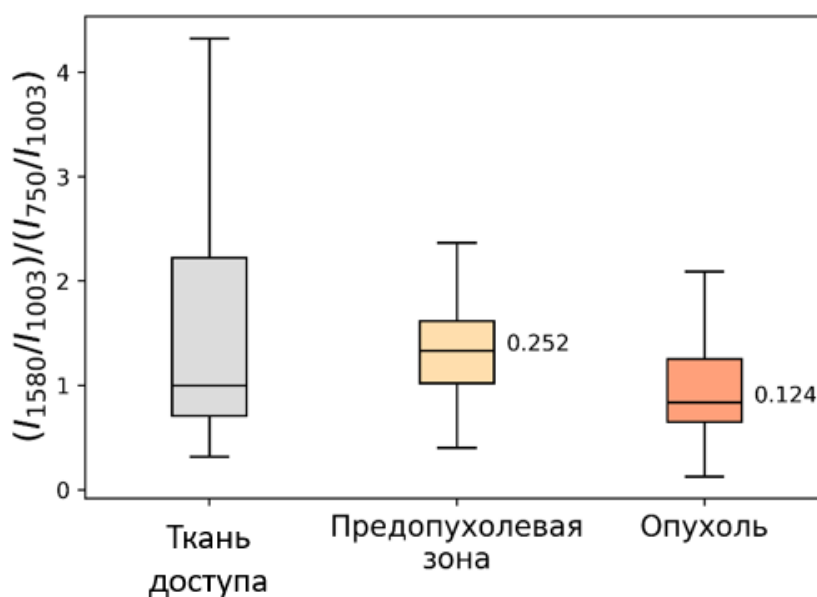
Чтобы оценить степень загруженности ЭТЦ на разных участках, по амплитудам пиков были рассчитаны соотношения цитохромов различных типов. Амплитуды пиков из спектров, зарегистрированных при разных длинах волн возбуждения, для расчёта соотношений предварительно нормировались на амплитуду пика, ассоциируемого с колебаниями связей в молекуле фенилаланина ( $1003\text{ см}^{-1}$ ) – его относительная интенсивность в спектрах, зарегистрированных от ткани доступа, предопухолевой и опухолевой областей, не различалась. В клетках предопухолевой области наблюдалось значимое снижение соотношения восстановленных цитохромов С- и В-типа ( $I_{750}/I_{1126}$ ) и А- и В-типа ( $I_{1580}/I_{1003}$  [633 нм] к  $I_{1338}/I_{1003}$  [532 нм]) по сравнению с клетками ткани доступа (рис. 46). При этом соотношение восстановленных цитохромов С- и А-типа не изменялось как в предопухолевой, так и в опухолевой области (рис. 47).



**Рисунок 46:** Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типов С ( $750\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 532 нм, диаграмма А) и А ( $1580\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 633 нм, диаграмма Б) и восстановленных цитохромов типа В ( $1126$  и  $1338\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 532 нм), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с глиобластомой.



Неравномерное изменение соотношений восстановленных цитохромов различных типов на фоне общей тенденции к снижению их количества может говорить о неравномерном ускорении переноса электрона на разных участках ЭТЦ. Облегчение транспорта электрона с комплекса III на цитохром С-типа, выражающееся в снижении соотношения восстановленных цитохромов В- и С-типа, может быть обусловлено формированием суперкомплекса из комплексов III и IV и цитохрома С-типа. Как было показано выше, такие изменения могут затрагивать астроциты в окружении злокачественной опухоли. Известно также, что в клетках некоторых опухолей комплексы ЭТЦ собраны в суперкомплексы, что способствует снижению риска синтеза эндогенных АФК.



**Рисунок 47:** Диаграмма размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типов А ( $1580 \text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения  $633 \text{ нм}$ ) и С ( $750 \text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения  $532 \text{ нм}$ ), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с глиобластомой.

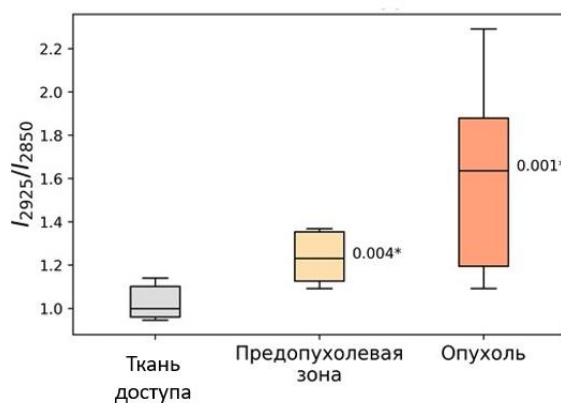
Снижение степени загруженности ЭТЦ электронами может быть напрямую связано с пониженным уровнем синтеза АФК и изменениями паттернов межклеточной сигнализации. Наблюдаемые изменения в состоянии ЭТЦ

характерны для предопухолевой области, где осуществляется активная инвазия раковых клеток, и могут облегчать их инфильтрацию. В настоящее время показана эффективность веществ, способствующих обособлению отдельных комплексов ЭТЦ, в качестве компонентов адъювантной терапии некоторых типов опухолей, и можно предположить, что они также могут быть использованы для глиобластом. Выявленные КР-маркеры предопухолевой области также могут стать эффективным средством интраоперационной диагностики глиобластом.

