

*На правах рукописи*



Стельмащук Ольга Андреевна

**Различия в энергетическом метаболизме и окислительно-  
восстановительном балансе между отделами мозга**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Орёл – 2023

Работа выполнена в лаборатории клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Абрамов Андрей Юрьевич**

**Официальный оппоненты:** **Плотников Егор Юрьевич**  
доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, отдел функциональной биохимии биополимеров, лаборатория структуры и функции митохондрий, заведующий

**Белослудцев Константин Николаевич**  
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», кафедра биохимии, клеточной биологии и микробиологии, профессор

**Ведущая организация:** **Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет»** (г. Ростов-на-Дону)

Защита диссертации состоится 30 ноября 2023 года в 14 ч 00 мин на заседании совета 24.1.232.01 (Д 002.285.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»» Институт биофизики клетки по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пущино, ул. Институтская, д. 3. и на сайте [www.psn.ru](http://www.psn.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга Васильевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Многие исследователи обращались к МХ нейронов, видя в них причину гибели клеток при различных заболеваниях. И они имели к тому веские основания. В эукариотических клетках митохондрии выполняют множество функций, помимо биоэнергетических (*Cheng et al. 2021*) и метаболических: они хранят ионы  $\text{Ca}^{2+}$  (*Giacomello et al. 2007*), участвуют в различных механизмах клеточной гибели, передают молекулярные сигналы (*Hajnóczky et al. 2000; Plotnikov and Zorov 2019*), регулирующие определенные клеточные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку и адаптацию к стрессовым условиям (*Duchen 2004; Козин, Кулакова, and Фаворова 2018*). Мозг использует до 20% всей глюкозы в организме, большая часть которого используется на гликолиз и окислительное фосфорилирование (*Kety 1957*). Согласно некоторым исследованиям, нейроны потребляют 70-80% энергии, остальная часть используется глиальными клетками, такими как астроциты, олигодендроциты и микроглия (*Camandola and Mattson 2017*), что делает нейроны особенно восприимчивы к митохондриальной дисфункции и энергетическому дефициту (*Magistretti and Allaman 2015*). В нервной системе важны не только нейроны, но и астроциты, поскольку они играют важную регулируемую роль в гомеостазе центральной нервной системы (ЦНС). Производство энергии в астроцитах зависит не столько от окислительного фосфорилирования, как в нейронах, сколько от анаэробного гликолиза (*Bélangier et al. 2011*).

Многие исследования связывают нейродегенеративные заболевания с митохондриальной дисфункцией (*Abramov and Angelova 2019; Herst et al. 2017; Son and Han 2018*). Старение способствует образованию мутаций митохондриальной ДНК и окислительного стресса, что является наибольшими факторами риска развития нейродегенеративных заболеваний (*Beal 2007*).

Основная гистопатологическая особенность болезни Альцгеймера (БА) представляет собой осаждение внеклеточных нейритических бляшек и внутриклеточных нейрофибрилляционных клубков, которые соответствуют агрегированным белкам:  $\beta$ -амилоид, тау (*Татарникова, Орлов, and Бобкова 2015*). Хотя молекулярные и клеточные механизмы патогенеза БА в основном остаются неясными, исследователями было предложено несколько потенциальных механизмов нарушения кальциевой сигнализации, которые включают глутаматную токсичность, дисфункцию ацетилхолиновых рецепторов и прямое образование  $\beta$ -амилоидами ионных каналов (*Abramov, Canevari, and Duchon 2004; Arispe, Rojas, and Pollard 1993*). Нарушение митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$  поглощения через митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$  унипортер (MCU) или высвобождение через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменник, которое приводит к перегрузке митохондрий кальцием, индукции окислительного стресса в сочетании с другими триггерами, может запускать открытие митохондриальной поры (mPTP) с последующей смертью клеток (*Esteras and Abramov 2020; Gandhi et al. 2009*).

Наряду с индукцией окислительного стресса при нейродегенеративных заболеваниях, АФК играют важную роль в окислительно-восстановительной сигнализации (редокс-сигнале) (Abramov and Angelova 2019). Одной из форм АФК является синглетный кислород (*Sergei G. Sokolovski et al. 2021*). Применение низких доз синглетного кислорода потенциально может быть использовано для сохранения нейронов в условиях накопления аномально агрегированных белков (*Sergei G Sokolovski et al. 2021; De Taboada et al. 2011; Wang et al. 2022*), поэтому, генерация в клетках синглетного кислорода воздействием лазера с длиной волны 1267 нм потенциально может иметь нейропротекторный эффект.

Учитывая важность митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$  в механизме нейродегенерации, были протестированы соединения, влияющие на поступление кальция в митохондрии, чтобы изучить, как фармакологическое ограничение транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии защищает нейроны против  $\beta$ -амилоидной гибели в первичных нейрональных культурах (*Shevtsova et al. 2022*).

Нейродегенеративные заболевания имеют ряд схожих механизмов развития патологий, но также и ряд отличий, среди которых избирательная нейрональная гибель в определенных участках мозга (*Ткачева et al. 2022; Чимагомедова et al. 2017*). Поэтому представляет интерес, как различаются энергетический метаболизм митохондрий и окислительно-восстановительный баланс в разных частях мозга.

Выявление патологических изменений в митохондриальном метаболизме при нейродегенеративных заболеваниях потенциально позволит проводить раннюю диагностику заболевания на уровне отдельных клеток, а также предлагать эффективные нейропротекторные воздействия.

**Цель исследования.** Целью данной работы является изучение роли митохондрий в физиологии нейронов и астроцитов из различных отделов мозга, а также, используя митохондрии как клеточную мишень, определение потенциальных нейропротекторных направлений против нейродегенеративных заболеваний.

**Основные задачи исследования:**

1. Определить разницу в митохондриальном метаболизме отделов головного мозга.
2. Изучить различия в окислительно-восстановительном балансе разных отделов головного мозга.
3. Исследовать нейропротекторный эффект ограничения поступления кальция в митохондрии в условиях  $\beta$ -амилоидной нейротоксичности в первичных со-культурах нейронов и астроцитов.
4. Исследовать возможность снижения токсического действия  $\beta$ -амилоида на первичные со-культуры нейронов и астроцитов при воздействии синглетного кислорода.

**Научная новизна работы.** Выявлена самая высокая относительная величина скорости продукции НАДН в митохондриях клеток срезов среднего мозга, что также объясняет повышенный относительный уровень окислительно-восстановительного потенциала НАДН в клетках этой области.

Несмотря на различие относительной величины  $\Delta\Psi_m$  между нейронами и астроцитами в коре головного мозга, среднего мозга и мозжечка, их механизм поддержания  $\Delta\Psi_m$  был сходен для обоих типов клеток и поддерживался электрон-транспортной цепью митохондрий.

Было показано, что воздействие нейромедиаторов, таких как АТФ и глутамат на нейроны и глию приводит к максимальной скорости продукции активных форм кислорода в среднем мозге по сравнению с остальной частью мозга, в то время как уровень восстановленного глутатиона оставался одинаковым в большинстве областей мозга с самым низким уровнем, наблюдаемым в среднем мозге.

В работе показано, что соединения ТГ2112х и ТГ2113х ограничивают, но не блокируют полностью поглощение митохондриями кальция и защищают нейроны против  $\beta$ -амилоидной гибели в первичных нейрональных культурах.

