

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Тяглик Алиса Борисовна

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

1.5.24. Нейробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., Браже Надежда Александровна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1.1. Метаболические потребности мозга	11
2.1.2. Метаболизм глюкозы в нейронах	12
2.1.3. Пентозофосфатный путь в нейронах	13
2.1.4. Метаболизм глюкозы в астроцитах и метаболическая поддержка нейронов	14
2.2.1. Бета-окисление жирных кислот в астроцитах	18
2.2.2. Связь бета-окисления ЖК и особенности строения ЭТЦ астроцитов	20
2.3.1. Общая организация ЭТЦ и различия ее строения в астроцитах и нейронах	22
2.3.2. Физиологическая роль редокс-состояния митохондрий астроцитов	24
2.4.1. Морфологические особенности и динамическая реорганизация сети митохондрий	27
2.4.2. Морфологические особенности астроцитов, обеспечивающие локальную метаболическую поддержку нейронов на уровне синапса	32
2.5. Изучение редокс-состояния клеток мозга	34
Заключение	38
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
3.1.1. Животные	39
3.1.2. Диета с высоким содержанием жира (High fat diet, HFD)	40
3.1.3. Индукция гипергликемии у мышей	41
3.1.4. Стереотаксическое введение вируса в область соматосенсорной коры и имплантация краниального окна	42
3.1.5. Стереотаксическое введение вируса в гиппокамп	45
3.2.1. Приучение животных к экспериментальным установкам для хронической регистрации флуоресценции или КР-спектров	45
3.2.2. Регистрация КР спектров на беговой дорожке	46
3.2.3. КР-микроспектроскопия <i>in vivo</i>	48
3.2.4. КР-микроспектроскопия степени оксигенации и диаметра просвета кровеносных сосудов <i>in vivo</i>	50
3.2.5. Анализ КР спектров астроцитов и нейронов <i>in vivo</i>	51
3.2.6. Визуализация двойного флуоресцентного мечения астроцитов и	

нейронов в условиях <i>in vivo</i>	54
3.2.7. Измерение продукции H_2O_2 в митохондриях астроцитов и нейронов <i>in vivo</i>	54
3.3.1. Морфологический имиджинг митохондрий <i>in vivo</i>	55
3.3.2. Анализ распределения и морфологии митохондрий <i>in vivo</i>	56
3.4. Поведенческий тест «Открытое поле»	58
3.5.1. Транскардиальная перфузия	59
3.5.2. Изготовление фиксированных срезов мозга	60
3.5.3. Иммуногистохимическое окрашивание для КР-микроспектроскопии <i>ex vivo</i>	60
3.5.4. КР-микроспектроскопия <i>ex vivo</i>	61
3.5.5. Анализ спектров КР <i>ex vivo</i>	62
3.6.1. Флуоресцентная визуализация морфологии астроцитов гиппокампа	63
3.6.2. Анализ морфологии астроцитов	64
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	68
4.1.1. Разработка метода КР микроспектроскопии <i>in vivo</i> для оценки редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов и мониторинга локальной оксигенации крови в сосудах коры мозга бодрствующих мышей	68
4.1.2. Влияние функциональной нагрузки на sO_2 и диаметр кровеносных сосудов в соматосенсорной коре мышей	77
4.1.3. Редокс-состояние ЭТЦ астроцитов и нейронов при функциональной нагрузке	82
4.2. Распределение митохондрий в астроцитах и нейронах <i>in vivo</i>	89
4.3. Редокс-состояние ЭТЦ нейронов и астроцитов при острой гипергликемии <i>in vivo</i>	100
4.4. Редокс-состояние ЭТЦ нейронов и астроцитов и особенности поведения животных на диете с высоким содержанием жира	107
4.5.1. Связь морфологических особенностей астроцитов и редокс-состояние их ЭТЦ	116
4.5.2. Структурные перестройки астроцитов	121
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
6. ВЫВОДЫ	131
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132
Благодарности	156

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – аэробный гликолиз

АНЛШ – астроцит-нейрон лактатный шаттл

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ацетил-КоА – ацетил кофермент А

дГб – дезоксигемоглобин

ДЦ – дыхательная цепь

ЖК – жирные кислоты

КР – комбинационное рассеяние

ЛК – липидные капли

НАДФН(H^+) – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

оГб – оксигемоглобин

ОФ – окислительное фосфолирование

ПФФ – пентозофосфатный путь

РКР – резонансное комбинационного рассеяние

ФАДН₂ – восстановленный флавинадениндинуклеотид

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

$O_2^{\bullet -}$ – супероксид-анион радикал

sO₂ – степень оксигенации крови

HFD – high fat diet, диета с высоким содержанием жира

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанность темы.

В течение длительного времени нейроны считались единственным типом клеток, вовлекаемым в обработку информации в головном мозге, обучение и память. Однако с точки зрения физиологии описание функций любого органа на основе одного типа клеток, из которых он состоит, является неверным (Semyanov & Verkhatsky, 2021). В последние десятилетия стала активно изучаться роль глиальных клеток в работе мозга. Астроциты, одни из основных типов глии, являются важным метаболическим элементом в мозге, поскольку они снабжают энергетическими субстратами нейроны, являющиеся главными потребителями энергии в мозге (Magistretti & Allaman, 2015). Астроциты обладают метаболической и морфологической пластичностью. Морфологические и метаболические изменения астроцитов могут возникать в ответ на физиологические и патологические стимулы. Их работа зависит от степени активности нейронов, и может переключаться на разный тип метаболизма в зависимости от доступных энергетических субстратов (Ioannou et al., 2019; Magistretti & Allaman, 2015). Одной из основных характеристик астроцитов является их особенная морфология, которая позволяет осуществлять различные физиологические функции. Тонкие отростки астроцитов – листочки – охватывают синаптические контакты, а концевые ножки регулируют диаметр кровеносных сосудов, а также играют ведущую роль в формировании гематоэнцефалического барьера (Díaz-Castro et al., 2023; Sweeney et al., 2019). Соответственно, изменение функционирования астроцитов может повлечь за собой сбой работы нейронов и нарушение активности мозга. На данный момент большинство данных о метаболических и морфологических характеристиках астроцитов получены в условиях *in vitro* и

ex vivo, не позволяющих в полной мере оценить сложность межклеточных взаимодействий в реальном времени в живом мозге.

Большинство существующих представлений о биоэнергетике мозга *in vivo* основаны на данных фМРТ – неинвазивной методике, позволяющей оценить изменения сигнала BOLD (blood-oxygen-level-dependent), однако его интерпретация остается нетривиальной задачей из-за нелинейности сигнала и отсутствия клеточного разрешения (E. M. C. Hillman, 2014; Attwell et al., 2010; Logothetis, 2010; Sirotin & Das, 2009; Girouard & Iadecola, 2006). Генетически-кодируемые сенсоры позволяют напрямую измерить вклад различных молекул (АТФ, лактат, глюкоза и др.) в биоэнергетические процессы мозга с клеточным разрешением в условиях *in vivo*, однако большинство из них схожи по своим спектральным характеристикам, поэтому такие измерения ограничиваются одним типом молекул.

С помощью электронной микроскопии охарактеризована и реконструирована с высокой разрешающей способностью морфология различных типов клеток и органелл, включая митохондрии, однако подготовка образцов и анализ результатов крайне трудоемки, и не позволяет дать динамическую оценку морфологических особенностей в реальном времени.

Существующие представления о морфологических и метаболических особенностях астроцитов и их связи с физиологией и поведением важно дополнить данными, полученными в условиях *in vivo* с помощью современных методов регистрации и анализа.

В данной работе мы разработали метод микроспектроскопии комбинационного рассеяния (КР), позволяющий оценить эффективность работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий астроцитов и нейронов, белково-липидный состав этих клеток и степень оксигенации

кровеносных сосудов мозга у животных при различных нагрузках в реальном времени. Мы показали различия в редокс-состоянии митохондрий астроцитов в зависимости от их внутриклеточной локализации. Также с использованием мультифотонного имиджинга и нейросетевого подхода мы охарактеризовали распределение и морфологию митохондрий в астроцитах и нейронах *in vivo*.

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

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

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

Научная новизна. С помощью разработанного нами нового методического подхода, основанного на КР-микроспектроскопии, мы установили особенности ответа дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов в ответ на функциональные нагрузки. Мы показали, что в условиях *in vivo* в

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

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

Методология и методы исследования. Для оценки морфологических и метаболических особенностей астроцитов *in vivo* были использованы мультифотонная микроскопия и конфокальная КР-микроспектроскопия идентифицированных астроцитов и нейронов соматосенсорной коры мозга мышей через краниальное прозрачное окно при использовании клеточно-специфичных аденоассоциированных вирусов (AAV), кодирующих репортерные белки с локализацией в цитоплазме или матриксе митохондрий, сенсор на пероксид водорода (HyPer7) и генетический нокдаун структурного белка листочков астроцитов эзрина. Анализ оптических изображений морфологии митохондрий и астроцитов проводили на основе нейросетевых подходов и собственных разработок. Также в работе использованы классические методики: иммуногистохимическое окрашивание, поведенческие тесты, диета с высоким содержанием жира и острая гипергликемия.

Положения, выносимые на защиту:

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

Степень достоверности данных. Результаты, представленные в данной работе, получены с использованием современных микро- и спектроскопических методов исследования в сочетании с флуоресцентными

генетически-кодируемыми конструкциями. Данные обработаны с помощью корректных методов анализа данных и статистических тестов, результаты являются воспроизводимыми и достоверными. Обсуждения основаны на данных современной литературы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science или RSCI.

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

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя А.Б. Тяглик является весомым на всех этапах исследования и заключается в изучении и анализе современной литературы по теме работы, планировании экспериментов и их проведении с использованием всех описанных методических подходов, анализе, обобщении и обсуждении результатов, написании статей и тезисов докладов, а также в представлении полученных данных на международных конференциях. Данные, полученные с помощью метода микроспектроскопии комбинационного

рассеяния при функциональной нагрузке, гипергликемии и диете с высоким содержанием жира собраны и проанализированы совместно с К.И. Морозовой.

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1.1. Метаболические потребности мозга

Мозг представляет приблизительно 2% от общей массы тела, при этом на поддержание его энергетических потребностей приходится до 20% всей произведенной энергии организма (Bonvento & Bolaños, 2021; Clarke & Sokoloff, 1999). Основные энергетические затраты в мозге происходят за счет генерации потенциалов действия и поддержания ионных градиентов через плазматическую мембрану (Bolaños, 2016). В мозге практически отсутствуют энергетические запасы, например в виде жировой ткани (Moreno & Martínez, 2002) вследствие чего, необходимо поддерживать постоянный приток энергетических субстратов и кислородоснабжения за счет организованной работы разных клеточных и внеклеточных элементов (Bonvento & Bolaños, 2021).

Самыми распространенными типами клеток мозга являются нейроны и астроциты, согласно современным данным их распределение близко к соотношению 1:1, что указывает на их ведущее значение в работе мозга и предполагает наличие тесной взаимосвязи и координации между ними (von Bartheld et al., 2016).

2.1.2. Метаболизм глюкозы в нейронах

Эволюционные исследования показали, что возникновение высшей когнитивной деятельности человека связано с высоким потреблением глюкозы и экспрессией генов энергетического метаболизма (Magistretti & Allaman, 2015). Согласно данным полученным с помощью фМРТ (функциональная магнитно-резонансная томография) и ПЭТ/КТ (позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией), глюкоза является основным энергетическим субстратом мозга (Hertz et al., 2007). Однако наличие задержки между усилением кровотока и потреблением кислорода после активации нейронов (Fox & Raichle, 1986) породило множество дискуссий на этот счет (Bolaños, 2016; Ivanov et al., 2014; Hertz et al., 2007; Pellerin et al., 2007).

Глюкоза поступает в клетки через транспортеры глюкозы (GLUT) и фосфолирируется гексокиназами до глюкоза-6-фосфата, который может быть переработан через три основные метаболические пути: гликолиз, пентозофосфатный путь (ПФФ), или накапливаться в виде гликогена в астроцитах (Magistretti & Allaman, 2015). Во время гликолиза образуются по 2 молекулы АТФ, НАДН и пирувата, последние в свою очередь поступают в митохондрии, где используются в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) и окислительном фосфорилировании (ОФ) с образованием 36 молекул АТФ, CO_2 и с поглощением кислорода. ОФ наиболее эффективный способ образования большого количества АТФ, однако перенос электронов по дыхательной цепи (электрон-транспортной цепи, ЭТЦ) приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), которые в небольшом количестве играют важную сигнальную роль, но при их избытке развивается окислительный стресс (Nolfi-Donagan et al., 2020).

Во время глутаматергической нейротрансмиссии, происходит увеличение расхода АТФ в нейронах (Almeida & Bolaños, 2001) и усиление потребления кислорода митохондриями (Bolaños, 2016; García et al., 2005; Jekabsons & Nicholls, 2004; Thompson et al., 2003), это указывает на высокую активность окислительного фосфорилирования в этих клетках (Nicholls, 2008). Однако, показатель окисления глюкозы в ЦТК нейронов очень низкий (Herrero-Mendez et al., 2009; García-Nogales et al., 2003), так же как и ее преобразование в лактат (Herrero-Mendez et al., 2009). При этом, увеличение экспрессии ферментов, стимулирующих гликолиз приводит к окислительному стрессу в нейронах и их гибели (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009).

Таким образом, предпочтительный энергетический субстрат мозга – глюкоза, неэффективно метаболизируется в нейронах за счет гликолиза. При этом в нейронах высокий уровень ОФ, и потребность большого количества АТФ этих клеток предполагает наличие других механизмов для получения энергии и подавления окислительного стресса.

2.1.3. Пентозофосфатный путь в нейронах

Ферменты пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы находятся в цитозоле клетки, этот процесс подразделяется на окислительный и неокислительный этапы. Во время окислительного, глюкоза фосфорилируется до глюкозо-6-фосфата переходит в рибулозо-5-фосфат с образованием двух восстановленных молекул НАДФН(H^+), этот кофактор играет важную роль в синтезе глутатиона, ключевой молекулы антиоксидантной системы (Bolaños, 2016; Bouzier-Sore & Bolaños, 2015; Wamelink et al., 2008). Неокислительный этап служит для образования пентоз, которые могут перейти в гексозы за счет обратимых реакций (Bolaños, 2016; Bouzier-Sore & Bolaños, 2015; Wamelink et al., 2008).

Активация глутаматергических рецепторов нейронов приводит к окислению глутатиона, это в свою очередь усиливает метаболизм глюкозы за счет ПФФ с образованием нейропротекторных молекул НАДФН(H^+) и глутатиона (Bolaños, 2016; Delgado-Esteban et al., 2000). В нейронах кортекса, экзогенный пероксид водорода (H_2O_2), также как и пероксинитрит в низких концентрациях (Bolaños, 2016; García-Nogales et al., 2003) активирует работу ПФФ, способствуя нейропротекторному эффекту за счет образования антиоксидантных молекул (Bolaños, 2016; Ben-Yoseph et al., 1996). Таким образом, нейроны предпочтительно метаболизируют глюкозу через ПФФ путь для обеспечения антиоксидантной защиты и клеточного выживания (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009; Vaughn & Deshmukh, 2008).

2.1.4. Метаболизм глюкозы в астроцитах и метаболическая поддержка нейронов

Астроциты, несмотря на свою электрическую невозбудимость, одни из самых многозадачных клеток мозга, они обеспечивают метаболическую и морфологическую поддержку нейронов, а также играют ключевую роль в нейротрансмиссии (Bolaños, 2016; Allen & Barres, 2009; Pappas et al., 1994). Так, во время глутаматергической передачи, одна из основных задач астроцитов – удаление глутамата из синаптической щели. Этот процесс осуществляется за счет натрий-зависимых транспортеров, и сопровождается высоким потреблением АТФ, необходимым для восстановления потенциала покоя на мембране благодаря работе натрий-калиевой АТФазы (Magistretti & Chatton, 2005). В условиях высокой активности нейронов, в астроцитах увеличивается захват глюкозы за счет работы специфических транспортеров (GLUT1, glucose transporter 1) (Magistretti & Chatton, 2005), при этом значительное количество митохондрий в этих клетках (Aten et al., 2022), может указывать на

доминирование окислительного метаболизма (Magistretti & Allaman, 2015; Lovatt et al., 2007; Pysh & Khan, 1972). Тем не менее, во время глутаматергической передачи, происходит ингибирование ЭТЦ астроцитов (в частности работы цитохрома *c*) за счет вторичного мессенджера оксида азота (NO), образующегося в нейронах во время нейротрансмиссии (Bolaños et al., 1994; Garthwaite et al., 1988), значительно снижая продукцию АТФ в ЭТЦ астроцитов. В таких условиях, до 90% потребляемой астроцитами глюкозы переходит в лактат за счет усиления гликолиза (Bolaños et al., 1994). В астроцитах активация гликолиза происходит и после ингибирования цианидом (ингибитор комплекса IV ЭТЦ) (Almeida et al., 2004). При добавлении NO в смешанную клеточную культуру астроцитов и нейронов происходит ингибирование работы цитохрома *c* и снижению активности ЭТЦ, что в результате приводит к апоптозу нейронов, но не астроцитов (Almeida et al., 2001; Bolaños et al., 1995). Стоит отметить, что процесс поступления пирувата в ЦТК митохондрий строго регулируется и зависит от активности фермента пируват дегидрогеназы (ПДГ). У ПДГ несколько сайтов фосфорилирования, при модификации которых активность фермента снижается (Magistretti & Allaman, 2015). В астроцитах наблюдается высокая степень фосфорилирования ПДГ и уровень экспрессии ПДГ-специфичной киназы (Magistretti & Allaman, 2015; Zhang et al., 2014; Halim et al., 2010), вследствие чего поступление пирувата в ЦТК лимитируется (Magistretti & Allaman, 2015). Таким образом, во время глутаматергической передачи в астроцитах происходит снижение ОФ на разных уровнях, и увеличение активности гликолиза, что обеспечивает выживаемость как астроцитов, так и нейронов (Bolaños, 2016; Bolaños et al., 1994).

В астроцитах утилизация глюкозы за счет гликолиза происходит в 4-5 раз эффективнее, чем в нейронах (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009). Гликолиз зависит от работы фосфофруктокиназы-1 (ФФК) и пируваткиназы

(ПК), примечательно, что активность ФФК-1 в 4 раза выше в астроцитах, чем в нейронах (Almeida et al., 2004). Транскриптомный анализ с помощью РНК-секвенирования показал, что экспрессия различных изоформ ферментов: ПК, лактат дегидрогеназы и киназы пируватдегидрогеназы значительно выше в астроцитах по сравнению с нейронами (Zhang et al., 2014). Соответственно, генетическая и молекулярная программа астроцитов обеспечивает активную работу гликолиза.

В условиях гипоксии или в случае Варбургского эффекта (аэробный гликолиз, АГ) в астроцитах пируват восстанавливается лактатдегидрогеназой до лактата (Magistretti & Allaman, 2015; Warburg, 1956). За счет аэробного гликолиза в ходе эмбрионального развития происходит продукция 30% потребляемой энергии мозгом, во взрослом возрасте АГ остается активным только в определенных областях мозга, лобных и теменных долях кортекса, где составляет до 25% общей энергопродукции (Magistretti & Allaman, 2015; Bauernfeind et al., 2014; Goyal et al., 2014). Во время глутаматергической передачи, в астроцитах увеличивается захват глюкозы, при этом поступление пирувата в ЦТК астроцитов лимитировано, вследствие чего утилизация глюкозы происходит за счет активации ключевых ферментов гликолиза в условиях АГ с образованием лактата (Magistretti & Allaman, 2015; Pellerin & Magistretti, 1994). Лактат выходит из астроцитов через астроцит-специфичные монокарбоксилатные транспортеры МСТ4 (Halestrap, 2013; Pierre & Pellerin, 2005) в пространство внеклеточного матрикса и захватывается нейрон-специфичными транспортерами МСТ2, где переходит в пируват и окисляется в митохондриях с образованием 14–17 молекул АТФ (Magistretti & Allaman, 2015), завершая полный цикл астроцит-нейрон-лактатного шаттла (АНЛШ). Астроциты накапливают гликоген в областях с высокой синаптической активностью (Pellerin & Magistretti, 2012), где гликоген

становится важным источником лактата и поддерживает работу нейронов (Pellerin et al., 2007), особенно в условиях гипогликемии (Bolaños, 2016; Brown & Ransom, 2007; Suh et al., 2007).

Помимо классической глутамат-опосредованной стимуляции АГ в астроцитах, арахидоновая кислота, норадреналин, натрий (Obel et al., 2012; Bittner et al., 2011; Ruminot et al., 2011; Hutchinson et al., 2007; Takahashi et al., 1995; Yu et al., 1993) и кальций (Horvat et al., 2021) также играют важную роль для активации этого процесса. Увеличение внутриклеточной концентрации кальция усиливает работу АГ в астроцитах, при этом повышение внутриклеточной концентрации глюкозы и лактата зависит от концентрации внеклеточной глюкозы (Horvat et al., 2021). Важно отметить, что процесс АНЛШ опосредован различными сигналами нейрональной активности, в покое, в нейронах происходит утилизация глюкозы через ПФФ путь с образованием восстановительных эквивалентов (Herrero-Mendez et al., 2009), а в астроцитах доминирует окислительный метаболизм (Magistretti & Allaman, 2015; Cahoy et al., 2008; Lovatt et al., 2007).

АНЛШ до сих пор остается одной из самых обсуждаемых гипотез в современной нейронауке, которая неоднократно подвергалась критике (Kim et al., 2025). Существующие несоответствия в литературе можно свести к нескольким аспектам. Так, ряд данных, указывает на возможность нейронов напрямую использовать глюкозу в качестве источника энергии, подвергая сомнению предположение, что именно лактат является основным энергетическим субстратом нейронов (H. Li et al., 2023; Tang, 2018). Другие исследования указывают на возможность обмена лактатом между нейронами и астроцитами, подвергая сомнению однонаправленность шаттла лактата из астроцитов в нейроны (Kim et al., 2025). Некоторые результаты компьютерного

моделирования, при симуляции энергетического метаболизма мозга, не смогли математически подтвердить гипотезу АНЛШ (Soltanzadeh et al., 2023).

Вероятно, существующие несоответствия в литературе классическому представлению о АНЛШ, можно использовать в качестве уточнения этой гипотезы для конкретных условий, и предположить, что разные типы клеток мозга действительно могут обладать определенной метаболической пластичностью. При этом классическая парадигма АНЛШ стала прочной основой развития и становления биоэнергетики мозга, и остается наиболее доказанной и связанной концепцией на настоящий момент.

Таким образом, сложный энергетический метаболизм глюкозы в мозге имеет различные способы реализации в нейронах и астроцитах, покрывая их высоко энергетические потребности, и обеспечивая субстраты для сдерживания окислительного стресса. Нейроны предпочтительно метаболизируют глюкозу через ПФФ путь для обеспечения антиоксидантной защиты и клеточного выживания (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009; Vaughn & Deshmukh, 2008), и используют лактат, полученный в ходе АНЛШ в качестве основного источника энергии для ОФ (Bolaños, 2016; Kasparov, 2016; Mächler et al., 2016). В астроцитах, в ответ на активность нейронов, происходит усиление гликолиза, при этом работа их ЭТЦ ингибируется, таким образом пируват не поступает в ЦТК, а восстанавливается до лактата в процессе АГ для обеспечения метаболической поддержки нейронов.

2.2.1. Бета-окисление жирных кислот в астроцитах

Основным энергетическим субстратом мозга считается глюкоза (Corales et al., 2024; Mergenthaler et al., 2013), однако жирные кислоты вносят меньший, но существенный вклад (Corales et al., 2024; Lebon et al., 2002; Auestad et al.,

1991; Cerdan et al., 1990; Edmond et al., 1987), который составляет приблизительно 20% (Ebert et al., 2003).

Бета-окисление жирных кислот происходит в аэробных условиях матрикса митохондрий с последовательным окислением двух атомов углерода с образованием переносчиков электронов ФАДН₂, НАДН (участвующих в работе ЭТЦ) и ключевого промежуточного метаболита ацетил-КоА, который поступает в ЦТК для продукции АТФ (Vasiljevski et al., 2018).

Жирные кислоты входят в состав фосфолипидов клеточной мембраны, а также могут накапливаться внутри клетки в виде липидных капель (ЛК) (Ioannou et al., 2019). Хранение ЖК в виде липидных капель необходимо для снижения количества свободных ЖК в цитоплазме, которые могут нарушать целостность мембраны митохондрий (Nguyen et al., 2017; Unger et al., 2010). При этом наличие запасов ЖК в виде липидных капель позволяет использовать их в качестве альтернативного источника энергии, например в условиях голодания или в период повышенной активности (Ioannou et al., 2019; Rambold et al., 2015). Нейроны, в отличие от астроцитов, в норме не накапливают ЛК, и неэффективно задействуют ЖК в митохондриальном метаболизме (Ioannou et al., 2019; Schönfeld & Reiser, 2017).

В условиях высокой активности, количество АФК в нейронах увеличивается, что может приводить к перекисному окислению липидов (ПОЛ) (Ioannou et al., 2019; Reynolds & Hastings, 1995). Без механизма обезвреживания ЖК и высокой антиоксидантной защиты, присущих астроцитам (Bélanger & Magistretti, 2009), окислительный стресс может приводить к нейродегенерации (Sultana et al., 2013).

Нейроны в период гиперактивности накапливают ЖК, включая токсичные ПОЛ-индуцированные формы (Ioannou et al., 2019). Вместо долгосрочного хранения в виде ЛК, токсичные ЖК выводятся из нейронов в виде липидных

частиц и захватываются астроцитами, где происходит формирование ЛК (Ioannou et al., 2019). Гиперактивация нейронов служит сигналом деградации ЛК в астроцитах, а свободные ЖК служат субстратом для ОФ в митохондриях (Ioannou et al., 2019). Эти процессы сопровождаются увеличением экспрессии генов, связанных с антиоксидантной защитой и энергетическим метаболизмом в астроцитах (Ioannou et al., 2019). В других работах было показано, что усиление бета-окисления ЖК в астроцитах обладает протекторным эффектом и влияет на выживаемость как нейронов, так и астроцитов (Escartin et al., 2007).

Таким образом, в условиях высокой нейрональной активности, астроциты получают токсичные ЖК от нейронов и переключаются на окислительный метаболизм за счет бета-окисления ЖК, что приводит к усилению антиоксидантной защиты (Ioannou et al., 2019) и способствует нейропротекторному эффекту (Corales et al., 2024).

2.2.2. Связь бета-окисления ЖК и особенности строения ЭТЦ астроцитов

В результате транскриптомного анализа культуры клеток нейронов и астроцитов, было показано, что количество фермента карнитин-пальмитоил трансферазы 1А (КПТ 1А), регулирующего поступление длинноцепочечной ацил-КоА в митохондрии (Jogl & Tong, 2003), существенно выше в астроцитах, чем в нейронах (Morant-Ferrando et al., 2023). На ряду с другими транскриптомными различиями генов метаболизма ЖК, можно сделать предположение, что профиль экспрессии генов в астроцитах рассчитан на эффективное окисление длинноцепочечных ЖК в митохондриях (Morant-Ferrando et al., 2023). Действительно, было показано, что эффективность продукции АТФ митохондриями астроцитов за счет бета-окисления ЖК составляет 62% (Morant-Ferrando et al., 2023).

При нарушении метаболизма ЖК, за счет генетического нокаута КППТ 1А в астроцитах, потребление длинноцепочечных ЖК снижается до 75%, при этом усиливается митохондриальное окисление пирувата без существенного изменения процесса гликолиза. Вероятно, контроль гликолиза и бета-окисления ЖК происходит независимо друг от друга, указывая на важность двух процессов и их различные роли в метаболизме астроцитов (Morant-Ferrando et al., 2023).

Снижение уровня КППТ 1А приводит к функциональной и метаболической адаптации астроцитов, а также к усилению их митохондриального дыхания. При этом эффективность клеточного дыхания не была связана с увеличением количества самих митохондрий. В экспериментах с использованием ротенона (специфичного ингибитора комплекса I ЭТЦ) было показано, что вклад комплекса I в митохондриальное дыхание существенно выше в нокаутных астроцитах. Таким образом, в норме митохондриальное окисление ЖК в астроцитах связано с менее эффективной работой ЭТЦ (Morant-Ferrando et al., 2023).

Известно, что в различных тканях, структурные элементы ЭТЦ могут собираться в суперкомплексы, от расположения комплексов ЭТЦ напрямую зависит скорость переноса электронов и эффективность митохондриального дыхания. Действительно, в митохондриях с нарушением метаболизма ЖК в астроцитах происходит значительное увеличение образования комплекса I ЭТЦ в суперкомплексы (Morant-Ferrando et al., 2023). Организация ЭТЦ в суперкомплексы влияет не только на эффективность митохондриального дыхания, но и продукцию АФК к нейронам и астроцитах (Morant-Ferrando et al., 2023; Lopez-Fabuel et al., 2016). Действительно, при нокауте КППТ 1А в астроцитах продукция пероксида водорода (H_2O_2) снижается.

Таким образом, в норме бета-окисление ЖК поддерживает разобщенную структурную организацию ЭТЦ астроцитов, что способствует образованию пероксида водорода в их митохондриях (Morant-Ferrando et al., 2023).

2.3.1. Общая организация ЭТЦ и различия ее строения в астроцитах и нейронах

ЭТЦ находится на внутренней мембране митохондрий, вблизи от митохондриального матрикса, в котором происходит ЦТК. Основными донорами электронов ЭТЦ являются НАДН и ФАДН₂, образующиеся в ходе ЦТК. В состав ЭТЦ входят 5 крупных белковых комплекса, включая комплекс I (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза), комплекс II (сукцинат дегидрогеназа), комплекс III (убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктаза), комплекс IV (цитохром *c* оксидаза) и комплекс V, известный как АТФ-синтаза и мобильные переносчики электронов, цитохром *c* и убихинон (Q). Расположение комплексов на протяжении ЭТЦ находится в порядке увеличения сродства к электрону, благодаря чему этот процесс происходит самопроизвольно и сопровождается выделением энергии, которая запускает перенос протонов в межмембранное пространство за счет работы комплексов I, III и IV. Результирующий протонный градиент используется АТФ-синтазой для создания АТФ. Также, за счет работы ЭТЦ происходит восполнение пула электронных переносчиков НАД и ФАД⁺, которые далее используются в ЦТК и гликолизе (Nelson et al., 2013; Nolfi-Donagan et al., 2020).

Сравнительный анализ структуры ЭТЦ митохондрий нейронов и астроцитов показал, что организация комплексов их дыхательной цепи значительно отличается (Lopez-Fabuel et al., 2016). В изолированных митохондриях из астроцитов и нейронов, комплекс I находится как в свободной, так и в связанной форме с комплексом III, образуя суперкомплексы. Количество

свободной фракции комплекса I ЭТЦ митохондрий астроцитов существенно выше, а связанной с комплексом III – ниже по сравнению с митохондриями нейронов (Lopez-Fabuel et al., 2016).

На функциональном уровне, увеличение свободной фракции комплекса I может быть связано с усилением продукции АФК, так как этот комплекс считается одним из основных источников образования супероксид анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) в ЭТЦ (Kussmaul & Hirst, 2006). Продукция АФК в астроцитах, содержащих высокое количество свободной фракции комплекса I значительно выше, чем в нейронах, при этом потребление кислорода в таких астроцитах было значительно ниже, чем в нейронах (Lopez-Fabuel et al., 2016).

Таким образом, организация ЭТЦ в суперкомплексы в нейронах усиливает их окислительный метаболизм и сдерживает наработку АФК, в астроцитах наблюдается противоположная картина. Разобшенная организация ЭТЦ в астроцитах согласуется с их гликолитическим типом метаболизма (Allaman et al., 2011; Herrero-Mendez et al., 2009; Almeida et al., 2004; Bouzier-Sore et al., 2003; Almeida et al., 2001; Pellerin & Magistretti, 1994) и с их высокой антиоксидантной активностью (Lopez-Fabuel et al., 2016; Fernandez-Fernandez et al., 2012; Diaz-Hernandez et al., 2005). При этом, в астроцитах отмечена высокая активность АФК-зависимого транскрипционного фактора Nrf2 (Jimenez-Blasco et al., 2015; Tebay et al., 2015), который отвечает за регуляцию экспрессии ряда антиоксидантных генов, обеспечивающих АФК защиту астроцитов и соседних нейронов (Lopez-Fabuel et al., 2016; D. A. Johnson & Johnson, 2015).

Таким образом, высокая активность бета-окисления ЖК в окислительном метаболизме митохондрий астроцитов поддерживает разобщенное строение их ЭТЦ и способствует генерации пероксида водорода.

2.3.2. Физиологическая роль редокс-состояния митохондрий астроцитов

Метаболический профиль и структурная организация ЭТЦ астроцитов и нейронов существенно различается (Lopez-Fabuel et al., 2016). Разобщенное строение комплексов астроцитарной ЭТЦ приводит к увеличенной продукции АФК в митохондриях (Lopez-Fabuel et al., 2016), однако физиологическое значение остается мало изученным (Vicente-Gutierrez et al., 2019).

При генетическом увеличении экспрессии каталазы (фермента, ускоряющего процесс разложение пероксида водорода до воды и кислорода) ассоциированной с цитохромом *c* астроцитов, продукция митохондриального H_2O_2 достоверно снижается на 25% от нормы (Vicente-Gutierrez et al., 2019). Транскриптомный анализ таких астроцитов показал, что экспрессия более 600 различных генов значительно меняется, включая гены редокс-состояния и метаболизма (Vicente-Gutierrez et al., 2019). В свою очередь изменения в экспрессии редокс-зависимых генов приводят к существенным метаболическим перестройкам астроцитов – увеличению активности пентозофатного пути и снижению гликолиза (Vicente-Gutierrez et al., 2019).

Таким образом, митохондриальный H_2O_2 в норме участвует в подавлении утилизации глюкозы за счет ПФФ, но стимулирует ее гликолиз. Также активация определенных факторов транскрипции за счет продукции H_2O_2 в митохондриях астроцитов, влияет на биосинтез и шаттл глутатиона, необходимых для поддержания антиоксидантной защиты и выживаемости нейронов (Vicente-Gutierrez et al., 2019).

На уровне поведения, снижение продукции пероксида водорода в митохондриях астроцитов отрицательно влияет на пройденный путь в тесте “Открытое поле”, время проведенное в центре арены и количество стоек, указывая на вероятное увеличение уровня тревожности у мышей и подавление исследовательской активности. При этом не было обнаружено изменений в

тесте ротарод, поэтому данные полученные в тесте “Открытое поле” не были связаны с нарушением моторной активности у мышей. Также, тест “Распознавание нового объекта” показал снижение исследовательской активности – количество подходов и время проведенное у нового объекта были достоверно ниже в группе с нарушением продукции пероксида водорода в астроцитах. Индекс распознавания предметов тоже снижался, указывая на вероятные нарушения связанные с кратковременной памятью в экспериментальной группе (Vicente-Gutierrez et al., 2019).

В альтернативной генетической модели изменения продукции H_2O_2 в митохондриях астроцитов за счет подавления окисления ЖК, было показано, что уровень как кратковременной, так и долговременной памяти нарушается, при этом не наблюдается изменений уровня моторной активности или тревожности у животных (Morant-Ferrando et al., 2023).

АФК активность астроцитарных митохондрий важна не только в нормальных условиях, но и при патологических состояниях. Так, в недавних исследованиях была показана роль АФК митохондрий астроцитов в условиях системной гипоксии *in vitro* и *in vivo* (Christie et al., 2023). Ткань мозга одна из наиболее подверженных патологическим изменениям, связанным с существенным снижением кислородоснабжения, за счет высокой метаболической активности нейронов (Christie et al., 2023; Howarth et al., 2012). Специализированные хеморецепторы кислорода располагаются на периферии, в области сонного и аортального гломуса, напрямую не способны отслеживать уровень кислорода в паренхиме мозга (Christie et al., 2023; Gourine & Funk, 2017). В мозге существует локальный механизм детекции уровня кислорода, который осуществляет контроль вазодилатации кровеносных сосудов мозга для увеличения притока крови в условиях гипоксии (Christie et al., 2023). Астроциты единственные клетки в ЦНС, которые физически связаны

концевыми ножками с кровеносными сосудами, и покрывают практически все сосуды паренхимы мозга и выделяют вазодилатирующие сигнальные молекулы (Christie et al., 2023; Attwell et al., 2010; Gordon et al., 2008).

В экспериментах в условиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что астроциты вырабатывают оксид азота (NO), который является эффективным вазодилататором. Ингибирование комплексов ЭТЦ митохондрий снижает генерацию NO в астроцитах в условиях гипоксии. При этом, в астроцитах обнаружена высокая экспрессия митохондриального фермента сульфид оксидазы, который катализирует восстановление нитрита. При генетическом нокадауне этого фермента, происходит снижение продукции NO астроцитами и вазодилатации в ответ на системную гипоксию (Christie et al., 2023).

Таким образом, митохондрии астроцитов, расположенные в концевых ножках, играют роль локальных сенсоров кислорода. За счет активности фермента сульфид оксидазы и разобщенной ЭТЦ, в которой происходит накопление электронов, создаются необходимые условия для восстановления нитрита до оксида азота в условиях гипоксии, высвобождение которого сопровождается вазодилатацией сосудов для усиления кровотока (Christie et al., 2023).

Можно заключить что редокс-состояние и продукция АФК митохондриями астроцитов играет важную роль в норме и при патологических условиях. Редокс сигнализация астроцитов оказывает влияние на разных уровнях организации, начиная от экспрессии генов, настройки метаболических каскадов, контроля кровеносных сосудов, и заканчивая процессами обучения и памяти.

2.4.1. Морфологические особенности и динамическая реорганизация сети митохондрий

Структурная организация ЭТЦ митохондрий играет важную роль в эффективности окислительного фосфолирования и регуляции продукции АФК, что во многом определяет тип метаболизма и редокс-статус разных типов клеток. При этом, физиологическое значение распределения и морфологических особенностей этих органелл внутри клетки остается малоизученным.

Митохондрии играют важную роль в работе большинства типов клеток, обеспечивая продукцию АТФ и АФК, и осуществляя контроль кальциевой сигнализации. Помимо центральной роли в нормальной физиологии клетки, в условиях стресса и при патологических воздействиях, митохондрии могут запускать программу апоптоза и некроза клеток (McCarron et al., 2013; Narayanan et al., 2010; Chalmers et al., 2007; Hajnóczky et al., 1999).