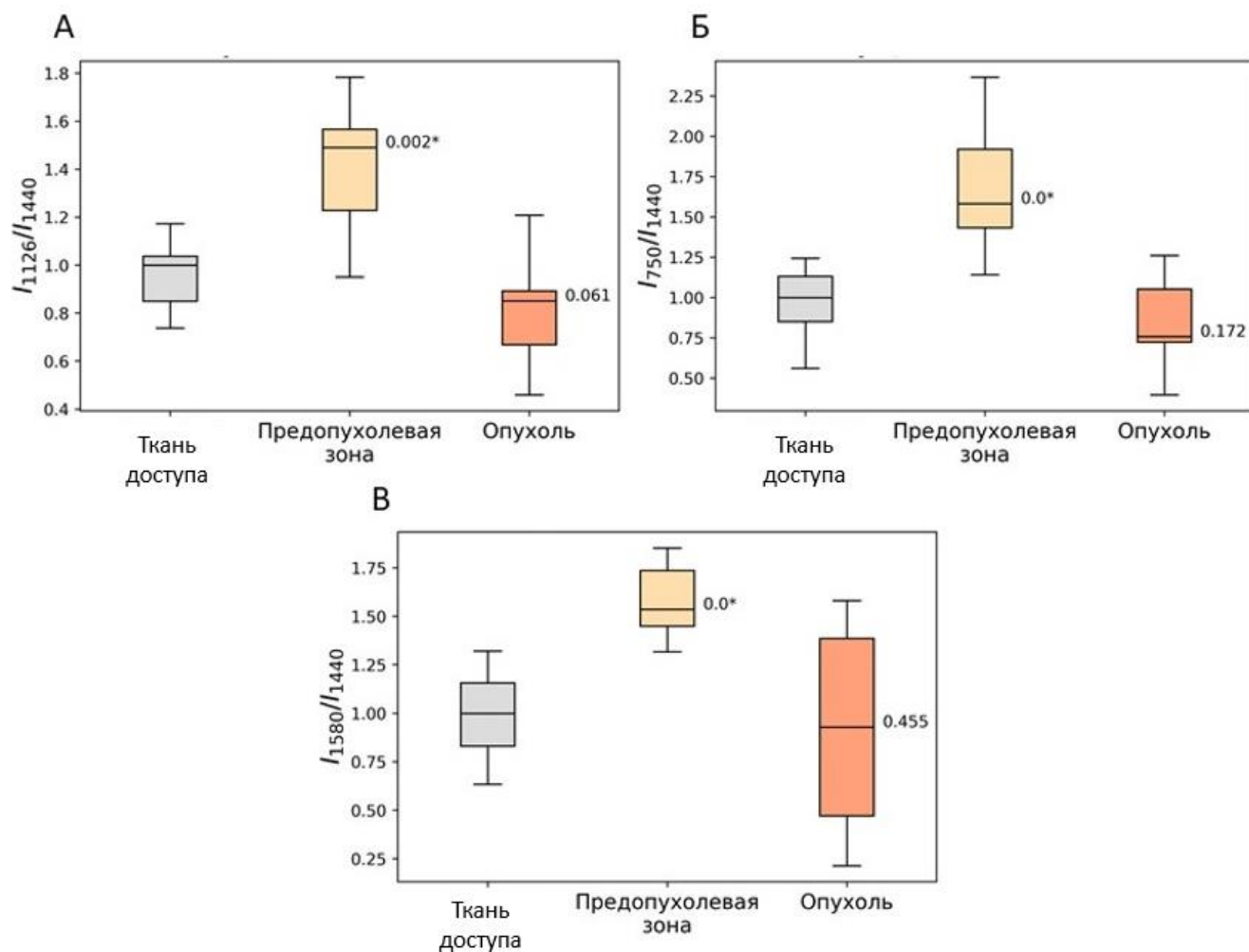
### 3.3.6. Метаболические изменения в тканях пациентов с неангиогенными опухолями

Другой тип менее агрессивных опухолей головного мозга у взрослых пациентов – глиомы I-II степени. Они характеризуются более медленным ростом и меньшей инвазивностью, чем глиобластомы, а также отсутствием выраженного ангиогенеза. При анализе спектров КР, для глиом I-II степени также были выявлены увеличения соотношений пиков, ассоциированных с колебаниями связей в молекулах белков и липидов ( $I_{2925}/I_{2850}$  и  $I_{1660}/I_{1440}$ ): они наблюдались в клетках как опухолевой, так и предопухолевой области (рис. 48). Так как глиомы I-II степени характеризуются меньшей инвазивностью, размер предопухолевой области для них меньше, а плотность раковых клеток в ней – выше, поэтому в ней наблюдаются значимые изменения в относительном количестве белка по отношению к общему количеству липидов, как и в опухолевой области.

В клетках предопухолевой области также наблюдалось увеличение относительной интенсивности пиков, ассоциируемых с колебаниями в молекулах восстановленных цитохромов. Относительное количество восстановленных цитохромов В-, С- и А-типов по отношению к общему количеству липидов в клетках предопухолевой области было выше, чем в клетках ткани доступа (рис. 49). При этом взаимные соотношения восстановленных цитохромов различных типов в клетках трех исследованных областей не отличались (рис. 50).



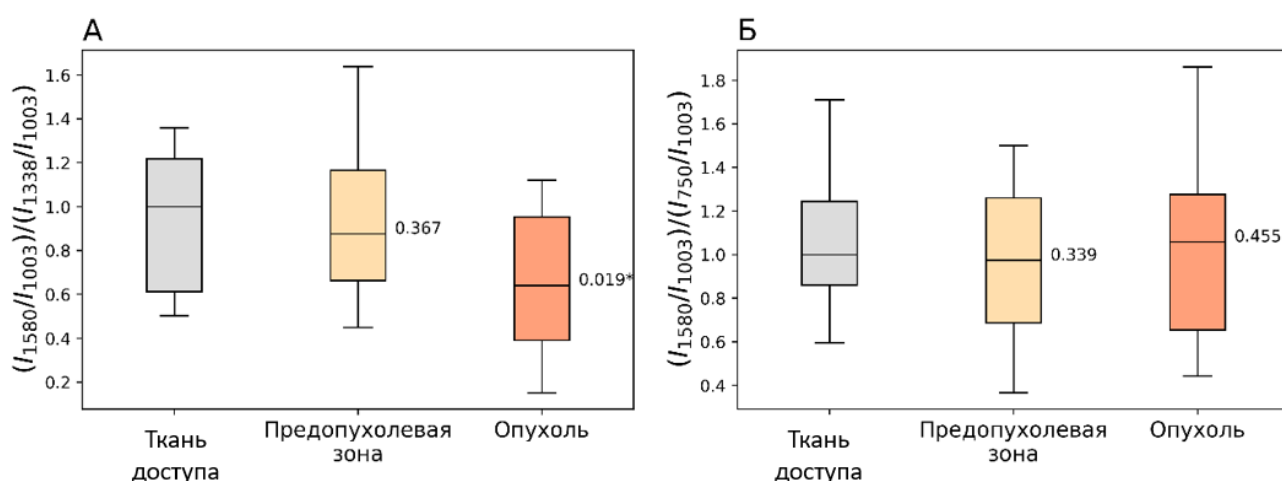
**Рисунок 48:** Диаграмма размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах белков ( $2925\text{ см}^{-1}$ ) и липидов ( $2850\text{ см}^{-1}$ ), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с неангиогенными опухолями.