Впервые применена выработка синглетного кислорода при облучении лазером с длиной волны 1267 нм в качестве защитного и восстанавливающего действия на митохондриальный  $Ca^{2+}$  в токсической модели БА in vitro, что повысило выживаемость клеток в два раза.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, описанные в данной работе, позволяют расширить понимание роли митохондриального кальция, АФК и митохондриального АТФ в развитии нейрональной клеточной гибели, в частности, объяснить причины избирательного поражения отделов головного мозга. Разработаны методы защиты клеток при амилоидной токсичности за счет ограничения митохондриального поглощения кальция с помощью соединений ТГ2112х и ТГ2113х, а также методом лазерной фотобиомодуляции производства синглетного кислорода. Разработан и зарегистрирован способ защиты нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и устройство для его реализации (патент №2783111 от 03.10.2022 «Способ защиты нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и устройство для его осуществления»).

**Методология и методы диссертационного исследования.** Настоящая работа была выполнена на первичной смешанной нейроглиальной культуре и переживающих срезах мозга крысы линии Wistar, на которой проведена апробация веществ и способов, способных корректировать кальций-зависимые патологические состояния. В работе использованы современные биофизические методы конфокальной и флуоресцентной микроскопии с применением специфичных флуоресцентных зондов. Проведение лазерной фотобиомодуляции клеток лазером на длине волны 1267 нм, а также работа по флуоресцентной и конфокальной микроскопии выполнена с помощью оборудования лаборатории клеточной физиологии и патологии НТЦ Биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Обработка цифровых изображений и статистический анализ данных осуществлялась с помощью специализированного программного обеспечения (Origin pro 2019b).

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Основные характеристики митохондриального энергетического метаболизма значительно различаются между областями мозга.

2. Различные участки мозга имеют высокую степень вариабельности в продукции АФК и уровня эндогенных антиоксидантов.

3. Ограничение митохондриального поглощения кальция защищает нейроны от гибели, вызванной  $\beta$ -амилоидом в первичных со-культурах нейронов и астроцитов.

4. Синглетный кислород защищает нейроны и астроциты от  $\beta$ -амилоидной нейротоксичности.

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора заключается в проведении обзора литературы роли энергетического метаболизма клеток мозга, митохондриального кальция, продукции АФК и митохондриального АТФ в физиологии и патологии нейродегенеративных заболеваний, а также в планировании и проведении экспериментальных исследований. Работа была выполнена и апробирована на базе лаборатории клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Все результаты, полученные соискателем, применены при выполнении научных исследований по темам: «Митохондрии как мишени в механизме нейродегенеративных заболеваний» (грант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации № 075-15-2019-1877, 2019-2021 гг.; № 075-15-2022-1095, 2022-2023 гг.); "Age-related changes in energy metabolism and function of mesenchymal stem cells and finding ways for recovery" (грант FEBS Short-Term Fellowships 2020, Лондон, Великобритания); «Исследование молекулярных и клеточных механизмов нейродегенеративных заболеваний, связанных с патологическими изменениями в митохондриально-кальциевом гомеостазе» (стипендия Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-5176.2022.4).

**Степень достоверности и апробация результатов.** Работа проведена с помощью современных методов исследования, приборов, реактивов и программного обеспечения, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Все полученные результаты имеют статистическую значимость и являются воспроизводимыми.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 15 международных и всероссийских конференциях, в частности на международной летней школе «IV Summer School Photonics Meets Biology 2017» (Террагона, Испания), симпозиуме Young scientist Chinese-Russian Optics & Photonics Symposium «CROPS 2017» (27 ноября – 6 декабря 2017 г.), международном 45-м Конгрессе FEBS «Molecules of Life: Towards New Horizons» (Любляна, Словения 2021), на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия 2021), международной научной конференции «Наука и инновации» (Ташкент, Узбекистан, 2022), международной научной конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (Курск, Россия 2022), VII Съезде биофизиков России (Краснодар, Россия, 2023) и др.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК, 8 статей в рецензируемых журналах базы данных WoS/Scopus и 16 тезисов в материалах конференций, получен патент на способ и устройство № 2783111 «Способ защиты нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и устройство для его осуществления».

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 142 машинописных страницах, включает 42 рисунка. Список литературы содержит 221 источник. Работа содержит следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений список литературы и список опубликованных работ и.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Объектами исследований служили переживающие срезы и первичная нейроглиальная культура 12 DIV коры, гиппокампа, среднего мозга, мозжечка и ствола мозга крысы. Токсическая модель БА воссоздавалась на нейроглиальной культуре коры головного мозга крысы 12 DIV. Кроме этого были использованы: культуры клеток фибробластов от здоровых пациентов, которые были получены из Института неврологии Университетского колледжа Лондона. Все исследования на животных проводились в ОГУ имени И.С. Тургенева согласно выписке из протокола заседания этического комитета «ОГУ имени И.С. Тургенева» №18 от 21.02.2020.

**Используемые реактивы и оборудование.** Исследования проводились с применением современных методов: флуоресцентной и конфокальной микроскопии с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и флуоресцентной станции Cell Observer на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M Carl Zeiss, Германия), а также флуоресцентной установки на базе инвертированного микроскопа IX73P1F (Olympus Corporation, Япония).

**Анализ данных и статистический анализ.** Компьютерную обработку серий изображений культур клеток, полученных с применением флуоресцентной и конфокальной микроскопии, проводили с помощью программы ImageJ. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab Corp., США). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$  по результатам ANOVA с тестом Тьюки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**1 Определение энергетического метаболизма митохондрий в разных отделах головного мозга.** При развитии нейродегенеративных заболеваний отмечается селективность в поражении различных отделов головного мозга (Ткачева *et al.* 2022). Возможной причиной поражения различных отделов головного мозга при нейродегенерации могут быть отличия, как на клеточном,

так и тканевом уровнях (Chen et al. 2020). Оценки энергетических потребностей клеток головного мозга, относительные величины  $\Delta\Psi_m$  и функции цикла Кребса могут быть использованы для объяснения разницы в чувствительности областей мозга к негативным факторам (Magistretti and Allaman 2015). Для объяснения различий чувствительности отделов мозга к негативным факторам был проанализирован уровень  $\Delta\Psi_m$  в переживающих срезах отделов мозга крыс (N=7 крыс, n=5 срезов). Для проведения исследований срезы отделов мозга крыс выдерживали в 1 мкМ растворе родамина 123 и трижды отмывали от красителя через 20 минут.  $\Delta\Psi_m$  влияет на производство АТФ, основной энергетической единицы клетки, и производство АФК (Рисунок 1). После измерения интенсивности флуоресценции родамина 123 в ячейку вносили рабочий раствор FCCP (разобщителя ОФ) для обеспечения концентрации 1 мкМ.