Митохондрии ограничены двумя мембранами, которые подразделяют эти органеллы на 4 отдельных компартмента – внешняя мембрана, межмембранное пространство, внутренняя мембрана, и матрикс, каждый из которых имеет определенное функциональное значение. Внешняя мембрана содержит порины, каналы которые обеспечивают свободную диффузию различных молекул между внешней и внутренней мембраной митохондрий. В межмембранном пространстве находятся белки (например, цитохром *c*), отвечающие за энергетическое состояние митохондрий и запуск апоптоза. Внутренняя мембрана митохондрий, в отличие от внешней, практически непроницаема для разных молекул, активный транспорт через нее происходит за счет специфических транспортеров. Белковая композиция внутренней мембраны составляет до 20% от всего белкового состава митохондрий, и содержит транспортеры белков в матрикс митохондрий и ферментные комплексы ЭТЦ. В

матриксе митохондрий находятся большинство ферментов обеспечивающих реакции ЦТК (McCarron et al., 2013).

Многочисленные данные электронной микроскопии (ЭМ) о морфологических фенотипах митохондрий в разных типах клеток, свидетельствуют о высоком уровне гетерогенности меж- и внутри-клеточного характера, которые могут быть овальной или палочковидной формы (Dai et al., 2005; Taggart & Wray, 1998; Nixon et al., 1994; Devine et al., 1972), или представлять разветвленную сеть (Shenouda et al., 2011), и располагаться в разных участках цитоплазмы клеток (McCarron et al., 2013). Не смотря на то что высокое разрешение ЭМ позволило в деталях исследовать морфологические особенности митохондрий, стоит отметить что ЭМ изображения показывают отдельно взятый “стоп-кадр” распределения митохондрий и не отражают всю динамическую картину (McCarron et al., 2013).

Несмотря на наличие взаимосвязанной митохондриальной сети, зачастую митохондрии не связаны между собой электрически (Chalmers & McCarron, 2008; Collins et al., 2002). Скорее, мембранный потенциал каждой митохондрии изменяется независимо друг от друга (McCarron et al., 2013; Chalmers, Caldwell, et al., 2012; Avlonitis et al., 2009; Chalmers & McCarron, 2008; O'Reilly et al., 2004, 2003), вероятно это указывает на то, что матриксы отдельных митохондрий структурно не связаны между собой (McCarron et al., 2013).

Существует предположение, что небольшие митохондрии связаны с менее активным окислительным метаболизмом, и характерны для покоящихся клеток (в стадии не активного деления) (Westermann, 2012; Mitra et al., 2009), при этом считается, что наличие митохондриальной сети скорее связано с высокой степенью клеточного дыхания за счет слияния содержимого митохондрий (McCarron et al., 2013; Westermann, 2012; Mitra et al., 2009).

У млекопитающих, митохондриальные сети скорее встречаются в культуре клеток, в естественных условиях клетки с высоким потреблением энергии (гладкомышечной мускулатуры, кардиомиоциты) содержат овальные или палочковидные митохондрии, возможно за счет отдельных митохондрий увеличивается площадь поверхности каждой органеллы, усиливая обмен метаболитов (McCarron et al., 2013). Представление, что наличие митохондриальной сети связано только с более энергетически-активными типами клеток, контрастирует с данными полученными на одном типе ткани, где митохондрии из разрозненных органелл перестраиваются в соединенную сеть в зависимости от стадии деления клеток (McCarron et al., 2013; Mitra et al., 2009).

Вероятнее, что морфология митохондрий отражает не метаболический профиль клетки, а более скоротечные процессы связанные с кальциевой или АФК-сигнализацией, или процессами биосинтеза. Изменение степени связанности митохондриальной сети в культуре клеток показало, что вход кальция происходит в ее определенных областях, а его концентрация увеличивается по ходу перемещения внутри сети. При разобщении митохондриальной сети, захват кальция остается локализованным, также как и диффузия и увеличение его концентрации (McCarron et al., 2013; Szabadkai et al., 2004).

Помимо морфологических особенностей, считается что митохондрии способны активно перемещаться по цитоскелету клетки за счет кинезин-зависимых моторных белков, однако большинство данных получено на клеточных культурах, в естественных условиях такое перемещение происходит крайне редко (McCarron et al., 2013), или совершенно отсутствует (Chalmers, Saunter, et al., 2012; Beraud et al., 2009). Скорее происходят небольшие изменения в виде Броуновского движения, что практически не влияет на

физическое положения митохондрий (McCarron et al., 2013; Chalmers, Saunter, et al., 2012; Beraud et al., 2009).

Однако, стоит отметить что активное перемещение митохондрий может происходить в ходе роста и развития клеток, например в развивающихся нейронах (Z. Li et al., 2004; Morris & Hollenbeck, 1993) или в культуре клеток, активно делящихся васкулярных миоцитов (Chalmers, Saunter, et al., 2012), что вероятно указывает на связь мобильности митохондрий и процесса активного деления клеток (McCarron et al., 2013).

Перемещение митохондрий связано со слиянием и расщеплением (fusion-fission), которые часто встречаются в клеточных культурах, но практически отсутствуют в естественных условиях (McCarron et al., 2013; Das et al., 2012). При этом сложно полностью исключать вероятность этих процессов, потому что они могут активно происходить, при этом общая картина морфологического распределения и локализации митохондрий может визуально не меняться. Было показано что в клетках скелетной мускулатуры, зеленый флуоресцентный белок (green fluorescence protein, GFP) экспрессированный в матриксе митохондрий, перемещается между разными митохондриями, при этом изменение общей морфологии и движение митохондрий не были зарегистрированы (McCarron et al., 2013; Pham et al., 2012).

Недавно, была проведена 3D реконструкция особенностей клеточной и внутриклеточной морфологии трех астроцитов гиппокампа с прилежащими отростками нейронов с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (ЭМ). Авторы показали, что разветвленная сеть митохондрий в астроцитах характерна практически для всех компартментов клетки, включая сому, веточки и концевые ножки, при этом в листочках, митохондрий практически не было обнаружено (Aten et al., 2022; Aboufares El Alaoui et al., 2020; Gavrilov et al., 2018; Patrushev et al., 2013). В данном клеточном

компарimente находятся другие субклеточные элементы, включая эндоплазматический ретикулум, везикулярно-подобные структуры и гранулы гликогена, что вероятно указывает на особенности метаболизма и сигнальной роли листочков, требующие дальнейших исследований (Aten et al., 2022). Примечательно, что общий объем и количество митохондрий в исследуемых астроцитах и отростках нейронов достоверно не различался (Aten et al., 2022), с учетом меньшего вклада ОФ в метаболизм астроцитов, можно предположить, что митохондрии имеют не только метаболическое значение, но и важную сигнальную роль за счет продукции АФК. Авторы отмечают, что вследствие химической подготовки образцов для проведения ЭМ, происходит усыхание тканей мозга за счет существенного уменьшения вклада внеклеточного матрикса до 1-2%, который в норме составляет 20% от общего объема мозга (Aten et al., 2022; Tønnesen et al., 2018; Korogod et al., 2015; H. Hillman & Deutsch, 1978; Kalimo, 1976), поэтому реальное распределение органелл, а также клеточная и субклеточная морфология могут существенно отличаться от *in vivo* условий.

Таким образом, на данный момент большинство данных о морфологических особенностях, перемещении и процессах расщепления-слияния митохондрий получены на клеточных культурах или в условиях *ex vivo*, которые существенно отличаются от немногочисленных данных зарегистрированных в условиях *in vivo* (McCarron et al., 2013). Представления о морфологических и динамических особенностях митохондрий и их связи с физиологией, типом метаболизма и влиянием на клеточную сигнализацию и редокс-состояние клеток важно дополнить данными, полученными в условиях *in vivo* с помощью современных методов регистрации и анализа.

2.4.2. Морфологические особенности астроцитов, обеспечивающие локальную метаболическую поддержку нейронов на уровне синапса

Наибольшие энергозатраты в нейронах необходимы для осуществления нейротрансмиссии, которая происходит на уровне синапса (Magistretti & Allaman, 2015; Harris et al., 2012). Наряду с генерацией постсинаптических потенциалов, процессы пресинаптического захвата и переработки везикул с нейромедиаторами, также являются высоко энергозатратными (Magistretti & Allaman, 2015; Rangaraju et al., 2014). Расположение синапсов вдали от основной молекулярной машины клетки – сомы, предполагает наличие локальных механизмов и морфологических адаптаций для доставки необходимых нутриентов и метаболитов необходимых для пре- и постсинаптических процессов (Magistretti & Allaman, 2015).

Многочисленные данные световой и электронной микроскопии позволили охарактеризовать детальное строение астроцитов, особенности которых позволяют осуществлять контроль и мониторинг синаптической активности и регуляцию диаметра кровеносных сосудов, поставляющих кислород и питательные вещества в ткани мозга (Magistretti & Allaman, 2015). Астроциты состоят из следующих основных морфологических компартментов: сомы, и ряда высоко специализированных отростков – крупных веточек, которые заканчиваются мелкими листочками и концевых ножек (КН) (Magistretti & Allaman, 2015; Sofroniew & Vinters, 2010; Nedergaard et al., 2003; Bushong et al., 2002). Концевые ножки практически полностью покрывают поверхность капилляров (Simard et al., 2003; Kacem et al., 1998), оставляя зазор в 20 нм (Magistretti & Allaman, 2015; Mathiisen et al., 2010). За счет наличия аквапориновых пор и 20 нм зазоров, обеспечивается транспорт растворимых веществ через КН в интерстиций мозга. Вывод растворенных веществ из мозга

происходит через околососудистый дренаж в спинномозговую жидкость за счет работы лимфатической системы (Magistretti & Allaman, 2015; Iliff et al., 2012).

На уровне синапса, астроцитарные листочки охватывают пространство синаптической щели и обладают высокой морфологической пластичностью, их структурная реорганизация тесно связана с нейрональной активностью (Magistretti & Allaman, 2015; Genoud et al., 2006). Морфологическое и молекулярное строение астроцита существенно различается в зависимости от его функционального компартмента. Классический молекулярный маркер астроцитов – глиальный кислый белок (glial fibrillary acid protein, GFAP), является структурным элементом цитоскелета, и основой крупных отростков – веточек. Уровень экспрессии GFAP зависит от типа астроцитов, их функционального состояния (например, реактивные формы астроцитов) и области мозга (Oberheim et al., 2006; Nixdorf-Bergweiler et al., 1994). Веточки, заканчиваются астроцитарными листочками, очень тонкими и маленькими отростками, размер которых находится за пределами оптического разрешения (Toman et al., 2023; Semyanov & Verkhratsky, 2021), в среднем их ширина составляет меньше 100 нм (Toman et al., 2023; Gavrilov et al., 2018), при этом листочки составляют до 70–80% от всей площади поверхности астроцита (Derouiche & Geiger, 2019).

Основным молекулярным маркером листочков является белок эзрин, который входит в семейство ЭРМ (эзрин-радиксин-моэзин), они обеспечивают структурную связь клеточной мембраны с актиновым цитоскелетом (Persson et al., 2010; Derouiche & Frotscher, 2001; Bretscher, 1999). В астроцитах, эзрин вовлечен в процессы реорганизации и подвижности листочков, которые регулируются глутаматергической нейротрансдукцией за счет активации глиальных метаботропных рецепторов глутамата 3 и 5 типа (metabotropic glutamate

receptors, mGluRs), однако точный молекулярный механизм остается мало изученным (Semyanov & Verkhratsky, 2021; Derouiche & Geiger, 2019; Derouiche & Frotscher, 2001). Недавно было показано, что подавление экспрессии эзрина с помощью генетического нокдауна приводит к увеличению расстояния между астроцитарными и нейрональными отростками в области синапса, и к снижению концентрации глутамата внутри синапса, увеличивая его внесинаптическую диффузию (Badia-Soteras et al., 2023; Zhou et al., 2019). На поведенческом уровне, происходит снижение когнитивных способностей в тесте на социальное взаимодействие (Zhou et al., 2019), при этом в тесте условно-рефлекторного замирания снижение уровня эзрина связано с ухудшением степени запоминания отрицательного контекста (Badia-Soteras et al., 2023). Вероятно, количество эзрина и его нормальная работа поддерживает динамическую реорганизацию листочков астроцитов и оказывает дифференциальное влияние на различные типы поведения и формирование памяти. Известно, что в ходе старения количество эзрина снижается естественным образом (Chen et al., 2024; Popov et al., 2023) и может быть связано с ухудшением когнитивных способностей. Увеличение количества эзрина у старых мышей восстанавливает размер астроцитарного домена и когнитивные функции (Chen et al., 2024).

Таким образом, нормальное распределение белка эзрина в листочках астроцитов, обеспечивает их структурную реорганизацию для поддержания нормальной работы синапсов, что в свою очередь играет ведущую роль в процессах обучения и памяти.

2.5. Изучение редокс-состояния клеток мозга

Согласно, современным данным реконструкции ЭМ изображений в 3D, распределение и объем занимаемый митохондриями в нейронах и астроцитах

практически не отличается (Aten et al., 2022). При этом функциональная роль этих клеток и их метаболический профиль существенно различаются (Magistretti & Allaman, 2015). Детальный анализ данных структурной и молекулярной биологии показал, что вероятно тип организации ЭТЦ митохондрий в астроцитах и нейронах играет ведущую роль в метаболической и физиологической идентичности этих клеток (Morant-Ferrando et al., 2023; Lopez-Fabuel et al., 2016).

Классические подходы изучения активности митохондрий основаны на *in vitro* аналитических системах, с возможностью контроля энергетических субстратов, газовой смеси и фармакологического воздействия на разные комплексы ЭТЦ. В таких экспериментах зачастую используются либо иммобилизованные клетки, суспензия ткани или отдельно выделенные митохондрии (Coulson et al., 2024). *In vitro* эксперименты позволяют оценить продукцию АТФ, АФК, потребление кислорода, мембранный потенциал митохондрий и захват кальция (Coulson et al., 2024). *In vitro* исследования позволили существенно продвинутся в расшифровке молекулярных и метаболических каскадов, проводить фармакологические скрининги и воздействия, которые зачастую совершенно невозможно этически и технически проводить в условиях *in vivo*.

Мозг один из самых сложных органов, который состоит из различных глиальных (астроциты, микроглия, олигодендроциты) и нейрональных (интернейроны, сенсорные, моторные и пирамидальные нейроны) типов клеток и внеклеточных элементов (внеклеточных матрикс, лимфатическая система, кровеносные сосуды), взаимосвязанная работа которых обеспечивает высшую нервную деятельность (Semyanov & Verkhatsky, 2021). Данная концепция известна под названием “активная среда мозга”, согласно которой нейрональные исследования важно проводить не только в изолированных

системах, но и *in vivo* условиях, где представлены все типы взаимодействия клеточного и внеклеточного характера (Semyanov & Verkhatsky, 2021).

До недавнего времени не существовало подходов, позволяющих оценить работу ЭТЦ в живом мозге. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), известная в зарубежной литературе как спектроскопия рамановского рассеяния (Raman scattering), может внести существенный вклад в развитие исследований ЭТЦ в живых системах.

Спектроскопия КР основана на физическом явлении неэластичного рассеяния, при котором происходит изменение частоты света, рассеянного многоатомными молекулами (Рис. 1). Эффект КР может наблюдаться только в случае, если происходит частичный взаимообмен энергии между приходящим фотоном света и рассеивающей молекулой вещества. При увеличении или снижении энергии фотона света после взаимодействия с молекулой вещества, говорят о стоксовом или антистоксовом КР, соответственно (Рис. 1) (Robert, 2009).

Неэластичное КР очень слабый эффект, с разницей в 6-10 порядков по сравнению с эластичным (Рэлеевским) рассеянием, это означает, что для работы с таким сигналом необходимы сложные, хорошо подобранные оптические фильтры и чувствительные системы детекции, которые позволяют зарегистрировать слабый сигнал среди шума (Vlasov et al., 2020).

Важно отметить, что существует модификация классического КР – резонансное КР (РКР) (Рис. 1). Интенсивность регистрируемого сигнала КР увеличивается до 6 порядков, если энергия фотонов приходящего света соответствует энергии электронного перехода молекулы вещества (Vlasov et al., 2020). Благодаря РКР можно зарегистрировать сигнал от специфических молекул в многокомпонентной среде, этот метод широко используется в биологических образцах, например для регистрации гемсодержащих белков,

концентрация которых значительно меньше по сравнению с другими молекулами (Brazhe et al., 2012; Robert, 2009).

Гемсодержащие цитохромы ЭТЦ обладают интенсивным КР сигналом, который зависит от редокс состояния гема (Brazhe et al., 2012; Berezhna et al., 2003; Adar & Erecinska, 1977; Adar & Erecińska, 1974). Редокс статус комплексов ЭТЦ зависит от скорости продукции АТФ, наличия O_2 , посттрансляционных модификаций, мутаций или степени повреждения белков ЭТЦ (Brazhe et al., 2012; Murphy, 2009).

Комбинация КР спектрометра с конфокальной оптической системой дала начало развития КР микроспектроскопии, которая позволяет зарегистрировать КР спектры и КР изображения (карты) биологических образцов в условиях *ex vivo*, *in vitro*, *in vivo*, с объектив-зависимым латеральным разрешением и z-разрешением меньше 1 мкм. Такой подход позволяет оценить на клеточном и субклеточном уровне, КР сигналы молекул, находящихся в области регистрации без дополнительного окрашивания исследуемых молекул (Kostyuk et al., 2024).

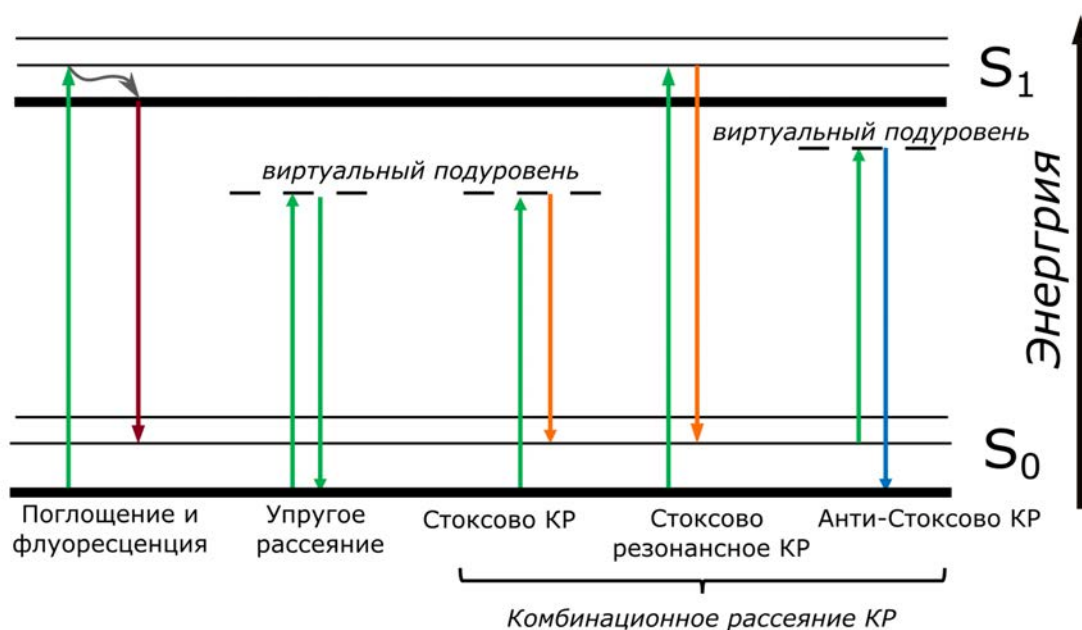


Рисунок 1. Диаграмма Яблонского, демонстрирует разные типы взаимодействия света с веществом. Рассеяние света может быть упругим, без изменения энергии рассеянного света и молекулы, или неупругим, или комбинационным рассеянием, приводящим к уменьшению или увеличению энергии рассеянного фотона (стоксово или антистоксово комбинационное рассеяние, соответственно). При резонансном комбинационном рассеянии возбуждающий фотон поглощается и затем рассеивается. Адаптировано из (Kostyuk et al., 2024).

Таким образом, КР микроспектроскопия быстро развивающийся метод регистрации редокс-состояния клеток и тканей, позволяющий с высокой точностью оценить молекулярный состав, без дополнительного окрашивания, а также зарегистрировать в одном спектре сигнал от различного типа биологических молекул. Это позволит значительным образом дополнить существующие знания о энергетическом метаболизме мозга, редокс-состоянии разных клеток, и их динамические изменения в реальном времени, в норме и при патологии (Kostyuk et al., 2024).

Заключение

Таким образом метаболическая и редокс кооперация между нейронами и астроцитами лежит в основе биоэнергетики мозга и играет ведущую роль в его нормальной работе. Молекулярная и морфологическая настройка астроцитов обеспечивает эффективную работу нейронов за счет астроцит-нейрон-лактатного шаттла. Для поддержания высокой активности окислительного фосфорилирования в нейронах, астроциты перенаправляют метаболизм глюкозы для продукции лактата, который обеспечивает нейроны энергией. При этом ЭТЦ астроцитов настроена на окисление ЖК и продукцию

АФК в качестве сигнальных молекул. Не смотря на то, что нейроны, обеспечены антиоксидантной защитой со стороны астроцитов, утилизация глюкозы в этих клетках идет через пентозофосфатный путь, который поддерживает необходимый пул глутатиона подавляющий окислительный стресс, связанный с активными процессами ОФ. Существующие данные о морфологических особенностях митохондрий и редокс-состоянии их ЭТЦ практически отсутствуют в *in vivo* условиях, в связи с чем существует необходимость развития новых подходов для оценки эффективности метаболизма в живом мозге. В этом ключе развитие КР микроспектроскопии является одним из наиболее перспективных направлений.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1.1. Животные

В работе был использован специализированный виварий, оснащенный современным оборудованием для содержания животных в конвенциональном и барьерном отделении на базе ГНЦ ИБХ РАН. Сотрудники вивария, в состав которых входит ветеринарный врач, осуществляли уход за животными и контроль состояния их здоровья. Вся экспериментальная работа с животными выполнялась в соответствии с указаниями институтской комиссии по контролю за содержанием и использование лабораторных животных, (IACUC, Institutional animal care and use committee), которая руководствуется Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных исследований или в иных научных целях (ETS №123 от 18.03.1986 г). Все манипуляции в рамках данной работы проводились согласно утвержденному комиссией протоколу по работе с животными № 353 от 27.09.2022. При разработке данного протокола, мы руководствовались этическим принципом “3R” и Директивой Европейского парламента и Совета

Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 о защите животных, использующихся для научных целей. Эксперименты были распланированы таким образом, чтобы значительно минимизировать количество используемых животных в каждом эксперименте.

Для экспериментов использовались мыши линии C57BL/6 (обоих полов, в возрасте 2-12 месяцев). Все мыши содержались в группах по 2-3 животных, на 12-часовом ночь/день (инвертированном) цикле, эксперименты проводили в течение дня, то есть в активной фазе животных. Мышам предоставлялся доступ к стандартному лабораторному корму и питьевой воде *ad libitum*, за исключение специализированных диет (гипергликемия и диета с высоким содержанием жира). Автор работы прошла курс повышения квалификации для лиц, осуществляющих манипуляции на лабораторных мышах и крысах, разработанный в соответствии с требованиями FELASA (сертификат RL A № 83/21, выдан 27.03.2021).

3.1.2. Диета с высоким содержание жира (High fat diet, HFD)

Мыши линии C57BL/6 были разделены случайным образом на контрольную и HFD группы. Группа HFD получала обогащенную жиром пищу (SNIFF, Германия, Таблица 1), а контрольные животные получали стандартный корм, за 1 месяц до начала проведения экспериментов. Проводился регулярный контроль веса животных, чтобы отслеживать изменения, связанные с диетой. Обе группы имели неограниченный доступ к пище и воде.

Состав	Контроль HFD	
Белки	17.3%	21%
Жиры	5.1%	30.7%
Пищевые волокна	5%	5%
Зола	3.9%	5.4%
Крахмал	38.5%	16.3%
Сахар	11 %	16.9%
Прочее	19.2%	4.7%

Таблица 1. Содержание питательных веществ в стандартном (контроль) и HFD корме.

3.1.3. Индукция гипергликемии у мышей

Кратковременное повышение уровня сахара в крови происходило за счет внутрибрюшинной инъекции глюкозы в соответствии с протоколом, описанным в (Hu et al., 2019). Сначала, животные находились без доступа к стандартному корму, но без ограничения питьевой воды в течение 18-24 ч до начала эксперимента. Для индукции гипергликемии мышам внутрибрюшинно вводили раствор стерильной глюкозы (4.0 г/кг). Контрольной группе вводили равный объем стерильного физ. раствора. Уровень глюкозы измеряли с помощью медицинского глюкометра в образцах крови из хвостовой вены в конце эксперимента, примерно через 60 мин после инъекции глюкозы или NaCl,

который составил 22.5 ± 2.8 мМ и 14.9 ± 1.3 мМ (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка) после инъекции глюкозы или NaCl, соответственно.

3.1.4. Стереотаксическое введение вируса в область соматосенсорной коры и имплантация краниального окна

Мышей анестезировали смесью кислорода и изофлурана (1-1.5%) и помещали в стереотаксическую установку (RWD, Китай). Кожу головы обрабатывали раствором 70% этилового спирта и 3% хлоргексидина, далее подкожно вводили новокаин (5 мг/мл) для местной анестезии. Кожу головы удаляли, чтобы обнажить кости черепа и определить координаты области интереса – проекции передней лапы области соматосенсорной коры S1 (AP -2.3, ML +0.5), которые были подобраны с помощью атласа мозга мышей (Paxinos & Franklin, 2004). Перед проведением краниотомии, поверхность черепа тщательно подготавливали, делали насечки, обезжиривали и покрывали тонким слоем цианкрилатного клея (Cosmofen Ca-12, Германия), чтобы в будущем обеспечить хорошее сцепление с краниальным стеклом и металлическим креплением для хронической регистрации. После полного высыхания клея, проводили 3-миллиметровую краниотомию над областью S1 с помощью стоматологического сверла (RWD, Китай). После краниотомии, поверхность мозга закрывали с помощью гемостатической губки, смоченной стерильным физ. раствором, чтобы предотвратить высыхание поверхности мозга, и возможное кровотечение. Далее проводили инъекцию аденоассоциированных вирусов (AAV) (Таблица 2). Для этого использовали стеклянный капилляр, рассчитанный на 5 мкл (Drummond, США), который был подготовлен с помощью пуллера микрокапилляров (Sutter instrument, США) таким образом, чтобы кончик капилляра был достаточно длинным и тонким, это позволяет

минимизировать повреждение мозга при вводе вируса. Инъекцию вирусного вектора с общим объемом 1 мкл осуществляли в трех точках, на разной глубине, чтобы обеспечить равномерное распределение и экспрессию вирусных частиц в области интереса (Таблица 2). После погружения капилляра в координаты нижней точки, его оставляли на месте в течение 5 мин, чтобы обеспечить диффузию вирусного вектора, а затем медленно поднимали, последовательно вводя содержимое капилляра. Вирусные векторы были получены в Центре наработки вирусных векторов ГНЦ ИБХ РАН. После инъекции вируса место краниотомии накрывали круглым покровным стеклом диаметром 5 мм (Thomas Scientific, США), и герметично фиксировали с помощью цианакрилатного клея. После полного высыхания клея, над областью краниального окна фиксировали металлическое крепление к черепу животного смесью стоматологического цемента (Simplex Rapid Powder, Kemdent, Великобритания) и цианакрилатного клея. Сразу после операции и на следующие сутки (и далее по мере необходимости), проводили послеоперационную анестезию с помощью внутрибрюшинной инъекции мелоксикама (1.5 мг/кг). Все экспериментальные процедуры начинались после полного восстановления животных, минимум через 4 недели после операции (Рис.2).

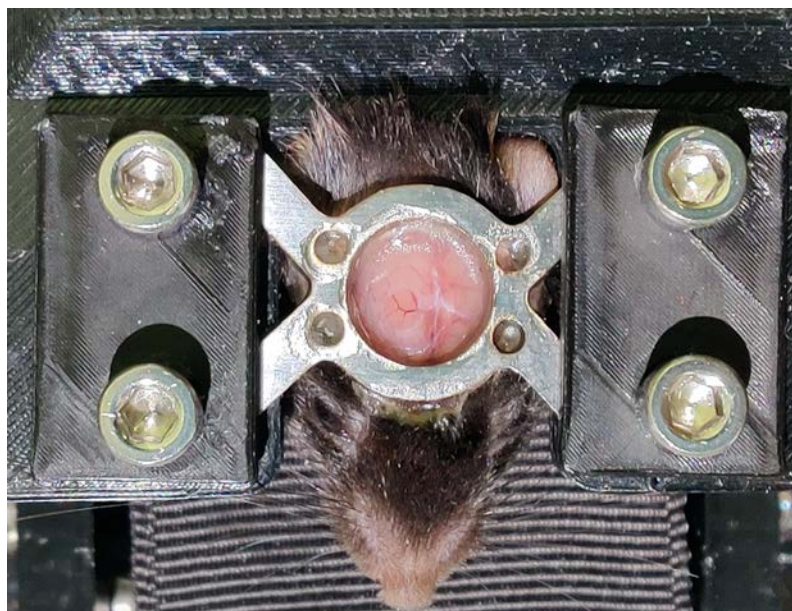


Рисунок 2. Фотография животного после полного пост-операционного 4-недельного восстановления перед началом эксперимента, зафиксированного за голову с помощью металлического крепления в установке “беговая дорожка”.

Название вируса	Титр, вир.ген./мл	Координаты, мм	Эксперимент
AAV-PHP.B-hSyn-NirFP	5.1e12	AP -2.3, ML +0.5, DV -0.8, -0.6, -0.4, -0.2	Идентификация нейронов КР- микроспектроскопия
AAV.PHP.B-gfaABC1D -eGFP	2.42e11	AP -2.3, ML +0.5, DV -0.8, -0.6, -0.4, -0.2	Идентификация астроцитов КР- микроспектроскопия
AAV9-hSyn-HyPer7-mito	1.2e12	AP -2.3, ML +0.5, DV -0.8, -0.5, -0.2	Мониторинг продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий нейронов и морфологический имиджинг митохондрий
AAV9-GFAP-HyPer7-mito	5.6e11	AP -2.3, ML +0.5, DV -0.4, -0.2, -0.1	Мониторинг продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий астроцитов и морфологический имиджинг митохондрий
AAV8-gfaABC1D-miRNAi (Ezrin)-BFP-WPRE-SV40	4.07e12	AP = -1.94, ML = -/+1.5,	Снижение количества структурного белка

		DV = -1.30	эзрина листочков астроцитов
AAV8-gfaABC1D-BFP- miRNAi(NC)-WPRE- bGHpA	5.18e12	AP = -1.94, ML = -/+1.5, DV = -1.30	Контроль снижения количества структурного белка эзрина листочков астроцитов

Таблица 2. Список вирусных векторов, использованных в работе со значением титров, координат инъекции и соответствующим названием эксперимента.

3.1.5. Стереотаксическое введение вируса в гиппокамп

Мышей подготавливали к стереотаксической операции, согласно выше описанному протоколу, но кожу головы не удаляли, а делали продольный разрез с помощью медицинского скальпеля. Проводили билатеральную краниотомию над областью поля CA1 диаметром 0.5 мм и вводили вирусные частицы на три разные глубины (Таблица 2). После инъекции вирусных частиц, отверстия краниотомии закрывали биосовместимым двухкомпонентным силиконом (Kwik-Sil, США), для того чтобы защитить поверхность мозга. Кожу головы заклеивали с помощью медицинского клея в месте разреза. Эксперименты проводили после полного восстановления и достаточной экспрессии вирусов, через 4 недели после операции

3.2.1. Приучение животных к экспериментальным установкам для хронической регистрации флуоресценции или КР-спектров

Перед началом экспериментов проводили процедуру хендлинга – приучения мышей к рукам экспериментатора. Для этого в течение последовательных нескольких дней взаимодействовали с животными, использовали одни и те же перчатки, лабораторный халат, средства личной гигиены, для того чтобы животные привыкли к разным запахам и тактильным ощущениям, голосу экспериментатора. В процессе хендлинга и для обогащения среды, использовали картонные тубусы, это позволяет ускорить и облегчить процесс приучения к рукам. Животные привыкают к таким тубусам в течение 1-2 дней, спокойно забегают в них, в этот момент животное можно аккуратно поднять и постепенно приучить переходить из тубуса на руки экспериментатора. После успешного приучения к рукам (когда животное не пытается выпрыгнуть или спрятаться, зарыться в подстил), этот этап хендлинга завершался. Животных приучали к закреплению за голову, для этого их аккуратно фиксировали за холку и придерживали хвост. За 30 мин перед каждой экспериментальной сессией животных приносили в их домашних клетках в экспериментальную комнату для акклиматизации. Приучение к перемещению на беговой дорожке происходило в течение нескольких сессий ознакомления с установкой, когда мышь закрепляли с помощью металлического крепления, расположенного на черепе к специальному держателю беговой дорожки. Так животное было зафиксировано за голову под объективом прибора, при этом оно могло перемещаться на ленте беговой дорожки, и совершать груминг.

3.2.2. Регистрация КР спектров на беговой дорожке

Все эксперименты проводились с 11:00 до 18:00. Перед экспериментами мышей приучали к беговой дорожке и помещали на моторизованный сканирующий стол КР-микроспектрометра (Рис. 3, 4). Беговую дорожку

очищали после каждой экспериментальной сессии, используя 70% этанол и дистиллированную воду, чтобы удалить посторонние запахи. Экспериментальные сессии не превышали 1-2 часов для каждой мыши. Все эксперименты сопровождались видеозаписью поведения, которая осуществлялась с помощью 1.3-мегапиксельной USB-камеры ELP (Shenzhen Ailipu Technology Co., Ltd, Китай) со скоростью 20 кадров в секунду. Видеофайлы использовались для поведенческой сегментации с помощью некоммерческой программы с открытым исходным кодом BORIS (Friard & Gamba, 2016). КР спектры кровеносных сосудов, астроцитов и нейронов регистрировались во время состояния покоя, стимулированной локомоции и постлокомоционного покоя. Стимулированная локомоция вызывалась бегом по ленте беговой дорожки со скоростью 15 см/с.

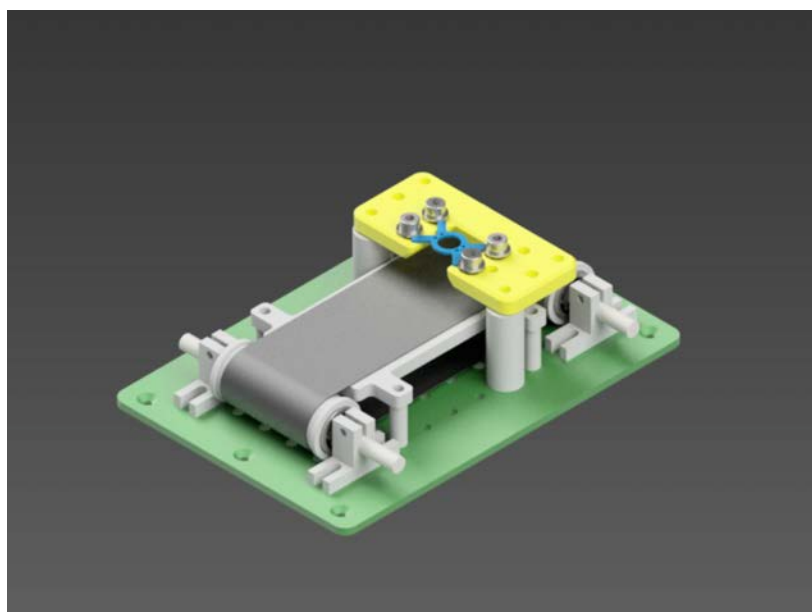


Рисунок 3. 3D модель модифицированной беговой дорожки на основе дизайна (<https://doi.org/10.25378/janelia.24691311>) для хронической регистрации КР спектров, зеленым цветом выделена платформа, которая монтируется внутри сканирующего стола КР-микроспектрометра Renishaw.

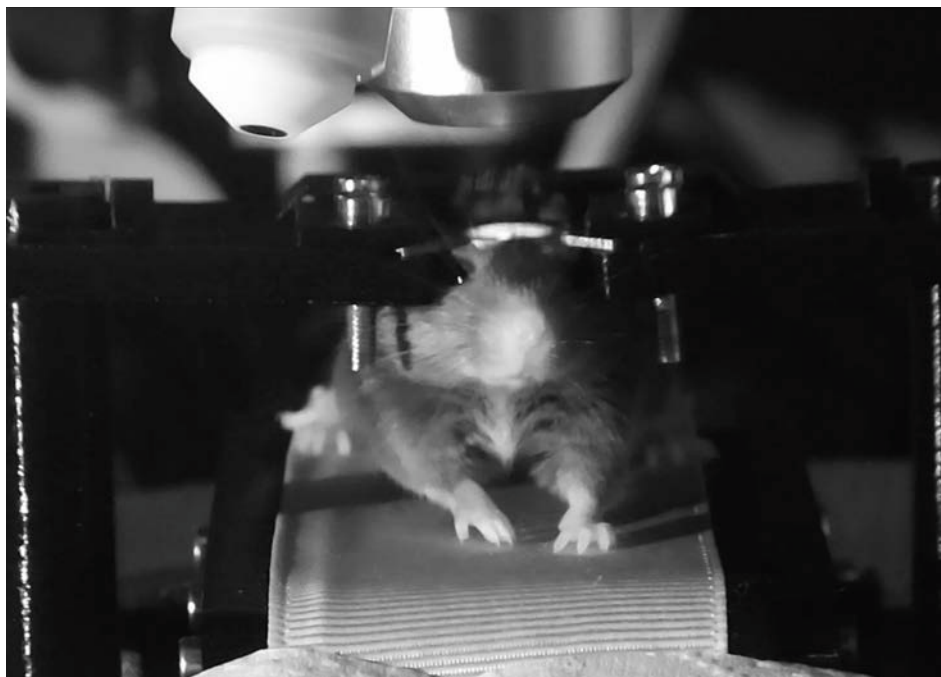


Рисунок 4. “Стоп-кадр” поведенческого видео, записанного во время эксперимента на беговой дорожке.

3.2.3. КР-микроспектроскопия *in vivo*

Мониторинг локальной оксигенации крови и изменений редокс-состояния комплексов ЭТЦ митохондрий и белково-липидный состав клеток мозга в области соматосенсорной коры (S1) бодрствующих мышей проводился с помощью конфокального КР-микроспектрометра (InVia Qontor, Renishaw, Великобритания), подключенного к разработанному вертикальному микроскопу в специальной конфигурации свободного пространства (Leica, Германия), позволяющей проводить эксперименты на животных в условиях *in vivo* с объективом 20x NA 0.4.