**Рисунок 49:** Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типов В ( $1126\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения  $532\text{ нм}$ , диаграмма А), С ( $750\text{ см}^{-1}$ ,

длина волны возбуждения 532 нм, диаграмма Б) и А (1580  $\text{см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 633 нм, диаграмма В) и липидов (1440  $\text{см}^{-1}$ ), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с неангиогенными опухолями.

Равномерное повышение относительного количества восстановленных цитохромов всех типов в клетках предопухолевой области указывает на повышенную степень загруженности ЭТЦ электронами, обусловленной, вероятнее всего, замедлением их оттока на кислород. При развитии глиом I-II степени не происходит роста новых сосудов, вследствие чего в области плотной опухоли и прилегающих тканях развиваются гипоксические условия. Клетки, подвергшиеся злокачественному перерождению, зачастую хорошо адаптированы к таким условиям, в то время как в предопухолевой области содержится значительная доля нормальных клеток мозга, испытывающих метаболический стресс от инвазии раковых клеток и развивающейся гипоксии. Также высокая степень загруженности ЭТЦ электронами может приводить к повышенным уровням синтеза АФК, оказывающим повреждающее действие и сдерживающим инвазию и рост опухоли.



**Рисунок 50:** Диаграммы размаха для соотношений интенсивностей пиков, ассоциируемых с колебаниями связей в молекулах восстановленных цитохромов типов А (1580  $\text{см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 633 нм) и В (1126 и 1338  $\text{см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 532 нм, диаграмма А) А (1580  $\text{см}^{-1}$ , длина волны возбуждения

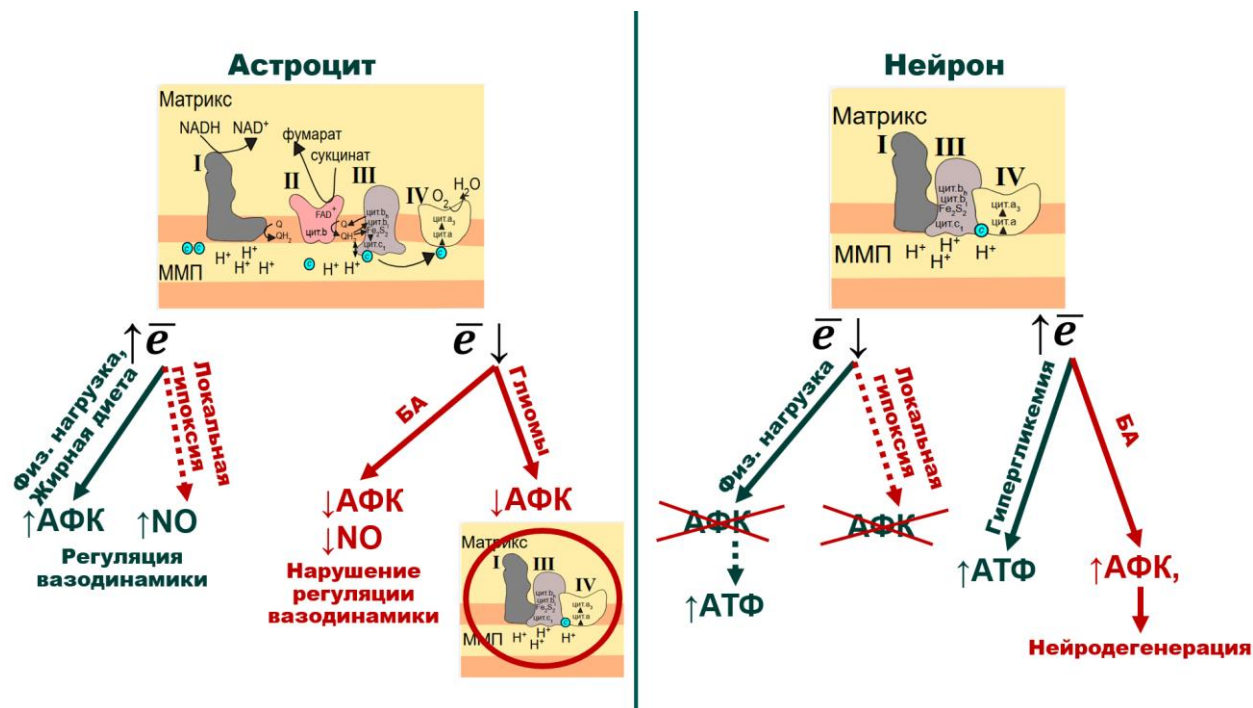
633 нм) и С ( $750\text{ см}^{-1}$ , длина волны возбуждения 532 нм, диаграмма Б), в клетках ткани доступа, предопухолевой области и опухоли в тканях пациентов с неангиогенными опухолями.

### 3.4. Заключение

В рамках данного исследования был разработан методический подход для регистрации и обработки спектров КР от клеток и кровеносных сосудов в мозге бодрствующих животных в условиях *in vivo*. Благодаря этому были выявлены особенности функционирования ЭТЦ с разной пространственной организацией в митохондриях астроцитов и нейронов (рис. 51). Была продемонстрирована связь транспорта электронов в ЭТЦ с различными физиологическими факторами: клеточной активностью, притоком доноров электронов и кислорода. Была также проанализирована взаимосвязь работы ЭТЦ с локальным кровоснабжением тканей головного мозга и его регуляцией. Было показано, что пространственная организация ЭТЦ и рассмотренные физиологические факторы влияют на генерацию АФК в клетке. Наконец, было рассмотрено влияние патологических процессов в головном мозге на транспорт электронов в ЭТЦ.