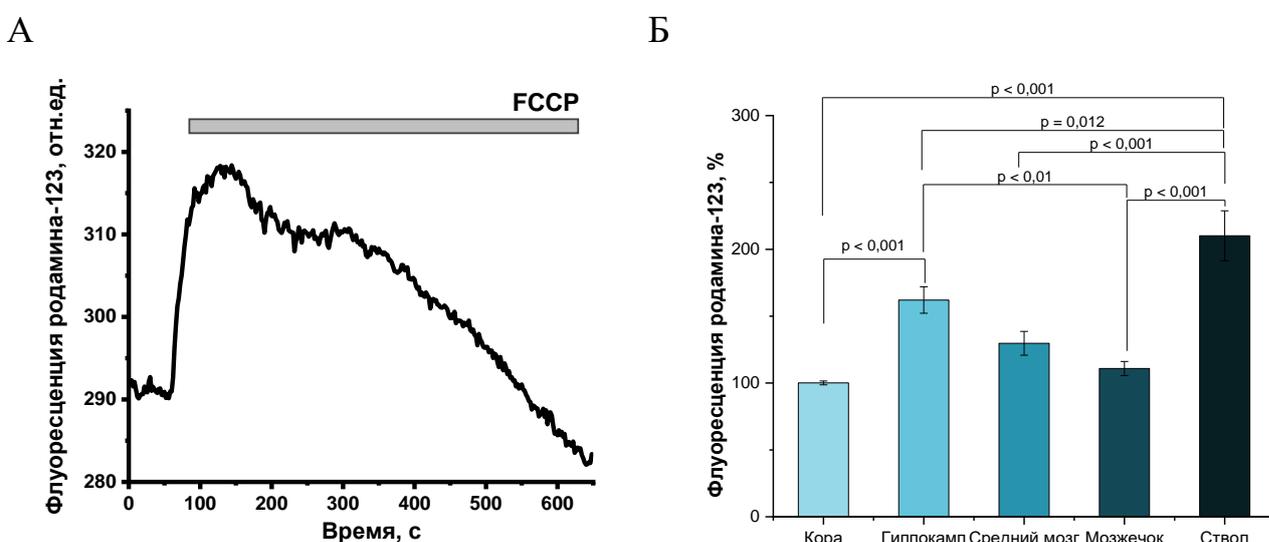


Рисунок 1 – Измерения флуоресценции родамина 123 в срезах. А. Пример графика изменения флуоресценции родамин 123 в срезах мозжечка. Б. Уровень флуоресценции родамина 123 в срезах отделов головного мозга крыс (за 100% принимался уровень интенсивности флуоресценции в срезах коры). Концентрация FCCP 1 мкМ. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Наибольшие значения относительной величины  $\Delta\Psi_m$  были обнаружены в срезах ствола мозга ( $195 \pm 11$  кортикального  $\Delta\Psi_m$ , N = 7 крыс, n = 14 срезов) и гиппокампа ( $155 \pm 7$  %, N = 7 крыс, n = 14 срезов).  $\Delta\Psi_m$  в срезах среднего мозга также был выше по сравнению со срезами коры ( $127 \pm 7$  %, N = 7 крыс, n = 14 срезов), в то время как в срезах мозжечка этот параметр был сходным с данными для коры.

Для сравнения ММП между астроцитами и нейронами в первичной нейрональной культуре  $\Delta\Psi_m$  оценивали с помощью зонда TMRM. Несмотря на различие относительной величин  $\Delta\Psi_m$  между нейронами и астроцитами, механизм поддержания  $\Delta\Psi_m$  сходен для обоих типов клеток (Рисунок 2). Нейроны и астроциты идентифицировали по морфологическим признакам и максимальной величине флуоресценции, полученной при поуровневом сканировании на конфокальном микроскопе.

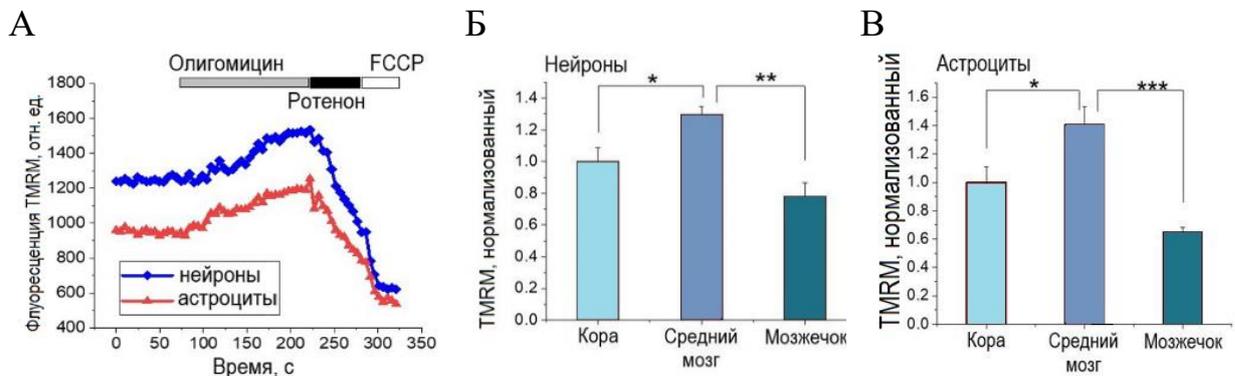


Рисунок 2 – А. График зависимости флуоресценции TMRM в ответ на внесение 2μg/мл олигомицина, 1μM ротенона и 1μM FCCP на нейроны среднего мозга и астроциты. Б, В. Разница в значениях ΔΨm для нейронов и астроцитов соответственно, полученных в первичных совместных культурах. Интенсивность флуоресценции TMRM в астроцитах и нейронах культуры отделов мозга нормировали относительно коры. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Так, внесение олигомицина – ингибитора F0-F1-АТФсинтазы, в смешанную культуру нейронов и астроцитов среднего мозга вызывало увеличение флуоресценции TMRM примерно на 20 % в обоих типах клеток. Данный клеточный ответ свидетельствует о том, что ΔΨm не поддерживается гидролизом АТФ в F0-F1-АТФазе (N = 4 экспериментов; Рисунок 2 А). Последующее применение ингибитора комплекса I ротенона приводило к глубокой деполяризации митохондрий при относительно небольшом ответе на внесение разобщителя (FCCP) (1 мкМ), что может свидетельствовать о поддержании ΔΨm электрон-транспортной цепью в нейронах и астроцитах (Рисунок 2 А).

Нейроны среднего мозга имели самую высокую относительную величину ΔΨm ( $124 \pm 8$  % от соответствующих значений нейронов коры, Рисунок 2 Б), тогда как первичные нейроны мозжечка – самый низкий ( $78 \pm 8$  % от значений нейронов коры; Рисунок 2 Б). Аналогичное различие между клетками из трех

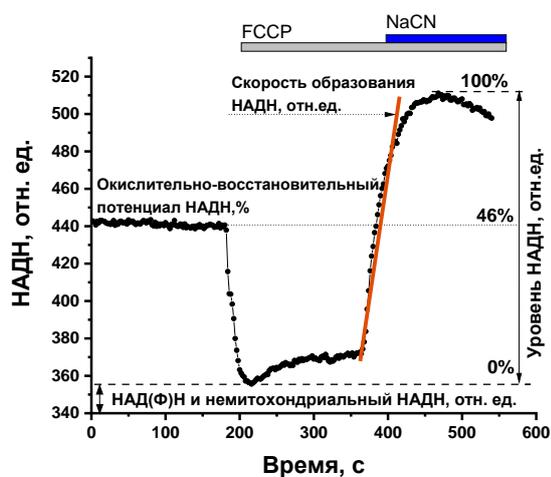


Рисунок 3 – Пример расчета относительных параметров NADH по его автофлуоресценции в срезах коры мозга крыс

областей мозга наблюдалось и для астроцитов (Рисунок 2 В). Таким образом, разница в относительной величине ΔΨm между астроцитами среднего мозга и коры была еще выше ( $141 \pm 10$  % в среднем мозге, Рисунок 2 А) и ниже в астроцитах мозжечка ( $62 \pm 6$  % от значений для астроцитов коры головного мозга, Рисунок 2 В).