В экспериментах по гипергликемии, в анализ были включены КР-спектры мышей в состоянии покоя. Оно определялось как базовое состояние животного без какого-либо видимого движения. Лазерное возбуждение с длиной волны 532

нм использовалось для изучения относительного количества восстановленных цитохромов с- и b-типа (в комплексе ЭТЦ III и цитохроме с, и гемоглобине) (Love et al., 2020). Перед проведением эксперимента, голова мыши фиксировалась в специальном держателе в форме моста на беговой дорожке, а затем вся поведенческая установка устанавливалась на столик микроскопа. Лазерное возбуждение с длиной волны 633 нм (решетка 1200 линий/мм) использовалось для возбуждения флуоресценции NirFP в нейронах, а возбуждение при 473 нм (решетка 1200 линий/мм) для идентификации GFP в астроцитах. После идентификации типа клеток, мы дополнительно проверяли интенсивность флуоресценции с альтернативным лазером, чтобы удостовериться, что конкретное место регистрации соответствует только GFP⁺ или NirFP⁺ сигналу.

Флуоресценцию NirFP и GFP возбуждали при мощности лазера (633 нм или 473 нм, соответственно) не более 0.3 мВт, время накопления флуоресценции составляло 1 с. NirFP и GFP были выбраны в качестве селективных флуоресцентных маркеров нейронов и астроцитов из-за их спектральных свойств: NirFP (λ_{ex} = 630–650 нм и λ_{em} = 670 нм), GFP (λ_{ex} = 488 нм и λ_{em} = 510 нм), которые не мешают комбинационному рассеянию клеток. После идентификации нужных клеток, КР-микроспектрометр переключали на возбуждение лазером с длиной волны 532 нм и регистрировали спектры КР (решетка 1800 линий/мм). Спектры КР регистрировались от сомы идентифицированных нейронов и астроцитов во время покоя (60 с), локомоции (60 с) – бега по беговой дорожке – и постлокомоционного покоя (60 с). При регистрации спектра КР мощность лазера (532 нм) на пятно регистрации составляла не более 0.5 мВт, а время накопления спектра — от 15 до 60 с. Диаметр пятна регистрации в латеральной плоскости составлял около 700 нм, а высота — около 1.52 мкм. Картирование распределения цитохромов с,b

(Fe²⁺)-типов было выполнено режиме “Map image acquisition” с пространственным разрешением 3 мкм/пиксель.

3.2.4. КР-микроспектроскопия степени оксигенации и диаметра просвета кровеносных сосудов при *in vivo*

Идентификация сосудов проводилась с помощью визуального осмотра, без использования дополнительных флуоресцентных маркеров. КР спектры регистрировались для отдельных сосудов со временем накопления 1 с/спектр в состоянии покоя (60 с), стимулированной локомоции (32 с) и постлокомоционном состоянии покоя (60 с). Рамановские пики для дезоксигемоглобина (дГб) располагались на частотах 1357, 1547 и 1604 см⁻¹, тогда как для оксигемоглобина (оГб) они были смещены на 1375, 1585 и 1638 см⁻¹ соответственно (Таблица 3) (Brazhe et al., 2018; Torres Filho et al., 2008). Линейная коррекция базовой линии проводилась на основе свободных от пиков областей на промежутках 1500–1530 и 1680–1700 см⁻¹. После коррекции пики при 1547 см⁻¹ (дГб) и 1585 см⁻¹ (оГб) использовались для расчета sO₂. Поскольку КР сечение или интенсивность дГб выше, чем у оГб, использовался множитель 1.44:

$$sO_2 = \frac{I_{1585} * 1.44}{I_{1585} * 1.44 + I_{1547}} * 100\%,$$

где I₁₅₈₅ и I₁₅₄₇ — интенсивности пиков оГб и дГб, соответственно. Множитель 1.44 был рассчитан для объектива 20x NA 0.4 с помощью калибровочных экспериментов, в которых измеряли артериальную кровь, отобранную из хвостовой артерии мыши в стеклянном капилляре, затем проводили отдельное измерение полностью деоксигенированной артериальной крови за счет дитионита натрия. Диаметр просвета кровеносных сосудов были рассчитаны из профилей sO₂, полученных с помощью линейного сканирования поперек

сосудов. Границы сосудов определялись, когда sO_2 падал ниже 10% от уровня sO_2 в центре сосудов.

Частотный сдвиг (cm^{-1})	Молекула	Колебание связи/ симметрия колебания	Специфичность
1357	Гем дезокси-гемоглобина	Пирольное дыхание / $A1g, \nu_4$	Редокс состояние атома железа (Fe^{2+}), в отсутствие шестого лиганда (например, O_2)
1375	Гем оксигемоглобина	Пирольное дыхание / $A1g, \nu_4$	Редокс состояние атома железа (Fe^{2+}), связанного с O_2
1547	Гем дезокси-гемоглобина	$CaC_m, CaC_mH, CaC_b, CaN / A2g$	Редокс (Fe^{2+}) и высоко-спиновое состояние атома Fe, в отсутствие шестого лиганда (например, O_2)
1585	Гем оксигемоглобина	$CaC_m, CaC_mH, CaC_b, CaN / A2g$	Редокс (Fe^{2+}) и низко-спиновое состояние атома Fe, связанного с O_2
1604	Гем дезокси-гемоглобина	$CaC_m, CaC_mH / B1g, \nu_{10}$	Редокс (Fe^{2+}) и высоко-спиновое состояние атома Fe, конформация гема, в отсутствие шестого лиганда (например O_2)
1638	Гем оксигемоглобина	$CaC_m, CaC_mH / B1g, \nu_{10}$	Редокс (Fe^{2+}) и низко-спиновое состояние атома Fe, конформация гема, связанного с O_2

Таблица 3. Соотнесение пиков спектров КР, зарегистрированных от кровеносных сосудов соматосенсорной коры мыши в условиях *in vivo*.

3.2.5. Анализ КР спектров астроцитов и нейронов *in vivo*

Спектры комбинационного рассеяния анализировались с помощью разработанного в лаборатории программного обеспечения Pyraman

(<https://github.com/abrazhe/pyraman>). Спектры флуоресценции GFP и NirFP использовались только для идентификации нейронов и астроцитов, и не анализировались далее. Базовая линия вычиталась из каждого спектра КР и определялась как кубическая сплайновая интерполяция набора узлов, количество и x-координаты которых выбирались вручную за пределами любых информативных пиков в спектрах.

Количество и x-координаты узлов были фиксированными для всех спектров в исследовании, y-координаты узлов определялись отдельно для каждого спектра как средние значения интенсивностей спектра по 5 точкам вокруг конкретного x-положения узла. Параметры вычитания базовой линии были выбраны после обработки примерно 30 спектров различных астроцитов и нейронов. После коррекции базовой линии мы определяли интенсивности пиков с положениями максимумов при 750, 1126, 1003, 1440 и 1660 см^{-1} (Таблица 4): пик с положением максимума при 750 см^{-1} соответствует колебаниям связей пирролов и метиновых мостиков в восстановленных цит с,b (цит с,b (Fe^{2+})), с основным вкладом цитохромов с-типа, пик с положением максимума при 1126 см^{-1} соответствует колебаниям связей в метильных радикалах гемов в цит. с,b (Fe^{2+}), с основным вкладом цитохромов b-типа, пик при 1003 см^{-1} соответствует колебаниям остатков фенилаланина в белках, пик с положением максимума 1440 см^{-1} соответствует колебаниям C-C и H-C-H связей в липидах, пик 1660 см^{-1} соответствует колебанием пептидных связей в белках (Love et al., 2020; Brazhe et al., 2012; Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012). Мы использовали отношения интенсивностей пиков КР для оценки относительного содержания липидов по сравнению с фенилаланином (I_{1440}/I_{1003}) и для оценки относительного содержания восстановленных цит. с,b (Fe^{2+}) по сравнению с липидами: соотношения I_{750}/I_{1440} и I_{1126}/I_{1440} , соответствующие относительному количеству восстановленных цитохромов с и b-типа по

сравнению с общим количеством липидов в нейронах и астроцитах (с основным вкладом восстановленных цитохромов с-типа или b-типа соответственно). Также мы использовали соотношение I_{750}/I_{1126} , соответствующее относительному количеству восстановленных цитохромов типа с (в первую очередь, цитохрома с) по сравнению с восстановленными цитохромами типа b в комплексе III.

<i>Частотный сдвиг (см⁻¹)</i>	<i>Молекула</i>	<i>Колебание связи/ симметрия колебания</i>	<i>Специфичность</i>
750	Гем в восстановленных цитохромах <i>c</i> , <i>b</i> (Fe ²⁺)	Дыхание гема / B1g, v15	Редокс состояние гема; интенсивность пика в 10 ² -10 ³ раз выше для восстановленных цитохромов, чем для окисленной формы; интенсивность пика выше для восстановленных цитохромов типа <i>c</i> , чем для <i>b</i> -типа
1003	Фенилаланин	аминокислотный остаток Фен	Относительное количество белков
1126	Гем в восстановленных цитохромах <i>c</i> , <i>b</i> (Fe ²⁺)	Метильный радикал гема -CH ₃ / B1g, v5	Редокс состояние гема; интенсивность пика в 10 ² -10 ³ раз выше для восстановленных цитохромов, чем для окисленной формы; интенсивность пика выше для восстановленных цитохромов типа <i>b</i> , чем для <i>c</i> -типа
1440	Липиды	C-C и -CH ₂	Интенсивность пика зависит от относительного количества липидов
1585	Гем в восстановленных цитохромах <i>c</i> , <i>b</i>	C _a C _m , C _a C _m H, C _a C _b , C _a N / A2g	Редокс состояние гема; интенсивность пика в 10 ² -10 ³ раз выше для восстановленных цитохромов, чем для окисленной формы
1660	Белки	C-N, пептидная связь	Интенсивность пика зависит от вторичной структуры белков и их относительного количества

Таблица 4. Соотнесение пиков спектров КР, зарегистрированных от астроцитов и нейронов соматосенсорной коры мыши в условиях *in vivo*.

3.2.6. Визуализация двойного флуоресцентного мечения астроцитов и нейронов в условиях *in vivo*

Для визуализации эффективности экспрессии репортерных белков в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры (S1) в условиях *in vivo* использовался многофотонный флуоресцентный микроскоп (Femtonics FemtoSmart Dual, Венгрия) с объективом 20x NA 1.0. Для возбуждения флуоресценции GFP и NrfFP использовался титан-сапфировый лазер (Chameleon Ultra, США) с длиной волны 820 нм. Флуоресценция детектировалась с помощью арсенид-фосфид галлиевых (GaAsP) фотоумножителей H10770PA-40 (Hamamatsu, Япония) после прохождения через полосовой фильтр (520/60 нм для зеленого света и 600/100 нм для красного света). Регистрация флуоресценции проводилась в режиме гальванического сканирования с размером кадра 592×592 пикселей и 0.5 мкм на пиксель.

3.2.7. Измерение продукции H_2O_2 в митохондриях астроцитов и нейронов *in vivo*

Мониторинг образования H_2O_2 в астроцитах или нейронах проводился с помощью генетически кодируемого сенсора HyPer7, экспрессируемого в матриксе митохондрий астроцитов или нейронов соматосенсорной коры бодрствующих мышей (Таблица 2). Клетки идентифицировались с помощью КР-микроспектрометра по флуоресценции HyPer7, возбуждаемой лазером с длиной волны 473 нм и мощностью 0.1 мВт. Спектры флуоресценции

регистрировались с использованием решетки 1200 линий/мм в состоянии покоя, локомоции и постлокомоционного покоя. После коррекции базовой линии максимальная интенсивность флуоресценции каждого спектра оценивалась при 515 нм.

3.3.1. Морфологический имиджинг митохондрий *in vivo*

Для регистрации распределения митохондрий в астроцитах и нейронах *in vivo* соматосенсорной коры мышей использовался многофотонный флуоресцентный микроскоп (Femtonics FemtoSmart Dual, Венгрия) с объективом 20х. Для возбуждения флуоресценции HyPer7, экспрессированного внутри митохондриального матрикса (Таблица 2) использовался титан-сапфировый лазер (Chameleon Ultra, США) с длиной волны возбуждения 980 нм, излучение детектировалось фотоумножителем (H11706P-40, Hamamatsu, Япония) после полосового фильтра 520/60 нм (Semrock, США). Регистрацию сигнала флуоресценции проводили с частотой 30 кадров в секунду в режиме резонансного сканирования с разрешением 512×512 пикселей. Перед началом экспериментов животных приучали к экспериментальной установке. Мыши находились в установке на вращающемся диске “граммофона” (Femtonics, Венгрия) (Рис.5), каждая экспериментальная запись составляла 5 мин и сопровождалась видео регистрацией поведения. Животные находились в установке не более 2х часов в рамках одного эксперимента.



Рисунок 5. Стоп-кадр поведенческого видео, записанного во время эксперимента на вращающемся диске установки “граммофон”.

3.3.2. Анализ распределения и морфологии митохондрий *in vivo*

Анализ имиджинга митохондрий проводили в периоды покоя животных. Записи флуоресцентного имиджинга сначала подвергались предварительной обработке с помощью разработанного в лаборатории программного обеспечения. Для увеличения отношения сигнала к шуму, видео с частотой 30 Гц были объединены партиями по 5 неперекрывающихся кадров во временном домене за счет суммирования их интенсивности. Затем была применена коррекция движения (связанная с дыханием или активностью животного) по типу жесткого тела (rigid-body correction). Для этого использовался сигнал автофлуоресценции, записанный в красном канале одновременной с зеленой флуоресценцией. Для более точной оценки сдвигов изображения, сигнал автофлуоресценции был адаптивно очищен от шума путем аппроксимации каждого кадра первыми 50 пространственными главными компонентами, сглаженными гауссовым фильтром с $\sigma = 1$ пиксель. Пространственные смещения, рассчитанные для канала автофлуоресценции, затем были применены к зеленому каналу, содержащему флуоресценцию HyPer7 в матриксе митохондрий астроцитов и нейронов. Далее данные имиджинга были дополнительно очищены от шума, сначала они были преобразованы по методу Анскомба для стабилизации дисперсии. Затем запись была разделена на перекрывающиеся пространственные окна (участки), где данные были аппроксимированы с помощью усеченной декомпозиции сингулярных значений (truncated Singular Value Decomposition, SVD) со сглаживающим фильтром, примененным к пространственным компонентам, за которым следовали

обратные SVD и преобразования Анскомба, усредняющие аппроксимации в перекрывающихся пространственных окнах.

После первого этапа предварительной обработки данных имиджинга, проводили дополнительное улучшение контрастности и резкости изображений митохондрий *in vivo* с помощью нескольких алгоритмов в программе Fiji. Использовали фильтр усиления резкости (unsharp mask), который позволяет усилить контраст краев, таким образом детали изображения становятся более четкими. Далее применялся метод ограниченного контрастом адаптивного выравнивания гистограммы (Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization, CLAHE), с помощью которого происходит адаптивное распределение яркости по локальным областям изображения, это позволяет избежать чрезмерного усиления контраста в областях с низкой интенсивностью сигнала. Далее вычитался фоновый сигнал, который дополнительно улучшает четкость изображения.

Для анализа морфологии и динамики митохондрий астроцитов и нейронов в условиях *in vivo* было использовано программное обеспечение Nellie (Lefebvre et al., 2025), которое разработано для автоматической сегментации, отслеживания и извлечения иерархических признаков органелл для 2D и 3D оптических данных. Программа Nellie основана на нейросетевых подходах, автоматическая сегментация митохондрий происходит за счет выделения органелл на основе их яркости и формы.

После сегментации органелл, происходит извлечение различных иерархических признаков митохондрий, таких как площадь, длина, толщина, соотношение сторон, форма (извилистость), распределение органелл. Признаки могут быть извлечены на разных уровнях включая ветви органелл (точки ветвления внутри органелл) и органеллы. Полученные данные автоматической сегментации и выделенных морфологических признаков митохондрий были

статистически обработаны в программе R с использованием смешанной линейной модели, которая учитывает как фиксированные эффекты (тип клеток), так и случайные (отдельные животные). В качестве единицы измерения данных были выбраны средние значения, выделенных параметров по отдельным экспериментальным записям.

3.4. Поведенческий тест «Открытое поле»

Все поведенческие испытания проводились с 10:00 до 22:00 во время активной фазы животных инвертированного цикла день/ночь. Перед поведенческими экспериментами мышей приучали к рукам и экспериментальной комнате в течение 4 дней. В экспериментальный день, мышей приносили в поведенческую комнату за 30 минут до начала проведения теста. Все эксперименты проводились в темной комнате с красным источником света, невидимым для мышей, но достаточным для видеозаписи поведения с помощью монохромной камеры GigE (The Imaging Source DMK 33GV024, Германия). Мышей помещали в центр белой арены «Открытое поле» размером $40 \times 40 \times 40$ см в течение 10 минут, и записывали видео поведения со скоростью 50 кадров в секунду. Арену тщательно очищали между каждой сессией 70% этанолом и дистиллированной водой, для удаления запаховых меток. Все видеозаписи были проанализированы с помощью протокола созданного в программе визуального программирования Bonsai, программное обеспечение с открытым исходным кодом (Lopes et al., 2015). Протокол анализа подразделялся на две части: определение центроида животного (отслеживание движения); время, проведенное в центре арены по сравнению с периферией. Для этого были использованы стандартные функции Bonsai из библиотеки OpenCV (computer vision, компьютерное зрение), сначала устанавливали

инвертированный бинарный порог для обнаружения черной мыши на белом фоне, после чего находили наибольшую бинарную область, проводили анализ этой бинарной области: находили ее центроид, который соответствовал положению животного по осям X и Y в каждом кадре. Мы использовали тот же порог для оценки времени, проведенного в центре арены, с помощью функции “область интереса”, где белые пиксели были задетектированы для каждого кадра видеозаписи. Для оценки уровня активности мы использовали пороговое значение скорости 0.5 см/с. Последующий статистический анализ выходных .csv-файлов был выполнен с помощью OriginPro (OriginLab Corp., США).

3.5.1. Транскардиальная перфузия

Для оценки экспрессии вирусных векторов, и последующего иммуногистохимического окрашивания проводили морфологический контроль. Животных анестезировали, с помощью внутрибрюшинной инъекции раствора золетил-ксилазин (40мг/кг – 5мг/кг). После погружения животного в состояние глубокого наркоза, проводили транскардиальную перфузию с помощью инфузионной системы. Животное располагали на спине, делали небольшой надрез в брюшной полости, далее разрезали ребра для обеспечения свободного доступа к сердцу. Тупой шприц, присоединенный к инфузионной системе заполненной раствором фосфатного буфера (PBS) вводили в левый желудочек, и сразу делали надрез правого предсердия, после чего пропускали 20-30 мл раствора для вымывания всего объема крови. Далее проводили фиксацию тканей с помощью 20-30 мл 4% раствора параформальдегида (PFA). Мозг аккуратно извлекали и помещали для последующей постфиксации в 4% PFA на сутки при 4°C. Через 24 ч раствор PFA заменяли раствором PBS для долгосрочного хранения при 4°C.

3.5.2. Изготовление фиксированных срезов мозга

Перед изготовлением коронарных срезов, фиксированный мозг предварительно подготавливали – помечали с помощью продольных надрезов правое полушарие, обрезали слуховые луковицы и мозжечок, чтобы ровно приклеить образец на агаровом блоке. Агаровый блок приклеивали на ориентируемый диск, который размещался внутри буферного лотка, заполненного раствором PBS. Для изготовления срезов с толщиной 60 мкм или 200 мкм использовали вибратор (Leica 1200s, Германия) в полуавтоматическом режиме. 60 мкм срезы изготавливали для экспериментов по оценке морфологии астроцитов с помощью флуоресцентного имиджинга. 200 мкм срезы использовали для ИГХ окрашивания с последующей КР-микроспектроскопией *ex vivo*. Изготовленные плавающие срезы хранили в растворе PBS при 4°C в культуральных 24-луночных планшетах.

3.5.3. Иммуногистохимическое окрашивание для КР-микроспектроскопии *ex vivo*

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание срезов мозга на специфичные маркеры для астроцитов GFAP, и нейронов NeuN (neuron specific nuclear protein, нейрон-специфичный ядерный белок) использовалось для идентификации типа клеток и последующего селективного изучения редокс состояния митохондрий, содержания белков и липидов в цитоплазме клеток. Стоит отметить, что фиксация тканей с помощью 4% PFA не оказывает значительного влияния на редокс состояние митохондриальных цитохромов, такой способ фиксации совместим с КР-микроспектроскопией (Okada et al., 2012).

Фиксированные 200 мкм срезы переносили в раствор PBS + 0.3% Triton-X100 на 20 мин, а затем в раствор PBS + 0.1% Tween 20 + 5% бычьего сывороточного альбумина при 25 °C на 90 мин. Затем срезы инкубировали в растворе первичных антител в разведении 1:1000 (поликлональные антитела из кролика против GFAP, Abcam, каталожный номер ab7260; и поликлональные антитела из курицы против NeuN, каталожный номер Novusbio NBP2-104491) в PBS + 0.01% Tween 20 в течение 60 ч при 25 °C. После инкубации с первичными антителами, срезы отмывали трижды в растворе PBS по 10 мин при 25 °C. Далее проводили инкубацию срезов в растворе вторичных антител в разведении 1:800 (против кролика, Alexa Fluor 488 AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 711-545-152; против курицы, Cy-5 AffiniPure donkey anti-chicken IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 703-175-155) в течение 2 ч при 25 °C. После инкубации со вторичными антителами срезы промывали дважды в PBS и трижды в деионизированной воде. Затем срезы монтировали на предметное стекло и высушивали в темноте. Окрашенные срезы хранили при комнатной температуре в темноте. Вторичные антитела были выбраны на основе их спектральных свойств (Alexa Fluor 488: λ_{ex} = 490 нм; λ_{em} = 510 нм и Cy-5: λ_{ex} = 650 нм; λ_{em} = 670 нм), таким образом, чтобы практически не возбуждать их флуоресценцию лазером с длиной волны 532 нм, который использовался для КР-микроспектроскопии.

3.5.4. КР-микроспектроскопия *ex vivo*

Для регистрации спектров КР астроцитов, окрашенных антителами против GFAP, и нейронов, окрашенных против NeuN, был использован конфокальный КР-микроспектрометр ИНТЕГРА СПЕКТРА (НТ-МДТ,

Зеленоград, Россия), совмещенный с инвертированным микроскопом Olympus (Германия). Астроциты и нейроны были идентифицированы по флуоресценции флуорофоров Alexa Fluor 488 или Cy-5, конъюгированных со вторичными антителами на GFAP и NeuN, соответственно. Флуоресценцию флуорофоров возбуждали галогенной лампой в эпифлуоресцентном режиме микроскопа. После идентификации типа клеток, микроспектрометр переключали в режим для регистрации спектров КР при возбуждении с длиной волны 532 нм с объективом $\times 40$ NA 0.45. Эта длина волны возбуждает незначительную флуоресценцию Alexa Fluor 488 или Cy-5, которая не мешает регистрации комбинационного рассеяния клеток. Мощность лазера на пятно регистрации не превышала 1 мВт, а время накопления спектра составляло 60 с. Диаметр пятна регистрации в латеральной плоскости составлял приблизительно 700 нм, а высота регистрационного объема составляла около 1.5–2 мкм.

3.5.5. Анализ спектров КР *ex vivo*

Анализ КР пиков *ex vivo* использовался для сравнения относительного количества липидов по сравнению с белками в цитоплазме и редокс-состояния митохондриальных цитохромов у контрольных и мышей на диете с высоким содержанием жиров (High Fat Diet, HFD) (Love et al., 2020; Perry et al., 2017). Спектры КР *ex vivo* были проанализированы с помощью описанного выше алгоритма. После вычитания базовой линии были определены интенсивности пиков со следующими положениями максимумов: 700, 720, 750, 1126, 1003, 1440-1445 и 1660 cm^{-1} . Эти пики соответствуют колебаниям связей в холестерине, фосфатидилхолине и восстановленных цитохромах с- и b-типов, остатках фенилаланина, липидах и белках соответственно (Love et al., 2020; Perry et al., 2017; Brazhe et al., 2012; Harkness et al., 2012; Kakita et al., 2012;

Okada et al., 2012). Отношение интенсивностей I_{1440}/I_{1660} соответствует относительному количеству всех липидов, нормированное на общее количество белков в области регистрации. соотношение I_{700}/I_{720} соответствует относительному количеству холестерина по сравнению с количеством фосфатидилхолина; соотношение I_{750}/I_{1003} соответствует относительному количеству восстановленных цитохромов с- и b-типа, нормированное на общее количество фенилаланина, с большим вкладом восст.цит. с-типа. Соотношения I_{604}/I_{1003} и I_{1338}/I_{1003} демонстрирует относительное количество восстановленных цитохромов с-типа и b-типа цитохромов, соответственно, нормированные на общее количество белков.

3.6.1. Флуоресцентная визуализация морфологии астроцитов гиппокампа

Регистрация сигнала проводилась с помощью мультифотонного флуоресцентного микроскопа Femtonics (FemtoSmart Dual, Венгрия) с водно-иммерсионным объективом с 20-ти кратным увеличением. Для возбуждения флуоресценции репортерного белка BFP (Таблица 2) использовали титан-сапфировый лазер (Chameleon Ultra, США) с длиной волны 750 нм, эмиссию красителя регистрировали с помощью фотоумножителя (H11706P-40, Hamamatsu, Япония) после прохождения через полосовой фильтр 520/60 нм (Semrock, США). Запись флуоресцентного сигнала проводилась с частотой съемки 1 Гц в режиме z-сканирования с разрешением 512 x 512 пикселей. Каждый z-стек состоял из 60-80 оптических срезов, толщиной в 1 мкм, которые были зарегистрированы с одинаковой интенсивностью лазера и оптическим увеличением для всех образцов.

3.6.2. Анализ морфологии астроцитов

Для анализа морфологии астроцитов был использован разработанный нами подход, основанный на методе быстрого марша (Kriuchechnikova et al., 2025). Он позволяет рассчитать расстояние от заданных координат до всех остальных точек в пространстве с учетом плавного распространения пространственного фронта. Сначала определяли порог яркости по медианному абсолютному отклонению, который соответствует моде распределения яркости и трем стандартным отклонениям (Рис. 6).

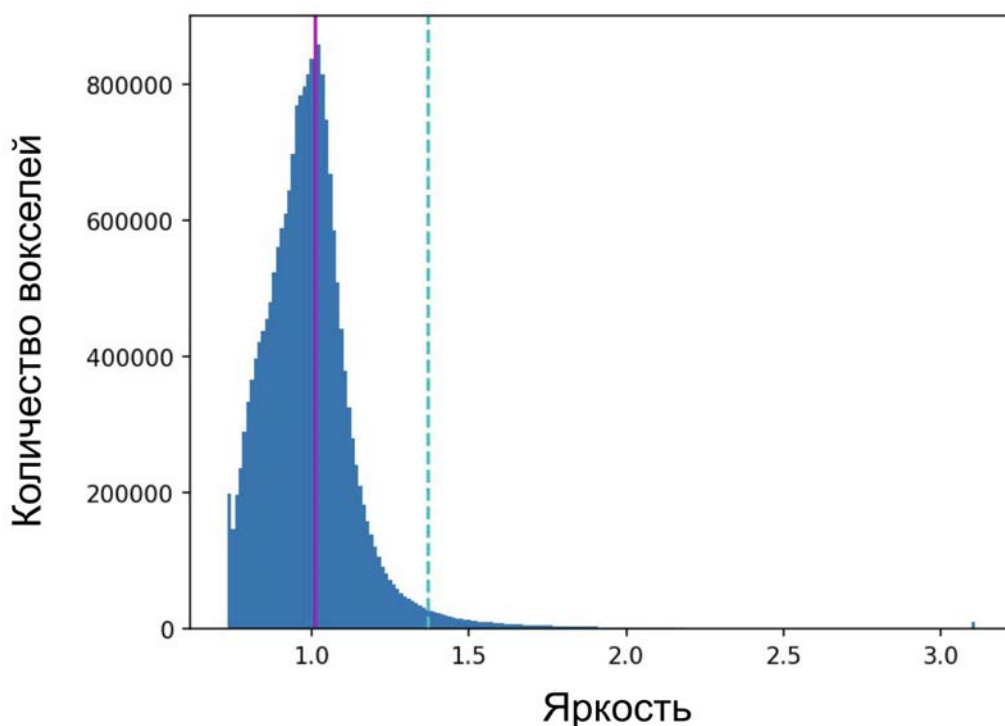


Рисунок 6. Определение порога яркости по медианному абсолютному отклонению. Розовая линия – мода, данного распределения, пунктирная линия соответствует значению $\sigma = 3$. По оси x — яркость (относительно среднего значения), y — количество вокселей.

Далее производился поиск локальных пиков яркости, который соответствовал соматическим астроцитам. Для этого из всех надпороговых (по яркости) вокселей строились пути вдоль максимального градиента яркости. Точки схождения таких путей — кандидаты в сомы, которые автоматически определялись в качестве тел клеток, если в контрасте Сато максимальный ответ фильтра достигался при достаточно большом значении параметра σ , приблизительно равному 500 пикселей, это значение соответствует физическому размеру сомы. В следующем шаге рассчитывался контраст Сато и амплитуды проекций градиента яркости на направлении поперек отростка. Далее, рассчитывался показатель “скорости” для метода быстрого марша, который представляет собой отношение контраста Сато на амплитуду векторов проекций градиента яркости. В данном случае происходило нахождение локального максимума, при котором одновременно сочетается высокое значение контраста Сато и маленькое значение градиента яркости (Рис.7).

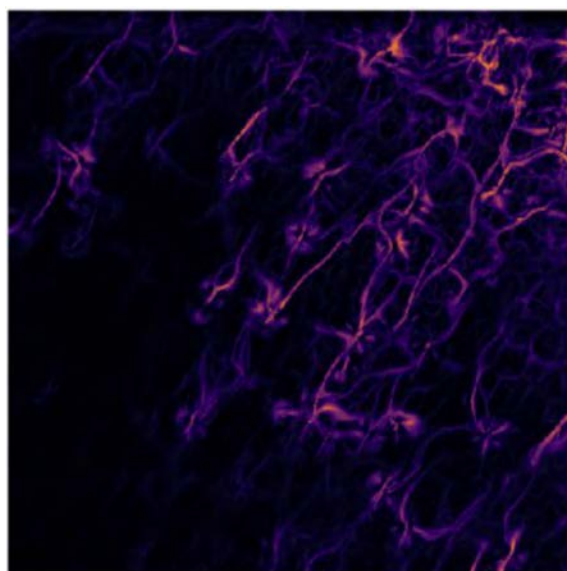


Рисунок 7. Визуализация расчета показателя “скорости” для метода быстрого марша. При нахождении локального максимума, с высоким значением

контраста Сато и маленьким значением градиента яркости, происходит “мягкая скелетизация” изображения.

Для построения финальной маски астроцитов, сочетался порог по яркости для самого z-стека и аналогичные пороги (мода и три σ) для контраста Сато на разных сигмах. Для расчета карты времен прибытия (Рис.8) использовался профиль “скорости” (Рис.7).

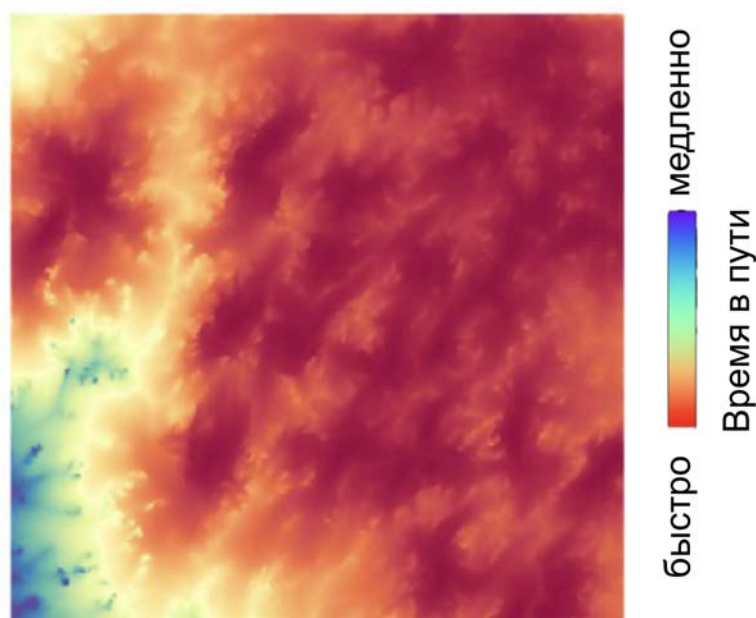


Рисунок 8. Визуализации карты времен прибытия от центра найденных сом до конечных точек. Чем “быстрее” время прибытия, тем краснее цветовая кодировка, поэтому в области сом наиболее интенсивное окрашивание красным, ближе к периферии клеток – оранжево-желтый цвет. Синий фрагмент – место без флуоресцентного окрашивания.

Реконструкция морфологии астроцитов происходила за счет того, что из всех точек финальной маски запускается градиентный спуск согласно карте времен прибытия, в результате ветки с большим количеством концевых

участков соответствуют толстым отросткам астроцитов. Для найденных отростков рассчитывалась длина пути от каждого кончика до корня (или сомы) — этот показатель соответствует длине отростков (Рис.9).

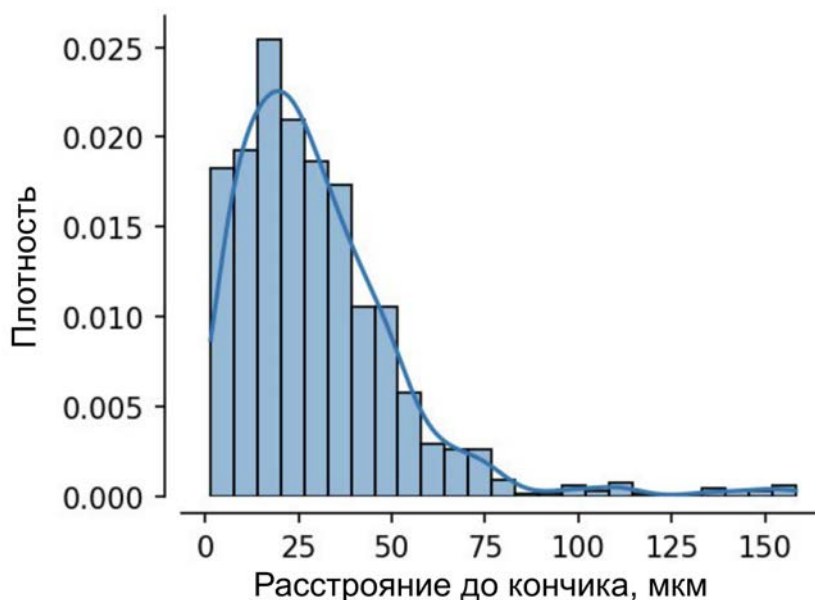


Рисунок 9. Распределение длин отростков астроцитов, соответствующих длине пути от каждого кончика до сомы.

Данный подход позволяет реконструировать сложную морфологию астроцитов с учетом их нелинейной геометрии и неоднородности формы, он широко используется для анализа ветвящихся систем, например для определения степени васкуляризации сосудистого русла и автоматической сегментации морфологии нейронов (Yang et al., 2019; Cardinal et al., 2010). С помощью метода быстрого марша, мы реконструировали морфологию астроцитов и вычислили геодезическую длину толстых отростков астроцитов, которая позволяет оценить расстояние между двумя точками на трехмерной поверхности. Также мы рассчитали, объемную долю флуоресценции толстых отростков в области всего z-стека.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

Существующие подходы для оценки метаболического и редокс-состояния мозга на клеточном уровне предполагают использование генетически кодируемых сенсоров, трансгенных животных или *in vitro* аналитических систем. Существенным ограничением таких подходов является лимитированный выбор доступных сенсоров и возможность визуализации одного или двух цветов одновременно, при этом такие эксперименты можно проводить в условиях *in vivo* в различных поведенческих парадигмах. Возможности *in vitro* исследований с помощью аналитических систем позволяют осуществить детальную расшифровку молекулярных механизмов и оценку работы и редокс-состояния ЭТЦ, при этом их практически невозможно воссоздать в условиях *in vivo*, в особенности у бодрствующих животных.

В данной работе мы разработали новый подход, основанный на микроспектроскопии КР, который позволяет оценить без дополнительного окрашивания ряд важных параметров, которые включают редокс-состояние

ЭТЦ и белково-липидный состав цитоплазмы клеток, а также степень оксигенации сосудов мозга у бодрствующих животных во время поведения (Рис.10).

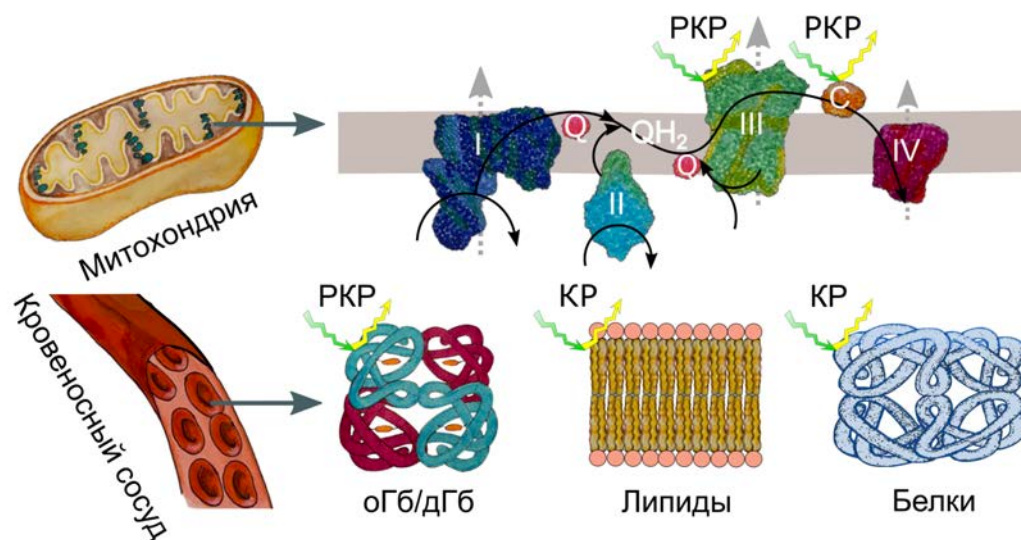


Рисунок 10. Схематическое изображение биомакромолекул, обладающих интенсивным КР-сигналом. КР микроспектроскопия применяется для определения белково-липидного состава клеток, а резонансное КР (РКР) – для определения относительного содержания цитохромов b, c (Fe^{2+}), расположенных в ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов, а также для мониторинга относительного содержания оГб, дГб в кровеносных сосудах мозга.