Полученные в настоящей работе данные укрепляют предположение о сенсорной и сигнальной роли митохондрий в астроцитах. Степень загруженности ЭТЦ электронами в их митохондриях при активации клеток приводила к продукции перекиси – долгоживущей АФК, имеющей сигнальное значение (Finkel, 2012). Увеличения степени загруженности ЭТЦ электронами не наблюдалось при гипергликемии, несмотря на то что глюкоза является основным источником энергии для клеток головного мозга. При этом заполнение ЭТЦ электронами происходило в условиях усиления липидного обмена, вызванного высокожировой диетой у мышей, что подтверждает значимую роль митохондрий астроцитов в бета-окислении жирных кислот в головном мозге. Рост степени загруженности ЭТЦ электронами в норме совмещался с увеличением диаметра артериол, а также наблюдался в условиях дефицита кислорода. При этом дефицит кислорода для

астроцитов не приводил к усиленной генерации АФК в первый час после развития гипоксии, что позволяет предположить, что электроны из ЭТЦ используются для синтеза NO при помощи сульфитоксидазы, способной получать электроны от комплексов ЭТЦ в митохондриях.



**Рисунок 51:** Схема факторов, влияющих на функционирование ЭТЦ астроцитов и нейронов, рассмотренных в данной работе. Физ. нагрузка – физиологическая нагрузка, БА – болезнь Альцгеймера, АФК – активные формы кислорода.

Под влиянием развития болезни Альцгеймера в астроцитах наблюдалось снижение степени загрузки ЭТЦ электронами, что напрямую связано с вероятностью синтеза АФК и NO. Наряду с этим был нарушен ответ кровеносных сосудов на физиологическую нагрузку: расширения сосудов в ответ на усиленную клеточную активность не наблюдалось, что приводило к нарушению кислородоснабжения тканей. При инвазии клеток глиомы в предопухолевой области наблюдались изменения в редокс-состоянии ЭТЦ, свидетельствующие о возможном нарушении структуры ЭТЦ с обобщёнными комплексами в

митохондриях астроцитов и формировании суперкомплекса. Этот процесс характерен для некоторых патологий и может приводить к снижению уровней генерации АФК, необходимых для жизнедеятельности астроцитов.

Выявленные особенности функционирования митохондрий в нейронах принципиально отличались от тех, что были описаны для астроцитов. При физиологической нагрузке транспорт электронов в ЭТЦ нейронов ускорялся, что потенциально может приводить к повышенной продукции АТФ. Загруженность ЭТЦ нейронов электронами существенно повышалась при гипергликемии из-за существенного увеличения притока субстратов окислительного фосфорилирования. При этом локальная гипоксия не оказывала значимого эффекта на загруженность ЭТЦ нейронов электронами в первый час после развития гипоксических условий.

Нарушение кровоснабжения головного мозга — нарушение регуляции диаметра артериол, наблюдаемые при болезни Альцгеймера, по-видимому, приводили к дефициту кислородоснабжения тканей, в результате чего увеличивалась степень загруженности ЭТЦ электронами в митохондриях нейронов. Интенсивные процессы клеточного дыхания, присущие нейронам, нуждаются в устойчивом притоке кислорода и нарушаются при системном длительном гипоксическом эффекте.

Метаболические взаимодействия астроцитов и нейронов обеспечивают нормальное функционирование головного мозга. В данной работе были выявлены особенности транспорта электронов в этих клетках, напрямую связанные с процессами катаболизма в них, а также описаны особенности функционирования высокоэффективной ЭТЦ, организованной в виде респирасомы, и низкоэффективной ЭТЦ с обобщёнными комплексами, необходимой для осуществления сенсорных и регуляторных функций клеток. Также были выявлены особенности патогенеза глиом головного мозга и болезни Альцгеймера, которые в дальнейшем могут быть использованы для разработки подходов к диагностике и терапии этих заболеваний.

## 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  $O_2^-$  вблизи метастаза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almeida A. J. P. O. de, Oliveira J. C. P. L. de, Silva Pontes L. V. da, Souza Júnior J. F. de, Gonçalves T. A. F., Dantas S. H., Almeida Feitosa M. S. de, Silva A. O., Medeiros I. A. de. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022. T. 2022. C. 1225578.
2. Angelova P. R., Kasymov V., Christie I., Sheikhabaei S., Turovsky E., Marina N., Korsak A., Zwicker J., Teschemacher A. G., Ackland G. L., Funk G. D., Kasparov S., Abramov A. Y., Gourine A. V. Functional oxygen sensitivity of astrocytes // *J. Neurosci.* 2015. T. 35. № 29. C. 10460–10473.
3. Arismendi-morillo G. J., Castellano-ramirez A. V. Ultrastructural mitochondrial pathology in human astrocytic tumors: potentials implications pro-therapeutics strategies // *J. Electron Microsc.* (Tokyo). 2008. T. 57. № 1. C. 33–39.
4. Aten S. и др. Ultrastructural view of astrocyte arborization, astrocyte-astrocyte and astrocyte-synapse contacts, intracellular vesicle-like structures, and mitochondrial network. , 2022. 1–43 с.
5. Bazargani N., Attwell D. Astrocyte calcium signaling : the third wave // *Nat. Neurosci.* 2016.
6. Beard E., Lengacher S., Dias S., Magistretti P. J., Finsterwald C. Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives // *Front. Physiol.* 2022. T. 12. № January.
7. Berezhna S., Wohlrab H., Champion P. M. Resonance Raman investigations of cytochrome c conformational change upon interaction with the membranes of intact and CA<sup>2+</sup>-exposed mitochondria // *Biochemistry.* 2003. T. 42. № 20. C. 6149–6158.
8. Bochkova Z. V., Semenova M. A., Smirnova O. M., Maksimov G. V., Rubin A. B., Kirpichnikov M. P., Dolgikh D. A., Chertkova R. V., Brazhe N. A. The molecular mechanism of redox interaction between neuroglobin and cytochrome c // *Int. J. Biol. Macromol.* 2025. T. 318. № P3. C. 145040.
9. Brand M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // *Exp. Gerontol.* 2010. T. 45. № 7–8. C. 466–472.