Измерения автофлуоресценции NADH могут дать информацию об активности митохондриального дыхания клеток. Что бы отличить флуоресценцию митохондриального NADH от сигнала НАДФН и немитохондриального NADH, добавлением 1 мкМ FCCP (который

минимизирует уровень НАДН в митохондриях—0%) было максимально увеличено дыхание в срезах мозга с последующим ингибированием дыхания 1 мм NaCN, что блокирует потребление НАДН, что в результате максимально повышает относительный уровень НАДН в митохондриях (Рисунок 3). Разница между минимальным и максимальным значениями автофлуоресценции НАДН была принята за относительный митохондриальный уровень НАДН. Относительный уровень митохондриального НАДН в клетках среднего мозга был значительно выше по сравнению с корой, гиппокампом, мозжечком стволом мозга (Рисунок 4). Относительный уровень окислительно-восстановительного потенциала НАДН, отражающий баланс между производством и потреблением НАДН в митохондриях, имел наименьшее значение в срезах гиппокампа ( $41 \pm 3 \%$ , N = 5 крыс, n = 15 срезов) и мозжечка ( $38 \pm 3 \%$ , N = 5 крыс, n = 15 срезов). Возможно, это предполагает более высокую дыхательную активность в данных областях мозга. Самый высокий относительный уровень окислительно-восстановительного потенциала НАДН наблюдался в срезах среднего мозга ( $62 \pm 5 \%$ , N = 5 крыс, n = 15 срезов) и ствола мозга ( $58 \pm 5 \%$ , N = 5 крыс, n = 15 срезов). Скорость производства НАДН различалась в срезах из разных областей мозга.

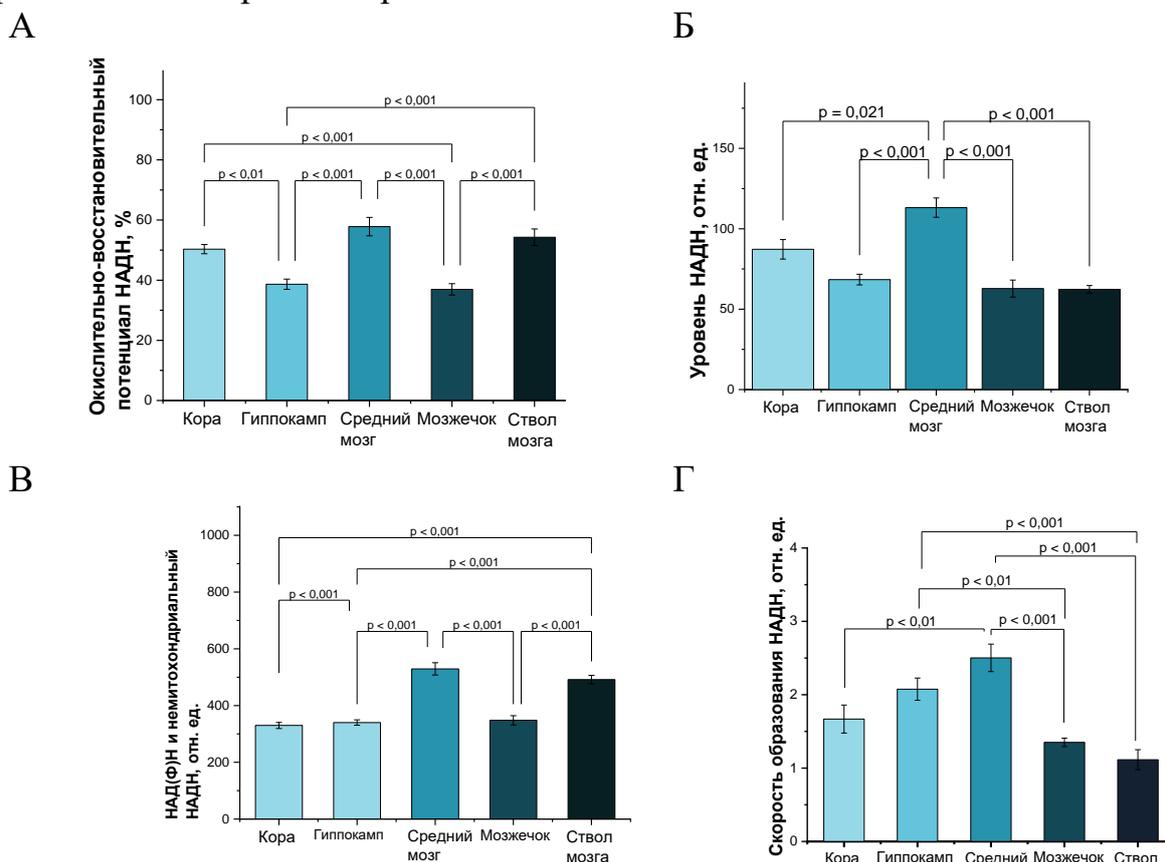


Рисунок 4 – Результаты статистической обработки энергетических параметров по автофлуоресценции НАДН: А. Относительная величина окислительно-восстановительного потенциала. Б. Относительный уровень НАДН. В. Относительная величина содержания НАД(Ф)Н и немитохондриального НАДН. Г. Относительная скорость образования НАДН в митохондриях срезов различных отделов головного мозга. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Самая высокая скорость продукции относительной величины НАДН наблюдалась в митохондриях клеток срезов среднего мозга, что также объясняет повышенный относительный уровень окислительно-восстановительного потенциала НАДН в клетках этой области. В то время как в стволе мозга данный эффект скорее объясняется снижением дыхательной активности (уровня НАДН). Интересно, что уровень НАД(Ф)Н и немитохондриального НАДН, также были самыми высокими в области среднего мозга и ствола мозга. Немитохондриальные уровни НАДН/НАД(Ф)Н в стволе мозга и мозжечке оказались выше по сравнению с кортикальными областями и областями гиппокампа.

Базовый уровень АТФ является важной характеристикой клеточного энергетического метаболизма, кроме того, он отражает баланс между производством и потреблением АТФ в данный момент в покоящихся клетках. Для определения скорости, с которой нейроны и астроциты первичной со-культуры из разных областей мозга потребляют АТФ, оценивали уровень свободного клеточного магния с помощью индикатора Mag-Fura-2 в присутствии ингибиторов продукции АТФ. Используемая комбинация ингибиторов ОФ (2 мкг/мл олигомицина) и гликолиза (20 мкМ йодоуксусной кислоты (ИУК)) блокировала основной источник продукции АТФ, и с этого момента клетки могли только потреблять АТФ, присутствующий в клетке. Это позволяет оценить уровень потребления АТФ независимо от его продукции. Несмотря на то, что нейроны считаются клетками, потребляющими больше энергии по сравнению с астроцитами, ингибирование синтеза АТФ привело к более быстрому истощению энергии и гибели астроцитов по сравнению с нейронами (Рисунок 5 А-Б). Скорость потребления АТФ была рассчитана, как скорость увеличения свободного магния при гидролизе АТФ после блокирования продукции АТФ олигомицином и ИУК. Истощение АТФ приводит к выключению активного ионного транспорта и лизису клеток, что обнаруживается по внезапному увеличению флуоресценции (Рисунок 5 А). Этот эффект наблюдался для со-культур коры, среднего мозга и мозжечка (Рисунок 5).