Комбинационное рассеяние света в отличие от флуоресценции не зависит от относительно долгоживущих возбужденных состояний, при этом по сравнению с Рэлеевским (упругим) рассеянием света, неупругое рассеяние имеет результирующую длину волны отличающую энергетически от лазерного излучения (Рис.11) (Butler et al., 2016; Krafft & Popp, 2015).

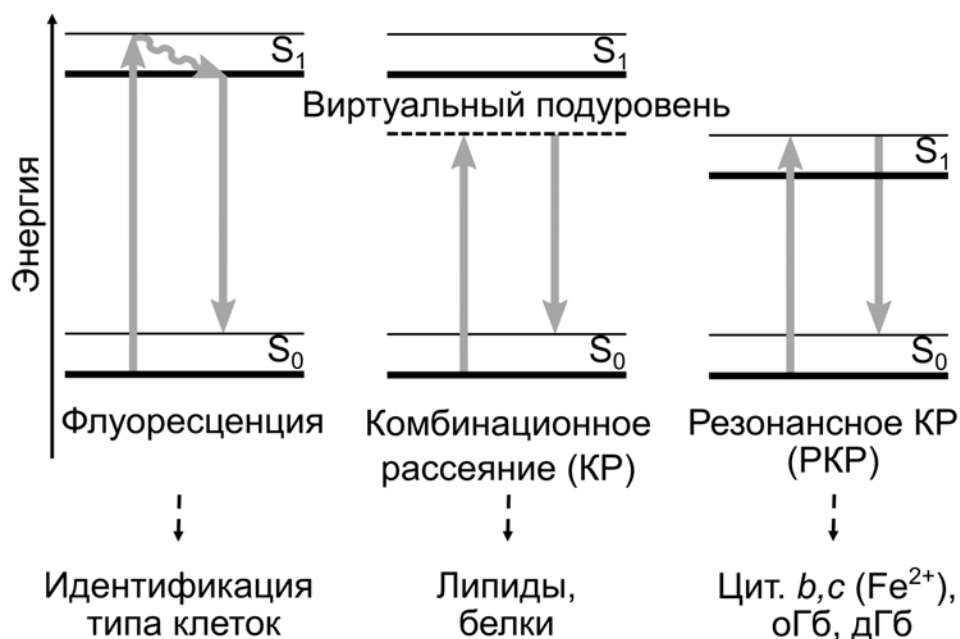


Рисунок 11. Диаграмма Яблонского. В данной работе флуоресценция использовалась для идентификации типа клеток – астроцитов или нейронов, экспрессирующих GFP, NirFP или HyPer 7, КР – для оценки белково-липидного состава цитоплазмы клеток, РКР – для определения редокс-состояния гемов цитохромов *c*-, *b*- типа, а также мониторинга относительного количества оГб и дГб. S_0 и S_1 – основное и первое возбужденное синглетное состояния, соответственно. Пунктирная линия – виртуальный подуровень.

КР света происходит на атомах молекул в зависимости от их колебательных и вращательных состояний, это позволяет оценивать их концентрацию, конформацию и редокс-состояние. Мы регистрировали характерные пики в спектрах комбинационного рассеяния, специфичные для липидов, белков, фенилаланинового остатка в белках (Фен), восстановленных цитохромов типов *c* и *b* [цит. *c,b* (Fe^{2+})], а также окси- и дезоксигемоглобина (оГб и дГб, соответственно; Рис. 10, 11). Лазерный свет с длиной волны 532 нм поглощается гемами *c*- и *b*-типов и рассеивается по механизму резонансного

комбинационного рассеяния (РКР), обеспечивая селективное усиление КР сигнала восстановленных цитохромов *c*, *b* (Fe^{2+}), оГб и дГб по сравнению с другими молекулами в мозге (Popov et al., 2023; Brazhe et al., 2018; Okada et al., 2012).

Мы использовали метод КР микроспектроскопии на соматосенсорной коре (S1) у мышей, закрепленных с помощью металлического держателя под объективом прибора в поведенческой установке, позволяющей перемещаться на беговой дорожке (Рис. 12). Для идентификации типа клеток, была проведена стереотаксическая операция по доставке двух аденоассоциированных вирусов под клеточно-специфичными промоторами, кодирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP) в астроцитах и флуоресцентный белок ближнего инфракрасного диапазона (NirFP) в нейронах, соответственно (Рис. 13). Операция по доставке вирусных векторов была совмещена с имплантацией краниального окна и установкой, металлического крепления на черепе животного для проведения хронических экспериментов на беговой дорожке. Перед регистрацией КР сигнала, астроциты и нейроны идентифицировали по их соответствующим спектрам флуоресценции, полученным при возбуждении лазером с длиной волны 473 нм или 633 нм (Рис. 14).

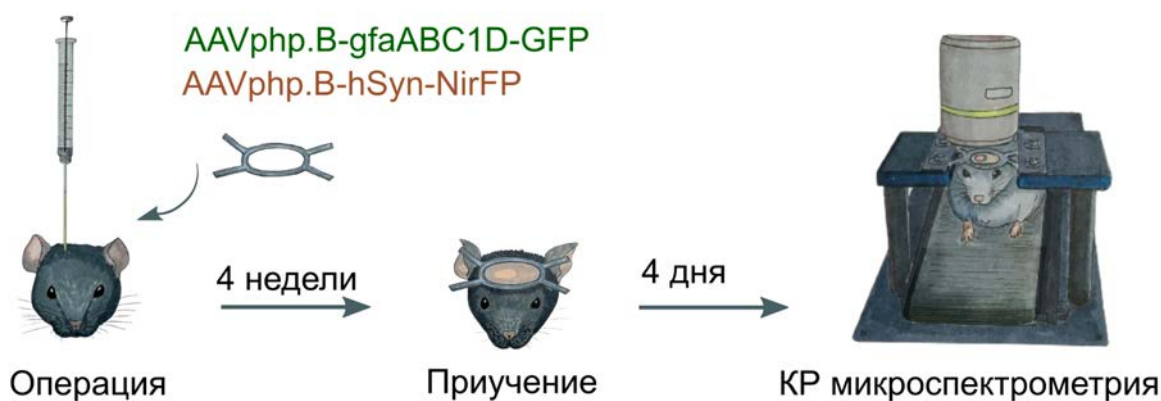


Рисунок 12. Схема эксперимента. Экспериментальный протокол включал стереотаксическую инъекцию смеси двух вирусных векторов в

соматосенсорную кору (S1) для астроцитарной экспрессии GFP (AAV.PHP.B-gfaABC1D-GFP) и нейрональной экспрессии NirFP (AAV.PHP.B-hSyn-NirFP). Через четыре недели после операции животных приучали к экспериментальной установке в течение четырёх дней. КР-микроспектрометрию проводили на бодрствующих животных, перемещающихся на беговой дорожке, голова которых была закреплена в специальном держателе.

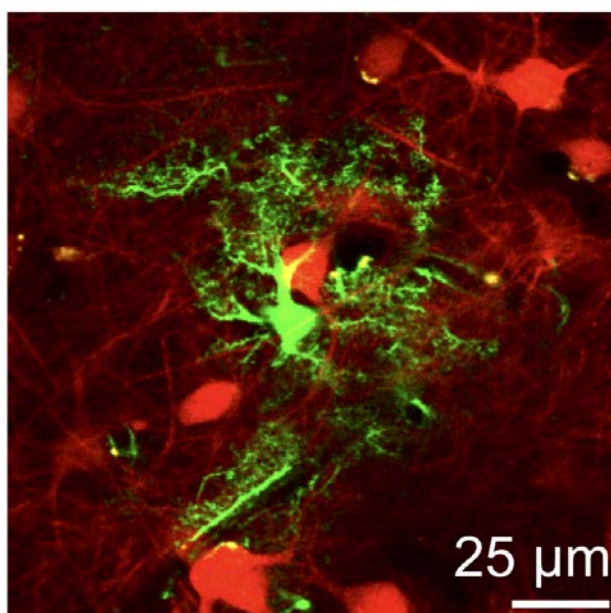


Рисунок 13. Флуоресцентное изображение астроцита и нейронов в соматосенсорной коре мозга бодрствующей мыши, полученное при помощи двухфотонной микроскопии. Астроцит экспрессирует зеленый флуоресцентный белок, GFP (зеленый цвет), нейроны – ближний инфракрасный белок, NirFP (красный цвет). Кровеносные сосуды видны как темные области без флуоресценции, окруженные зелеными астроцитарными отростками.

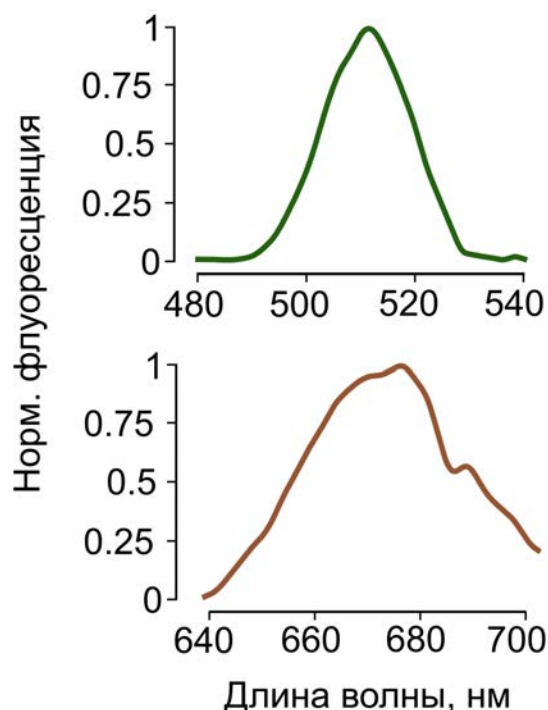


Рисунок 14. Спектры флуоресценции, полученные с помощью КР микроспектрометра, соответствующие флуоресценции GFP в астроците (вверху, зеленая кривая) при лазерном возбуждении 473 нм, и NirFP в нейроне (внизу, коричневая кривая) при возбуждении 633 нм.

КР спектры нейронов и астроцитов *in vivo* представляют собой набор пиков с положениями максимумов при 750, 1126, и 1585 см^{-1} , соответствующих колебаниям связей в молекулах гемов восстановленных цитохромов *b*-типа (цит. $\text{b}(\text{Fe}^{2+})$) и восстановленного цитохрома *c*1 в комплексе III и восстановленного цитохрома *c* (цит. $\text{c}(\text{Fe}^{2+})$) (Рис.15) (Popov et al., 2022; Brazhe et al., 2013; Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012).

Пики соответствуют цитохромам как *c*-, так и *b*-типов с доминирующим вкладом цитохромов *c*-типа в пик при 750 см^{-1} и доминирующим вкладом цитохромов *b*-типа в пик при 1126 см^{-1} (Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012). Также присутствуют пики, соответствующие колебаниям остатков

фенилаланина (1003 см^{-1}), связям С–С и Н–С–Н в липидах (1440 см^{-1}) и пептидным связям в белках (1660 см^{-1}) (Рис.15) (Popov et al., 2022).

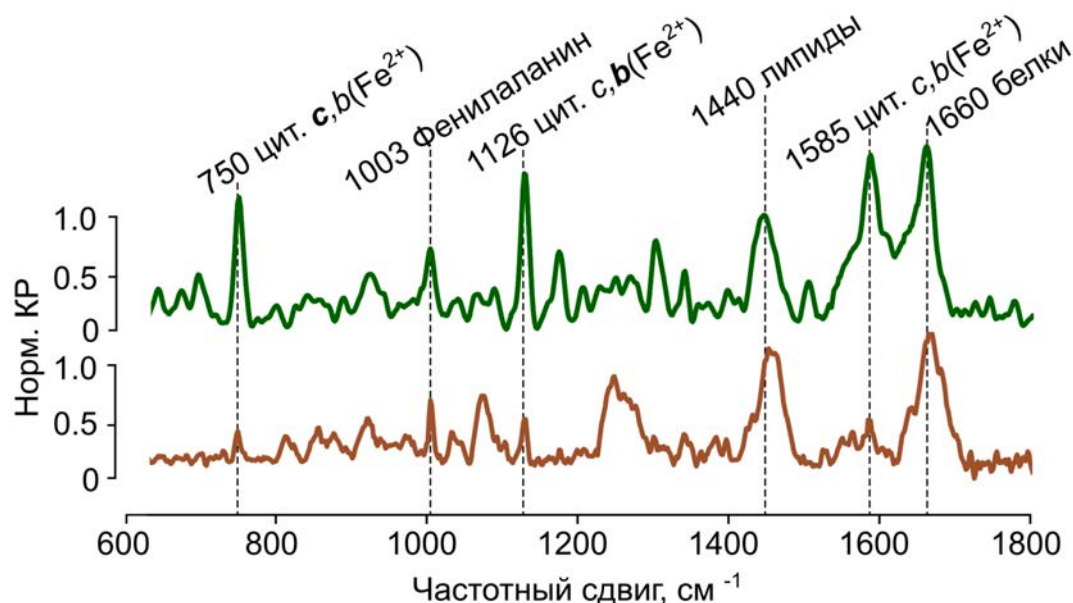


Рисунок 15. Спектры КР, зарегистрированные от астроцита (вверху, зеленая кривая) и нейрона (внизу, коричневая кривая). Пики КР, которые были использованы для дальнейшего анализа, отмечены с помощью пунктирных линий с соответствующими названиями молекул и их значениями положения максимумов (частотного сдвига, см^{-1}).

Для оценки относительного количества восстановленных цитохромов с,b (Fe^{2+}) в митохондриях было рассчитано соотношение интенсивности пика КР цитохромов с,b (Fe^{2+}) к интенсивности пика липидов, полученных в одном спектре. У животных в состоянии покоя в астроцитах уровень восстановленных цит. с,b (Fe^{2+}) значительно выше ($p=0.03$, двухсторонний тест Манна-Уитни), по сравнению с нейронами (Рис. 16). Различия в относительном содержании цитохромов могли быть следствием разницы в количестве липидов в этих типах клеток. Мы не обнаружили достоверных различий в отношении липидов к

фенилаланину для нейронов и астроцитов ($p=0.89$, двухсторонний тест Манна-Уитни) (Рис. 17).

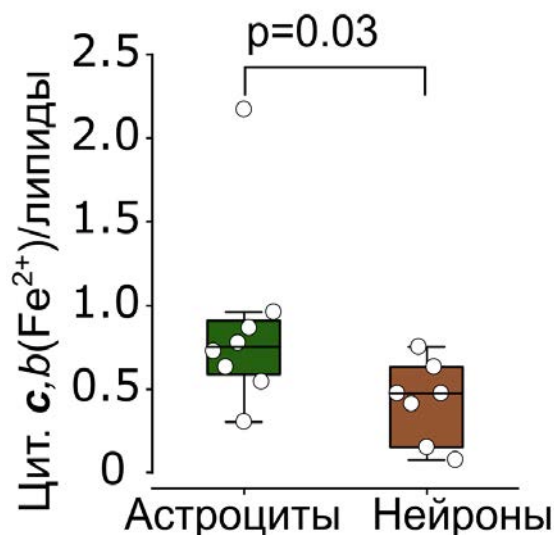


Рисунок 16. Диаграмма размаха, показывающая относительное количество восстановленных цит. с, b (Fe^{2+}) в состоянии покоя для астроцитов (зеленый цвет) и нейронов (коричневый цвет). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни между астроцитами ($n=8$) и нейронами ($n=7$). У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

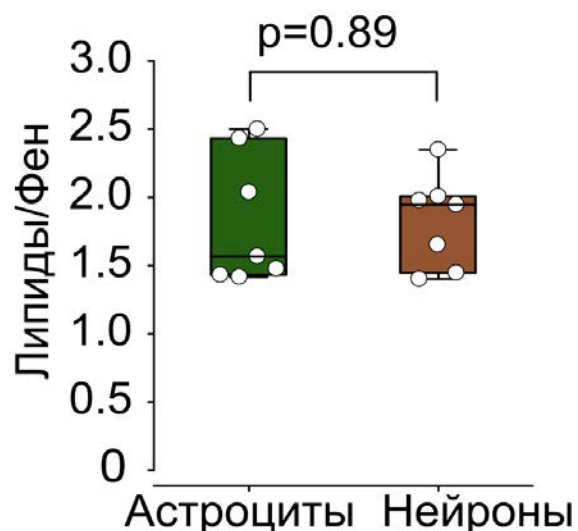


Рисунок 17. Диаграмма размаха, показывающая соотношение пика липидов к пику фенилаланина в состоянии покоя для астроцитов (зеленый цвет) и нейронов (коричневый цвет). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни между астроцитами (n=7) и нейронами (n=7). У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

Полученный результат согласуется с данными о разнице строения ЭТЦ в астроцитах и нейронах. В астроцитах комплексы ЭТЦ имеют разобщенную организацию, что может приводить к накоплению электронов, соответственно количество восстановленных цитохромов становится выше. В нейронах, напротив, комплексы ЭТЦ собираются в суперкомплексы, что увеличивает эффективность переноса электронов, а уровень восстановленных цитохромов снижается (Lopez-Fabuel et al., 2016).

Сигнал от кровеносных сосудов головного мозга был зарегистрирован на основе визуальной детекции, без дополнительного флуоресцентного окрашивания в состоянии покоя животного и при локомоции. Полученные спектры КР обладают характерным положением и формой пиков, соответствующих колебаниям гемовых связей в оГб и дГб (Рис. 18) (Brazhe et al., 2018). Соотношение оГб к дГб было использовано для расчета степени насыщения крови кислородом (sO_2) с использованием поправочного коэффициента, рассчитанного для данной установки. Таким образом, наш подход позволяет регистрировать КР спектры характерной формы и

положением пиков для артериол и венул (Рис.18, черная и серая кривая, соответственно) и количественную оценку степени оксигенации крови.

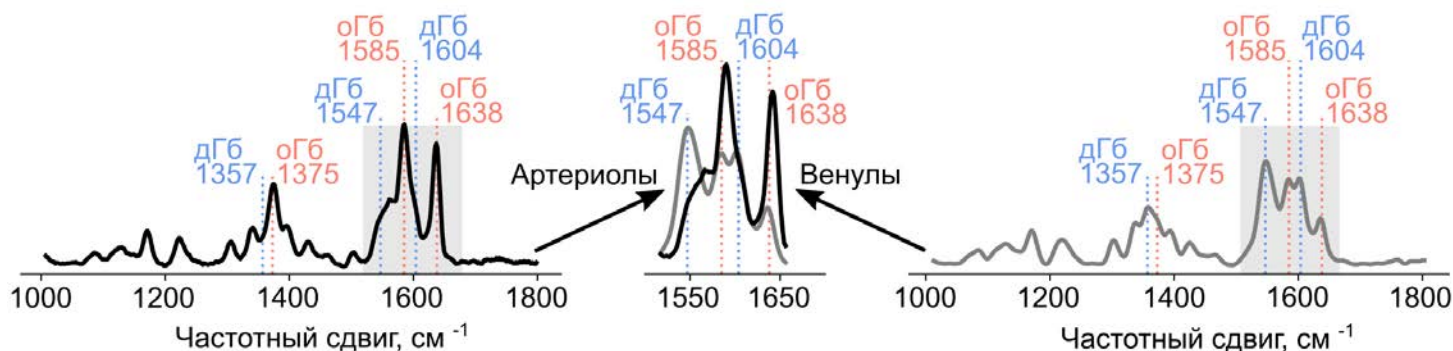


Рисунок 18. Спектры КР, зарегистрированные от артериолы (слева, черная кривая) и венулы (справа, серая кривая). На рисунке посередине показано наложение характерной области спектра, соответствующей колебаниям гемовых связей в оГб и дГб, которое было использовано в анализе. Пунктирными линиями отмечены пики КР, с соответствующими названиями молекул, сверху показаны значения частотного сдвига для положений максимумов пиков.

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

Работа мозга во время физической активности, например локомоции, связана с увеличением притока крови к определенным областям, включая первичную моторную (M1) и соматосенсорную кору (S1) (W. Li et al., 2024). Приток крови к активным областям мозга обеспечивает их кислородом и энергетическими субстратами (глюкозой и жирными кислотами), необходимыми для продукции АТФ (Bonvento & Bolaños, 2021). Региональное увеличение оксигенации крови в ответ на усиление метаболической активности клеток мозга называется гемодинамическим ответом (Рис.19). Эта концепция

лежит в основе интерпретации данных фМРТ, где оценивается сигнал BOLD (blood-oxygen-level-dependent), который зачастую считают прямым измерением количества потребляемого кислорода клетками мозга. На самом деле, классический сигнал BOLD показывает снижение дГб, что связывают с увеличением потребления кислорода в активной области мозга (Е. М. С. Hillman, 2014; Attwell & Iadecola, 2002; Ogawa et al., 1990).

Несмотря на то, что метод фМРТ широко используется на протяжении 35 лет, интерпретация комплексного сигнала BOLD до сих пор остается затрудненной (Е. М. С. Hillman, 2014; Attwell et al., 2010; Logothetis, 2010; Sirotin & Das, 2009; Girouard & Iadecola, 2006). Это связано с нелинейным ответом степени оксигенации крови во время активности мозга, что вероятно указывает на наличие метаболического компонента (Рис. 19).

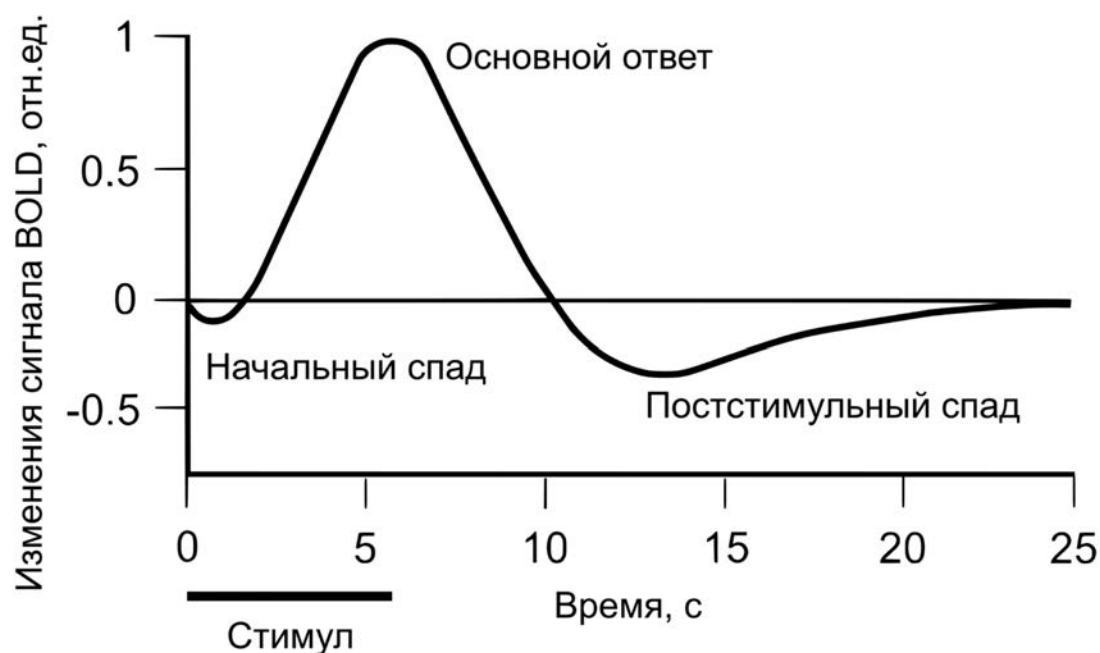


Рисунок 19. Схема изменения сигнала BOLD во время гемодинамического ответа сосудов мозга. Нелинейный ответ сигнала BOLD характеризуется начальным спадом оксигенации крови перед стимулом, ее значительным увеличением во время активности (основной ответ), за которым следует выраженный постстимульный спад.

Разработанный нами метод КР микроспектроскопии позволяет успешно определять тип кровеносных сосудов, а также напрямую регистрировать вклад оГб и дГб для количественной оценки степени оксигенации крови у животных в покое. Мы провели серию экспериментов в парадигме вынужденный бег-покой на беговой дорожке, чтобы оценить изменения степени оксигенации в разных сосудах мозга во время функциональной нагрузки в области S1. Статистический анализ изменения степени оксигенации ($\Delta sO_2/sO_2$) во время бега по отношению к состоянию покоя, показал, что в венулах происходит достоверный 5-20 % прирост по сравнению с артериолами (Рис. 20) ($p=0.001$, двухсторонний тест Манна-Уитни, сравнение артериол и венул; двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона для проверки значимости изменений в венулах $p<0.01$, и в артериолах $p=0.11$).

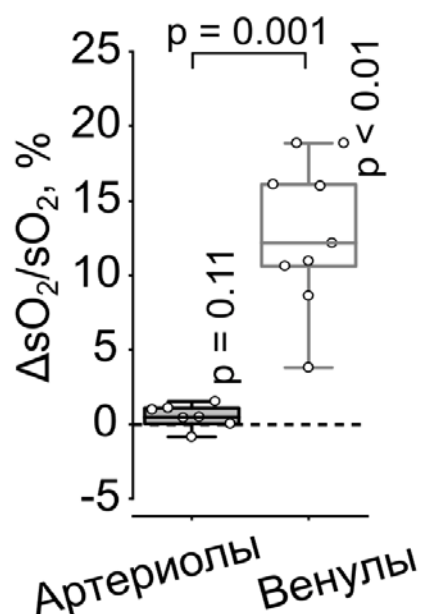


Рисунок 20. Диаграммы размаха, показывающие изменения степени оксигенации крови во время локомоции, относительно уровня sO_2 в состоянии покоя до локомоции ($\Delta sO_2/sO_2$) в артериолах (серый) и венулах (белый). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили,

горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между артериол ($n=7$) и венул ($n=9$); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений в венулах и в артериолах. Количество животных $N = 7$.

Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что относительные изменения $\Delta sO_2/sO_2$ практически не происходят в артериолах, потому что уровень их оксигенации уже близок к сатурации, при этом значительные изменения в ответ на функциональную нагрузку наблюдаются в венулах. Можно заключить, что ткани мозга получают дополнительный кислород не за счет притока более оксигенированной крови, а вследствие функциональной гиперемии.

Функциональное увеличение кровотока в активных областях мозга связано с процессом вазодилатации. Мы оценили диаметр просвета артериол и венул ($\varnothing_o$) с помощью поперечного КР-сканирования сосудов. В покое просвет венул был достоверно выше, чем в артериолах ($p = 0.03$, двухсторонний тест Манна-Уитни) (Рис. 21, а), что согласуется с морфологическими особенностями последних, известно, что стенки артериол толще венул, внутренний слой которых выстлан клетками гладкомышечной мускулатуры (Martinez-Lemus, 2012). Изменение диаметра артериол во время функциональной нагрузки было значительно больше венул (Рис. 21, б) ($p = 0.01$, двухсторонний тест Манна-Уитни, сравнение артериол и венул; двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона для проверки значимости изменений в венулах

$p < 0.001$, и в артериолах $p < 0.001$), что вероятно также связано с особенностями строения артериол и их физиологической ролью по доставке в мозг оГб.

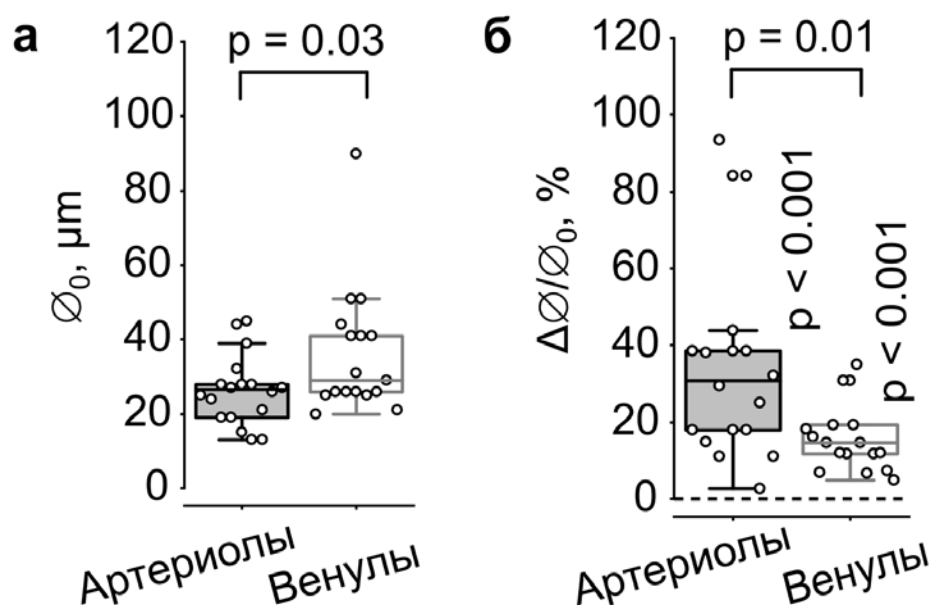


Рисунок 21. Диаграммы размаха, представляющие изменения просвета артериол (серый) и венул (белый) во время функциональной нагрузки. (а) – Сравнение диаметра просвета артериол и венул в покое; (б) – сравнение диаметра просвета сосуда во время локомоции ($\Delta\varnothing$) относительно диаметра в покое до локомоции ($\varnothing_0$) в артериолах и венулах. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между артериол ($n=18$) и венул ($n=17$); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений в венулах и в артериолах. Количество животных $N = 7$.

Таким образом, можно заключить, что во время локомоции, область соматосенсорной коры снабжается кислородом, и питательными веществами

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

4.1.3. Редокс-состояние ЭТЦ астроцитов и нейронов при функциональной нагрузке

Во время функциональной нагрузки наблюдается снижение количества кислорода и питательных веществ в активных областях мозга, которое затем компенсируется их избытком (Bonvento & Bolaños, 2021; Logothetis, 2008) (Рис. 19). Мы предположили, что изменение sO_2 в кровеносных сосудах и редокс-состояния ЭТЦ, расположенных рядом с ними астроцитов, а также нейронов во время функциональной нагрузки носит нелинейный характер.

Для проверки этой гипотезы мы измерили уровень восстановленных цитохромов c,b (Fe^{2+}) в митохондриях, который коррелирует со степенью заполнения ЭТЦ электронами и опосредованно свидетельствует об эффективности окислительного фосфорилирования. С помощью КР картирования, мы зарегистрировали пространственное распределение степени оксигенации sO_2 в кровеносном сосуде и относительное содержание восстановленных цитохромов c,b (Fe^{2+}) в митохондриях астроцита во время функциональной нагрузки (Рис. 22) (сине-желтая цветовая шкала обозначает

относит. содержание восст. цит с,b (Fe^{2+}), фиолетово-оранжевая – уровень оксигенации крови $s\text{O}_2$ в процентах). Во время локомоции происходит значительное увеличение степени оксигенации крови и заметная вазодилатация сосуда (Рис. 22, фиолетово-оранжевая шкала, $s\text{O}_2$). При этом, в астроците наблюдается значительное увеличение восст. цит. с,b (Fe^{2+}) вблизи сосуда (Рис. 22, сине-желтая цветовая шкала). После локомоции наблюдаемые изменения в кровеносном сосуде и астроците возвращаются к изначальному уровню.

Соответственно, функциональная нагрузка связана с увеличением оксигенации крови, вазодилатацией и метаболической активацией близко-расположенных астроцитов, эти наблюдения согласуются с данными о структурной организации астроцитов и их функциональной связи с кровеносными сосудами (Bolaños, 2016).

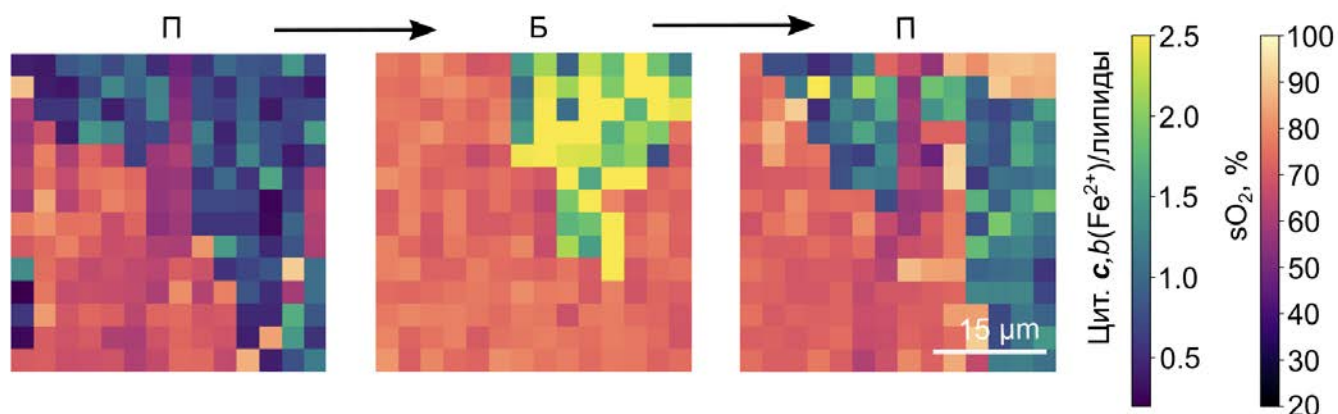


Рисунок 22. КР картирование пространственного распределения степени оксигенации $s\text{O}_2$ в кровеносном сосуде и относительного содержания восстановленных цитохромов с,b (Fe^{2+}) в митохондриях астроцита во время функциональной нагрузки. Регистрация проводилась во время покоя (П), бега (Б) и после функциональной нагрузки (П). Сине-желтая цветовая шкала обозначает содержание восст. цит с,b (Fe^{2+}) относительно липидов, а фиолетово-оранжевая – уровень оксигенации $s\text{O}_2$ в процентах. Спектры КР были записаны в каждом пикселе с шагом в 3 мкм.

Временное разрешение КР-картирования не позволяет в должной мере оценить переход между разными функциональными состояниями животного, поэтому мы зарегистрировали временные серии спектров КР во время функциональной нагрузки, в области идентифицированных астроцитов и нейронов, соответственно.

В астроцитах относительное содержание восст. цит. с,b (Fe^{2+}) постепенно увеличивалось в течение периода локомоции и медленно возвращалось к исходному уровню после него (Рис. 23, а). Напротив, в нейронах уровень восст. цит. с,b (Fe^{2+}) резко снижался в начале локомоции и медленно восстанавливался до исходного уровня в течение оставшегося эпизода локомоции, а также после его окончания (Рис. 23, б). Таким образом, в среднем относительное содержание восст. цит. с,b (Fe^{2+}) в митохондриях астроцитов увеличивалось во время локомоции, тогда как в митохондриях нейронов оно снижалось (Рис. 24) ($p = 0.005$, двухсторонний тест Манна-Уитни, сравнение астроцитов и нейронов; двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона для проверки значимости изменений в астроцитах $p=0.03$, и в нейронах $p=0.03$).

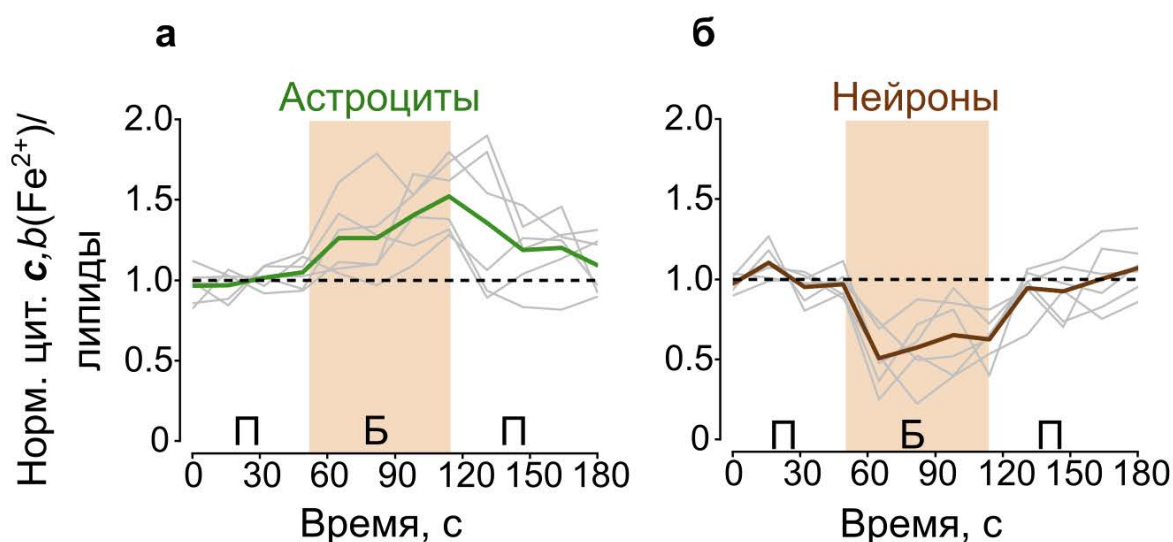


Рисунок 23. Изменение относительного количества восстановленных цит. с, b (Fe^{2+}) в астроцитах (а) и нейронах (б), нормированное на относительное количество восстановленных цит. с, b (Fe^{2+}) в состоянии покоя перед

локомоцией. Тонкие серые линии показывают записи, сделанные для отдельных клеток, толстые цветные линии – средние значения для астроцитов (зеленый) и нейронов (коричневый). Покой (П), бег (Б) и покой после функциональной нагрузки (П).