10. Brazhe N. A., Treiman M., Brazhe A. R., Find N. L., Maksimov G. V., Sosnovtseva O. V. Mapping of Redox State of Mitochondrial Cytochromes in Live Cardiomyocytes Using Raman Microspectroscopy // PLoS One. 2012. T. 7. № 9. C. 1–8.
11. Brazhe N. A., Nikelshparg E. I., Prats C., Dela F., Sosnovtseva O. Raman probing of lipids , proteins , and mitochondria in skeletal myocytes : a case study on obesity // J. Raman Spectrosc. 2017. № November 2016.
12. Brazhe N. A., Nikelshparg E. I., Baizhumanov A. A., Grivennikova V. G., Semenova A. A., Novikov S. M., Volkov V. S., Arsenin A. V., Yakubovsky D. I., Evlyukhin A. B., Bochkova Z. V., Goodilin E. A., Maksimov G. V., Sosnovtseva O., Rubin A. B. SERS uncovers the link between conformation of cytochrome c heme and mitochondrial membrane potential // Free Radic. Biol. Med. 2023. T. 196. C. 133–144.
13. Butterfield D. A. Brain lipid peroxidation and alzheimer disease: Synergy between the Butterfield and Mattson laboratories. // Ageing Res. Rev. 2020. T. 64. C. 101049.
14. Chendong Y., Sudderth J., Tuyen D., Bachoo R. G., McDonald J. G., DeBerardinis R. J. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling // Cancer Res. 2009. T. 69. № 20. C. 7986–7993.
15. Christie I. N., Theparambil S. M., Braga A., Doronin M., Hosford P. S., Brazhe A., Mascarenhas A., Nizari S., Hadjihambi A., Wells J. A., Hobbs A., Semyanov A., Abramov A. Y., Angelova P. R., Gourine A. V. Astrocytes produce nitric oxide via nitrite reduction in mitochondria to regulate cerebral blood flow during brain hypoxia // Cell Rep. 2023. T. 42. № 12.
16. Cogliati S., Calvo E., Loureiro M., Guaras A. M., Nieto-Arellano R., Garcia-Poyatos C., Ezkurdia I., Mercader N., Vázquez J., Enriquez J. A. Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV // Nature. 2016. T. 539. № 7630. C. 579–582.
17. Crochemore C., Mekki M., Corbière C., Karoui A., Noël R., Vendeville C., Vaugeois J. M., Monteil C. Subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct superoxide production profiles // Free Radic. Res. 2015. T. 49. № 3. C. 331–337.

18. Cunnane S. C. и др. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020. T. 19. № 9.
19. Czamara K., Majzner K., Selmi A., Baranska M., Ozaki Y., Kaczor A. Unsaturated lipid bodies as a hallmark of inflammation studied by Raman 2D and 3D microscopy // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № December 2016. C. 1–10.
20. Deighton R. F., Bihan T. Le, Martin S. F., Gerth A. M. J., McCulloch M., Edgar J. M., Kerr L. E., Whittle I. R., McCulloch J. Interactions among mitochondrial proteins altered in glioblastoma // *J. Neurooncol.* 2014. T. 118. № 2. C. 247–256.
21. Desroches J., Jermyn M., Pinto M., Picot F., Tremblay M. A., Obaid S., Marple E., Urmei K., Trudel D., Soulez G., Guiot M. C., Wilson B. C., Petrecca K., Leblond F. A new method using Raman spectroscopy for in vivo targeted brain cancer tissue biopsy // *Sci. Rep.* 2018. T. 8. № 1. C. 1–10.
22. Diaz F., Fukui H., Garcia S., Moraes C. T. Cytochrome c Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts // *Mol. Cell. Biol.* 2006. T. 26. № 13. C. 4872–4881.
23. Drulis-Fajdasz D., Gizak A., Wójtowicz T., Wiśniewski J. R., Rakus D. Aging-associated changes in hippocampal glycogen metabolism in mice. Evidence for and against astrocyte-to-neuron lactate shuttle // *Glia.* 2018. T. 66. № 7.
24. Finkel T. Signal transduction by mitochondrial oxidants // *J. Biol. Chem.* 2012. T. 287. № 7. C. 4434–4440.
25. Fonteh A. N., Cipolla M., Chiang J., Arakaki X., Harrington M. G. Human cerebrospinal fluid fatty acid levels differ between supernatant fluid and brain-derived nanoparticle fractions, and are altered in Alzheimer's disease. // *PLoS One.* 2014. T. 9. № 6. C. e100519.
26. Friedman H. S., Prados M. D., Wen P. Y., Mikkelsen T., Schiff D., Abrey L. E., Yung W. K. A., Paleologos N., Nicholas M. K., Jensen R., Vredenburgh J., Huang J., Zheng M., Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma // *J. Clin. Oncol.* 2009. T. 27. № 28. C. 4733–4740.
27. Grivennikova V. G., Vinogradov A. D. Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex i // *Biochim. Biophys. Acta -*

Bioenerg. 2013. T. 1827. № 3. C. 446–454.

28. Guarás A. и др. The CoQH<sub>2</sub>/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency // Cell Rep. 2016. T. 15. № 1. C. 197–209.

29. Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D., Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol // J. Biol. Chem. 2003. T. 278. № 8. C. 5557–5563.

30. Ioannou M. S., Jackson J., Sheu S. H., Chang C. L., Weigel A. V., Liu H., Pasolli H. A., Xu C. S., Pang S., Matthies D., Hess H. F., Lippincott-Schwartz J., Liu Z. Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity // Cell. 2019. T. 177. № 6. C. 1522–1535.e14.

31. Jermyn M., Mok K., Mercier J., Desroches J., Pichette J., Saint-arnaud K., Bernstein L., Guiot M., Petrecca K., Leblond F. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans // Sci. Transl. Med. 2015. T. 7. № 274. C. 1–10.

32. Jimenez-Blasco D., Agulla J., Lapresa R., Garcia-Macia M., Bobo-Jimenez V., Garcia-Rodriguez D., Manjarres-Raza I., Fernandez E., Jeanson Y., Khoury S., Portais J. C., Padro D., Ramos-Cabrera P., Carmeliet P., Almeida A., Bolaños J. P. Weak neuronal glycolysis sustains cognition and organismal fitness // Nat. Metab. 2024. T. 6. № 7. C. 1253–1267.