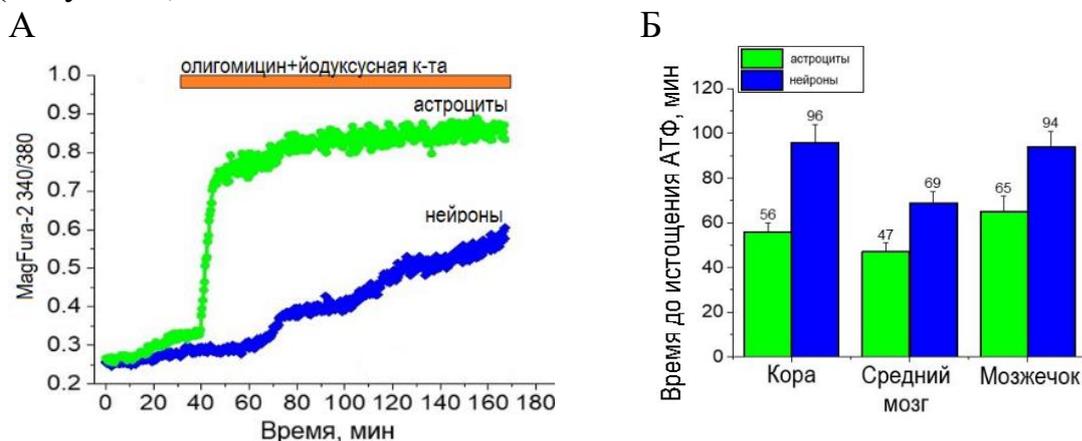


Рисунок 5 А. Графики потребления АТФ в первичной со-культуре мозжечка. Б. Время истощения АТФ после блокирования продукции АТФ в нейронах коры ( $N = 5$  препаратов клеточных культур) и астроцитах среднего мозга ( $N = 4$ ) и мозжечка ( $N = 4$  клеточных препарата). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Нейроны среднего мозга из первичных смешанных культур были наиболее уязвимы к ингибированию продукции АТФ и показали самое короткое время ( $69 \pm 5$  мин,  $N = 4$  эксперимента,  $n = 87$  клеток) до энергетического истощения по сравнению с нейронами коры ( $96 \pm 8$  мин,  $N = 5$  экспериментов,  $n = 103$  клетки) или мозжечка ( $94 \pm 7$  мин;  $N = 4$  эксперимента,  $n = 97$  клеток; Рисунок 5 Б). Базовый уровень АТФ оценивали в нейронах и астроцитах после трансфекции генетически кодируемым митохондриально-направленным зондом АТ1.03, созданным Imamura et al (Imamura et al. 2009). Различие относительного базового уровня АТФ наблюдали как между нейронами и астроцитами одного и того же отдела головного мозга, так и между разными отделами (Рисунок 6). Учитывая сходный уровень АТФ в астроцитах и нейронах, можно сделать предположение, что разница в относительной величине  $\Delta\Psi_m$  зависит от скорости метаболизма и механизма поддержания  $\Delta\Psi_m$ . Кроме того,  $\Delta\Psi_m$  важен для поглощения кальция митохондриями (Chen et al. 2020), а разница между нейронами и астроцитами может отражать высокую важность кальциевой буферизации в митохондриях для нейронов.

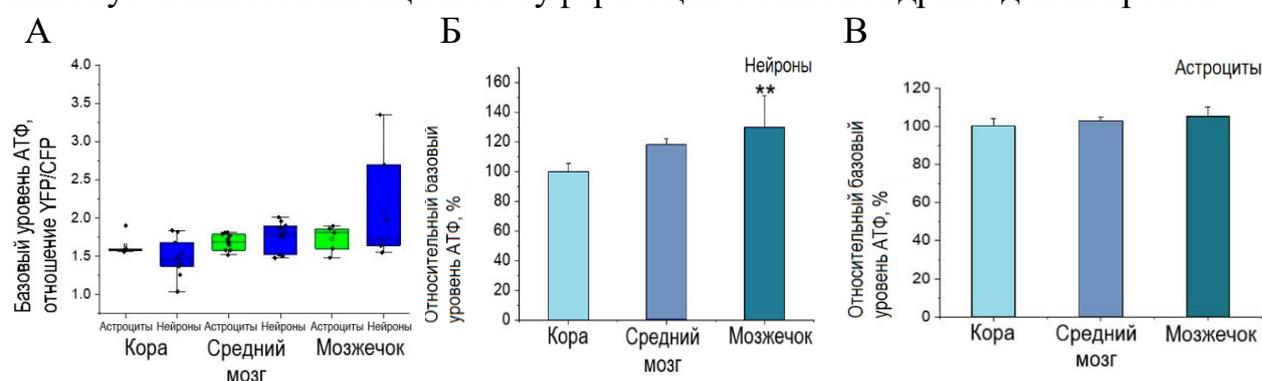


Рисунок 6 – А. Относительный уровень АТФ и скорость потребления АТФ в нейронах и астроцитах, выделенных из коры, среднего мозга и мозжечка. А-В. Относительный базовый уровень АТФ оценивали в нейронах и астроцитах после трансфекции генетически кодируемым митохондриально-направленным зондом АТ1.03 (за 100% принимался уровень интенсивности флуоресценции в срезах коры мозга)

Нейроны мозжечка в экспериментах имели самый высокий уровень АТФ (130 % нейронов коры,  $N = 4$ ,  $n = 87$  клеток); Рисунок 6 Б), а в нейронах среднего мозга он также был относительно высоким –  $118 \pm 4$  % от нейронов коры.

**2 Отличия продукции активных форм кислорода и основных антиоксидантов в разных отделах мозга.** Мозг потребляет около 20% всей глюкозы, кислорода и липидов, используемых организмом, поэтому мозг подвержен риску повышенного образования свободных радикалов, в том числе АФК (Angelova, Esteras, and Abramov 2021b). Защита от окислительного повреждения требует наличия эффективной антиоксидантной системы, для чего мозг расходует энергию из различных источников, в основном глюкозы, для поддержания окислительно-восстановительного баланса в нейронах и глии (Bolaños 2016; Rodriguez-Rodriguez et al. 2013; Vinokurov et al. 2021).

Относительную базовую скорость выработки АФК в переживающих срезах отделов мозга оценивали по увеличению флуоресценции окисленной формы флуоресцентного зонда Dihydroethidium (HEt) (Рисунок 7).

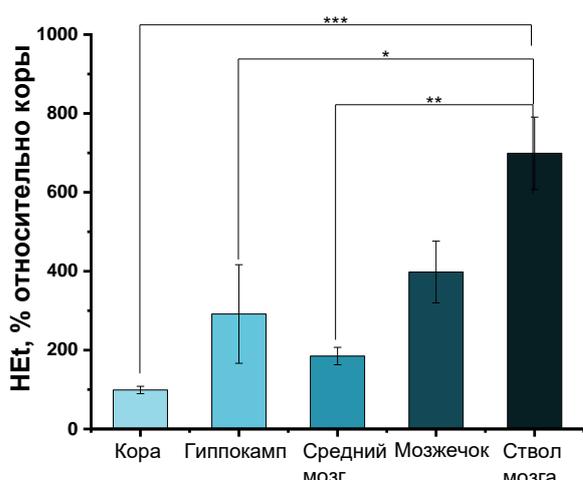


Рисунок 7 – Относительная скорость выработки АФК в переживающих срезах отделов мозга. Интенсивность флуоресценции *Net* в срезах отделов мозга нормировали относительно коры. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Самые низкие показатели наблюдались в коре (Рисунок 7), тогда как относительная величина скорости продукции АФК в соседних с гиппокампом областях была в 3 раза выше ( $291 \pm 124\%$  коры,  $N=3$  крысы,  $n=9$  срезов). Области ствола головного мозга имели самый высокий относительный уровень выработки АФК ( $699,2 \pm 91,6 \%$ ,  $n=9$  срезов), в 1,8 раза выше, чем показатели для мозжечка ( $398,0 \pm 78,3 \%$  коры,  $N = 3$  крысы,  $n = 9$  срезов) (Рисунок 7). Таким образом, базовый уровень продукции АФК, который должен соответствовать функциональной активности покоящихся клеток, существенно различается между областями мозга. Чтобы определить, как активация глиальных клеток и нейронов изменяет максимальную скорость продукции АФК, для стимуляции нейронов использовали 100 мкМ раствор АТФ (который активирует астроциты преимущественно через пуринаргические рецепторы) и нейротрансмиттер L-глутамат (20 мкМ) (Berezhnov et al. 2021) (Рисунок 8).