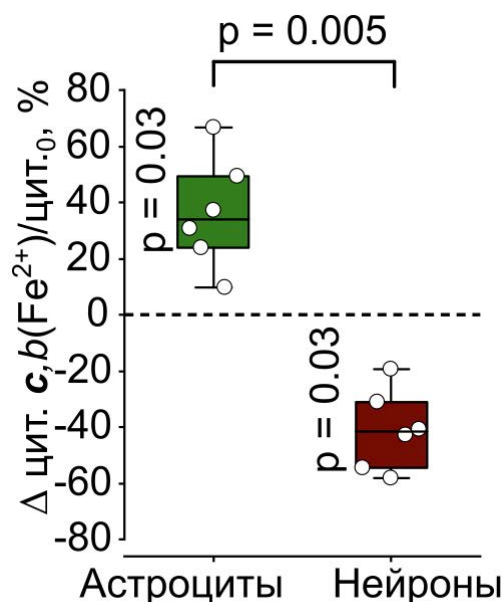


Рисунок 24. Диаграммы размаха, показывающие изменения относительного количества восстановленных цит. с, b (Fe^{2+}) во время локомоции относительно состояния покоя перед локомоцией ($\Delta\text{цит.с,b}(\text{Fe}^{2+})/\text{цит.}_0$) для астроцитов (зеленый цвет) и нейронов (коричневый цвет). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между астроцитами ($n=6$) и нейронами ($n=6$); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был использован для проверки значимости изменений $\Delta\text{цит.с,b}(\text{Fe}^{2+})/\text{цит.}_0$ в астроцитах и нейронах. У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

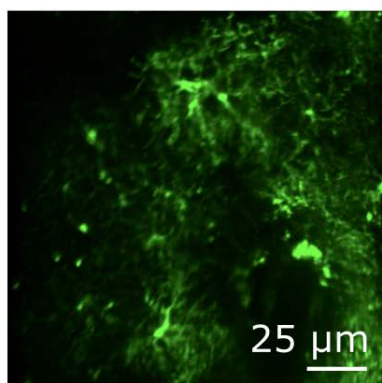
Эти различия, вероятно, связаны со структурными особенностями строения ЭТЦ в астроцитах и нейронах и степенью активности ОФ в этих клетках. Так, ЭТЦ астроцитов имеет разобщенное строение, что приводит к накоплению электронов, и может в свою очередь усиливать продукцию АФК (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019; Lopez-Fabuel et al., 2016). Высокая активность ферментов гликолиза по сравнению с нейронами и эффективность утилизации глюкозы, (Bolaños, 2016; Zhang et al., 2014; Herrero-Mendez et al., 2009; Almeida et al., 2004) указывают на значительную гликолитическую активность астроцитов. Мы полагаем, что активация нейронов при локомоции приводит к Ca^{2+} -опосредованному усилению гликолиза в астроцитах и образованию в них лактата (Horvat et al., 2021; Fedotova et al., 2023), который переходит в нейроны и превращается в пируват для цикла Кребса, увеличивая синтез НАДН для ЭТЦ. Увеличение энергетических потребностей нейронов приводит к активации электронного транспорта в ЭТЦ и усилению синтеза АТФ. При этом в астроцитах, нейрон-опосредованная активация гликолиза вызывает подавление ОФ и замедление ЭТЦ с накоплением электронов. ЭТЦ нейронов, как и других электрогенных клеток, кардиомиоцитов, собрана в виде суперкомплексов и адаптирована для эффективного переноса электронов, электрохимическая сила которого направлена на продукцию молекул АТФ покрывающих высокие энергетические затраты (Lopez-Fabuel et al., 2016; Rosca et al., 2008). Стоит отметить, что скорость снижения количества восст. цит. с,b (Fe^{2+}) в нейронах быстрее, чем зарегистрированное увеличение в астроцитах, вероятно эти временные различия косвенно указывают на лежащие в их основе различные физиологические процессы. В нейронах наблюдаемые изменения вероятно связаны с быстрым метаболическим ответом, тогда как в астроцитах постепенная адаптация, похожа на динамику развития сигнального ответа,

возможно связанного с продукцией АФК (Conze et al., 2025; Ledo et al., 2022; Vicente-Gutierrez et al., 2019).

Заполнение ЭТЦ электронами наряду с повышенной оксигенацией кровеносных сосудов указывает на то, что митохондрии астроцитов могут служить потенциальным источником АФК (Bochkova et al., 2025; Bolaños, 2016). Для того, чтобы проверить эту гипотезу, мы измерили продукцию пероксида водорода в митохондриях астроцитов и нейронов с помощью генетически-кодированного сенсора HyPer7, локализованного в матриксе митохондрий астроцитов (Рис. 25, слева; рис. 26, а) или нейронов (Рис. 25, справа; рис. 26, б). При взаимодействии этого сенсора с эндогенным H_2O_2 происходит увеличение флуоресцентного сигнала окисленной формы HyPer7 (Kotova et al., 2025). Стоит отметить, что новое поколение данного сенсора является стабильным к изменению pH, а также чувствительным к субнанолярным концентрациям H_2O_2 (Pak et al., 2020) в рамках физиологических значений (Sies, 2017). Эти характеристики являются ключевыми в условиях работы *in vivo*.

Действительно, мы обнаружили значительное увеличение концентрации пероксида водорода в астроцитах во время локомоции, но не в нейронах (Рис. 26, в) ($p = 0.03$, двухсторонний тест Манна-Уитни, сравнение астроцитов и нейронов; двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона для проверки значимости изменений в астроцитах $p=0.03$, и в нейронах $p=0.15$).

AAV9-gfaABC1D-mito-HyPer7



AAV9-hSyn-mito-HyPer7

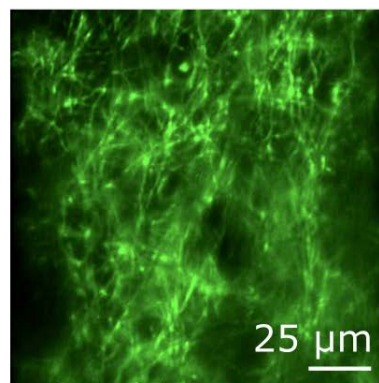


Рисунок 25. Флуоресцентные изображения астроцитов (слева) и нейронов (справа) в области S1, в которых экспрессирован H_2O_2 -сенсор HyPer7 в матриксе митохондрий, полученные с помощью мультифотонной флуоресцентной микроскопии *in vivo*.

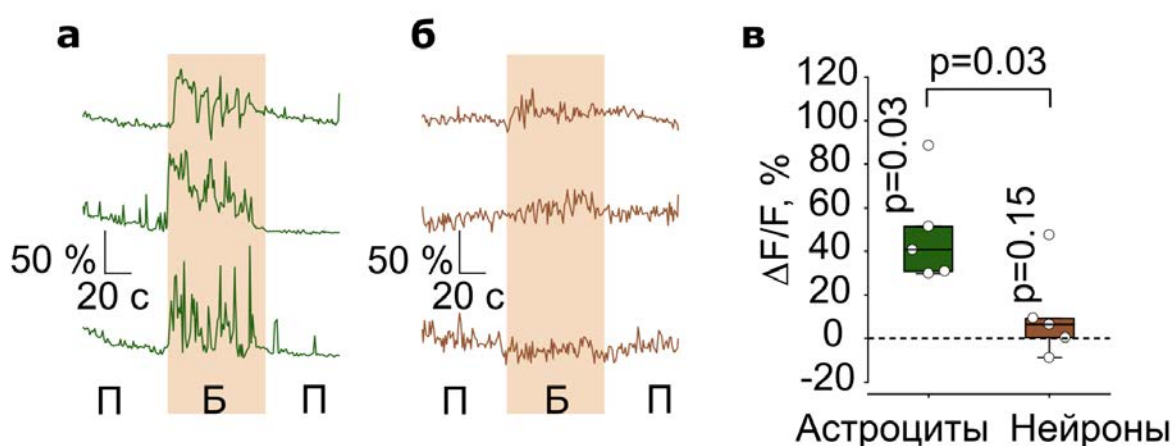


Рисунок 26. Локомоция сопровождается генерацией H_2O_2 в митохондриях астроцитов, но не нейронов. (а) – Примеры изменения флуоресценции сенсора HyPer7 в митохондриях трех астроцитов во время покоя (П), бега (Б) и постлокомоционного покоя (П), измеренные с помощью флуоресцентного режима КР-микроспектрометра. (б) – Примеры изменения флуоресценции сенсора HyPer7 в митохондриях трех нейронов во время покоя (П), бега (Б) и постлокомоционного покоя (П), измеренные с помощью флуоресцентного режима КР-микроспектрометра. (в) – Диаграммы размаха, показывающие изменения флуоресценции HyPer7 во время локомоции по сравнению с ее уровнем во время покоя перед локомоцией ($\Delta F/F$) для астроцитов (зеленый) и нейронов (коричневый). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни для сравнения различий между астроцитами (n=5) и нейронами (n=5); двусторонний одновыборочный ранговый критерий Вилкоксона был

использован для проверки значимости изменений $\Delta F/F$ в астроцитах и нейронах. У каждого животного было зарегистрировано по одной клетке, представлено в виде отдельных точек данных.

Эти данные согласуются с работами, в которых показана связь между продукцией H_2O_2 в митохондриях астроцитов и эффективностью процесса обучения у мышей (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019). Вероятно, сигнальная роль пероксида водорода зависит от астроцита, в котором он образуется, а также от области мозга. Наши результаты указывают на генерацию H_2O_2 в митохондриях астроцитов соматосенсорной коры при функциональных нагрузках, что также может играть сигнальную роль в астро-нейрональных взаимодействиях.

4.2. Распределение митохондрий в астроцитах и нейронах *in vivo*

Ограничением КР-спектроскопии в применении к исследованиям митохондрий является регистрация спектров КР от восстановленных цитохромов b- и c-типа, а не их окисленной формы. Эта методологическая особенность создает трудности при сравнении редокс-состояния митохондрий различных групп животных или клеток, в которых потенциально могут существовать различия в общем количестве комплексов ЭТЦ (Love et al., 2020), самих митохондрий, также результаты могут зависеть от перемещения этих органелл. Для того, чтобы оценить такую возможность мы провели серию экспериментов с двухфотонным имиджингом митохондрий *in vivo* в нейронах и астроцитах, в которых был экспрессирован генетически кодируемый сенсор HyPer7, с локализацией в матриксе этих органелл. При анализе мы не оценивали изменение флуоресценции, а использовали экспрессию этого

сенсора для определения распределения митохондрий в астроцитах и нейронах у бодрствующих животных в покое.

Анализ морфологии и распределения митохондрий является критически важным аспектом в таких экспериментах, потому что существенную сложность представляет разработка и подбор инструментов для обработки данных флуоресцентного имиджинга. Основными ограничениями ручной сегментации изображений являются субъективность исследователя и высокая времязатратность. Несмотря на множество существующих решений для универсальной автоматизированной обработки (традиционные алгоритмы, подходы машинного обучения) (Lefebvre et al., 2025), их эффективность зависит от экспериментальных условий: типа микроскопии, объекта исследований (*ex vivo*, *in vivo*), артефактов изображений (движение во время съемки, соотношение сигнал/шум, вариабельность сигнала). Комбинация адаптированных методов с учетом специфики экспериментальных данных обеспечивает создание воспроизводимого протокола анализа для проведения сравнительных исследований. Исходя из вышеизложенного, мы разработали и оптимизировали протокол анализа морфологии митохондрий астроцитов и нейронов мышей на основе данных флуоресцентного имиджинга *in vivo*. Данный подход включает предобработку изображений (устранение шумов, коррекция артефактов и др.), сегментацию органелл с использованием традиционных алгоритмов и нейросетевых подходов, извлечение и анализ морфометрических параметров, а также динамики митохондриальной сети в реальном времени (Рис. 27). Предварительная обработка сырых данных, заключалась в подавлении шума, с помощью недавно разработанного в лаборатории алгоритма (Fedotova et al., 2023). После улучшения локального контраста в программе ImageJ, мы использовали плагин Napari – Nellie, для

автоматической сегментации и извлечения морфологических параметров митохондрий (Lefebvre et al., 2025).

В ходе сегментации с помощью Nellie, сначала происходит маркировка пространственно разобщенных органелл. На их основе происходит скелетизация, с помощью которой определяются точки ветвления внутри отдельных органелл, в итоге можно разложить сеть органелл на индивидуально маркированные ветви или субкомпарменты органелл (Рис. 28).

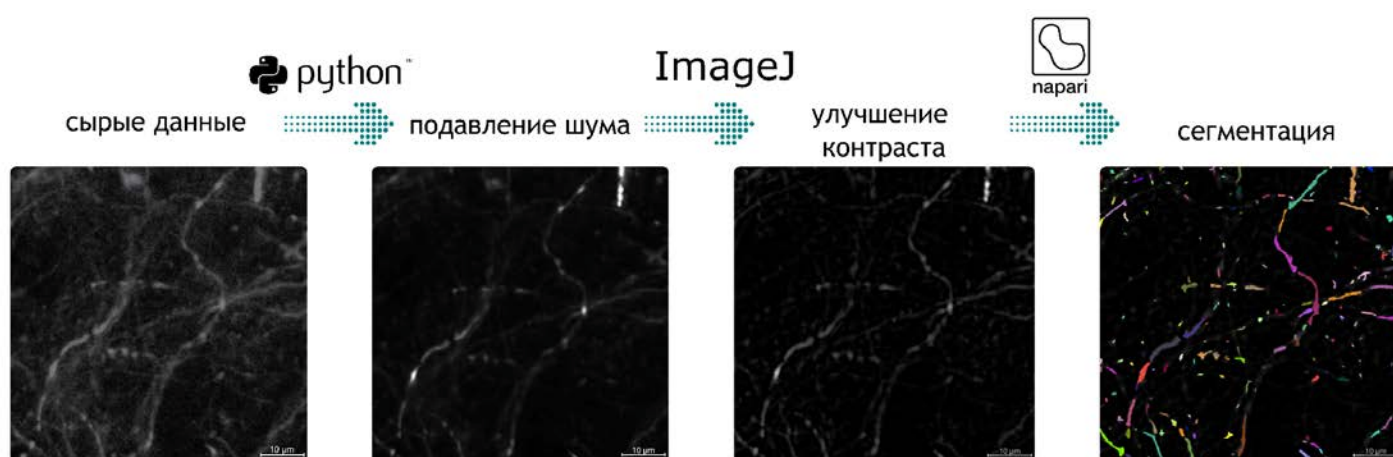


Рисунок 27. Разработанная схема анализа морфологии митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo*. Сначала, в сырых данных происходит коррекция сдвигов, биннинг, и подавление шума, далее с помощью ImageJ производится улучшение локального контраста. Плагин Napari – Nellie используется для автоматической сегментации и извлечение признаков митохондрий. Шкала 10 МКМ.

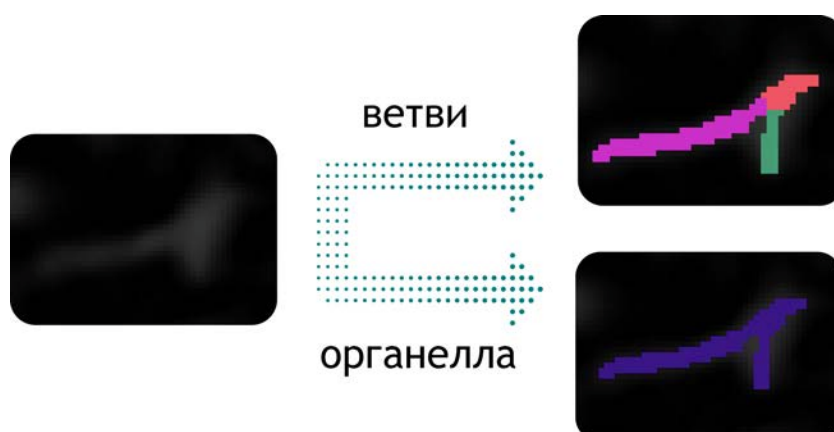


Рисунок 28. Типы сегментации флуоресцентных изображений митохондрий с помощью Nellie. Разным цветом обозначены отдельные ветви митохондрий (сверху), которые принадлежат выделенной органелле (снизу).

В результате автоматической сегментации на отдельные ветви и органеллы мы не обнаружили достоверных различий в значении средней площади митохондрий между нейронами и астроцитами ($p = 0.7222$ смешанная линейная модель, средняя площадь органелл) (Рис.29, слева), ($p = 0.7987$ смешанная линейная модель, средняя площадь ветвей) (Рис.29, справа).

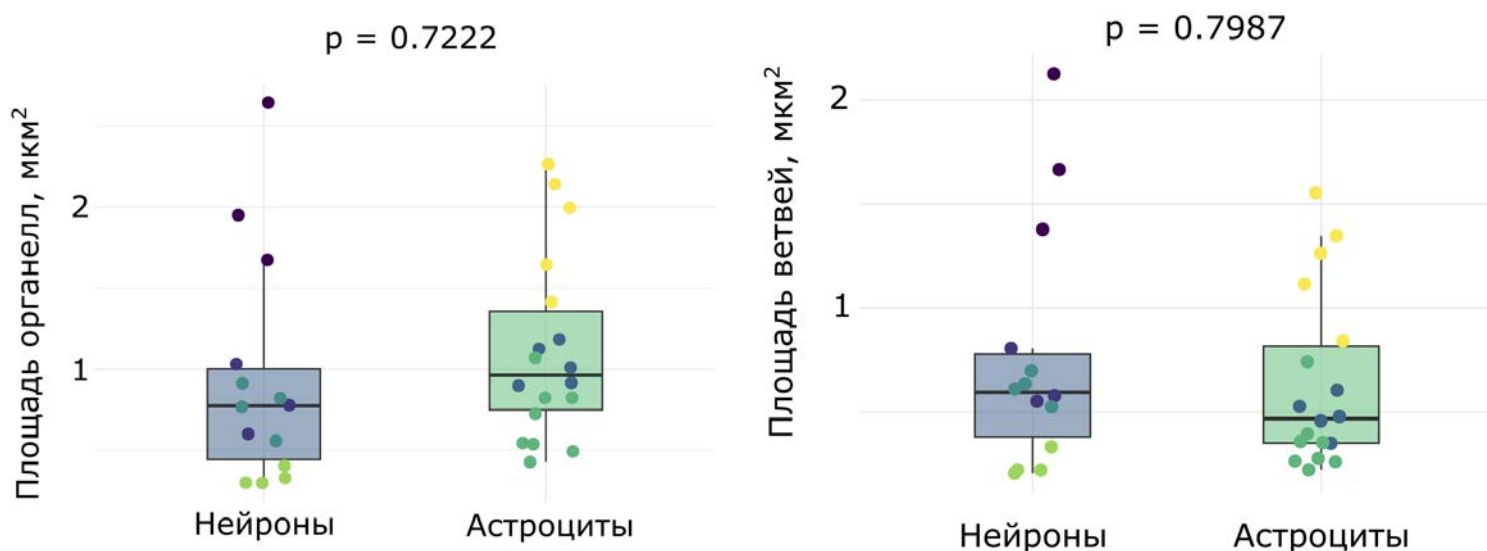


Рисунок 29. Средняя площадь органелл (слева) и ветвей митохондрий (справа) астроцитов и нейронов. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квантили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов ($N = 3$), нейронов ($N=4$).

Мы сравнили суммарное значение площади, выделенных ветвей и органелл между астроцитами и нейронами, это значение не различалось между типами клеток для двух типов сегментации ($p = 0.2923$ смешанная линейная модель, общая площадь органелл) (Рис. 30, слева), ($p = 0.2924$ смешанная линейная модель, общая площадь ветвей) (Рис. 30, справа). Значения площади между разными типами сегментации совпадают, это означает, что в ходе автоматической обработки на точки ветвления из органелл, не происходит лишней или недостаточной сегментации. Таким образом, полученные данные указывают на похожее распределение количества митохондрий в астроцитах и нейронах.

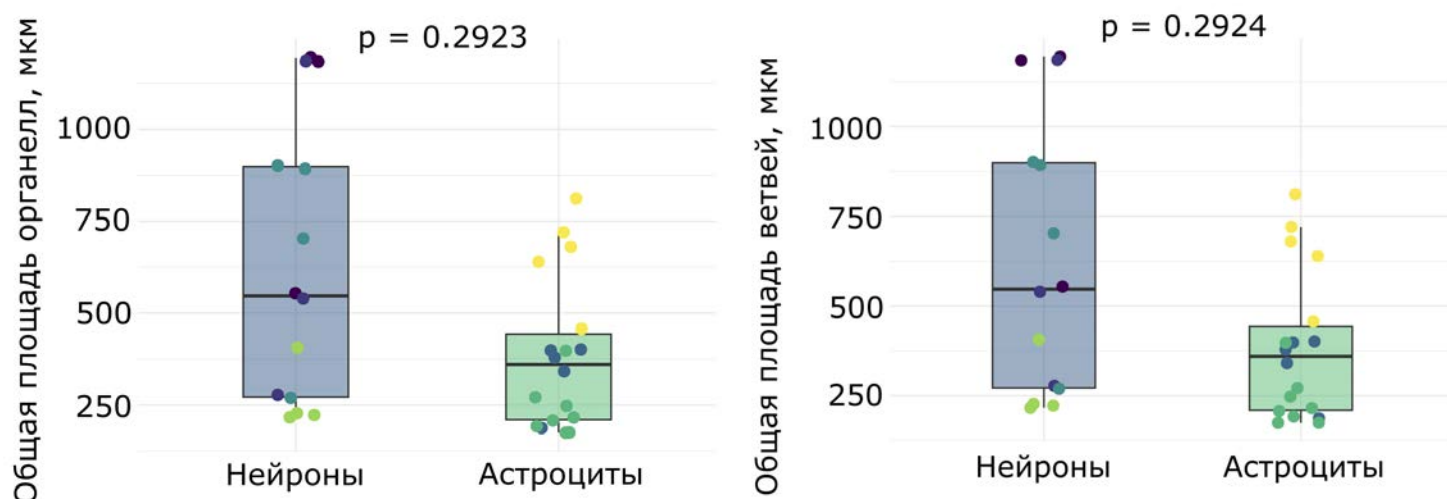


Рисунок 30. Общая площадь органелл (слева) и ветвей митохондрий (справа) астроцитов и нейронов. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов (N = 3), нейронов (N=4).

Учитывая, что мы не нашли достоверных различий в распределении количества митохондрий между астроцитами и нейронами, и не обнаружили различий между типами сегментации, мы предположили, что детальный анализ различных параметров ветвей органелл позволит более точно оценить морфологические особенности сетей митохондрий. Мы сравнили длину и ширину ветвей митохондрий между астроцитами и нейронами, эти параметры достоверно не различались ($p = 0.8886$ смешанная линейная модель, средняя длина ветвей органелл) (Рис.31, слева), ($p = 0.7972$ смешанная линейная модель, средняя толщина ветвей) (Рис.31, справа). Так, средняя длина, выделенных ветвей митохондрий составляет приблизительно 1-1.5 мкм, а толщина 0.4-0.5 мкм в астроцита и в нейронах, а среднее соотношение сторон находится в области 2.5-2.75 ($p = 0.567$ смешанная линейная модель, соотношение сторон ветвей) (Рис. 32).

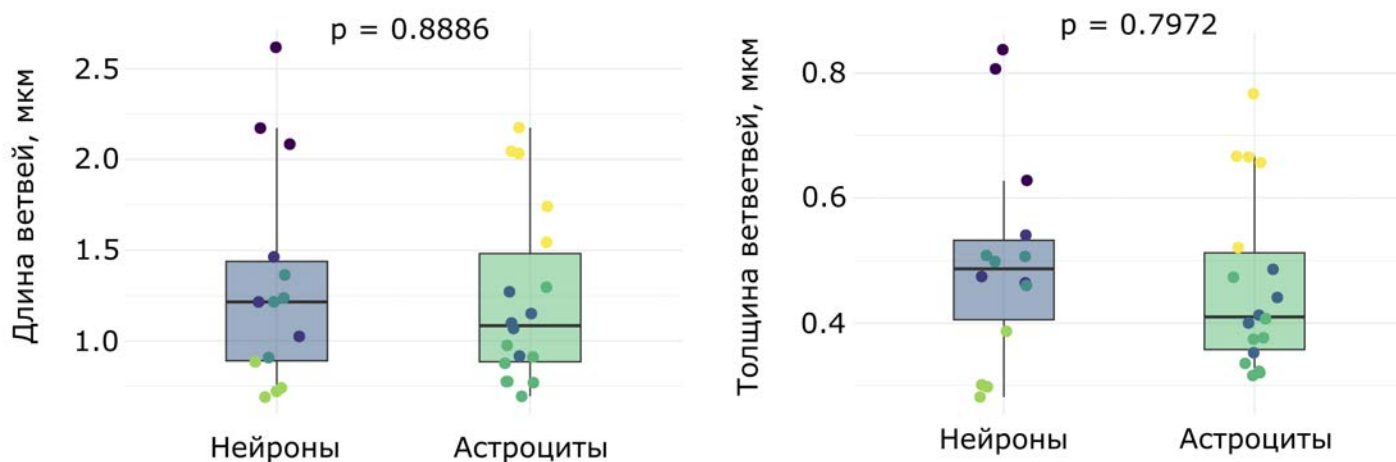


Рисунок 31. Сравнение длины (слева) и толщины (справа) ветвей митохондрий астроцитов и нейронов. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов (N = 3), нейронов (N=4).

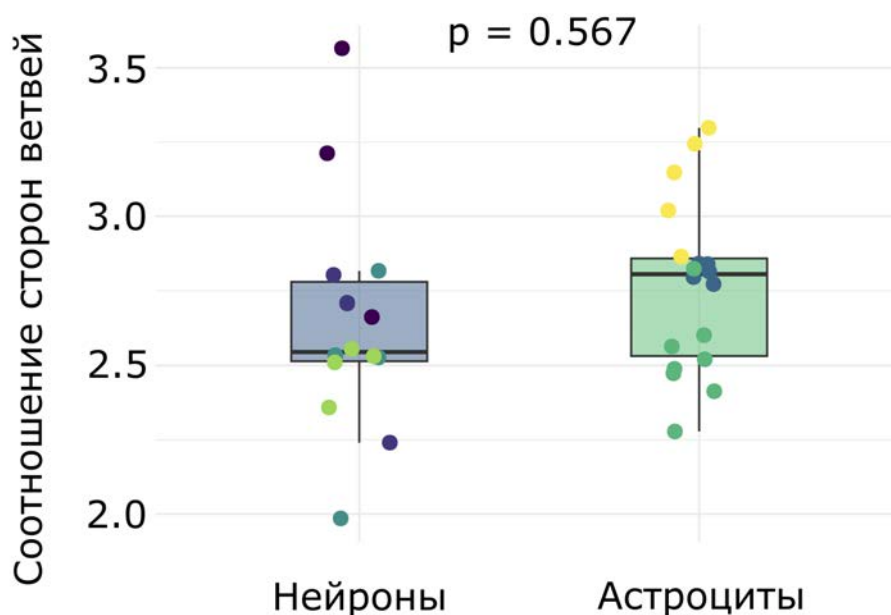


Рисунок 32. Соотношение длины и толщины ветвей митохондрий астроцитов и нейронов. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов (N = 3), нейронов (N=4).

Несмотря на то, что размеры, выделенных ветвей митохондрий не различаются между астроцитами и нейронами, эти значения напрямую не влияют на количество изгибов или степень извилистости митохондрий. Эта характеристика косвенно указывает на сложность организации митохондриальной сети, и может быть связана с морфологическими особенностями определенных клеток. Количество изгибов ветвей митохондрий между астроцитами и нейронами статистически не различаются ($p = 0.1048$ смешанная линейная модель) (Рис.33).

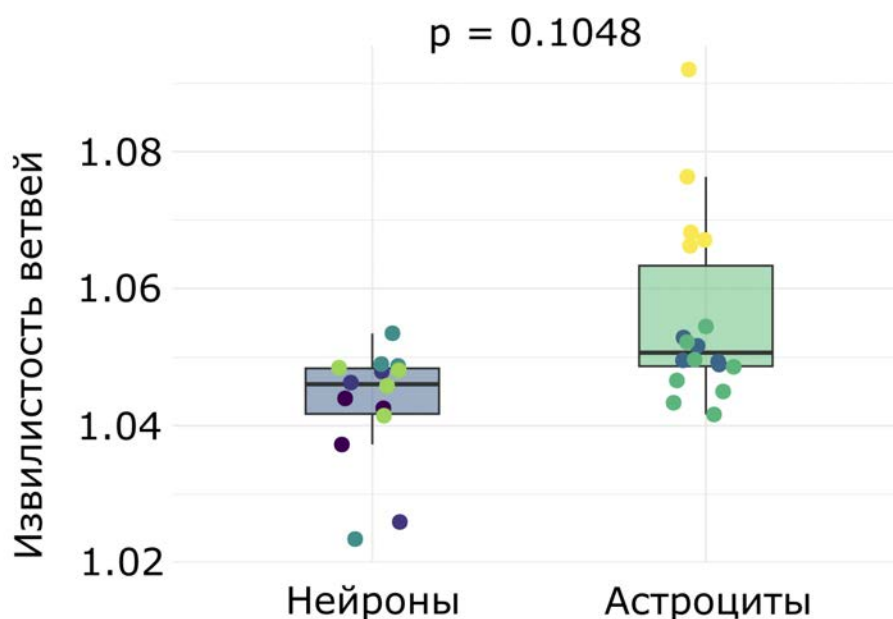


Рисунок 33. Сравнение степени извилистости ветвей митохондрий астроцитов и нейронов. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов (N = 3), нейронов (N=4).

Мы оценили коэффициент заполнения (extent feature) для ветвей митохондрий, этот параметр рассчитывается как отношение между количеством вокселей конкретной ветви, деленное на количество вокселей в ограничивающем прямоугольнике (bounding box) для этой ветви. Чем ближе это значение к единице, тем плотнее заполнено возможное пространство. Ветви митохондрий нейронов более плотно занимают пространство, чем астроциты ($p = 0.0239$ смешанная линейная модель) (Рис.34). Эти данные косвенно

указывают на то, что степень связанности в митохондриальной сети нейронов выше, вероятно она более компактна, по сравнению с астроцитами. В митохондриальной сети с такой организацией контроль качества отдельных митохондрий, а также эффективность метаболических процессов может быть выше.

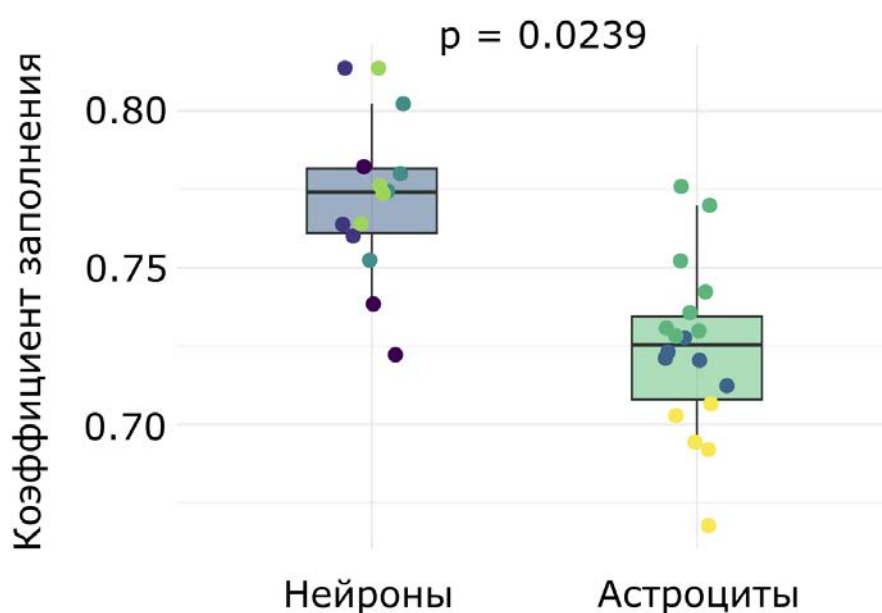


Рисунок 34. Сравнение коэффициентов заполнения, рассчитанных для ветвей митохондрий астроцитов и нейронов. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – 95 % доверительный интервал. Статистическая значимость определялась с помощью смешанной линейной модели. Точки соответствуют отдельным записям, цвет точек – конкретное животное. Количество животных в группе астроцитов (N = 3), нейронов (N=4).

Мы оценили возможные перестройки сети митохондрий с течением времени, для этого было проведено сравнение площади ветвей митохондрий внутри конкретной экспериментальной сессии, чтобы оценить мобильность

этих органелл. В наших экспериментах мы не обнаружили достоверных изменений, указывающих на перестройки или движение в сети митохондрий астроцитов ($p = 0.1064$, парный критерий Вилкоксона) (Рис. 35, слева) и нейронов ($p = 0.2393$, парный критерий Вилкоксона) (Рис. 35, справа) на разных временных отрезках (кадрах записи).

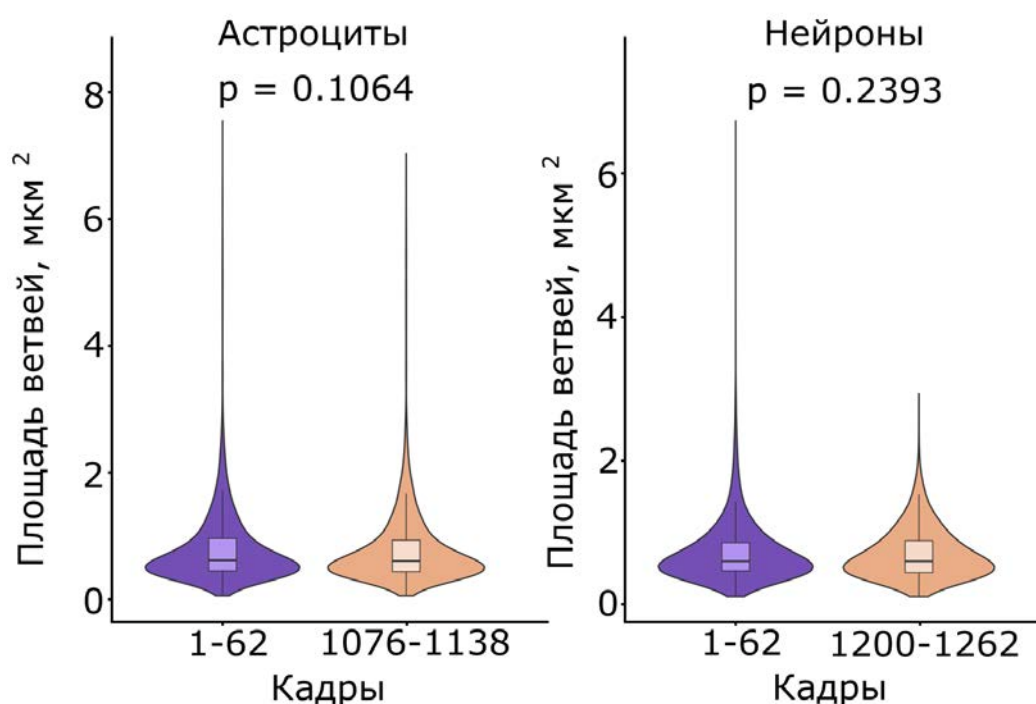


Рисунок 35. Сравнение распределения площади ветвей митохондрий астроцитов (*слева*) и нейронов (*справа*) внутри одной экспериментальной записи. Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Статистическая значимость определялась с помощью парного критерия Вилкоксона. На графике представлены значения распределения площади ветвей митохондрий в промежутках определенных кадров, сравнивали начало сессии 1-62 кадры и ее конец 1076-1138/1200-1262.

Таким образом, мы не обнаружили достоверных различий в распределении и морфологических характеристиках митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo*. Согласно полученным данным, мы охарактеризовали средний размер ветвей митохондрий, который составили 1-1.5 мкм в длину, с толщиной 0.4-0.5 мкм. Мы отметили, что коэффициент заполненности несколько выше для митохондрий нейронов, что указывает на более компактную морфологию сети митохондрий, эта характеристика вероятно связана с более эффективным метаболизмом и осуществлением контроля качества отдельных органелл. Перераспределение митохондрий в условиях *in vivo* в течение наших экспериментальных сессий не происходило, вероятно эти процессы могут осуществляться на других временных интервалах, или в определенных условиях, например во время активного деления и развития клеток (McCarron et al., 2013; Chalmers, Saunter, et al., 2012; Z. Li et al., 2004; Morris & Hollenbeck, 1993).

Можно заключить, что полученные результаты КР-микроспектроскопии *in vivo* между нейронами и астроцитами при функциональных нагрузках не связаны с морфологическими особенностями, распределением или мобильностью митохондриальной сети. Скорее, полученные данные свидетельствуют о различной организации ЭТЦ астроцитов и нейронов и связаны с особенностями их метаболизма.

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

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

Мы показали, что во время покоя и функциональной нагрузки степень заполнения ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов в соматосенсорном кортексе различается. Это обусловлено строением ЭТЦ и различным вкладом ОФ и гликолиза в метаболизм этих клеток. Основной энергетический субстрат нейронов лактат, который поставляется в эти клетки из астроцитов для последующего ОФ во время усиленной нейрональной активности, опосредованной глутаматергической передачей и рядом других стимулов (Horvat et al., 2021; Obel et al., 2012; Bittner et al., 2011; Ruminot et al., 2011; Hutchinson et al., 2007; Takahashi et al., 1995; Pellerin & Magistretti, 1994; Yu et al., 1993). В нейронах, ЭТЦ работает на продукцию АТФ через ОФ, при этом усиление гликолиза может приводить к окислительному стрессу (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009).

Мы предположили, что повышенная концентрация глюкозы в крови может влиять на редокс-состояние митохондрий нейронов, но не астроцитов, способствуя образованию активных форм кислорода. Мы проверили эту гипотезу в модели острой гипергликемии, чтобы оценить с помощью разработанного нами метода КР микроспектроскопии *in vivo*, как резкое системное увеличение концентрации глюкозы влияет на работу ЭТЦ в нейронах и астроцитах в спокойном бодрствовании.

После идентификации астроцитов и нейронов по флуоресценции репортерных белков, КР спектры регистрировали в спокойном состоянии мышей до и после внутрибрюшинной инъекции глюкозы или NaCl.

КР спектры нейронов и астроцитов *in vivo* представляют собой набор пиков с максимальными положениями описанными выше, а также выделяют 1172, 1300, 1313, 1338 см^{-1} , соответствующих колебаниям связей в молекулах гема восстановленных цитохромов b-типа (цит. $\text{b}(\text{Fe}^{2+})$) и восстановленного цитохрома c1 в комплексе III и восстановленного цитохрома c (цит. $\text{c}(\text{Fe}^{2+})$) (Popov et al., 2022; Brazhe et al., 2013; Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012). Пики при 1300 и 1338 см^{-1} относятся к гему в цитохроме b (Fe^{2+}), тогда как пик при 1313 см^{-1} относится исключительно к гему в цитохромах c-типа, в пик 1172 см^{-1} вносит вклад гемы c и b-типа (Kakita et al., 2012; Okada et al., 2012).