33. Kneipp J., Kneipp H., Wittig B., Kneipp K. Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells. // Nanomedicine. 2010. T. 6. № 2. C. 214–226.

34. Kotova D. A. и др. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide // Free Radic. Biol. Med. 2023. T. 208. № May. C. 153–164.

35. Kotova D. A. и др. Redox Differences Between Neurons and Astrocytes In Vivo in Ischemic Brain Tissues of Rodents. // Antioxid. Redox Signal. 2025. T. 43. № 4–6. C. 272–287.

36. Kroes M., Bultynck G., Janssens S. ER-Mitochondria contact sites: A new regulator of cellular calcium flux comes into play. // J. Cell Biol. 2016. T. 214. № 4. C. 367–370.

37. Kucharska-Newton A. M., Stoner L., Meyer M. L. Determinants of vascular

age: An epidemiological perspective // Clin. Chem. 2019. T. 65. № 1.

38. la Torre J. C. de. Cerebral Perfusion Enhancing Interventions: A New Strategy for the Prevention of Alzheimer Dementia. // Brain Pathol. 2016. T. 26. № 5. C. 618–631.

39. Lalo U., Koh W., Lee C. J., Pankratov Y. The tripartite glutamatergic synapse // Neuropharmacology. 2021. T. 199.

40. Lambert A. J., Brand M. D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) // J. Biol. Chem. 2004. T. 279. № 38. C. 39414–39420.

41. Lapuente-Brun E., Moreno-Loshuertos R., Acín-Pérez R., Latorre-Pellicer A., Colaś C., Balsa E., Perales-Clemente E., Quirós P. M., Calvo E., Rodríguez-Hernández M. A., Navas P., Cruz R., Carracedo Á., López-Otín C., Pérez-Martos A., Fernández-Silva P., Fernández-Vizarra E., Enríquez J. A. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain // Science (80-. ). 2013. T. 340. № 6140. C. 1567–1570.

42. Letts J. A., Fiedorczuk K., Sazanov L. A. The architecture of respiratory supercomplexes // Nature. 2016. T. 537. № 7622. C. 644–648.

43. Letts J. A., Sazanov L. A. Clarifying the supercomplex: The higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain // Nat. Struct. Mol. Biol. 2017. T. 24. № 10. C. 800–808.

44. Lewis J. S. и др. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo // Sci. Transl. Med. 2015. T. 7. № 274. C. 274ra17-274ra17.

45. Liu L., MacKenzie K. R., Putluri N., Maletić-Savatić M., Bellen H. J. The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D // Cell Metab. 2017. T. 26. № 5. C. 719-737.e6.

46. Liu X., Gebremedhin D., Harder D. R., Koehler R. C. Contribution of epoxyeicosatrienoic acids to the cerebral blood flow response to hypoxemia // J. Appl. Physiol. 2015. T. 119. № 10. C. 1202–1209.

47. Lopez-Fabuel I., Douce J. Le, Logan A., James A. M., Bonvento G., Murphy

M. P., Almeida A., Bolaños J. P. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. T. 113. № 46. C. 13063–13068.

48. López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe // *Cell*. 2023. T. 186. № 2. C. 243–278.

49. Love D. T., Guo C., Nikelshparg E. I., Brazhe N. A., Sosnovtseva O., Hawkins C. L. The role of the myeloperoxidase-derived oxidant hypothiocyanous acid (HOSCN) in the induction of mitochondrial dysfunction in macrophages // *Redox Biol.* 2020. T. 36. № June. C. 101602.

50. Magistretti P. J., Allaman I. Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule // *Nat. Rev. Neurosci.* 2018. T. 19. № 4. C. 235–249.

51. Mahley R. W. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016. T. 36. № 7. C. 1305–1315.

52. Marin R., Fabelo N., Fernández-Echevarría C., Canerina-Amaro A., Rodríguez-Barreto D., Quinto-Aleman D., Mesa-Herrera F., Díaz M. Lipid Raft Alterations in Aged-Associated Neuropathologies. // *Curr. Alzheimer Res.* 2016. T. 13. № 9. C. 973–984.

53. Martínez-Cué C., Rueda N. Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. // *Front. Cell. Neurosci.* 2020. T. 14. C. 16.

54. Matrella M. L., Valletti A., Gigante I., Rasmø D. De, Signorile A., Russo S., Lobasso S., Lobraico D., Dibattista M., Pacelli C., Cocco T. High OXPHOS efficiency in RA-FUdr-differentiated SH-SY5Y cells: involvement of cAMP signalling and respiratory supercomplexes // *Sci. Rep.* 2024. T. 14. № 1.

55. Mi Y., Qi G., Vitali F., Shang Y., Raikes A. C., Wang T., Jin Y., Brinton R. D., Gu H., Yin F. Loss of fatty acid degradation by astrocytic mitochondria triggers neuroinflammation and neurodegeneration // *Nat. Metab.* 2023. T. 5. № 3. C. 445–465.

56. Mikhail Kellawan J., Peltonen G. L., Harrell J. W., Roldan-Alzate A., Wieben O., Schrage W. G. Differential contribution of cyclooxygenase to basal cerebral blood flow and hypoxic cerebral vasodilation // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*

2020. T. 318. № 2. C. R468–R479.

57. Morant-Ferrando B., Jimenez-Blasco D., Alonso-Batan P., Agulla J., Lapresa R., Garcia-Rodriguez D., Yunta-Sanchez S., Lopez-Fabuel I., Fernandez E., Carmeliet P., Almeida A., Garcia-Macia M., Bolaños J. P. Fatty acid oxidation organizes mitochondrial supercomplexes to sustain astrocytic ROS and cognition // *Nat. Metab.* 2023. T. 5. № 8. C. 1290–1302.

58. Morozova K. I., Parshina E. Y., Kazakova T. A., Yusipovich A. I., Slatinskaya O. V., Brazhe A. R., Grivennikov I. A., Brazhe N. A., Maksimov G. V. Study of Brain Cells in Neurodegenerative Diseases: Raman Microspectroscopy and Scanning Ion-Conductance Microscopy // *Современные технологии в медицине.* 2025. T. 17. № 1. C. 27–37.