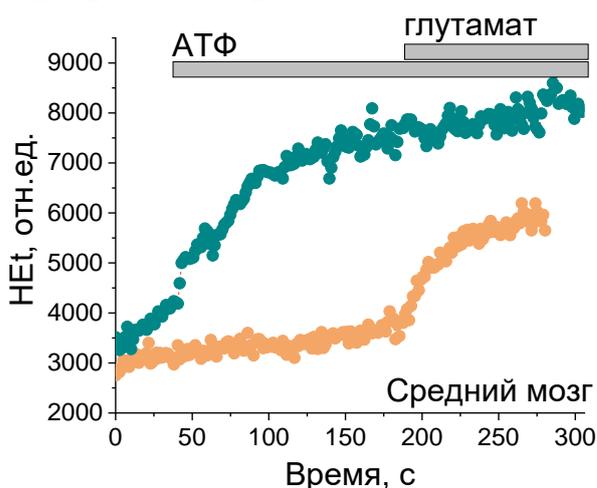


Рисунок 8 – Пример экспериментальных кривых роста флуоресценции *Net* в переживающих срезах отделов головного мозга с реакцией на 100 мкМ АТФ или 10 мкМ глутамата. Зеленая кривая отражает ответ области с преобладанием глиальных клеток, оранжевая – нейрональных

Для обоих нейротрансмиттеров сообщается о способности НАДФН-оксидазы активировать выработку АФК (Abramov and Duchen 2005; Brennan et al. 2009). Резкие различия в базовой скорости АФК, которые были обнаружены в отделах мозга, наблюдались только в клетках, которые реагировали на АТФ, но не в клетках с реакцией на глутамат (Рисунок 9). Внесение АТФ или

глутамата приводило к увеличению скорости роста интенсивности флуоресценции HET по сравнению с базовыми показателями в тех же регионах.

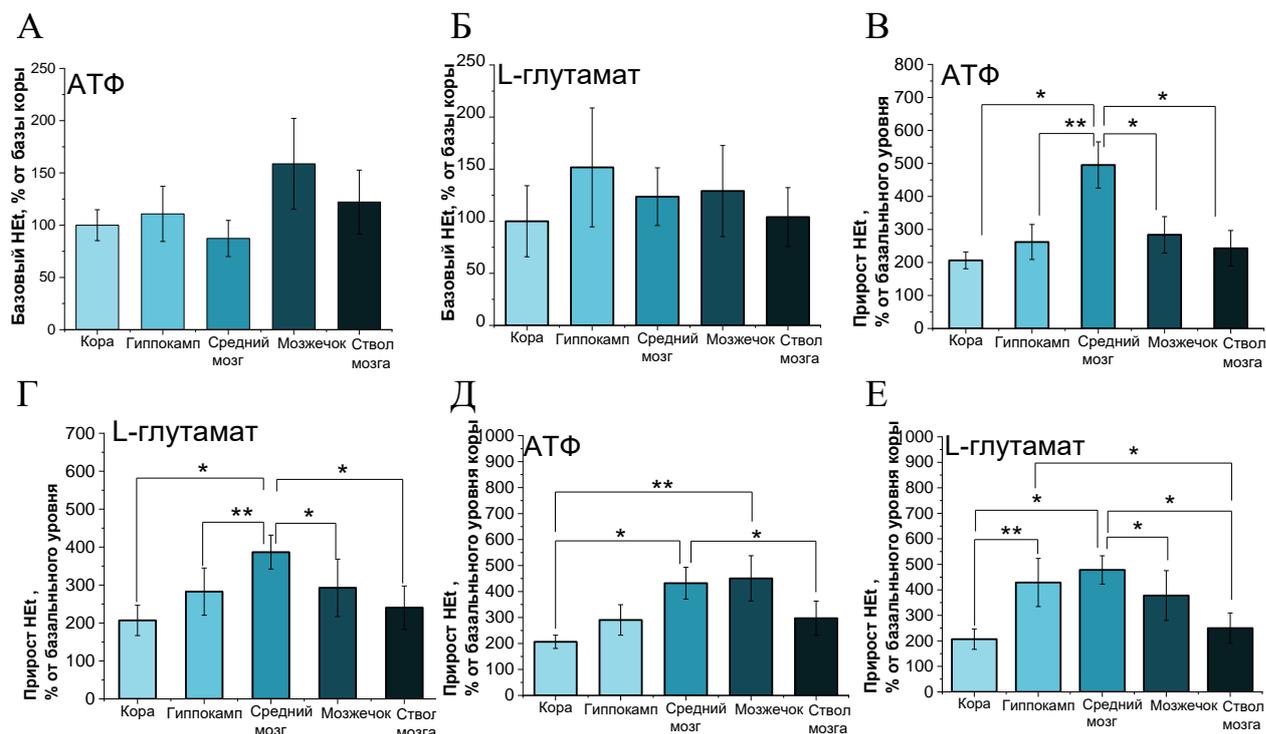


Рисунок 9 – Данные базовой скорости роста флуоресценции HET в ответ на добавление 100 мкМ АТФ (А) или 10 мкМ глутамата (Б); скорость роста флуоресценции HET после внесения 100 мкМ АТФ или 10 мкМ глутамата, нормализованная по относительной базовой скорости в этих областях (В-Г) или в процентах от значений коры головного мозга (Д-Е). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Данные, представленные на гистограммах (Рисунок 9 А-Б), помогают сравнить значения относительного увеличения производства АФК в данной конкретной области, но не позволяют сравнить активированное производство АФК между отделами. В связи с этим была выполнена нормализация данных к базовой скорости выработки АФК из коры головного мозга и обнаружено, что увеличение скорости флуоресценции в ответ на АТФ уменьшалось в последовательности «мозжечок – средний мозг – ствол головного мозга – гиппокамп – кора» (соответственно  $450,5 \pm 87,5$  %;  $432,2 \pm 61,1$  %,  $297,2 \pm 65,9$  %,  $290,5 \pm 58,7$  %,  $206,4 \pm 25,4$  %,  $N = 4$  крысы,  $n = 8$  срезов) (Рисунок 9 Д), а в ответ на глутамат уменьшение наблюдалось в последовательности «средний мозг – гиппокамп – мозжечок – ствол головного мозга – кора» соответственно  $478,1 \pm 55,6$  %,  $428,8 \pm 94,3$  %,  $377,7 \pm 97,6$  %,  $250,1 \pm 59,4$  %,  $206,8 \pm 39,9$  %,  $N = 4$  крысы,  $n = 8$  срезов) (Рисунок 9 Е).

Таким образом, более высокие уровни продукции АФК в стволе головного мозга и мозжечке могут объясняться активированными глиальными клетками этих областей. Однако максимальная стимуляция выработки АФК в ответ на АТФ или глутамат наблюдалась в среднем мозге, что свидетельствует

о более высокой важности окислительно-восстановительной сигнализации в этой области мозга.

Митохондрии являются одним из основных источников продукции АФК клетками в условиях покоя. Уровень продукции АФК в цепи переноса электронов митохондрий зависит от состояния метаболизма и ряда других факторов, включая уровень кислорода, кальция, присутствия токсинов и т.д. (Angelova and Abramov 2016). Для оценки продукции митохондриальных АФК в переживающих срезах головного мозга был использован флуоресцентный зонд MitoTracker Red (Рисунок 10).