Мы показали, что инъекция глюкозы приводит к увеличению относительного содержания восстановленных цитохромов c- и b-типов по сравнению с липидами в ЭТЦ митохондрий нейронов (Kotova et al., 2023) (Рис. 36). При наложении спектров КР в контроле и после инъекции глюкозы видно, что относительная интенсивность всех пиков, относящихся к восстановленным цитохромам c- и b-типа становится выше при гипергликемии (Рис. 36, светло-голубой спектр). Эти данные указывают на то, что в этих условиях ЭТЦ нейронов переполняется электронами больше, чем в контроле.

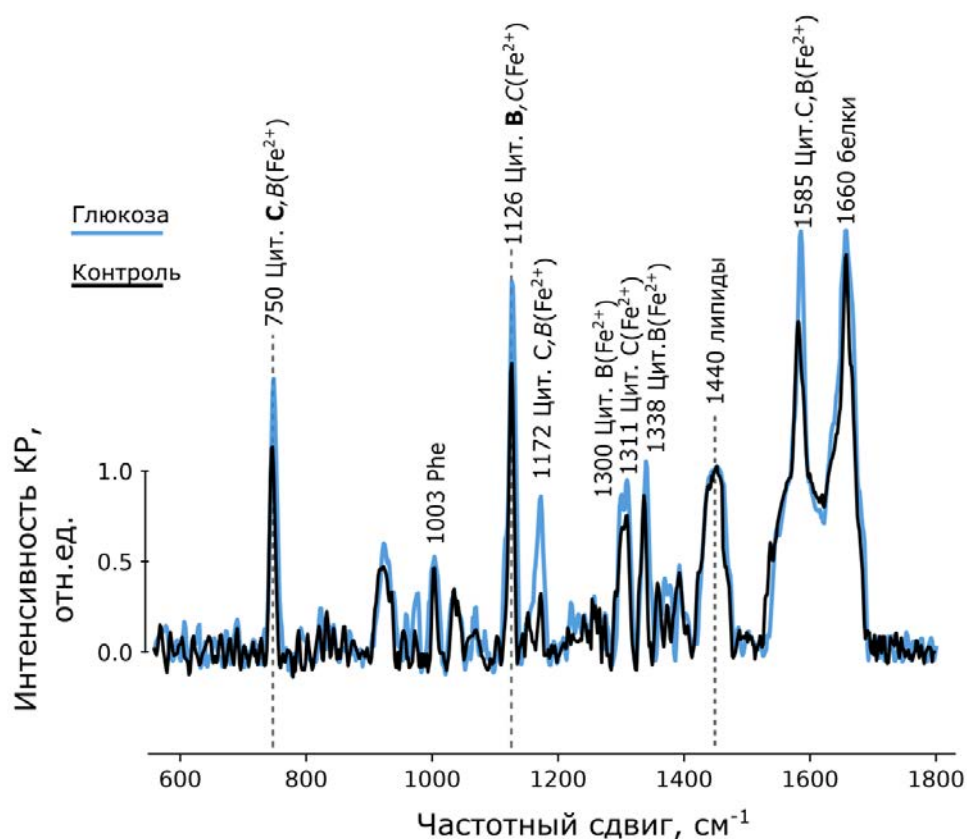


Рисунок 36. Гипергликемия приводит к увеличению загрузки ЭТЦ электронами в нейронах соматосенсорной коры бодрствующих мышей. Типичные спектры КР нейронов соматосенсорной коры мыши через 35 мин после инъекции глюкозы (светло-голубой спектр) и после инъекции раствора NaCl (черный спектр). Каждый спектр нормирован по интенсивности его пика с положением максимума при 1440 см^{-1} , соответствующего колебаниям связей Н-С-Н в липидах. Числа и сокращения над пиками соответствуют названиями молекул и значениям частотного сдвига для положения их максимумов. Пунктирные линии обозначают пики, которые использовались для оценки редокс-состояния ЭТЦ митохондрий.

Увеличение относительного количества восст. цит. с (Fe^{2+}) и цит. b (Fe^{2+}) начинается через минуту после инъекции глюкозы и достигает плато через

10–15 мин (Рис. 37 а, б). В течение этого временного интервала восстановление цитохромов с-типа, по-видимому, происходит немного быстрее, чем цитохромов b-типа (Рис. 37 в), что может быть связано со снижением скорости переноса электронов от цитохрома с к комплексу IV.

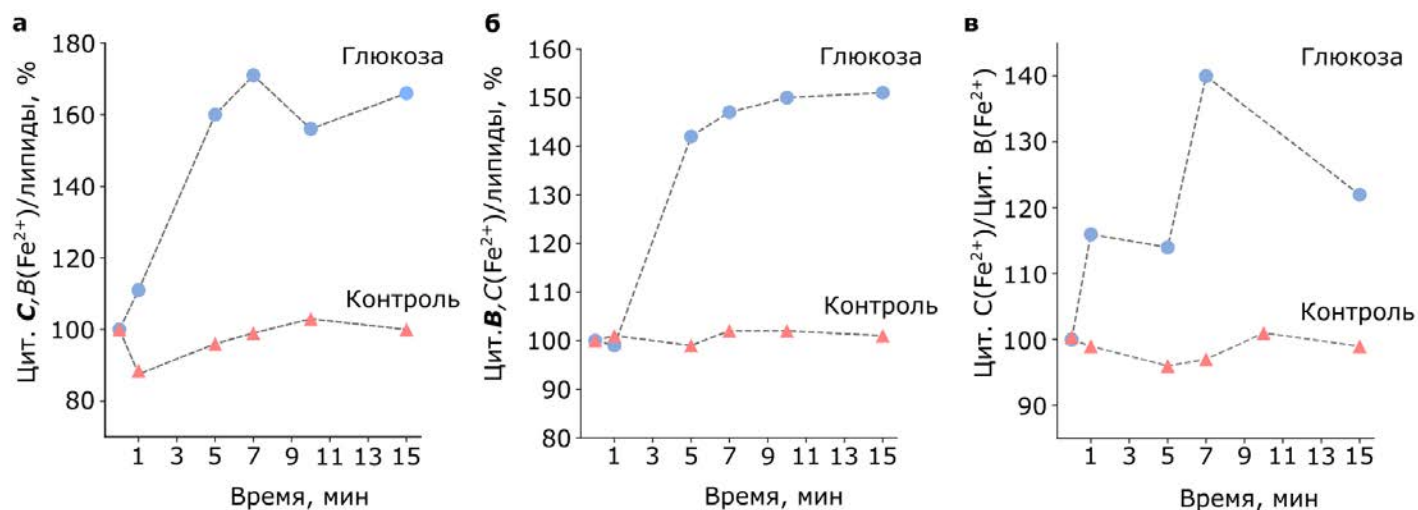


Рисунок 37. Типичная кинетика изменения относительного количества восстановленных цитохромов с и b-типа (КР-соотношения I_{750}/I_{1440} и I_{1126}/I_{1440}) (**а** и **б**) и их соотношения (КР-соотношение I_{750}/I_{1126}) (**в**) в митохондриях нейронов *in vivo* после инъекции глюкозы или раствора NaCl (контроль). Для наглядности КР-соотношения в каждой временной точке нормированы по соответствующему КР-соотношению в нулевой временной точке и представлены в процентах от нулевого минимального значения. I – интенсивность.

Через 20–50 мин после инъекции глюкозы все еще наблюдается увеличение относительного количества цит. с (Fe²⁺) (Рис. 38, а) ($p = 0.001$, непараметрический t-критерий Стьюдента) и цит. b (Fe²⁺) (Рис. 38, б) ($p = 0.01$, непараметрический t-критерий Стьюдента), но относительное восстановление

цитохромов с-типа по сравнению с цитохромами b-типа происходит одинаково (Рис. 38, в) ($p = \text{NS}$, непараметрический t-критерий Стьюдента). Эти данные указывают на то, что загрузка ЭТЦ электронами пропорционально увеличивается на участках цит. b в Q-цикле, цитохромах c1, цитохроме c и комплексе IV (Рис. 38, в).

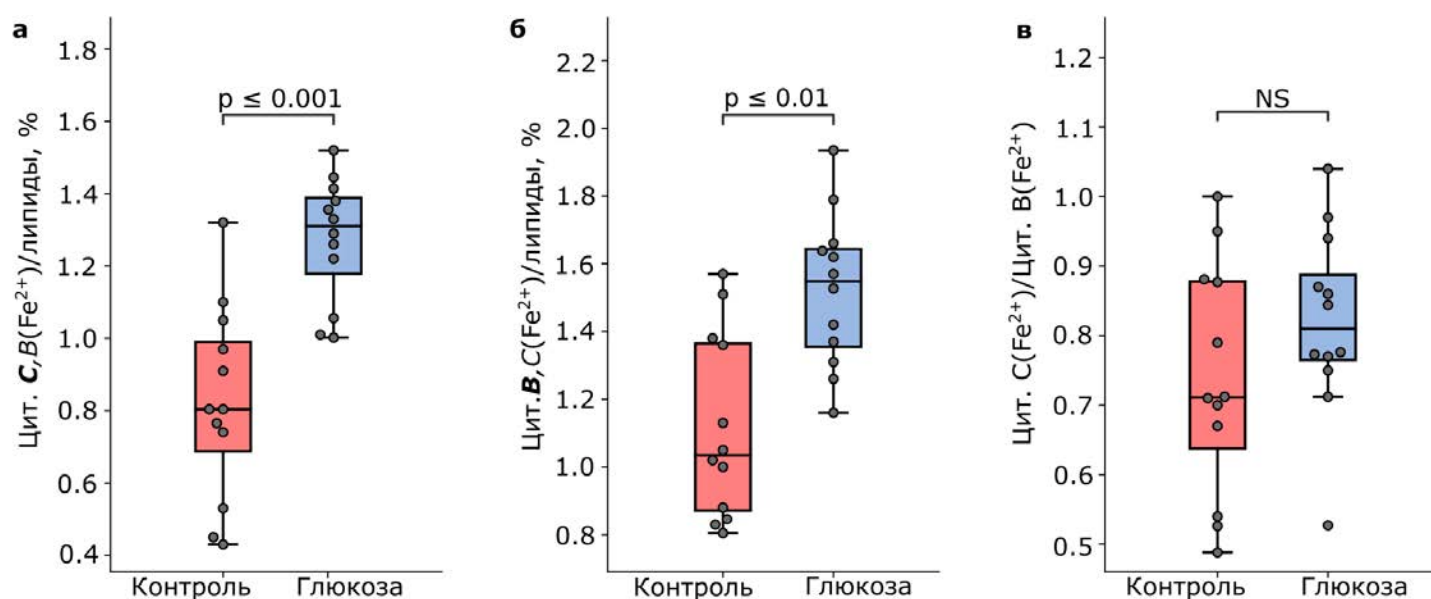


Рисунок 38. Относительное количество восстановленных цитохромов с- и b-типов (а и б) и их соотношение (в) в митохондриях ЭТЦ нейронов *in vivo* через 20–50 мин после инъекции глюкозы или раствора NaCl (контроль). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Серые точки показывают индивидуальные экспериментальные значения. Количество мышей в каждой группе ($N = 4$), количество зарегистрированных клеток в каждой группе ($n = 12$). Статистическая значимость определялась с помощью непараметрического t-критерия Стьюдента. NS $p > 0.05$.

Анализ астроцитов в условиях гипергликемии не показал достоверных различий в редокс состоянии цит. *c* (Рис. 39 а, $p = 0.4020$, двусторонний критерий Манна-Уитни) и *b* типа (Рис. 39 б, $p = 0.1653$, двусторонний критерий Манна-Уитни) и их соотношении (Рис. 39 в; $p = 0.8154$, двусторонний критерий Манна-Уитни). Таким образом, резкое увеличение глюкозы не приводит к загрузке ЭТЦ астроцитов электронами.

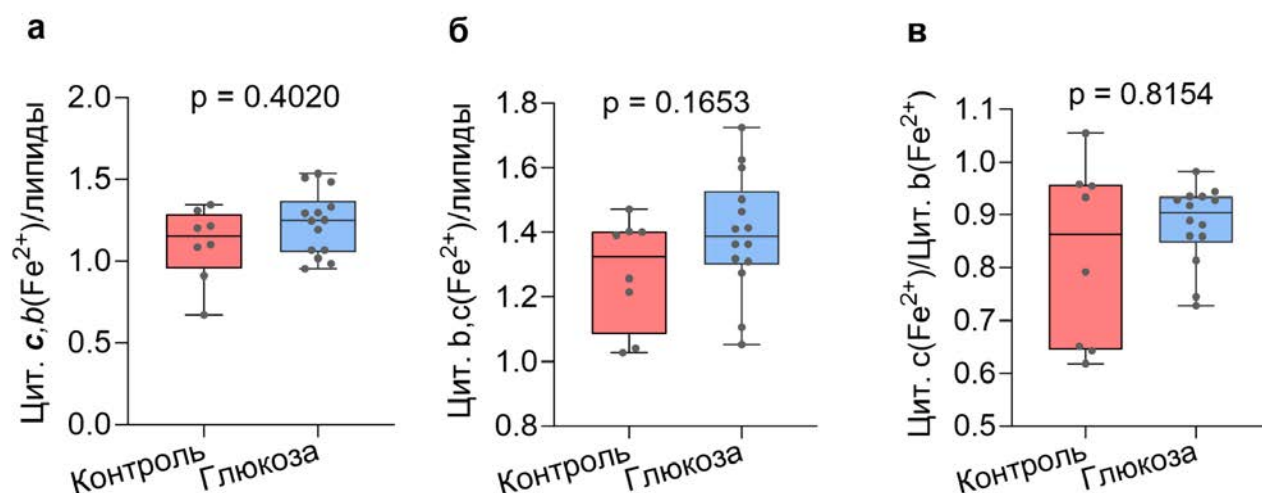


Рисунок 39. Относительное количество восстановленных цитохромов *c*- и *b*-типов (а и б) и их соотношение (в) в митохондриях ЭТЦ астроцитов *in vivo* через 20–50 мин после инъекции глюкозы или раствора NaCl (контроль). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Серые точки показывают индивидуальные экспериментальные значения. Количество мышей в каждой группе ($N = 3$), количество зарегистрированных клеток в контрольной группе ($n = 8$), в группе с инъекцией глюкозы ($n = 14$). Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни.

В условиях острой гипергликемии мы обнаружили накопление электронов в ЭТЦ нейронов, но не астроцитов, что может быть обусловлено

несколькими причинами. Увеличение заполненности ЭТЦ электронами может быть связано с увеличением количества первичных доноров электронов в комплексах I и II. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемое увеличение загрузки ЭТЦ электронами в нейронах обусловлено повышенным снабжением комплексов I и II молекулами НАДН, поступающих из ЦТК, который в свою очередь может перенасыщаться ацетилкоферментом А из-за избытка глюкозы и активации гликолиза. Мы предполагаем, что в условиях текущего эксперимента снабжение нейронов O_2 одинаково для обеих исследуемых групп мышей, поэтому отток электронов с комплекса IV на O_2 не изменяется. Увеличение количества восстановленных цитохромов в дыхательной цепи может усилить генерацию $O_2^{\cdot -}$ в Q-цикле в комплексе III или в комплексе I в сайте взаимодействия с НАДН или при восстановлении убихинона (Murphy, 2009). В свою очередь, супероксид-анион радикал может взаимодействовать с соседними молекулами или с другими активными формами кислорода или азота и инициировать окислительный стресс.

Наши данные указывают на то, что в условиях гипергликемии происходит увеличение загруженности ЭТЦ электронами в нейронах, что в свою очередь может приводить к увеличенной продукции АФК. При этом, достоверных различий в редокс-состоянии ЭТЦ митохондрий в астроцитах в условиях гипергликемии не было обнаружено. Это согласуется с литературными данными, где показано, что усиление гликолиза в нейронах, но не в астроцитах приводит к нейродегенерации за счет АФК-опосредованного окислительного стресса (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009). Мы предполагаем, что в астроцитах гипергликемия усиливает захват глюкозы и гликолиз с образованием лактата, который затем транспортируется в нейроны, превращается в пируват и в виде кофермента А входит в цикл Кребса. В результате, в митохондриях нейронов образуется избыток НАДН и сукцината, и в ЭТЦ поступает

количество электронов сверх нормы, приводя к увеличению содержания восстановленных цитохромов. При этом астроциты не получают избытка субстратов цикла Кребса и поэтому астроцитарная ЭТЦ не заполняется электронами. Также нельзя исключать активацию гликолиза и в самих нейронах с последующим увеличением активности как пентозофосфатного шунта, так и “обычного” гликолиза.

Мы предполагаем, что гипергликемия за счет увеличения количества электронов в ЭТЦ может вызывать увеличение продукции O_2^- в нейронах, что в свою очередь приводит к окислительному стрессу при хроническом воздействии. Так, известно, что при диабете 2 типа, который характеризуется высоким содержанием глюкозы в крови из-за инсулинорезистентности (хроническая гипергликемия), наблюдаются когнитивные нарушения (Gupta et al., 2023; Lalithambika et al., 2019; Rajamani, 2014).

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

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

Мы показали, что гипергликемия приводит к увеличению загруженности ЭТЦ электронами в нейронах, что может усиливать продукцию O_2^- и приводить к окислительному стрессу. Глюкоза - это основной, но не единственный энергетический субстрат, который поступает в мозг с кровотоком, при этом жирные кислоты вносят меньший, но существенный вклад в метаболизм мозга

(Corales et al., 2024; Lebon et al., 2002; Auestad et al., 1991; Cerdan et al., 1990; Edmond et al., 1987).

Нейроны, в отличие от астроцитов, в норме не накапливают жирные кислоты в виде липидных капель, также известно, что этот субстрат неэффективно окисляется за счет их митохондриального метаболизма (Ioannou et al., 2019; Schönfeld & Reiser, 2017). Усиление бета-окисления ЖК в астроцитах обладает нейропротекторным эффектом (Escartin et al., 2007). При катаболизме ЖК происходит образование сигнальных АФК в астроцитах, играющих важное значение в различных когнитивных процессах, включая исследовательское поведение, обучение и память (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019).

Мы предположили, что увеличение количества жирных кислот, поступающих с пищей, скажется на метаболизме астроцитов, но не нейронов, что в свою очередь может оказать положительный эффект на работу мозга. Для того, чтобы проверить эту гипотезу мы провели эксперименты на двух группах мышей, в возрасте 2 месяцев, содержащихся в течение 1 месяца на стандартной диете (контроль, контр.) или диете с высоким содержанием жира (high fat diet, HFD; Рис. 40 а, б).

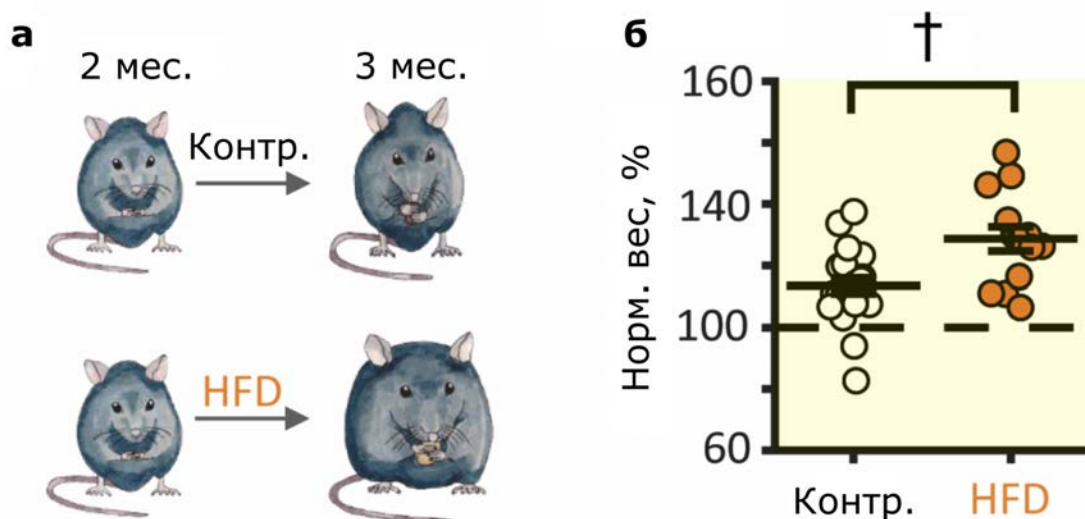


Рисунок 40. Дизайн эксперимента (а) и изменение веса животных на диете с высоким содержанием жира (HFD) (б). (а) В исследовании были использованы две группы двухмесячных мышей, контрольная группа (контр.) получала стандартный корм; экспериментальная группа получала корм с высоким содержанием жира (HFD) в течение одного месяца. (б) Изменение веса в процентах в контрольной (контр.) и HFD группах, нормированы на значение в контроле. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 22) и HFD (оранжевые кружки, N = 14) группах; $\dagger p < .01$, двухвыборочный t-критерий.

Набор веса был достоверно выше в группе HFD ($p = 0.002$, двухвыборочный t-критерий; Рис. 40, б). Диета с высоким содержанием жира приводит к более быстрому набору веса у молодых животных и вероятно может оказывать влияние на метаболизм разных клеток мозга.

В мозге астроциты играют центральную роль в метаболизме липидов, они метаболизируют жирные кислоты и запасают их в форме липидных капель. Астроциты синтезируют стероловые липиды, фосфолипиды, сфинголипиды и холестерин, которые необходимы для производства и поддержания биологических мембран (Lee et al., 2021; Pfrieger & Ungerer, 2011). Холестерин является важным строительным элементом для процесса синаптогенеза как в период развития, так и во взрослом возрасте (van Deijk et al., 2017). В центральной нервной системе, в астроцитах происходит основной синтез и транспорт холестерина в нейроны (Nieweg et al., 2009).

В связи с тем, что накопление субстрата в виде жирных кислот происходит в течение долгого времени, проведение острых экспериментов с увеличением количества ЖК в крови в условиях *in vivo* было затруднено.

Поэтому мы оценили влияние HFD на метаболический статус астроцитов и нейронов области гиппокампа, с помощью КР-микроспектроскопии на срезах в условиях *ex vivo*. Мы выбрали данную область из-за характерной citoархитектуры разных слоев, и ее ведущей роли в исследовательском поведении, и процессах обучения и памяти (Ben-Ari & Represa, 2009; A. Johnson et al., 2012).

Астроциты и нейроны были идентифицированы с помощью двойного иммуногистохимического окрашивания срезов гиппокампа. Эта методика была специально разработана и адаптирована в нашей лаборатории для КР-микроспектроскопии таким образом, чтобы избежать вымывания липидов из клеточных мембран при окрашивании, и существенно снизить интенсивность флуоресценции вторичных антител для успешной регистрации многокомпонентных КР спектров, позволяющих оценить различные липидные и цитохромные пики (Рис. 41).

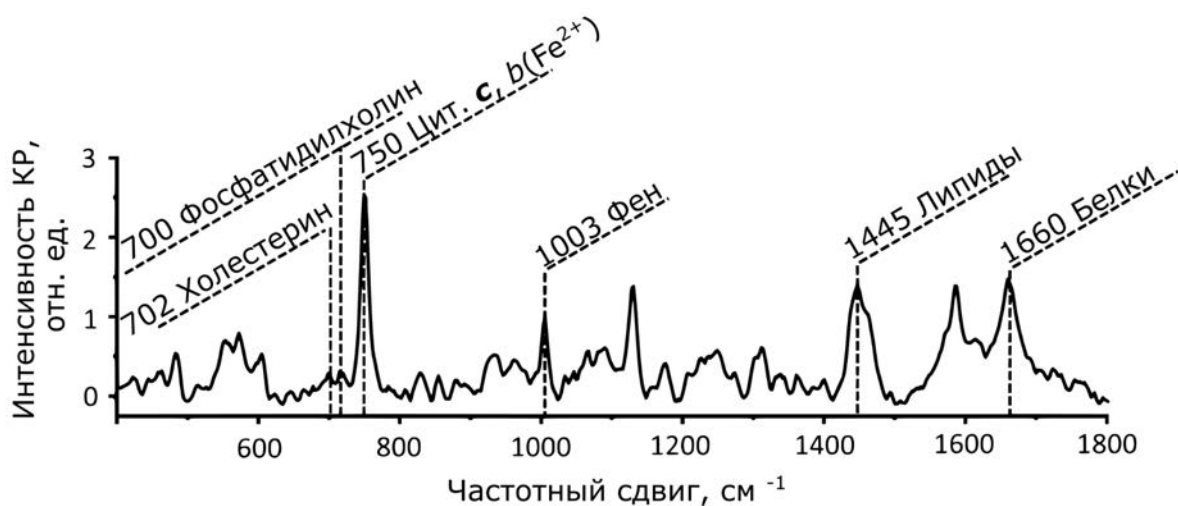


Рисунок 41. Пример спектра КР от сомы астроцита гиппокампа *ex vivo*. Пунктирными линиями обозначены пики со значениями частотного сдвига и названием соответствующей молекулы. Фен — фенилаланин.

Мы обнаружили, что воздействие HFD значительно увеличило относительное количество всех липидов в астроцитах ($p < 0.001$, двухвыборочный t-критерий; Рис. 42, слева). Примечательно, существует тенденция увеличения содержания холестерина, без статистической достоверности ($p = 0.14$, двухвыборочный t-критерий; Рис. 42, справа).

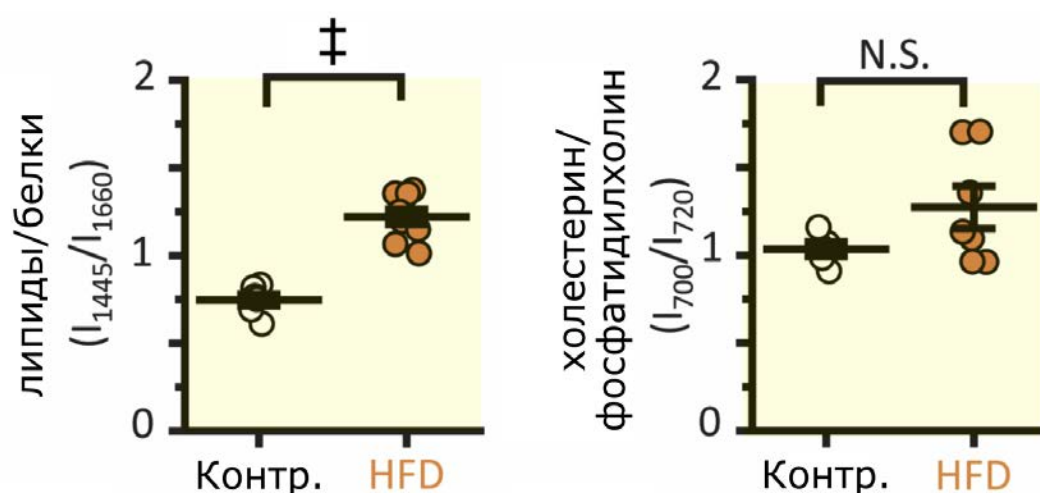


Рисунок 42. Относительное количество липидов (слева) и холестерина (справа) в астроцитах в контроле (контр.) и после HFD. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения для соотношения липиды/белки соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, $N = 6$) и HFD (оранжевые кружки, $N = 9$) группах; индивидуальные значения для соотношения холестерин/фосфатидилхолин соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, $N = 5$) и HFD (оранжевые кружки, $N = 7$) группах. NS $p > 0.05$, ‡ $p < 0.001$, двухвыборочный t-критерий.

Относительное количество восстановленных цитохромов с- и b-типов было значительно выше в астроцитах после HFD ($p = 0.037$, двухвыборочный t-критерий; Рис. 43 а). Детальный анализ характерных селективных пиков КР цитохромов с- и b-типа в астроцитах показал, что увеличение относительного

содержания восстановленных цитохромов происходит за счет цитохромов с (Рис. 43 б, в) ($p < 0.001$, двухвыборочный t-критерий; Рис.43, б).

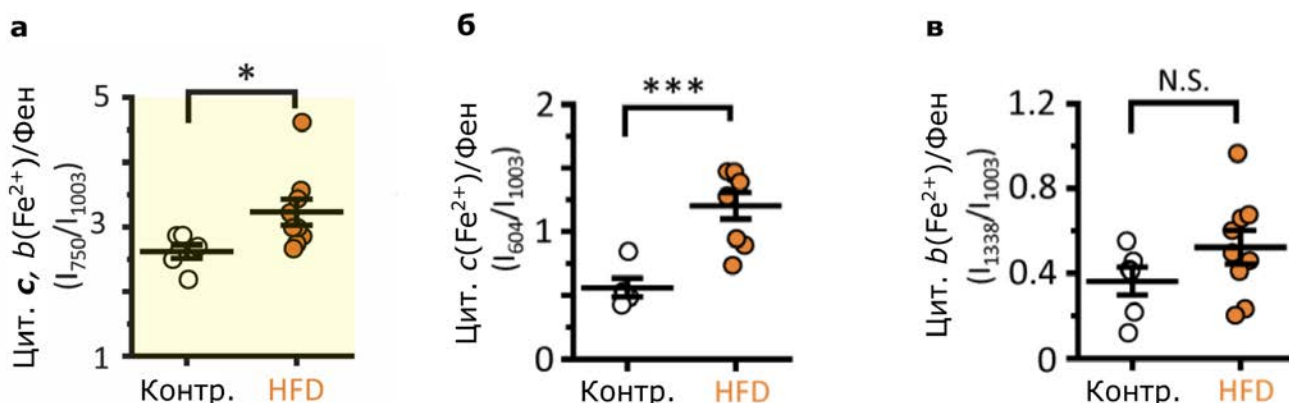


Рисунок 43. Относительное количество восстановленных цитохромов с,b (а) и цитохромов с, с1 (б) и b (в) в астроцитах контрольной группы (контр.) и после HFD. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 6) и HFD (оранжевые кружки, N = 9) группах. NS $p > 0.05$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, двухвыборочный t-критерий.

Напротив, HFD существенно не повлияла ни на относительное количество липидов, включая холестерин (Рис. 44 а, б; NS, двухвыборочный t-критерий), ни на относительное содержание восстановленных цитохромов с,b-типа в нейронах (Рис. 44 в; NS, двухвыборочный t-критерий).

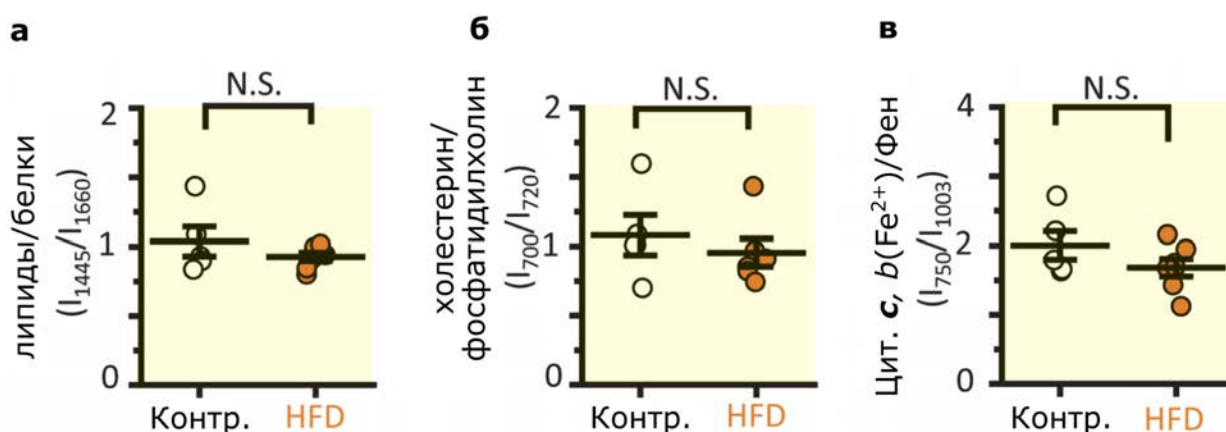
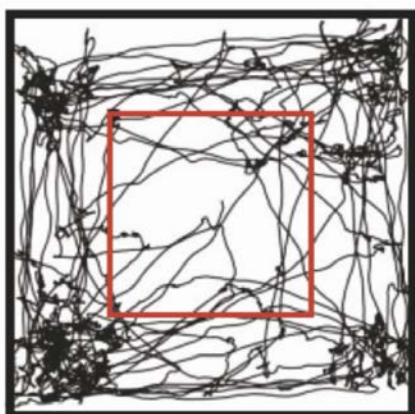


Рисунок 44. Относительное количество липидов (а), холестерина (б) в нейронах и восст. цитохромов с, b (в) в нейронах в контроле и после HFD. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 6) и HFD (оранжевые кружки, N = 6) группах. NS $p > 0.05$, двухвыборочный t-критерий.

Таким образом, HFD способствует возникновению ряда метаболических изменений в астроцитах гиппокампа, но не в нейронах. Эта диета привела к увеличению относительного содержания липидов, которые могут накапливаться в виде липидных капель в качестве дополнительных запасов энергии. ЛК метаболизируются за счет β -окисления жирных кислот и последующего ОФ в астроцитах, особенно в период интенсивной активности нейронов (Ioannou et al., 2019). Также, накопленные липиды в астроцитах могут играть роль в структурных перестройках этих клеток и быть использованы в качестве строительного материала мембраны астроцитов (Popov et al., 2022). Наблюдаемое увеличение относительного количества восстановленных цитохромов с- и b-типов в митохондриях астроцитов мышей в группе HFD указывает на перегрузку ЭТЦ электронами, предположительно, из-за увеличения количества первичных доноров электронов, образующихся в результате β -окисления жирных кислот. Это увеличение может способствовать продукции АФК. Эти данные согласуются, со связью β -окисления жирных кислот в астроцитах и продукцией АФК, и сигнальной роли последних в различных когнитивных процессах (Morant-Ferrando et al., 2023). Кроме того, полученные нами данные демонстрируют отсутствия существенного вклада β -окисления жирных кислот в общий метаболизм нейронов.

Обнаруженные метаболические перестройки в астроцитах области гиппокампа в условиях жирной диеты, могут оказывать влияние на поведение животных. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели тест “Открытое поле”, оценивающий общую локомоторную активность, тревожность и исследовательское поведение (Рис. 45, 46). Мы не обнаружили значительной разницы в локомоторной активности, измеренной как процент времени, проведенного в движении между двумя группами животных ($p = 0.48$, двухвыборочный t -критерий; Рис. 46 слева). Однако животные с HFD проводили значительно больше времени в центре арены ($p = 0.002$, двухвыборочный t -тест; Рис. 46 справа), этот показатель связан с низким уровнем тревожности. Также, увеличение количества побегов животных с HFD через открытое центральное пространство арены может быть связано с активным исследовательским поведением (Рис. 45). Было показано, что в условиях HFD происходит усиление синаптической пластичности на клеточном уровне в области гиппокампа (Porov et al., 2022), наряду с метаболическими и морфологическими перестройками астроцитов в этой области, можно предположить, что эти изменения лежат в основе зарегистрированных нами улучшений на уровне поведения.

Контр.



HFD

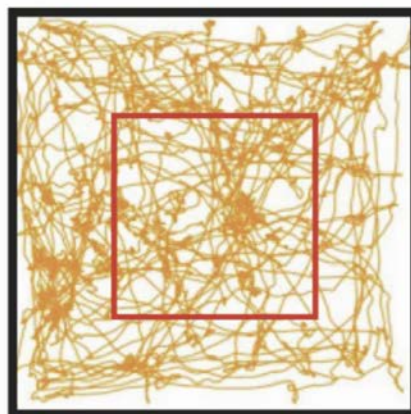


Рисунок 45. Репрезентативные траектории перемещения мышей в тесте “Открытое поле”, полученные для контрольного (слева) и HFD (справа) животного. Красный прямоугольник обозначает центр арены.

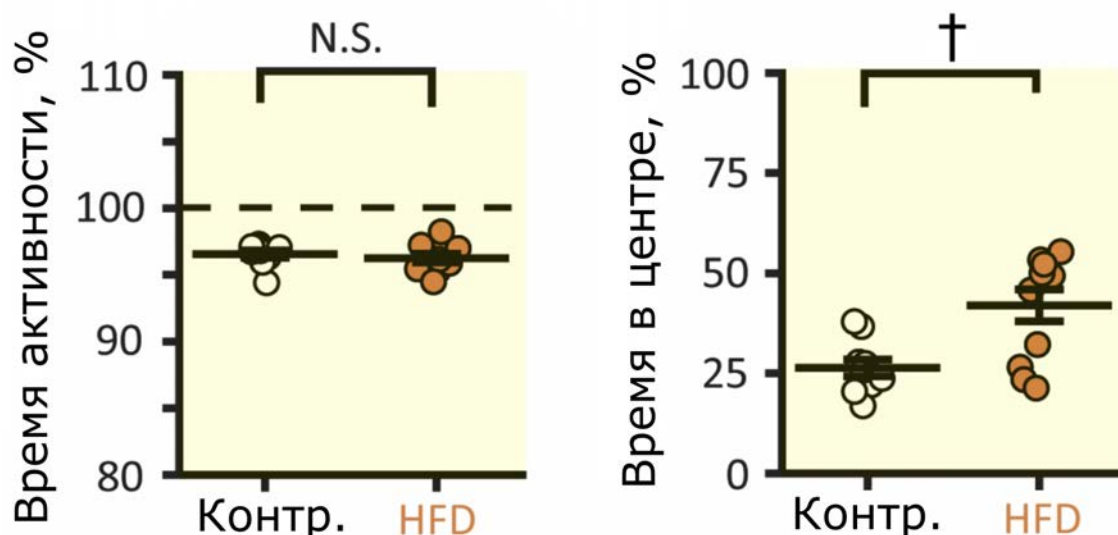


Рисунок 46. Общее время активности (слева) и время проведенное в центре арены теста “Открытое поле” (справа) мышей в контрольной и HFD-группах. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего; индивидуальные значения соответствуют измерениям для разных мышей в контрольной (пустые кружки, N = 10) и HFD (оранжевые кружки, N = 11) группах. NS $p > 0.05$, $\dagger p < 0.01$, двухвыборочный t-критерий.

Таким образом, мы обнаружили, что один месяц содержания молодых животных на диете с высоким содержанием жира влияет на метаболизм астроцитов гиппокампа, но не нейронов. С помощью КР-микроспектроскопии с клеточным разрешением нами было показано достоверное увеличение содержания липидов и относительного количества восстановленных цитохромов в астроцитах, но не в нейронах после HFD, это указывает на то, что астроциты активно задействуют ЖК в своем метаболизме. Известно, что ЖК накапливаются в виде липидных капель в астроцитах и расщепляются за счет активности бета-окисления ЖК и ОФ и играют ключевую роль в метаболизме

астроцитов (Morant-Ferrando et al., 2023; Ioannou et al., 2019). Эти процессы определяют и тесно взаимосвязаны с работой ЭТЦ митохондрий астроцитов и особенностями ее строения, окислительный метаболизм ЖК поддерживает комплексы дыхательной цепи в разобранном состоянии, усиливая продукцию сигнальных АФК, играющих важную роль в когнитивных процессах (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019). Мы также показали, что HFD приводит к положительным изменениям на уровне поведения, подчеркивая значимость метаболизма ЖК и роли астроцитов в его поддержании для нормальной работы мозга.