59. Moulton M. J., Barish S., Ralhan I., Chang J., Goodman L. D., Harland J. G., Marcogliese P. C., Johansson J. O., Ioannou M. S., Bellen H. J. Neuronal ROS-induced glial lipid droplet formation is altered by loss of Alzheimer's disease-associated genes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2021. T. 118. № 52.

60. Mrdenovic D., Pieta I. S., Nowakowski R., Kutner W., Lipkowski J., Pieta P. Amyloid  $\beta$  interaction with model cell membranes – What are the toxicity-defining properties of amyloid  $\beta$ ? // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. T. 200. C. 520–531.

61. Nagy J. I., Lynn B. D., Tress O., Willecke K., Rash J. E. Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice // *Eur. J. Neurosci.* 2011. T. 34. № 2. C. 263–271.

62. Niu Y., Desmarais T. L., Tong Z., Yao Y., Costa M. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. T. 82. C. 22–28.

63. Okada M., Isaac N., Flotildes A., Endo H., Kawata S. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. T. 109. № 1.

64. Onishi M., Ichikawa T., Kurozumi K., Date I. Angiogenesis and invasion in glioma // *Brain Tumor Pathol.* 2011. T. 28. № 1. C. 13–24.

65. Orr A. L., Quinlan C. L., Perevoshchikova I. V., Brand M. D. A refined analysis



of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase // J. Biol. Chem. 2012. T. 287. № 51. C. 42921–42935.

66. Oyewole A. O., Birch-Machin M. A. Mitochondria-targeted antioxidants // FASEB J. 2015. T. 29. № 12. C. 4766–4771.

67. Peng W., Tan C., Mo L., Jiang J., Zhou W., Du J., Zhou X., Liu X., Chen L. Glucose transporter 3 in neuronal glucose metabolism: Health and diseases // Metabolism. 2021. T. 123.

68. Perevoshchikova I. V., Quinlan C. L., Orr A. L., Gerencser A. A., Brand M. D. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria // Free Radic. Biol. Med. 2013. T. 61. C. 298–309.

69. Pérez-Pérez R., Lobo-Jarne T., Milenkovic D., Mourier A., Bratic A., García-Bartolomé A., Fernández-Vizarra E., Cadenas S., Delmiro A., García-Consuegra I., Arenas J., Martín M. A., Larsson N. G., Ugalde C. COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III<sub>2</sub>+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation // Cell Rep. 2016. T. 16. № 9. C. 2387–2398.

70. Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. T. 20. № 5. C. 267–284.

71. Pisapia D. J. The Updated World Health Organization Glioma Classification Cellular and Molecular Origins of Adult Infiltrating Gliomas // Arch. Pathol. Lab. Med. 2017. T. 141. № December. C. 1633–1645.

72. Popov A., Brazhe N., Fedotova A., Tiaglik A., Bychkov M., Morozova K., Brazhe A., Aronov D., Lyukmanova E., Lazareva N., Li L., Ponimaskin E., Verkh ratsky A., Semyanov A. A high-fat diet changes astrocytic metabolism to promote synaptic plasticity and behavior // Acta Physiol. 2022. T. 236. № 1. C. 1–14.

73. Popov A., Brazhe N., Morozova K., Yashin K., Bychkov M., Nosova O., Sutyagina O., Brazhe A., Parshina E., Li L., Medyanik I., Korzhevskii D. E., Shenkarev Z., Lyukmanova E., Verkh ratsky A., Semyanov A. Mitochondrial malfunction and atrophy of astrocytes in the aged human cerebral cortex // Nat. Commun. 2023. T. 14. № 1.

74. Priego N. и др. STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis article // *Nat. Med.* 2018. T. 24. № 7. C. 1024–1035.
75. Qi G., Mi Y., Shi X., Gu H., Brinton R. D., Yin F. ApoE4 Impairs Neuron-Astrocyte Coupling of Fatty Acid Metabolism // *Cell Rep.* 2021. T. 34. № 1. C. 108572.
76. Quinlan C. L., Gerencser A. A., Treberg J. R., Brand M. D. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. № 36. C. 31361–31372.
77. Quinlan C. L., Treberg J. R., Perevoshchikova I. V., Orr A. L., Brand M. D. Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria measured using endogenous reporters // *Free Radic. Biol. Med.* 2012a. T. 53. № 9. C. 1807–1817.
78. Quinlan C. L., Orr A. L., Perevoshchikova I. V., Treberg J. R., Ackrell B. A., Brand M. D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions // *J. Biol. Chem.* 2012b. T. 287. № 32. C. 27255–27264.
79. Quinlan C. L., Goncalves R. L. S., Hey-Mogensen M., Yadava N., Bunik V. I., Brand M. D. The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I // *J. Biol. Chem.* 2014. T. 289. № 12. C. 8312–8325.
80. Rappe A., Vihinen H. A., Suomi F., Hassinen A. J., Ehsan H., Jokitalo E. S., McWilliams T. G. Longitudinal autophagy profiling of the mammalian brain reveals sustained mitophagy throughout healthy aging // *EMBO J.* 2024. C. 1–33.
81. Rich P. R., Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain // *Essays Biochem.* 2010. T. 47. C. 1–23.
82. Rui T.-Y., Huang H.-Z., Zheng K., Fan H.-W., Zhang J., Guo Z.-Y., Man H.-Y., Brazhe N., Semyanov A., Lu Y.-M., Liu D., Zhu L.-Q. Tau Pathology Drives Disease-Associated Astrocyte Reactivity in Salt-Induced Neurodegeneration. // *Adv. Sci.* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Ger. 2025. T. 12. № 11. C. e2410799.
83. Schönfeld P., Reiser G. Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration //

Neurochem. Int. 2017. T. 109. C. 68–77.

84. Schreiner B., Hedskog L., Wichager B., Ankarcrona M. Amyloid- $\beta$  peptides are generated in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. // J. Alzheimers. Dis. 2015. T. 43. № 2. C. 369–374.

85. 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  $H_2O_2$  Produced During Acute Hypoxia? // Antioxid. Redox Signal. 2025. T. 42. № 4–6. C. 292–300.