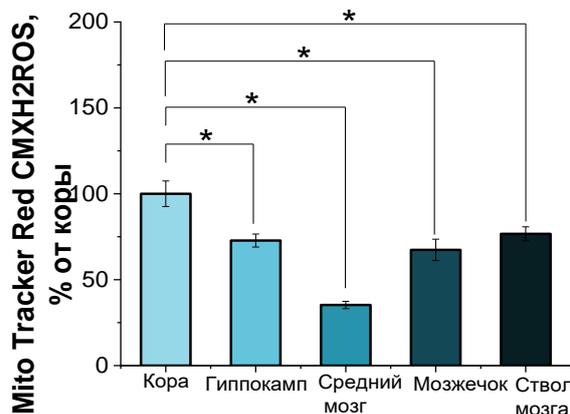


Рисунок 10 – Статистический анализ относительного уровня выработки АФК в митохондриях клеток переживающих срезов отделов головного мозга. Скорость роста интенсивности флуоресценции зонда MitoTracker Red в срезах отделов мозга (за 100% принят уровень интенсивности флуоресценции в срезах коры мозга). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

В результате исследований обнаружено, что относительная скорость выработки АФК в матрице митохондрий была самой высокой в коре (принято за 100 %; Рисунок 10). Продукция АФК митохондриями в гиппокампе, мозжечке и стволе головного мозга была значительно ниже ( $72,8 \pm 3,8$  %,  $67,3 \pm 6,2$  %,  $76,7 \pm 4,1$  % от значений коры соответственно,  $N = 5$  крыс,  $n = 10$  срезов). Самая низкая относительная величина продукции митохондриальных АФК была выявлена в среднем мозге ( $35,3 \pm 2,1$  % от уровня коры головного мозга,  $N = 5$  крыс,  $n = 10$  срезов). Митохондрии в клетках переживающих срезов коры головного мозга обладали самым низким относительным уровнем  $\Delta\Psi_m$  по сравнению с другими областями мозга, а клетки среднего мозга обладали самой высокой метаболической активностью. Полученные результаты показывают, что митохондриальные АФК оказывают лишь незначительное влияние на выработку АФК в нейронах и астроцитах *ex vivo*.

Сравнение скорости ПОЛ в переживающих срезах разных отделов головного мозга может дать понимание процессов селективного поражения регионов мозга при нейродегенеративных заболеваниях. Исследования проводились с помощью двух волнового флуоресцентного зонда C11 BODIPY 581/591 (Рисунок 11).

А

Б

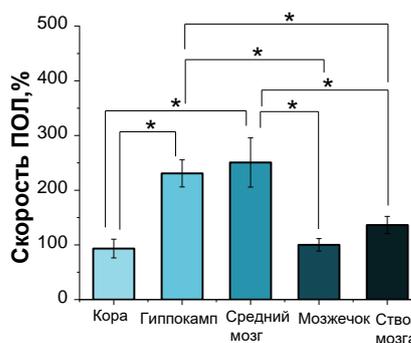
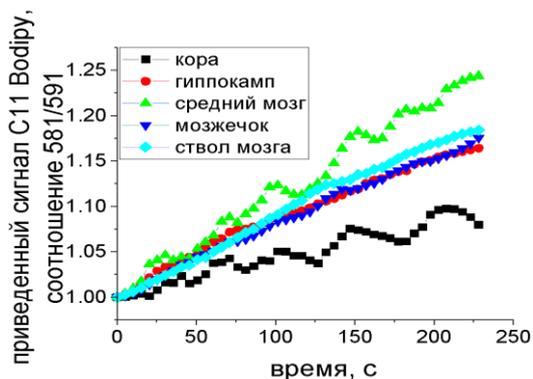


Рисунок 11 – Скорость перекисного окисления липидов в переживающих срезах из разных отделов мозга. А. Типичные кривые флуоресценции C-11 BODIPY (соотношение 560 нм/488 нм) в переживающих срезах областей головного мозга. Б. Количественная оценка скорости флуоресценции C-11 BODIPY (соотношение 560 нм/488 нм) в переживающих срезах отделов мозга. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Скорость ПОЛ была наиболее выражена в среднем мозге и гиппокампе ( $250,7 \pm 45,0$  % и  $230,8 \pm 24,7$  % от уровня срезов коры соответственно,  $N=4$  крысы,  $n = 6$  срезов; Рисунок 11). Более низкие и примерно равные значения были получены для мозжечка и ствола головного мозга ( $100,1 \pm 11,4$  % и  $136,4 \pm 15,8$  % от уровня коры,  $N=4$ ,  $n = 6$  срезов). Интересно, что самый высокий относительный уровень ПОЛ в среднем мозге не был сопоставим с относительно низкой базовой скоростью выработки АФК в этой области мозга (Рисунок 8 и 10). Однако клетки из этой области имели самую высокую относительную величину продукции АФК в ответ на стимул (Рисунок 9) и самую высокую скорость метаболизма митохондрий по сравнению с другими областями мозга.

Поддержание уровня глутатиона (GSH), основного эндогенного антиоксиданта в головном мозге, зависит от множества ферментов и взаимодействия нейронов с глией (Dringen and Hirrlinger 2003). С целью сравнительного анализа проведена оценка относительного уровня эндогенного глутатиона в переживающих срезах тканей разных отделов мозга крыс (Рисунок 12).

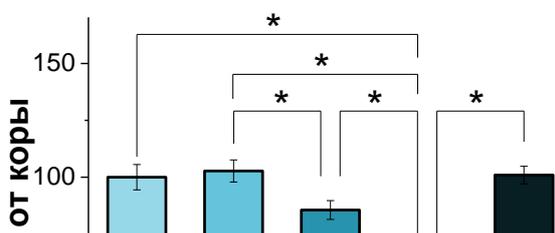


Рисунок 12 – Относительный уровень восстановленного глутатиона в различных отделах головного мозга. Интенсивность флуоресценции MCB в переживающих срезах отделов мозга нормировали относительно коры \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Уровень восстановленного GSH в переживающих срезах отделов мозга был измерен по различия интенсивности флуоресценции флуоресцентного зонда Monochlorobimane (MCB). Исследования показали отсутствие различий в относительных величинах GSH между гиппокампом, стволом головного мозга и корой головного мозга ( $102,7 \pm 4,8$  % и  $100,9 \pm 3,9$  % от значений коры соответственно;  $N = 3$  крысы,  $n = 12$  срезов) (Рисунок 12), в то время как средний мозг и мозжечок имели значительно более низкие

относительные величины GSH ( $85,6 \pm 4,1 \%$  и  $56,4 \pm 1,3 \%$  соответственно от уровня коры головного мозга,  $N = 3$  крысы,  $n = 12$  срезов).

**3 Запуск открытия митохондриальной поры.** Высокий уровень цитозольного кальция клеток снижается за счет аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  через митохондриальный кальциевый унипортер в матрикс митохондрий по электрохимическому градиенту, благодаря митохондриальному мембранному потенциалу (Abeti and Abramov 2015). Гипернакопление кальция может приводить к открытию высоко проницаемой митохондриальной поры, падению мембранного потенциала, активации каскада каспаз и запуску апоптоза (Vaseva et al. 2012; Zamzami et al. 1996).

Дозозависимое титрование кальциевым ионофором-феррутинином различных типов клеток, таких как фибробласты и нейроглиальные клетки, определило порог кальциевой чувствительности к индукции апоптоза через открытие mPTP. Было обнаружено, что для индукции апоптоза в фибробластах необходим наименьший процент митохондрий с открытыми mPTP в сравнении с нейроглиальными клетками мозга крыс. (Рисунок 13).