4.5.1. Связь морфологических особенностей астроцитов и редокс-состояние их ЭТЦ

Метаболическая поддержка нейронов, одна из основных функций астроцитов в головном мозге, тесно связана с особенностями их морфологического строения. Астроциты являются связующим звеном в глио-нейро-васкулярной единице, эффективная работа которых обеспечивает контроль синаптической передачи и диаметр кровеносных сосудов (Magistretti & Allaman, 2015). Тонкие отростки астроцитов – листочки охватывают синаптические контакты, а концевые ножки – регулируют диаметр кровеносных сосудов, а также играют ведущую роль в формировании гематоэнцефалического барьера (Díaz-Castro et al., 2023; Sweeney et al., 2019).

Мы предположили, что редокс-состояние ЭТЦ в разных компартментах астроцита может отличаться в зависимости от их физиологического значения. Для проверки данной гипотезы мы оценили редокс-состояние ЭТЦ митохондрий и белково-липидный состав сомы, толстых отростков и концевых ножек астроцитов гиппокампа. Для более детальной оценки морфологии,

исследования проводили в условиях *ex vivo* с помощью ИГХ окрашивания против GFAP белка для идентификации астроцитов, и регистрировали КР-спектры с субклеточным разрешением (Рис. 47, 49 слева). Мы оценили КР-спектры с пиками, связанными с колебаниями связей в гемах восстановленных цитохромов с и b-типов (пики с положением максимумов 750 и 1126 cm^{-1}), липидах (1440 cm^{-1}) и белках (1660 cm^{-1}) в сомах астроцитов и в их концевых ножках. Мы установили, что в ножках астроцитов снижено относительное содержание белков ($p < 0.01$, двусторонний критерий Манна-Уитни) при этом увеличено относительное содержание восстановленных цитохромов с- (соотношение 750/1440 cm^{-1} $p < 0.05$, соотношение 750/1126 cm^{-1} $p < 0.01$, двусторонний критерий Манна-Уитни) по сравнению с телами астроцитов (Рис. 48).

Мы полагаем, что в концевых ножках астроцитов относительное содержание белков к липидам меньше, чем в теле клетки, по-видимому, из-за особой морфологии концевых ножек и большего относительного объема мембраны. При этом различия в относительном содержании восстановленных цитохромов может указывать на неоднородную продукцию АФК и NO в митохондриях, расположенных в разных компартментах астроцитов. Действительно, ранее было показано, что митохондрии в концевых ножках, в условиях переполнения ЭТЦ электронами, в частности, при гипоксии, генерируют вторичный мессенджер NO, который является эффективным вазодилататором (Christie et al., 2023).

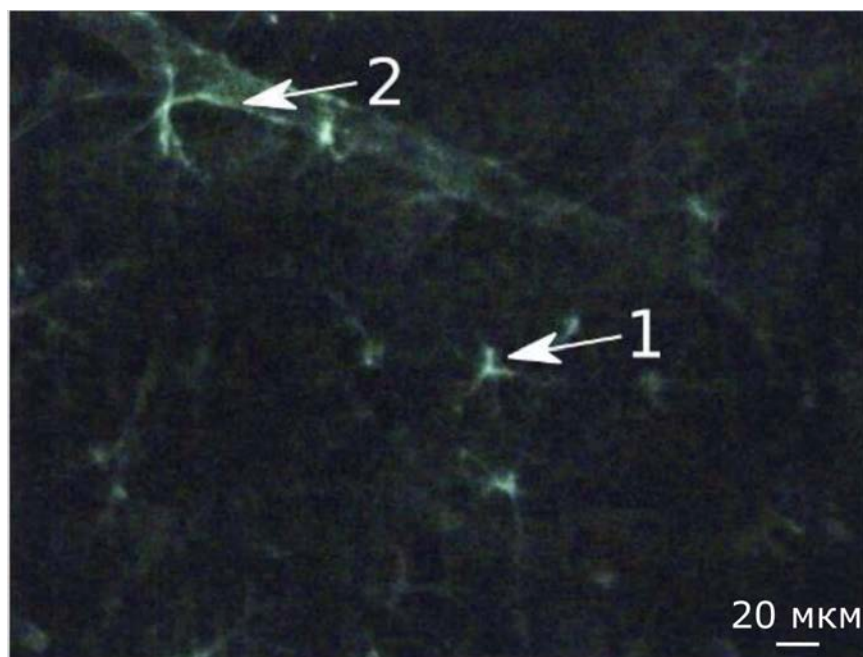


Рисунок 47. Флуоресцентное изображение среза гиппокампа мыши с иммуногистохимическим окрашиванием. Светло-зеленые клетки и отростки – астроциты, окрашенные первичными антителами на GFAP и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488. Стрелками указаны: тело астроцита – 1, концевая ножка астроцита вокруг кровеносного сосуда – 2.

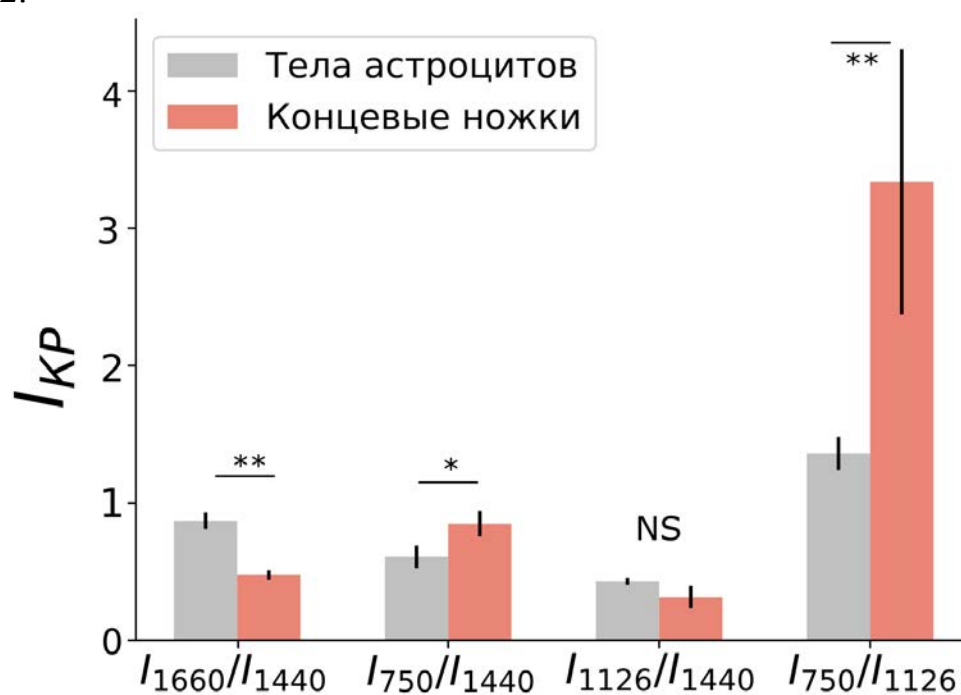


Рисунок 48. Относительное содержание белков/липидов и редокс-состояние цитохромов ЭТЦ митохондрий в телах и концевых ножках астроцитов гиппокампа мышей. Гистограммы показаны для тел и концевых ножек астроцитов для относительного содержания белков, нормированного на общее количество липидов (соотношение пиков I_{1660}/I_{1440}), относительное содержание восст. цит. с-типа и b-типа, нормированных на липиды (соотношения I_{750}/I_{1440} и I_{1126}/I_{1440} , соответственно), а также содержание восст. цит. с-типа относительно восст. цит. b-типа (соотношение I_{750}/I_{1126}). По осям ординат указано значение соотношений интенсивностей указанных КР-пиков. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни, $p < 0.05$; $** < 0.01$, NS $p > 0.05$.

Мы не обнаружили достоверных различий между сомой астроцитов и их толстыми отростками (Рис. 49) в содержание восстановленных цитохромов с- и b-типов (Рис. 50 а, б) ($p > 0.05$, двусторонний критерий Манна-Уитни), или в их белково-липидном составе (Рис. 50 в, г) ($p > 0.05$, двусторонний критерий Манна-Уитни). Можно предположить, что функциональные различия между митохондриями в соме и толстых отростках существенно ниже по сравнению с митохондриями в концевых ножках.

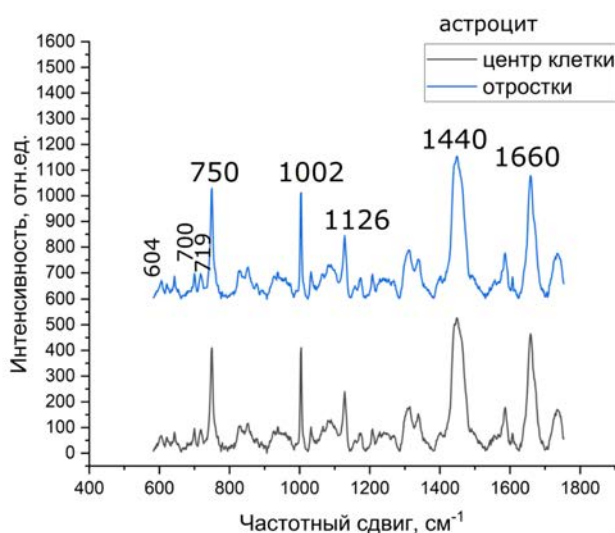
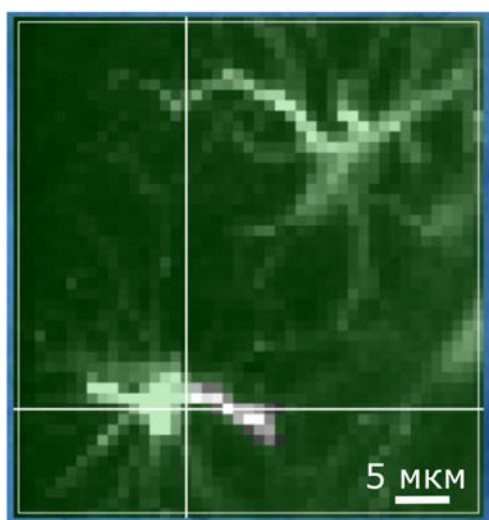


Рисунок 49. Сравнительное исследование редокс-состояния цитохромов в ЭТЦ митохондрий, локализованных в телах и толстых отростках астроцитов в срезах мозга *ex vivo*, а также белок-липидного состава их цитоплазмы. Слева – светло-зеленые клетки – астроциты, окрашенные первичными антителами на GFAP и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488, толстый отросток выделен светло-серым цветом. Справа – КР-спектры, зарегистрированные от сомы и толстого отростка астроцита, значения максимумов частотных сдвигов соответствуют колебаниям связей в восстановленных цитохромах с-типа (604 см^{-1}), холестерине (700 см^{-1}), фосфатидилхолине (719 см^{-1}), восстановленных цитохромах с и b-типов (750 см^{-1}), фенилаланине (1002 см^{-1}), восстановленных цитохромах b- и c-типов (1126 см^{-1}), липидах (1440 см^{-1}) и белках (1660 см^{-1}).

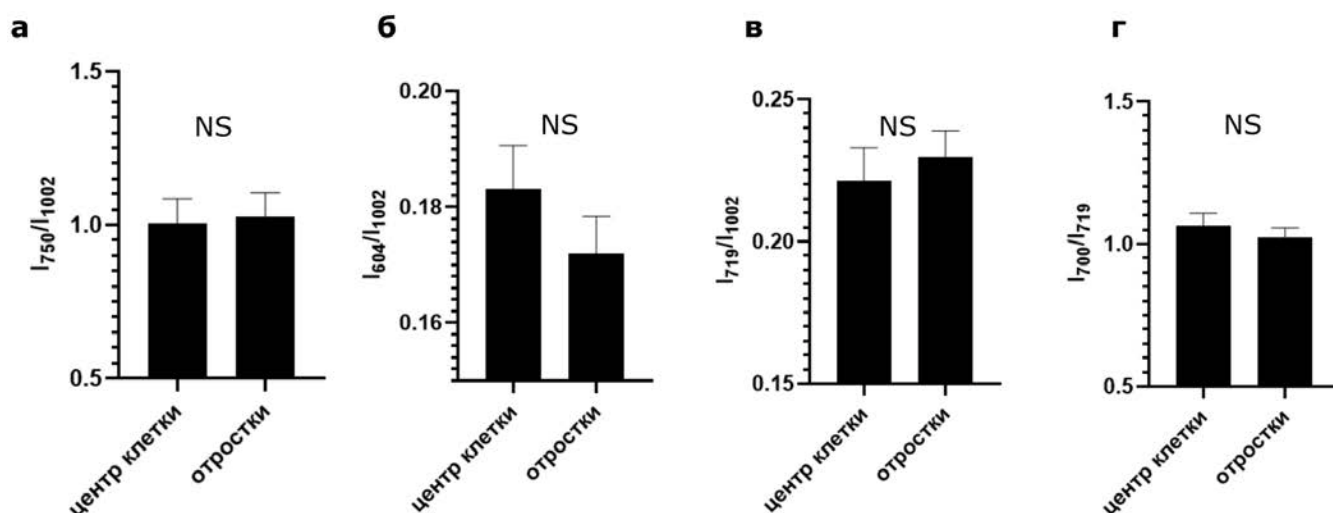


Рисунок 50. Сравнительное исследование редокс-состояния цитохромов в ЭТЦ митохондрий тел и толстых отростков астроцитов *ex vivo*, а также белок-липидного состава их цитоплазмы. Сравнение тел и толстых отростков астроцитов по следующим параметрам: (а) содержание восстановленных цитохромов с- и b-типов относительно фенилаланина; (б) содержание восстановленных цитохромов с-типа относительно фенилаланина; (в) содержание фосфатидилхолина относительно фенилаланина; (г) содержание холестерина

относительно фосфатидилхолина. Статистическая значимость определялась с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни, $p > 0.05$.

4.5.2. Структурные перестройки астроцитов

С помощью КР-микроспектроскопии *ex vivo* мы показали, что редокс-состояние и белково-липидный состав концевых ножек астроцитов различается по сравнению с сомой, при этом достоверных различий между толстыми отростками и телом клетки не было обнаружено. Метаболическая специализация митохондрий концевых ножек астроцитов, вероятно, играет важную роль в слаженной работе нейро-глио-васкулярной единицы. Эффективная доставка энергетических субстратов и регуляция синаптической передачи также зависит от морфологической пластичности мелких отростков астроцитов – листочков. Основным структурным элементом листочков астроцитов является белок эзрин, он связывает клеточный цитоскелет с плазматической мембраной (Derouiche & Geiger, 2019). Количество этого белка может меняться под воздействием внешних и внутренних факторов, что в свою очередь приводит к морфологическим перестройкам астроцитарных листочков и оказывает влияние на когнитивные процессы (Chen et al., 2024; Badia-Soteras et al., 2023; Popov et al., 2023, 2022; Zhou et al., 2019). Мы предположили, что снижение количества эзрина изменит морфологию астроцитов, что в свою очередь может оказывать влияние на синаптическую передачу.

Для проверки этой гипотезы мы использовали билатеральную доставку генетически-кодируемых векторов (AAV8-gfaABC1D-miRNAi(Ezrin)-BFP (Эзрин ↓), снижающих экспрессию белка эзрин по механизму микро-РНК интерференции в астроцитах поля CA1 области гиппокампа, и соответствующий контроль, где была использована перемешанная микро-РНК последовательность той же длины AAV8-gfaABC1D-BFP-miRNAi(Non-Coding)

(Zhou et al., 2019) (Рис. 51). Для оценки морфологических изменений астроцитов в 3D, мы использовали флуоресцентный имиджинг *ex vivo* репортерного белка BFP (blue fluorescent protein) и регистрировали серийные изображения в виде z-стеков.

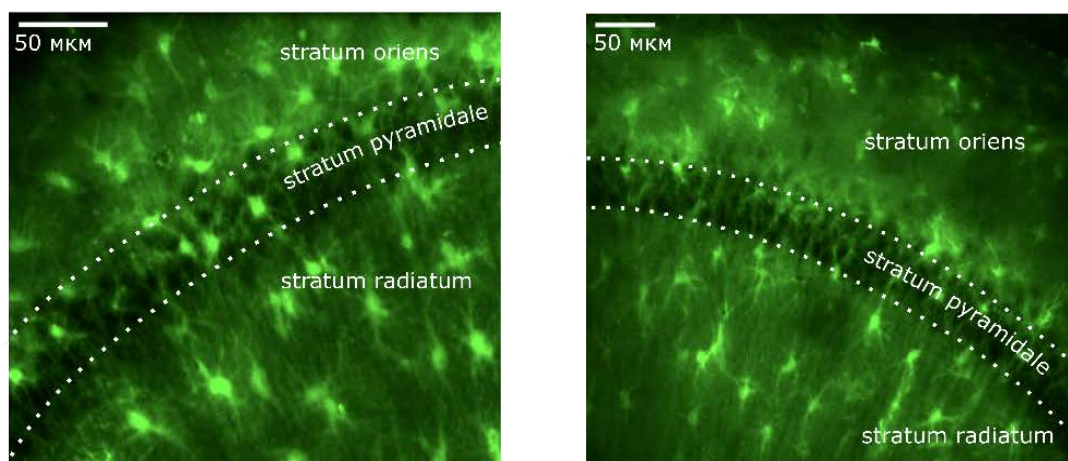


Рисунок 51. Флуоресцентные изображения экспрессии аденоассоциированных вирусов, для снижения экспрессии белка эзрин (Эзрин ↓) и соответствующего контроля (Non-coding, NC). Слева – флуоресцентное изображение экспрессии вируса, снижающего количество белка эзрина в поле CA1 в фиксированных срезах мозга; справа – флуоресцентное изображение экспрессии контрольного вируса в поле CA1 в фиксированных срезах мозга.

Белок BFP остается в цитоплазме клеток после экспрессии вирусного вектора и окрашивает сому и крупные отростки астроцитов. Стоит отметить, что визуализация листочков астроцитов – нетривиальная задача, потому что их физический размер лежит за пределами оптического разрешения (Toman et al., 2023; Semyanov & Verkhatsky, 2021) и предполагает использование микроскопии сверхразрешения, в этой связи были использованы доступные нам методики для оценки морфологических изменений астроцитов после их генетической модификации.

Мы использовали разработанный в лаборатории морфологических анализ астроцитов, основанный на методе быстрого марша (Kriuchehnikova et al., 2025) (Рис. 52), и построили распределения геодезических длин веточек, от их окончания до сомы (Рис. 53).

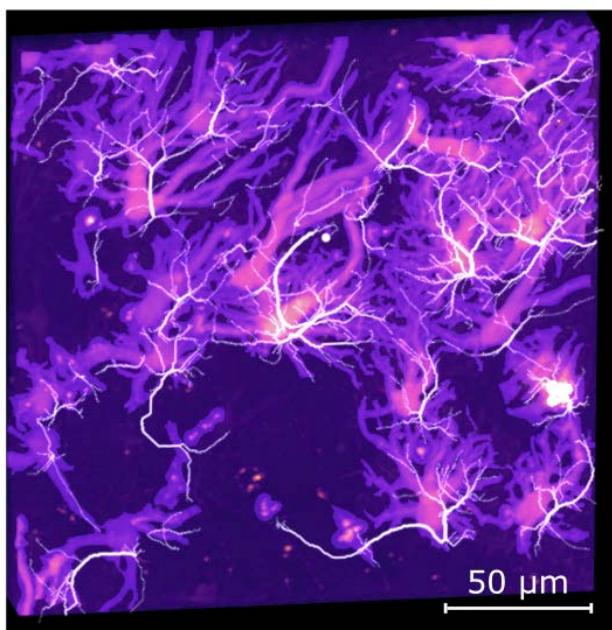


Рисунок 52. Флуоресцентное изображение морфологии астроцитов после построения масок (светло-фиолетовый) и скелетов (белый) клеток с помощью разработанного в лаборатории алгоритма.

Геодезическая длина позволяет оценить расстояние между двумя точками на трехмерной поверхности, а не по прямой линии в пространстве. Этот метод предоставляет возможность охарактеризовать особенности морфологии более детально и надежно с учетом расположения клеток в 3D пространстве. Мы показали, что максимум распределения при снижении количества белка эзрина смещен влево по сравнению с контролем (Рис.53, розовый). Такое смещение, означает что в этой популяции клеток короткие геодезические длины встречаются чаще и говорит о том, что отростки расположены ближе друг к

другу относительно поверхности клетки. Полученные данные указывают на то, что морфология астроцитов после снижения количества белка эзрина становится более компактной, что вероятно свидетельствует об уменьшении общего домена астроцитов.

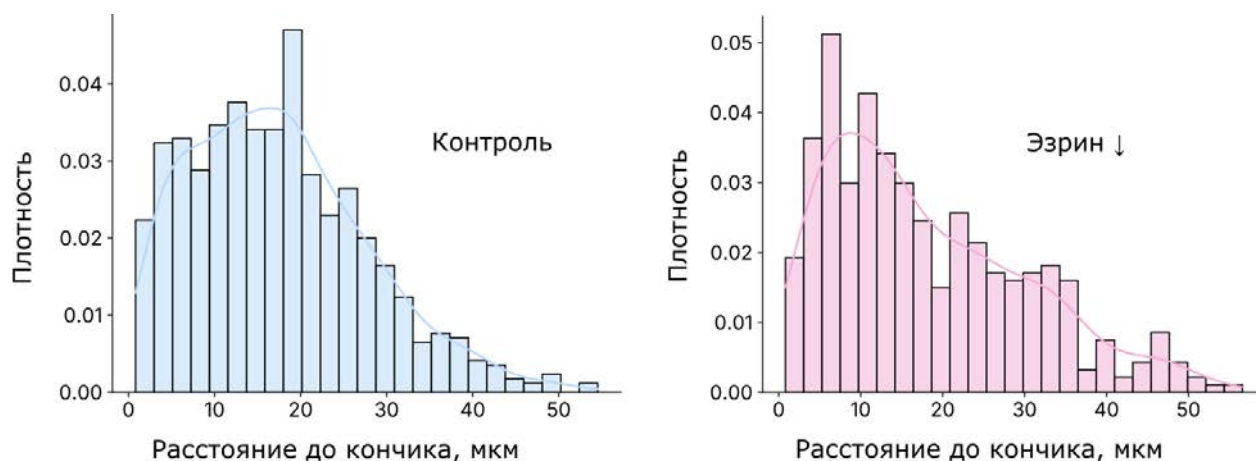


Рисунок 53. Распределение геодезических длин отростков от сомы до конечной точки астроцита, голубой – контроль, розовый – снижение экспрессии белка эзрин (Эзрин ↓).

Чтобы проверить эту гипотезу, мы оценили распределение объемной доли астроцитов (volume fraction, vf), которая рассчитывается как отношение флуоресценции толстых отростков на объем всего z-стека. Это отношение позволяет оценить занимаемый объем толстых отростков, который связан с размером клеток. Объемная доля отростков астроцитов в группе (Эзрин ↓) достоверно ниже, чем в контроле (p-значение = 0.004329, U-критерий Манна-Уитни) (Рис. 54), что косвенно указывает на уменьшение общего размера астроцитов в группе (Эзрин ↓).

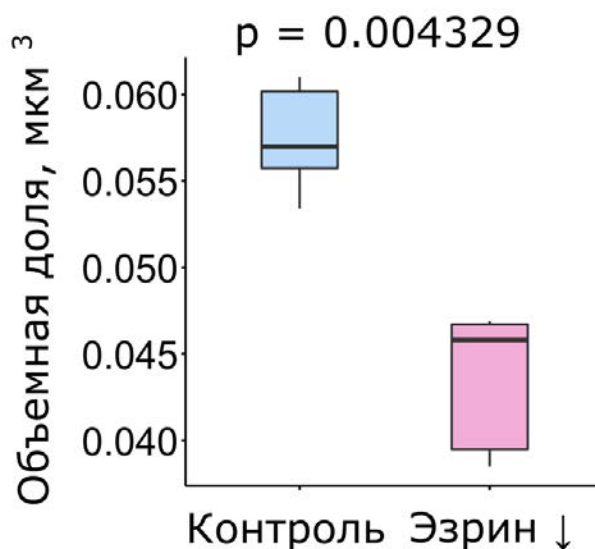


Рисунок 54. Распределение объемной доли веточек астроцитов контрольной группы (голубой) и группы со сниженной экспрессией белка эзрин (Эзрин ↓). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Для оценки статистических различий был использован U-критерий Манна-Уитни.

Мы предположили, что распределение длины веточек может измениться при уменьшении количества эзрина. В недавних исследованиях было показано, что снижение этого белка приводит к увеличению экспрессии GFAP, основного структурного элемента веточек астроцитов (Schacke et al., 2022), эти данные косвенно указывают о существовании молекулярной и структурной взаимосвязи между листочками и веточками астроцитов. В группе со сниженной экспрессией эзрина есть тренд к увеличению средней длины веточек, однако он не достигает статистической достоверности (p -значение = 0.2468, U-критерий Манна-Уитни) (Рис.55).

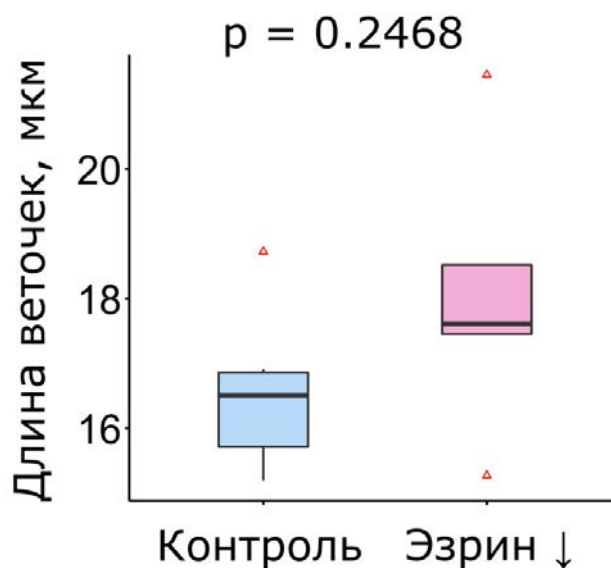


Рисунок 55. Сравнение длины веточек астроцитов контрольной группы (голубой) и группы со сниженной экспрессией белка эзрин (Эзрин ↓). Горизонтальные границы ящиков представляют 25 и 75%-ные квартили, горизонтальная линия в центре ящика – медиану, вертикальные отрезки-разбросы – максимальное и минимальное значения. Для оценки статистических различий был использован U-критерий Манна-Уитни.

Таким образом, мы показали, что генетическая модификация астроцитов за счет снижения количества структурного белка листочков – эзрина, приводит к достоверным морфологическим перестройкам астроцитов, распределение веточек становится более компактным, а также происходит существенное уменьшение размера клеток, но не за счет изменения длины толстых отростков, а по всей видимости, за счет тонких отростков – листочков. Обнаруженные изменения могут влиять на эффективность синаптической передачи.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы разработали методический подход, основанный на КР-микроспектроскопии, который впервые позволил оценить метаболические особенности глио-нейро-васкулярных взаимодействий в мозге во время функциональных нагрузок. Степень оксигенации кровеносных сосудов соматосенсорной коры увеличивается во время локомоции, и сопровождается вазодилатацией, при этом ЭТЦ близко расположенных астроцитов заполняется электронами. Различия в заполненности ЭТЦ наблюдались для концевых ножек астроцитов и в условиях *ex vivo*, вероятно это указывает на неравномерную продукцию АФК в разных компартментах астроцитов, играющих важное физиологическое значение для генерации вторичного мессенджера NO, индуцирующего вазодилатацию сосудов. Также мы показали, что увеличение заполненности ЭТЦ в митохондриях астроцитов во время локомоции приводит к продукции пероксида водорода, который играет важное сигнальное значение в процессах обучения и памяти (Morant-Ferrando et al., 2023; Vicente-Gutierrez et al., 2019), и вероятно, при функциональных нагрузках (Рис. 56, а).

В нейронах во время локомоции уровень восстановленных цитохромов ЭТЦ митохондрий снижается, что свидетельствует об ускорении переноса электронов в ЭТЦ и усилении окислительного фосфорилирования в ответ на повышение энергетических потребностей нейронов. В астроцитах при локомоции в ЭТЦ увеличивается количество электронов, что может быть связано с замедлением электронного транспорта из-за подавления ОФ в силу активации гликолиза и β -окисления жирных кислот (Рис. 56, а). Активация гликолиза в астроцитах используется для продукции большего количества лактата, который транспортируется в нейроны для поддержания их активного

метаболизма, а именно, цикла Кребса и ОФ. Активация β -окисления жирных кислот в астроцитах увеличивает заполненность ЭТЦ электронами.

Кроме того, различия в редокс-состоянии ЭТЦ астроцитов и нейронов при функциональной нагрузке, вероятно, отражают особенности организации ЭТЦ этих клеток: в астроцитах дыхательная цепь находится в разобщенном состоянии, неэффективный перенос электронов сопровождается генерацией АФК при усилении гликолиза в условиях повышенной нейрональной активности; в нейронах, напротив, ЭТЦ собрана в суперкомплексы для эффективного переноса электронов и продукции АТФ за счет окислительного фосфорилирования.

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

Мы показали, что резкое повышение уровня глюкозы в крови приводит к увеличению относительного количества восстановленных цитохромов в ЭТЦ нейронов, но не в астроцитах *in vivo*. Нейроны предпочтительно метаболизируют глюкозу через ПФФ путь для обеспечения антиоксидантной защиты и клеточного выживания (Bolaños, 2016; Herrero-Mendez et al., 2009; Vaughn & Deshmukh, 2008) и используют лактат, полученный в ходе АНЛШ в качестве основного источника энергии в процессе ОФ (Bolaños, 2016; Kasparov, 2016; Mächler et al., 2016). В астроцитах в ответ на гипергликемию вероятно происходит усиление гликолиза, а образующийся избыточный лактат транспортируется в нейроны, переводится в пируват и в виде кофермента А входит в цикла Кребса, в конечном счете увеличивая загрузку ЭТЦ электронами. При этом, судя по нашим данным, работа астроцитарной ЭТЦ при гипергликемии не изменяется, поскольку гликолиз практически не

поставляет пируват для цикла Кребса собственных, астроцитарных, митохондрий (Рис. 56, б).

Диета с высоким содержанием жира способствует возникновению ряда метаболических изменений в астроцитах гиппокампа, но не в нейронах. В астроцитах мы наблюдали увеличение относительного содержания липидов, которые могут накапливаться в виде ЛК, в качестве дополнительных запасов энергии. ЛК метаболизируются за счет β -окисления жирных кислот и последующего ОФ в астроцитах, особенно в период интенсивной нейрональной активности (Ioannou et al., 2019). Наблюдаемое увеличение относительного количества восстановленных цитохромов с- и b-типов в астроцитах после HFD указывает на перегрузку ЭТЦ электронами, вероятно связанную с увеличением поступления первичных доноров электронов, образующихся в результате β -окисления жирных кислот (Рис. 56, в). Усиление катаболизма жирных кислот в астроцитах может способствовать продукции АФК, которые играют важную сигнальную роль в различных когнитивных процессах (Morant-Ferrando et al., 2023) и вероятно связаны с отмеченным улучшением исследовательского поведения мышей при HFD.

Эффективная доставка энергетических субстратов и регуляция нейротрансмиссии зависит от морфологической пластичности мелких отростков астроцитов – листочков. Основным структурным элементом листочков астроцитов является белок эзрин. Мы разработали новый подход для анализа морфологии астроцитов на основе метода быстрого марша и показали, что снижение количества эзрина в астроцитах гиппокампа приводит к уменьшению астроцитарного домена, вероятно это может способствовать менее эффективному охвату синаптической щели и влиять на синаптическую передачу (Рис. 56, в).

Суммируя, мы показали отличия редокс-состояния митохондрий и метаболизма астроцитов и нейронов в условиях *in vivo*, что связано с сигнальной функцией астроцитов и их метаболической поддержкой нейронов.

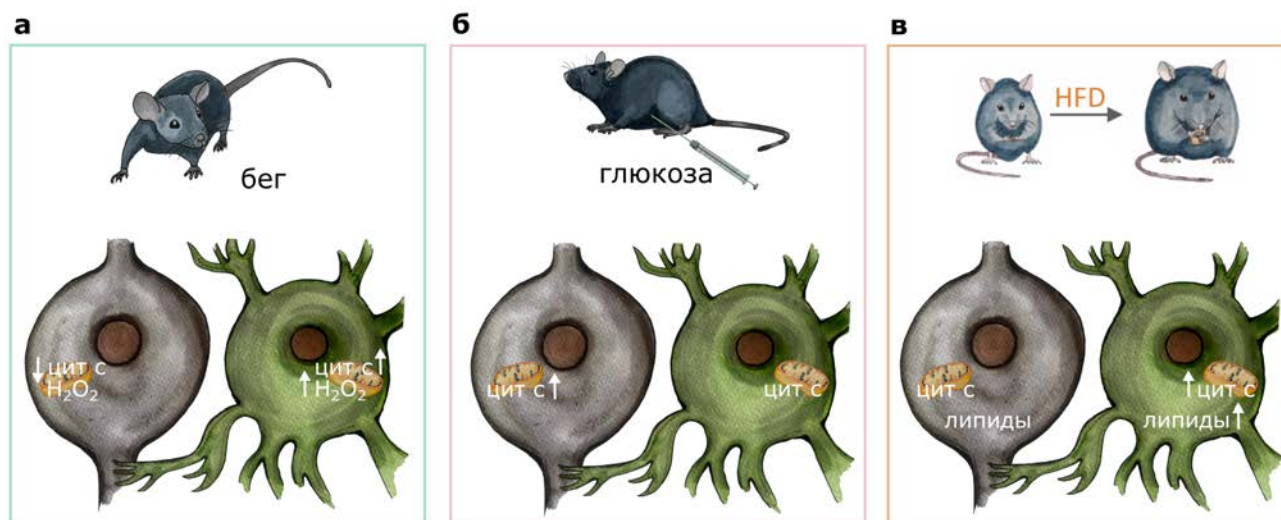


Рисунок 56. Финальная схема. (а) – В условиях *in vivo* в состоянии покоя ЭТЦ митохондрий астроцитов демонстрирует большее заполнение электронами, чем ЭТЦ нейронов, при этом во время локомоции ЭТЦ астроцитов дополнительно заполняется электронами, что сопровождается продукцией пероксида водорода, а в нейронах происходит снижение относительного содержания восстановленных переносчиков электронов без образования H_2O_2 . (б) – Острая гипергликемия приводит к заполнению электронами ЭТЦ нейронов, но не астроцитов, что свидетельствует о преимущественном поступлении электронов в ЭТЦ нейронов от НАДН и сукцината, образующихся в цикле Кребса, и о незначительном влиянии гликолиза в астроцитах на их окислительное фосфорилирование. (в) – Диета с высоким содержанием жира приводит к метаболическим перестройкам астроцитов, но не нейронов: накоплению липидов в цитоплазме астроцитов и накоплению электронов в астроцитарной ЭТЦ, без изменений в редокс-состоянии митохондрий и белок-липидном составе цитоплазмы нейронов, что свидетельствует о существенном влиянии на ОФ астроцитов β -окисления жирных кислот.

6. ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в условиях *in vivo* в соматосенсорной коре мозга бодрствующих мышей в состоянии покоя ЭТЦ митохондрий астроцитов демонстрирует большее заполнение электронами, чем ЭТЦ нейронов, при этом во время локомоции ЭТЦ астроцитов дополнительно заполняется электронами, что сопровождается продукцией пероксида водорода, а в нейронах происходит снижение относительного содержания восстановленных переносчиков электронов без образования H_2O_2 .
2. Морфология, распределение и подвижность митохондрий одинаковы для астроцитов и нейронов коры бодрствующих мышей.
3. Острая гипергликемия приводит к заполнению электронами ЭТЦ нейронов, но не астроцитов, что свидетельствует о преимущественном поступлении электронов в ЭТЦ нейронов от НАДН и сукцината, образующихся в цикле Кребса, и о незначительном влиянии гликолиза в астроцитах на их окислительное фосфорилирование.
4. Диета с высоким содержанием жира приводит к метаболическим перестройкам астроцитов, но не нейронов: накоплению липидов в цитоплазме астроцитов и накоплению электронов в астроцитарной ЭТЦ, без изменений в редокс-состоянии митохондрий и белок-липидном составе цитоплазмы нейронов, что свидетельствует о существенном влиянии на ОФ астроцитов β -окисления жирных кислот.
5. ЭТЦ концевых ножек астроцитов больше заполнена электронами по сравнению с сомой и толстыми отростками, что может играть важное значение для генерации NO – вазодилататора.

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

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aboufars El Alaoui A., Jackson M., Fabri M., de Vivo L., Bellesi M. Characterization of Subcellular Organelles in Cortical Perisynaptic Astrocytes // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2020. – V. 14. – P. 573944.
2. Adar F., Erecińska M. Resonance Raman spectra of the b- and c-type cytochromes of succinate-cytochrome c reductase // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1974. – V. 165. – № 2. – P. 570–580.
3. Adar F., Erecińska M. Spectral evidence for interactions between membrane-bound hemes: Resonance Raman spectra of mitochondrial cytochrome b-c₁ complex as a function of redox potential // *FEBS Letters*. – 1977. – V. 80. – № 1. – P. 195–200.
4. Allaman I., Bélanger M., Magistretti P.J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse // *Trends in Neurosciences*. – 2011. – V. 34. – № 2. – P. 76–87.
5. Allen N.J., Barres B.A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue // *Nature*. – 2009. – V. 457. – № 7230. – P. 675–677.
6. Almeida A., Almeida J., Bolaños J.P., Moncada S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – V. 98. – № 26. – P. 15294–15299.
7. Almeida A., Bolaños J.P. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons // *Journal of Neurochemistry*. – 2001. – V. 77. – № 2. – P. 676–690.