86. Shin H., Oh S., Hong S., Kang M., Kang D., Ji Y. G., Choi B. H., Kang K. W., Jeong H., Park Y., Kim H. K., Choi Y. Early-Stage Lung Cancer Diagnosis by Deep Learning-Based Spectroscopic Analysis of Circulating Exosomes // ACS Nano. 2020. T. 14. № 5. C. 5435–5444.

87. Szablewski L. Brain glucose transporters: Role in pathogenesis and potential targets for the treatment of alzheimer's disease // Int. J. Mol. Sci. 2021. T. 22. № 15.

88. Tabner B. J., El-Agnaf O. M. A., Turnbull S., German M. J., Paleologou K. E., Hayashi Y., Cooper L. J., Fullwood N. J., Allsop D. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. // J. Biol. Chem. 2005. T. 280. № 43. C. 35789–35792.

89. Todorovic S., Teixeira M. Resonance Raman spectroscopy of Fe–S proteins and their redox properties // J. Biol. Inorg. Chem. 2018. T. 23. № 4. C. 647–661.

90. Tubbs E., Rieusset J. Metabolic signaling functions of ER-mitochondria contact sites: role in metabolic diseases. // J. Mol. Endocrinol. 2017. T. 58. № 2. C. R87–R106.

91. Vicente-Gutierrez C., Bonora N., Bobo-Jimenez V., Jimenez-Blasco D., Lopez-Fabuel I., Fernandez E., Josephine C., Bonvento G., Enriquez J. A., Almeida A., Bolaños J. P. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour // Nat. Metab. 2019. T. 1. № 2. C. 201–211.

92. Waltz F., Righetto R. D., Lamm L., Salinas-Giegé T., Kelley R., Zhang X., Obr M., Khavnekar S., Kotecha A., Engel B. D. In-cell architecture of the mitochondrial

respiratory chain // *Science*. 2025. T. 387. № 6740. C. 1296–1301.

93. Wang X., Wang Y., He Y., Liu L., Wang X., Jiang S., Yang N., Shi N., Li Y. A versatile technique for indiscriminate detection of unlabeled biomolecules via double-enhanced Raman scattering // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. T. 228. № October 2022. C. 615–623.

94. Wei Y., Miao Q. Q., Zhang Q., Mao S., Li M., Xu X., Xia X., Wei K., Fan Y., Zheng X., Fang Y., Mei M., Zhang Q., Ding J., Fan Y., Lu M., Hu G. Aerobic glycolysis is the predominant means of glucose metabolism in neuronal somata, which protects against oxidative damage // *Nat. Neurosci.* 2023. T. 26. № 12.

95. Wiel J. van de, Meigh L., Bhandare A., Cook J., Nijjar S., Huckstepp R., Dale N. Connexin26 mediates CO<sub>2</sub>-dependent regulation of breathing via glial cells of the medulla oblongata // *Commun. Biol.* 2020. T. 3. № 1. C. 1–12.

96. Wilson E. L., Metzakopian E. ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. // *Cell Death Differ.* 2021. T. 28. № 6. C. 1804–1821.

97. Yang C., Wang X., Wang J., Wang X., Chen W., Lu N., Siniosoglou S., Yao Z., Liu K. Rewiring Neuronal Glycerolipid Metabolism Determines the Extent of Axon Regeneration // *Neuron*. 2020. T. 105. № 2. C. 276- 292.e5.

98. Zehnder T., Petrelli F., Romanos J., Oliveira Figueiredo E. C. De, Lewis T. L., Déglon N., Polleux F., Santello M., Bezzi P. Mitochondrial biogenesis in developing astrocytes regulates astrocyte maturation and synapse formation // *Cell Rep.* 2021. T. 35. № 2.

## Благодарности

Я благодарю своего научного руководителя, Браже Надежду Александровну, за чуткое научное руководство, терпеливое наставничество и всестороннюю поддержку на протяжении всей нашей совместной работы, за множество бесценных возможностей для профессионального роста и развития. Надежда Александровна сделала мой путь в науке невероятно интересным, захватывающим и приятным с самого начала.

Я также хотела бы поблагодарить коллег из института биоорганической химии и с кафедры биофизики биологического факультета МГУ за многолетнее продуктивное сотрудничество, постоянный обмен знаниями и общую дружескую поддержку. Я благодарю Алису Борисовну Тяглик и Анну Алексеевну Федотову за обучение тонкостям работы с животными и вирусами, за каждый совместно проведенный эксперимент и подготовленный доклад, за неугасимый оптимизм и творческие поиски научных, жизненных, гастрономических и культурологических путей. Выражаю признательность Милене Сергеевне Шестопаловой за совместные исследования особенностей спектроскопии комбинационного рассеяния и инженерные изыскания. Благодарю Ольгу Сосновцеву и Юлию Дембицкую за возможности интеграции в международное научное сообщество и интересные научные беседы.

Выражаю глубокую признательность Алексею Рудольфовичу Браже за консультации по вопросам программирования, а также Паршиной Евгении Юрьевне и Байжуманову Адилю Ануаровичу за помощь в проведении экспериментов и не всегда научные, но неизменно захватывающие дискуссии. Благодарю Дмитрия Сергеевича Билана и сотрудников группы метаболических основ патологии ИБХ РАН за продуктивные коллаборации.

Благодарю Рубина Андрея Борисовича и Максимова Георгия Владимировича за мудрые советы и время, уделённое совершенствованию моей работы, а также Алексея Васильевича Семьянова и Владимира Александровича Олейникова за предоставленные лабораторные ресурсы.

Я очень признательна Ольге Дмитриевне Лопиной, Александру Михайловичу Сурину и Марине Вадимовне Ширмановой за оппонирование моей работы и Полине Викторовне Фурсовой за помощь в её оформлении и подготовке необходимых документов.

Эта работа не была бы завершена без всеобъемлющей поддержки моих родных и близких, их активного слушания, терпения, участия, их веры в мои способности и такого необходимого взгляда со стороны.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда развития науки и образования «Интеллект» и РФФИ (РНФ 23-44-00015, РНФ 23-74-00006). Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.