8. Almeida A., Moncada S., Bolaños J.P. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway // *Nature Cell Biology*. – 2004. – V. 6. – № 1. – P. 45–51.
9. Aten S., Kiyoshi C.M., Arzola E.P., Patterson J.A., Taylor A.T., Du Y., Guiher A.M., Philip M., Camacho E.G., Mediratta D., ... Zhou M. Ultrastructural view of astrocyte arborization, astrocyte-astrocyte and astrocyte-synapse contacts, intracellular vesicle-like structures, and mitochondrial network // *Progress in Neurobiology*. – 2022. – V. 213. – P. 102264.
10. Attwell D., Buchan A.M., Charpak S., Lauritzen M., Macvicar B.A., Newman E.A. Glial and neuronal control of brain blood flow // *Nature*. – 2010. – V. 468. – № 7321. – P. 232–243.
11. Attwell D., Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals // *Trends in Neurosciences*. – 2002. – V. 25. – № 12. – P. 621–625.
12. Auestad N., Korsak R.A., Morrow J.W., Edmond J. Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis by Astrocytes in Primary Culture // *Journal of Neurochemistry*. – 1991. – V. 56. – № 4. – P. 1376–1386.
13. Avlonitis N., Chalmers S., McDougall C., Stanton-Humphreys M.N., Brown C.T.A., McCarron J.G., Conway S.J. Caged AG10: New tools for spatially predefined mitochondrial uncoupling // *Molecular bioSystems*. – 2009. – V. 5. – № 5. – P. 450–457.
14. Badia-Soteras A., Heistek T.S., Kater M.S.J., Mak A., Negrean A., Van Den Oever M.C., Mansvelder H.D., Khakh B.S., Min R., Smit A.B., ... Verheijen M.H.G. Retraction of Astrocyte Leaflets From the Synapse Enhances Fear Memory // *Biological Psychiatry*. – 2023. – V. 94. – № 3. – P. 226–238.
15. Bauernfeind A.L., Barks S.K., Duka T., Grossman L.I., Hof P.R., Sherwood C.C. Aerobic glycolysis in the primate brain: Reconsidering the implications for growth

and maintenance // *Brain Structure & Function*. – 2014. – V. 219. – № 4. – P. 1149–1167.

16. Bélanger M., Magistretti P.J. The role of astroglia in neuroprotection // *Dialogues in Clinical Neuroscience*. – 2009. – V. 11. – № 3. – P. 281–295.

17. Ben-Ari Y., Represa A. Hippocampus: Organization, Maturation, and Operation in Cognition and Pathological Conditions // *B Encyclopedia of Neuroscience*. – 2009. – P. 1845–1850.

18. Ben-Yoseph O., Boxer P.A., Ross B.D. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress // *Journal of Neurochemistry*. – 1996. – V. 66. – № 6. – P. 2329–2337.

19. Beraud N., Pelloux S., Usson Y., Kuznetsov A.V., Ronot X., Tourneur Y., Saks V. Mitochondrial dynamics in heart cells: Very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating H1-1 cells // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2009. – V. 41. – № 2. – P. 195–214.

20. Berezhna S., Wohlrab H., Champion P.M. Resonance Raman investigations of cytochrome c conformational change upon interaction with the membranes of intact and Ca^{2+} -exposed mitochondria // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – № 20. – P. 6149–6158.

21. Bittner C.X., Valdebenito R., Ruminot I., Loaiza A., Larenas V., Sotelo-Hitschfeld T., ... Barros L.F. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K^+ and a delayed and persistent effect of glutamate // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – V. 31. – № 12. – P. 4709–4713.

22. Bochkova Z.V., Baizhumanov A.A., Yusipovich A.I., Morozova K.I., Nikelshparg E.I., Fedotova A.A., ... Brazhe N.A. The flexible chain: Regulation of structure and activity of ETC complexes defines rate of ATP synthesis and sites of superoxide generation // *Biophysical Reviews*. – 2025. – V. 17. – № 1. – P. 55–88.

23. Bolaños J.P. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – V. 139. – Suppl. 2. – P. 115–125.
24. Bolaños J.P., Heales S.J., Land J.M., Clark J.B. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture // *Journal of Neurochemistry*. – 1995. – V. 64. – № 5. – P. 1965–1972.
25. Bolaños J.P., Peuchen S., Heales S.J., Land J.M., Clark J.B. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes // *Journal of Neurochemistry*. – 1994. – V. 63. – № 3. – P. 910–916.
26. Bonvento G., Bolaños J.P. Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity // *Cell Metabolism*. – 2021. – V. 33. – № 8. – P. 1546–1564.
27. Bouzier-Sore A.-K., Bolaños J.P. Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: Relevance for neurodegeneration and aging // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2015. – V. 7. – P. 89.
28. Bouzier-Sore A.-K., Voisin P., Canioni P., Magistretti P.J., Pellerin L. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2003. – V. 23. – № 11. – P. 1298–1306.
29. Brazhe N.A., Thomsen K., Lønstrup M., Brazhe A.R., Nikelshparg E.I., Maksimov G.V., Lauritzen M., Sosnovtseva O. Monitoring of blood oxygenation in brain by resonance Raman spectroscopy // *Journal of Biophotonics*. – 2018. – V. 11. – № 6. – P. e201700311.
30. 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. – V. 7. – № 9. – P. e41990.

31. Brazhe N.A., Treiman M., Faricelli B., Vestergaard J.H., Sosnovtseva O. In situ Raman study of redox state changes of mitochondrial cytochromes in a perfused rat heart // *PloS One*. – 2013. – V. 8. – № 8. – P. e70488.
32. Bretscher A. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1999. – V. 11. – № 1. – P. 109–116.
33. Brown A.M., Ransom B.R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism // *Glia*. – 2007. – V. 55. – № 12. – P. 1263–1271.
34. Bushong E.A., Martone M.E., Jones Y.Z., Ellisman M.H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains // *The Journal of Neuroscience*. – 2002. – V. 22. – № 1. – P. 183–192.
35. Butler H.J., Ashton L., Bird B., Cinque G., Curtis K., Dorney J., ... Martin F.L. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials // *Nature Protocols*. – 2016. – V. 11. – № 4. – P. 664–687.
36. Cahoy J.D., Emery B., Kaushal A., Foo L.C., Zamanian J.L., Christopherson K.S., ... Barres B.A. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function // *The Journal of Neuroscience*. – 2008. – V. 28. – № 1. – P. 264–278.
37. Cardinal M.-H. R., Soulez G., Tardif J.-C., Meunier J., Cloutier G. Fast-marching segmentation of three-dimensional intravascular ultrasound images: A pre- and post-intervention study // *Medical Physics*. – 2010. – V. 37. – № 7. – P. 3633–3647.
38. Cerdan S., Künnecke B., Seelig J. Cerebral metabolism of [1,2-¹³C₂]acetate as detected by in vivo and in vitro ¹³C NMR // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – № 22. – P. 12916–12926.
39. Chalmers S., Caldwell S.T., Quin C., Prime T.A., James A.M., Cairns A.G., ... Hartley R.C. Selective uncoupling of individual mitochondria within a cell using a mitochondria-targeted photoactivated protonophore // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – V. 134. – № 2. – P. 758–761.

40. Chalmers S., McCarron J.G. The mitochondrial membrane potential and Ca^{2+} oscillations in smooth muscle // *Journal of Cell Science*. – 2008. – V. 121. – Pt 1. – P. 75–85.
41. Chalmers S., Olson M.L., MacMillan D., Rainbow R.D., McCarron J.G. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria // *Cell Calcium*. – 2007. – V. 42. – № 4–5. – P. 447–466.
42. Chalmers S., Saunter C., Wilson C., Coats P., Girkin J.M., McCarron J.G. Mitochondrial motility and vascular smooth muscle proliferation // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2012. – V. 32. – № 12. – P. 3000–3011.
43. Chen L., Jiao J., Lei F., Zhou B., Li H., Liao P., ... Jiang R. Ezrin-mediated astrocyte-synapse signaling regulates cognitive function via astrocyte morphological changes in fine processes in male mice // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2025. – V. 124. – P. 177–191.
44. Chetana Shanmukhappa S., Lokeshwaran S. Venous Oxygen Saturation // *B StatPearls*. – 2025.
45. Christie I.N., Theparambil S.M., Braga A., Doronin M., Hosford P.S., Brazhe A., ... Gourine A.V. Astrocytes produce nitric oxide via nitrite reduction in mitochondria to regulate cerebral blood flow during brain hypoxia // *Cell Reports*. – 2023. – V. 42. – № 12. – P. 113514.
46. Clarke D.D., Sokoloff L. Circulation and Energy Metabolism of the Brain // *B Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. – 1999.
47. Collins T.J., Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells // *The EMBO Journal*. – 2002. – V. 21. – № 7. – P. 1616–1627.
48. Conze C., Trushina N.I., Monteiro-Abreu N., Singh L., Romero D.V., Wienbeuker E., ... Brandt R. Redox signaling modulates axonal microtubule

- organization and induces a specific phosphorylation signature of microtubule-regulating proteins // *Redox Biology*. – 2025. – V. 83. – P. 103626.
49. Corales L.G., Inada H., Owada Y., Osumi N. Fatty acid preference for beta-oxidation in mitochondria of murine cultured astrocytes // *Genes to Cells*. – 2024. – V. 29. – № 9. – P. 757–768.
50. Coulson S.Z., Duffy B.M., Staples J.F. Mitochondrial techniques for physiologists // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2024. – V. 271. – P. 110947.
51. Dai J., Kuo K.-H., Leo J.M., van Breemen C., Lee C.-H. Rearrangement of the close contact between the mitochondria and the sarcoplasmic reticulum in airway smooth muscle // *Cell Calcium*. – 2005. – V. 37. – № 4. – P. 333–340.
52. Das S., Hajnóczky N., Antony A.N., Csordás G., Gaspers L.D., Clemens D.L., Hoek J.B., Hajnóczky G. Mitochondrial morphology and dynamics in hepatocytes from normal and ethanol-fed rats // *Pflugers Archiv*. – 2012. – V. 464. – № 1. – P. 101–109.
53. Delgado-Esteban M., Almeida A., Bolaños J.P. D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons // *Journal of Neurochemistry*. – 2000. – V. 75. – № 4. – P. 1618–1624.
54. Delgado-Esteban M., García-Higuera I., Maestre C., Moreno S., Almeida A. APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development // *Nature Communications*. – 2013. – V. 4. – P. 2879.
55. Derouiche A., Frotscher M. Peripheral astrocyte processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins // *Glia*. – 2001. – V. 36. – № 3. – P. 330–341.

56. Derouiche A., Geiger K.D. Perspectives for Ezrin and Radixin in Astrocytes: Kinases, Functions and Pathology // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – № 15. – P. 3776.
57. Devine C.E., Somlyo A.V., Somlyo A.P. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles // *The Journal of Cell Biology*. – 1972. – V. 52. – № 3. – P. 690–718.
58. Díaz-Castro B., Robel S., Mishra A. Astrocyte Endfeet in Brain Function and Pathology: Open Questions // *Annual Review of Neuroscience*. – 2023. – V. 46. – № 1. – P. 101–121.
59. Diaz-Hernandez J.I., Almeida A., Delgado-Esteban M., Fernandez E., Bolaños J.P. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – № 47. – P. 38992–39001.
60. Ebert D., Haller R.G., Walton M.E. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy // *The Journal of Neuroscience*. – 2003. – V. 23. – № 13. – P. 5928–5935.
61. Edmond J., Robbins R.A., Bergstrom J.D., Cole R.A., de Vellis J. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture // *Journal of Neuroscience Research*. – 1987. – V. 18. – № 4. – P. 551–561.
62. Escartin C., Pierre K., Colin A., Brouillet E., Delzescaux T., Guillermier M., ... Bonvento G. Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity and increases resistance to metabolic insults // *The Journal of Neuroscience*. – 2007. – V. 27. – № 27. – P. 7094–7094.
63. Fedotova A., Brazhe A., Doronin M., Toptunov D., Pryazhnikov E., Khiroug L., Verkhatsky A., Semyanov A. Dissociation Between Neuronal and Astrocytic

Calcium Activity in Response to Locomotion in Mice // *Function*. – 2023. – V. 4. – № 4. – P. zqad019.

64. Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolaños J.P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes // *The Biochemical Journal*. – 2012. – V. 443. – № 1. – P. 3–11.

65. Fox P.T., Raichle M.E. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1986. – V. 83. – № 4. – P. 1140–1144.

66. Friard O., Gamba M. BORIS: A free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations // *Methods in Ecology and Evolution*. – 2016. – V. 7. – № 11. – P. 1325–1330.

67. García O., Almeida A., Massieu L., Bolaños J.P. Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrane potential and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous model of glutamate receptor activation // *Journal of Neurochemistry*. – 2005. – V. 92. – № 1. – P. 183–190.

68. García-Nogales P., Almeida A., Bolaños J.P. Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – № 2. – P. 864–874.

69. Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain // *Nature*. – 1988. – V. 336. – № 6197. – P. 385–388.

70. Gavrilov N., Golyagina I., Brazhe A., Scimemi A., Turlapov V., Semyanov A. Astrocytic Coverage of Dendritic Spines, Dendritic Shafts, and Axonal Boutons in Hippocampal Neuropil // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2018. – V. 12. – P. 248.

71. Genoud C., Quairiaux C., Steiner P., Hirling H., Welker E., Knott G.W. Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex // *PLoS Biology*. – 2006. – V. 4. – № 11. – P. e343.
72. Gordon G.R.J., Choi H.B., Rungta R.L., Ellis-Davies G.C.R., MacVicar B.A. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles // *Nature*. – 2008. – V. 456. – № 7223. – P. 745–749.
73. Gourine A.V., Funk G.D. On the existence of a central respiratory oxygen sensor // *Journal of Applied Physiology*. – 2017. – V. 123. – № 5. – P. 1344–1349.
74. Goyal M.S., Hawrylycz M., Miller J.A., Snyder A.Z., Raichle M.E. Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression // *Cell metabolism*. – 2014. – V. 19. – № 1. – P. 49–57.
75. Gupta M., Pandey S., Rumman M., Singh B., Mahdi A.A. Molecular mechanisms underlying hyperglycemia associated cognitive decline // *IBRO Neuroscience Reports*. – 2023. – V. 14. – P. 57–63.
76. Hajnóczky G., Hager R., Thomas A.P. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca^{2+} // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – № 20. – P. 14157–14162.
77. Halestrap A.P. Monocarboxylic acid transport // *Comprehensive Physiology*. – 2013. – V. 3. – № 4. – P. 1611–1643.
78. Halim N.D., Mcfate T., Mohyeldin A., Okagaki P., Korotchkina L.G., Patel M.S., ... Verma A. Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons // *Glia*. – 2010. – V. 58. – № 10. – P. 1168–1176.
79. Harkness L., Novikov S.M., Beermann J., Bozhevolnyi S.I., Kassem M. Identification of abnormal stem cells using Raman spectroscopy // *Stem Cells and Development*. – 2012. – V. 21. – № 12. – P. 2152–2159.

80. Harris J.J., Jolivet R., Attwell D. Synaptic energy use and supply // *Neuron*. – 2012. – V. 75. – № 5. – P. 762–777.
81. Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernández E., Maestre C., Moncada S., Bolaños J.P. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1 // *Nature Cell Biology*. – 2009. – V. 11. – № 6. – P. 747–752.
82. Hertz L., Peng L., Dienel G.A. Energy metabolism in astrocytes: High rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2007. – V. 27. – № 2. – P. 219–249.
83. Hillman H., Deutsch K. Area changes in slices of rat brain during preparation for histology or electron microscopy // *Journal of Microscopy*. – 1978. – V. 114. – № 1. – P. 77–84.
84. Horvat A., Muhič M., Smolič T., Begić E., Zorec R., Kreft M., Vardjan N. Ca^{2+} as the prime trigger of aerobic glycolysis in astrocytes // *Cell Calcium*. – 2021. – V. 95. – P. 102368.
85. Howarth C., Gleeson P., Attwell D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. – V. 32. – № 7. – P. 1222–1232.
86. Hu J., Zhong X., Yang X., Li H., Ran Y. A novel inducible acute hyperglycemia mouse model for assessing 6-KTP // *Biomedical Reports*. – 2019. – V. 11. – № 3. – P. 110–114.
87. Hutchinson D.S., Summers R.J., Gibbs M.E. Beta2- and beta3-adrenoceptors activate glucose uptake in chick astrocytes by distinct mechanisms: A mechanism for memory enhancement? // *Journal of Neurochemistry*. – 2007. – V. 103. – № 3. – P. 997–1008.

88. Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A., ... Nedergaard M. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β // *Science translational medicine*. – 2012. – V. 4. – № 147. – P. 147ra111.
89. Ioannou M.S., Jackson J., Sheu S.-H., Chang C.-L., Weigel A.V., Liu H., ... Liu Z. Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity // *Cell*. – 2019. – V. 177. – № 6. – P. 1522-1535.e14.
90. Ivanov A.I., Malkov A.E., Waseem T., Mukhtarov M., Buldakova S., Gubkina O., Zilberter M., Zilberter Y. Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2014. – V. 34. – № 3. – P. 397–407.
91. Jekabsons M.B., Nicholls D.G. In situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – № 31. – P. 32989–33000.
92. Jimenez-Blasco D., Santofimia-Castaño P., Gonzalez A., Almeida A., Bolaños J.P. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway // *Cell Death and Differentiation*. – 2015. – V. 22. – № 11. – P. 1877–1889.
93. Jogl G., Tong L. Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport // *Cell*. – 2003. – V. 112. – № 1. – P. 113–122.
94. Johnson A., Varberg Z., Benhardus J., Maahs A., Schrater P. The hippocampus and exploration: Dynamically evolving behavior and neural representations // *Frontiers in Human Neuroscience*. – 2012. – V. 6.

95. Johnson D.A., Johnson J.A. Nrf2—A therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases // *Free radical biology & medicine*. – 2015. – V. 88. – Pt B. – P. 253–267.
96. Kacem K., Lacombe P., Seylaz J., Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: A confocal microscopy study // *Glia*. – 1998. – V. 23. – № 1. – P. 1–10.
97. Kakita M., Kaliaperumal V., Hamaguchi H. Resonance Raman quantification of the redox state of cytochromes b and c in-vivo and in-vitro // *Journal of Biophotonics*. – 2012. – V. 5. – № 1. – P. 20–24.
98. Kalimo H. The role of the blood-brain barrier in perfusion fixation of the brain for electron microscopy // *The Histochemical Journal*. – 1976. – V. 8. – № 1. – P. 1–12.
99. Kasparov S. Are Astrocytes the Pressure-Reservoirs of Lactate in the Brain? // *Cell Metabolism*. – 2016. – V. 23. – № 1. – P. 1–2.
100. Kim Y., Dube S.E., Park C.B. Brain energy homeostasis: The evolution of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis // *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. – 2025. – V. 29. – № 1. – P. 1–8.
101. Korogod N., Petersen C.C.H., Knott G.W. Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation // *eLife*. – 2015. – V. 4. – P. e05793.
102. Kostyuk A.I., Rapota D.D., Morozova K.I., Fedotova A.A., Jappy D., Semyanov A.V., ... Bilan D.S. Modern optical approaches in redox biology: Genetically encoded sensors and Raman spectroscopy // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2024. – V. 217. – P. 68–115.
103. Kotova D.A., Ivanova A.D., Kelmanson I.V., Morozova K.I., Khramova Y.V., Solotenko M.A., ... Bilan D.S. Redox Differences Between Neurons and Astrocytes

In Vivo in Ischemic Brain Tissues of Rodents // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2025. – V. 43. – № 4–6. – P. 272–287.

104. Kotova D.A., Ivanova A.D., Pochechuev M.S., Kelmanson I.V., Khramova Y.V., Tiaglik A., ... Bilan D.S. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2023. – V. 208. – P. 153–164.

105. Krafft C., Popp J. The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2015. – V. 407. – № 3. – P. 699–717.

106. Kriuchechnikova A., Tiaglik A., Levdik T., Brazhe A. Fast Marching to Branching Morphologies // *SSRN*. – 2025.

107. Kussmaul L., Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103. – № 20. – P. 7607–7612.

108. Lebon V., Petersen K.F., Cline G.W., Shen J., Mason G.F., Dufour S., ... Rothman D.L. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: Elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism // *The Journal of Neuroscience*. – 2002. – V. 22. – № 5. – P. 1523–1531.

109. Ledo A., Fernandes E., Salvador A., Laranjinha J., Barbosa R.M. In vivo hydrogen peroxide diffusivity in brain tissue supports volume signaling activity // *Redox Biology*. – 2022. – V. 50. – P. 102250.

110. Lefebvre A.E.Y.T., Sturm G., Lin T.-Y., Stoops E., López M.P., Kaufmann-Malaga B., Hake K. Nellie: Automated organelle segmentation, tracking

and hierarchical feature extraction in 2D/3D live-cell microscopy // *Nature Methods*. – 2025. – V. 22. – № 4. – P. 751–763.

111. Li H., Guglielmetti C., Sei Y.J., Zilberter M., Le Page L.M., Shields L., ... Nakamura K. Neurons require glucose uptake and glycolysis in vivo // *Cell Reports*. – 2023. – V. 42. – № 4. – P. 112335.

112. Li Z., Okamoto K.-I., Hayashi Y., Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses // *Cell*. – 2004. – V. 119. – № 6. – P. 873–887.

113. Lopes G., Bonacchi N., Frazão J., Neto J.P., Atallah B.V., Soares S., ... Kampff A.R. Bonsai: An event-based framework for processing and controlling data streams // *Frontiers in Neuroinformatics*. – 2015. – V. 9. – P. 7.

114. Lopez-Fabuel I., Le Douce J., 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 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – V. 113. – № 46. – P. 13063–13068.

115. Lovatt D., Sonnewald U., Waagepetersen H.S., Schousboe A., He W., Lin J.H.-C., ... Nedergaard M. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex // *The Journal of Neuroscience*. – 2007. – V. 27. – № 45. – P. 12255–12266.

116. 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 Biology*. – 2020. – V. 36. – P. 101602.

117. Mächler P., Wyss M.T., Elsayed M., Stobart J., Gutierrez R., von Faber-Castell A., ... Weber B. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons // *Cell Metabolism*. – 2016. – V. 23. – № 1. – P. 94–102.

118. Magistretti P.J., Allaman I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging // *Neuron*. – 2015. – V. 86. – № 4. – P. 883–901.
119. Magistretti P.J., Chatton J.-Y. Relationship between L-glutamate-regulated intracellular Na⁺ dynamics and ATP hydrolysis in astrocytes // *Journal of Neural Transmission*. – 2005. – V. 112. – № 1. – P. 77–85.
120. Mathiisen T.M., Lehre K.P., Danbolt N.C., Ottersen O.P. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction // *Glia*. – 2010. – V. 58. – № 9. – P. 1094–1103.
121. Mergenthaler P., Lindauer U., Dienel G.A., Meisel A. Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function // *Trends in Neurosciences*. – 2013. – V. 36. – № 10. – P. 587–597.
122. Mitra K., Wunder C., Roysam B., Lin G., Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – № 29. – P. 11960–11965.
123. Morant-Ferrando B., Jimenez-Blasco D., Alonso-Batan P., Agulla J., Lapresa R., Garcia-Rodriguez D., ... Bolaños J.P. Fatty acid oxidation organizes mitochondrial supercomplexes to sustain astrocytic ROS and cognition // *Nature Metabolism*. – 2023. – V. 5. – № 8. – P. 1290–1302.
124. Moreno M.J., Martínez J.A. [Adipose tissue: A storage and secretory organ] // *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*. – 2002. – V. 25. – Suppl 1. – P. 29–39.
125. Morris R.L., Hollenbeck P.J. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth // *Journal of Cell Science*. – 1993. – V. 104. – Pt 3. – P. 917–927.
126. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochemical Journal*. – 2009. – V. 417. – Pt 1. – P. 1–13.

127. Narayanan D., Xi Q., Pfeffer L.M., Jaggar J.H. Mitochondria control functional CaV1.2 expression in smooth muscle cells of cerebral arteries // *Circulation Research*. – 2010. – V. 107. – № 5. – P. 631–641.
128. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain // *Trends in Neurosciences*. – 2003. – V. 26. – № 10. – P. 523–530.
129. Nelson D.L., Cox M.M., Nelson D.L. *Lehninger principles of biochemistry* // – 2013. – 6th edition.
130. Nguyen T.B., Louie S.M., Daniele J.R., Tran Q., Dillin A., Zoncu R., Nomura D.K., Olzmann J.A. DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy // *Developmental Cell*. – 2017. – V. 42. – № 1. – P. 9-21.e5.
131. Nicholls D.G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – V. 1147. – P. 53–60.
132. Nixdorf-Bergweiler B.E., Albrecht D., Heinemann U. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus // *Glia*. – 1994. – V. 12. – № 3. – P. 180–195.
133. Nixon G.F., Mignery G.A., Somlyo A.V. Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1994. – V. 15. – № 6. – P. 682–700.
134. Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement // *Redox Biology*. – 2020. – V. 37. – P. 101674.
135. Obel L.F., Müller M.S., Walls A.B., Sickmann H.M., Bak L.K., Waagepetersen H.S., Schousboe A. Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and

regulation at the subcellular level // *Frontiers in Neuroenergetics*. – 2012. – V. 4. – P. 3.

136. Oberheim N.A., Wang X., Goldman S., Nedergaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain // *Trends in Neurosciences*. – 2006. – V. 29. – № 10. – P. 547–553.

137. Ogawa S., Lee T.M., Kay A.R., Tank D.W. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – V. 87. – № 24. – P. 9868–9872.

138. Okada M., Smith N.I., Palonpon A.F., Endo H., Kawata S., Sodeoka M., Fujita K. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – V. 109. – № 1. – P. 28–32.

139. O'Reilly C.M., Fogarty K.E., Drummond R.M., Tuft R.A., Walsh J.V. Quantitative analysis of spontaneous mitochondrial depolarizations // *Biophysical Journal*. – 2003. – V. 85. – № 5. – P. 3350–3357.

140. O'Reilly C.M., Fogarty K.E., Drummond R.M., Tuft R.A., Walsh J.V. Spontaneous mitochondrial depolarizations are independent of SR Ca²⁺ release // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2004. – V. 286. – № 5. – P. C1139-1151.

141. Pak V.V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O.G., Pedre B., Tyurin-Kuzmin P.A., Mishina N.M., ... Belousov V.V. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function // *Cell Metabolism*. – 2020. – V. 31. – № 3. – P. 642-653.e6.

142. Parpura V., Basarsky T.A., Liu F., Jeftinija K., Jeftinija S., Haydon P.G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling // *Nature*. – 1994. – V. 369. – № 6483. – P. 744–747.

143. Patrushev I., Gavrilov N., Turlapov V., Semyanov A. Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron-astrocyte communication // *Cell Calcium*. – 2013. – V. 54. – № 5. – P. 343–349.
144. Paxinos G., Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates // – 2004. – 2nd edition.
145. Pellerin L., Bouzier-Sore A.-K., Aubert A., Serres S., Merle M., Costalat R., Magistretti P.J. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update // *Glia*. – 2007. – V. 55. – № 12. – P. 1251–1262.
146. Pellerin L., Magistretti P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – V. 91. – № 22. – P. 10625–10629.
147. Pellerin L., Magistretti P.J. Sweet sixteen for ANLS // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. – V. 32. – № 7. – P. 1152–1166.
148. Perry D.A., Salvin J.W., Romfh P., Chen P., Krishnamurthy K., Thomson L.M., ... Kheir J.N. Responsive monitoring of mitochondrial redox states in heart muscle predicts impending cardiac arrest // *Science Translational Medicine*. – 2017. – V. 9. – № 408. – P. eaan0117.
149. Persson A., Lindwall C., Curtis M.A., Kuhn H.G. Expression of ezrin radixin moesin proteins in the adult subventricular zone and the rostral migratory stream // *Neuroscience*. – 2010. – V. 167. – № 2. – P. 312–322.
150. Pham A.H., McCaffery J.M., Chan D.C. Mouse lines with photo-activatable mitochondria to study mitochondrial dynamics // *Genesis*. – 2012. – V. 50. – № 11. – P. 833–843.
151. Pierre K., Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function // *Journal of Neurochemistry*. – 2005. – V. 94. – № 1. – P. 1–14.

152. Popov A., Brazhe N., Fedotova A., Tiaglik A., Bychkov M., Morozova K., ... Semyanov A. A high-fat diet changes astrocytic metabolism to promote synaptic plasticity and behavior // *Acta Physiologica*. – 2022. – V. 236. – № 1.
153. Popov A., Brazhe N., Morozova K., Yashin K., Bychkov M., Nosova O., ... Semyanov A. Mitochondrial malfunction and atrophy of astrocytes in the aged human cerebral cortex // *Nature Communications*. – 2023. – V. 14. – № 1.
154. Pysh J.J., Khan T. Variations in mitochondrial structure and content of neurons and neuroglia in rat brain: An electron microscopic study // *Brain Research*. – 1972. – V. 36. – № 1. – P. 1–18.
155. Rajamani U. Causes of Neurodegeneration in Diabetes: Possible Culprits and Therapeutic Targets // *Brain Disorders & Therapy*. – 2014. – V. 03. – № 04.
156. Rambold A.S., Cohen S., Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics // *Developmental Cell*. – 2015. – V. 32. – № 6. – P. 678–692.
157. Rangaraju V., Calloway N., Ryan T.A. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function // *Cell*. – 2014. – V. 156. – № 4. – P. 825–835.
158. Reynolds I.J., Hastings T.G. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation // *The Journal of Neuroscience*. – 1995. – V. 15. – № 5. – P. 3318–3327.
159. Robert B. Resonance Raman spectroscopy // *Photosynthesis Research*. – 2009. – V. 101. – № 2–3. – P. 147–155.
160. Rosca M.G., Vazquez E.J., Kerner J., Parland W., Chandler M.P., Stanley W., Sabbah H.N., Hoppel C.L. Cardiac mitochondria in heart failure: Decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation // *Cardiovascular Research*. – 2008. – V. 80. – № 1. – P. 30–39.
161. Ruminot I., Gutiérrez R., Peña-Münzenmayer G., Añazco C., Sotelo-Hitschfeld T., Lerchundi R., ... Barros L.F. NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic

- glycolysis by extracellular K^+ // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – V. 31. – № 40. – P. 14264–14271.
162. Schacke S., Kirkpatrick J., Stocksdales A., Bauer R., Hagel C., Riecken L.B., Morrison H. Ezrin deficiency triggers glial fibrillary acidic protein upregulation and a distinct reactive astrocyte phenotype // *Glia*. – 2022. – V. 70. – № 12. – P. 2309–2329.
163. Schönfeld P., Reiser G. Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration // *Neurochemistry International*. – 2017. – V. 109. – P. 68–77.
164. Semyanov A., Verkhratsky A. Astrocytic processes: From tripartite synapses to the active milieu // *Trends in Neurosciences*. – 2021. – V. 44. – № 10. – P. 781–792.
165. Shenouda S.M., Widlansky M.E., Chen K., Xu G., Holbrook M., Tabit C.E., ... Vita J.A. Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus // *Circulation*. – 2011. – V. 124. – № 4. – P. 444–453.
166. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // *Redox Biology*. – 2017. – V. 11. – P. 613–619.
167. Simard M., Arcuino G., Takano T., Liu Q.S., Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface // *The Journal of Neuroscience*. – 2003. – V. 23. – № 27. – P. 9254–9262.
168. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: Biology and pathology // *Acta Neuropathologica*. – 2010. – V. 119. – № 1. – P. 7–35.
169. Soltanzadeh M., Blanchard S., Soucy J.-P., Benali H. Lactate's behavioral switch in the brain: An in-silicomodel // *Journal of Theoretical Biology*. – 2023. – V. 575. – P. 111648.
170. Suh S.W., Bergher J.P., Anderson C.M., Treadway J.L., Fosgerau K., Swanson R.A. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: Studies

with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide) // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2007. – V. 321. – № 1. – P. 45–50.

171. Sultana R., Perluigi M., Butterfield D.A. Lipid Peroxidation Triggers Neurodegeneration: A Redox Proteomics View into the Alzheimer Disease Brain // Free radical biology & medicine. – 2013. – V. 62. – P. 157–169.

172. Szabadkai G., Simoni A.M., Chami M., Wieckowski M.R., Youle R.J., Rizzuto R. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis // Molecular Cell. – 2004. – V. 16. – № 1. – P. 59–68.

173. Taggart M.J., Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: Gestational dependence in isolated rat uterus // The Journal of Physiology. – 1998. – V. 511. – Pt 1. – P. 133–144.

174. Takahashi S., Driscoll B.F., Law M.J., Sokoloff L. Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – V. 92. – № 10. – P. 4616–4620.

175. Tang B.L. Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis: Is the lactate shuttle not required? // Brain Research Bulletin. – 2018. – V. 137. – P. 225–228.

176. Tebay L.E., Robertson H., Durant S.T., Vitale S.R., Penning T.M., Dinkova-Kostova A.T., Hayes J.D. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease // Free Radical Biology & Medicine. – 2015. – V. 88. – Pt B. – P. 108–146.

177. Thompson J.K., Peterson M.R., Freeman R.D. Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex // *Science*. – 2003. – V. 299. – № 5609. – P. 1070–1072.
178. Toman M., Wade J.J., Verkhratsky A., Dallas M., Bithell A., Flanagan B., Harkin J., McDaid L. The influence of astrocytic leaflet motility on ionic signalling and homeostasis at active synapses // *Scientific Reports*. – 2023. – V. 13. – № 1.
179. Tønnesen J., Inavalli V.V.G.K., Nägerl U.V. Super-Resolution Imaging of the Extracellular Space in Living Brain Tissue // *Cell*. – 2018. – V. 172. – № 5. – P. 1108–1121.e15.
180. Torres Filho I.P., Turner J., Pittman R.N., Proffitt E., Ward K.R. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation // *Journal of Applied Physiology*. – 2008. – V. 104. – № 6. – P. 1809–1817.
181. Unger R.H., Clark G.O., Scherer P.E., Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2010. – V. 1801. – № 3. – P. 209–214.
182. Vasiljevski E.R., Summers M.A., Little D.G., Schindeler A. Lipid storage myopathies: Current treatments and future directions // *Progress in Lipid Research*. – 2018. – V. 72. – P. 1–17.
183. Vaughn A.E., Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c // *Nature Cell Biology*. – 2008. – V. 10. – № 12. – P. 1477–1483.
184. Vicente-Gutierrez C., Bonora N., Bobo-Jimenez V., Jimenez-Blasco D., Lopez-Fabuel I., Fernandez E., ... Bolaños J.P. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour // *Nature Metabolism*. – 2019. – V. 1. – № 2. – P. 201–211.

185. Vlasov A.V., Maliar N.L., Bazhenov S.V., Nikelshparg E.I., Brazhe N.A., Vlasova A.D., ... Gordeliy V.I. Raman Scattering: From Structural Biology to Medical Applications // *Crystals*. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 38.
186. von Bartheld C.S., Bahney J., Herculano-Houzel S. The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A Review of 150 Years of Cell Counting // *The Journal of comparative neurology*. – 2016. – V. 524. – № 18. – P. 3865–3895.
187. Wamelink M.M.C., Struys E.A., Jakobs C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2008. – V. 31. – № 6. – P. 703–717.
188. Warburg O. On the origin of cancer cells // *Science*. – 1956. – V. 123. – № 3191. – P. 309–314.
189. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1817. – № 10. – P. 1833–1838.
190. Yu N., Martin J.L., Stella N., Magistretti P.J. Arachidonic acid stimulates glucose uptake in cerebral cortical astrocytes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – V. 90. – № 9. – P. 4042.
191. Zhang Y., Chen K., Sloan S.A., Bennett M.L., Scholze A.R., O’Keeffe S., ... Wu J.Q. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex // *The Journal of Neuroscience*. – 2014. – V. 34. – № 36. – P. 11929–11947.
192. Zhou B., Chen L., Liao P., Huang L., Chen Z., Liao D., ... Jiang R. Astroglial dysfunctions drive aberrant synaptogenesis and social behavioral deficits in mice with neonatal exposure to lengthy general anesthesia // *PLOS Biology*. – 2019. – V. 17. – № 8. – P. e3000086.

Благодарности

Хочу выразить глубокую благодарность моим научным наставникам Надежде Александровне Браже и Алексею Васильевичу Семьянову, за возможность работать над этим проектом, оказанное доверие, предоставленную творческую свободу, содержательные семинары и обсуждения, вдохновение и моральную поддержку. Я невероятно рада, что стала вашей ученицей, вы помогли мне сформироваться в качестве независимого исследователя.

Хочу выразить свою особую признательность Анне Федотовой и Ксении Морозовой, с такой замечательной командой все проведенные часы в темных имиджинговых комнатах пролетели незаметно, спасибо вам за интересные обсуждения, невероятную моральную поддержку, и соавторство в выведении формулы против профессионального выгорания – бабл чай и научные мемы.

Выражаю свою глубокую признательность Алексею Рудольфовичу Браже за неоценимую помощь в анализе морфологии астроцитов, за все плодотворные научные обсуждения, полезные советы по научному английскому, невероятное терпение и позитивный настрой.

Выражаю свою особую благодарность Льву Гославскому за неоценимую помощь в анализе морфологии митохондрий астроцитов и нейронов.

Хочу выразить особую признательность Дмитрию Сергеевичу Билану и всем сотрудникам его группы (группа метаболических основ патологий отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН) за многолетнее и невероятно плодотворное сотрудничество.

Выражаю глубокую признательность Владимиру Александровичу Олейникову и коллективу его отдела (отдел молекулярной биофизики ГНЦ ИБХ РАН), благодаря вашей поддержке совместная работа получилась по-настоящему многогранной и результативной.

Выражаю большую признательность Евгении Юрьевне Паршиной за бесценную помощь в проведении *ex vivo* исследований пространственной неоднородности редокс-состояния митохондрий астроцитов.

Выражаю свою особенную признательность сотрудникам кафедры высшей нервной деятельности МГУ, в частности Александру Васильевичу Латанову и Марии Валерьевне Славуцкой за невероятную поддержку на всех этапах обучения в аспирантуре.

Выражаю глубокую признательность сотрудникам вивария ГНЦ ИБХ РАН, в частности Альфие Камаевой за бережное отношение и заботу о животных.

Сердечно благодарю своего любимого мужа Андрея Качмазова, твоя поддержка, уважение, терпение и бесконечная вера в меня позволили твердо идти по выбранному пути.

Работа выполнена при поддержке гранта Программы «Мозг» АНО «Идея» и грантов РФФИ: РФФИ 23-74-00006 (с использованием ОИ ГНЦ ИБХ РАН), РФФИ 23-44-00015, РФФИ 23-44-00103.

Работа посвящается моей маме.