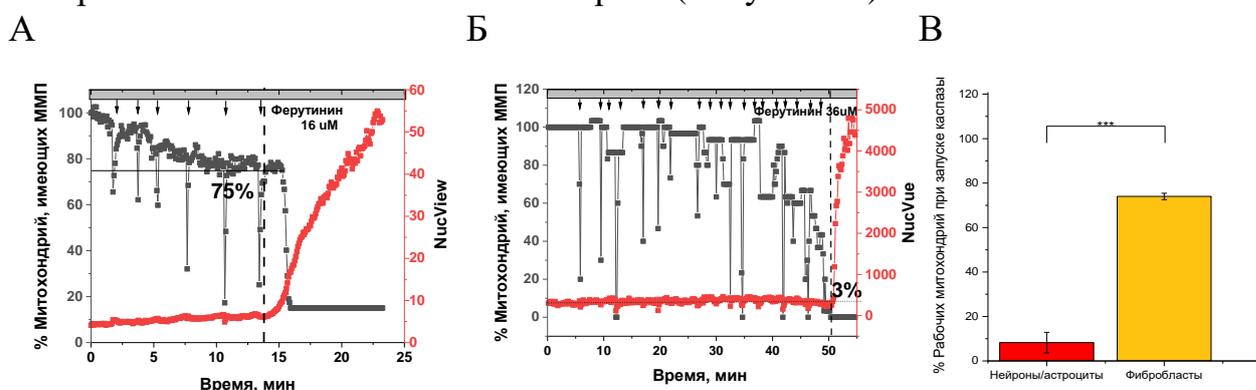


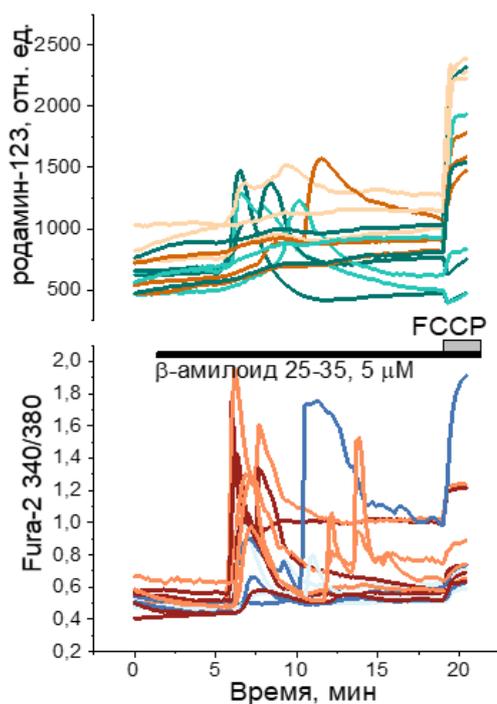
Рисунок 13 - Открытия поры перехода проницаемости митохондрий с дальнейшим запуском апоптоза А. Открытие митохондриальной поры в клетках фибробластов дозозависимым титрованием феррутинином. Б. Открытие митохондриальной поры перехода проницаемости в первичных нейроглиальных клетках дозозависимым титрованием феррутинином. В. Статистический анализ различий количества недеполяризованных митохондрий на момент запуска апоптоза в первичной нейроглиальной культуре и культуре фибробластов.  $p < 0,05$ ;  $** p < 0,01$ ;  $*** p < 0,001$

Феррутинин-индуцированное увеличение концентрации кальция в цитозоле митохондрий приводило к снижению интенсивности флуоресценции потенциал-зависимого зонда TMRM, что может свидетельствовать о деполяризации митохондриальной мембраны и открытию mPTP (Рисунок 13). При подсчете количества митохондрий выявлено, что для запуска апоптоза у нейроглиальных клеток требуется деполяризация большего числа митохондрий ( $91,75 \pm 4,6$ ), чем у клеток фибробластов ( $26 \pm 1,4$ ). Было предположено, что сохранение относительной критической доли митохондрий (около 9% для нейроглиальных клеток и около 74% для клеток фибробластов) может снизить клеточную гибель при нейродегенеративных процессах.

**4 Фармакологическое ограничение митохондриального поглощения кальция как защита от  $\beta$ -амилоидной нейротоксичности.** Применение полного пептида  $\beta\text{A}$  1-42 (1 мкМ) или короткого пептида  $\beta\text{A}$  25-35 (5 мкМ)

через 5-10 мин вызывало типичный для этих пептидов кальциевый сигнал (*Abramov et al.* 2011, 2004) (Рисунок 30 А). В соответствии с ранее опубликованными данными (*Abramov et al.* 2004), одновременные измерения интенсивности флуоресценции двух волнового кальциевого зонда Fura-2 и потенциал-зависимого зонда родамина 123, показали глубокую и изменчивую по форме сигнала  $\beta$ A-индуцированная потеря относительной величины  $\Delta\Psi_m$  в астроцитах (Рисунок 14 А).

А



Б

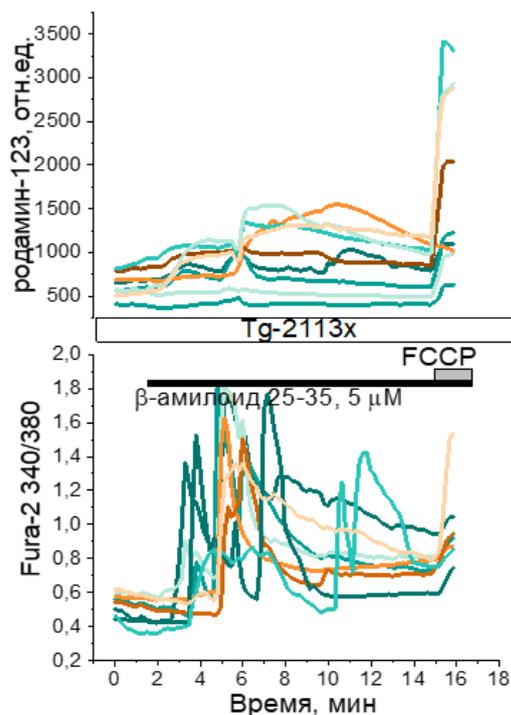


Рисунок 14 – Влияние ТГ-2113х на  $\beta$ A-индуцированный кальциевый сигнал и относительную величину  $\Delta\Psi_m$ . А. График изменения относительной величины  $\Delta\Psi_m$  и кальциевого ответа на внесение  $\beta$ -амилоида 25-35. Б. График изменения относительной величины  $\Delta\Psi$  и кальциевого ответа на внесение  $\beta$ -амилоида 25-35 после предварительной инкубации с ТГ-2113х

Предварительная инкубация первичной со-культуры нейронов и астроцитов в течение 10 мин перед экспериментом с 0,5 мкМ ТГ-2113х ( $N = 7$  экспериментов) или 0,5 мкМ ТГ-2112х ( $N = 6$  экспериментов) не изменила эффект  $\beta$ A 25-35 или  $\beta$ A 1-42 на повышение  $[Ca^{2+}]_c$  в астроцитах (Рисунок 14 Б).

Применение 1 мкМ  $\beta$ A 1-42 или 5 мкМ  $\beta$ A 25-35 в смешанной культуре нейронов коры и астроцитов вызывало изменения  $[Ca^{2+}]_c$  астроцитов ( $n = 88$  астроцитов для  $\beta$ A 1-42;  $n = 96$  астроцитов для  $\beta$ A 25-35; Рисунок 15 А, Б, Д).

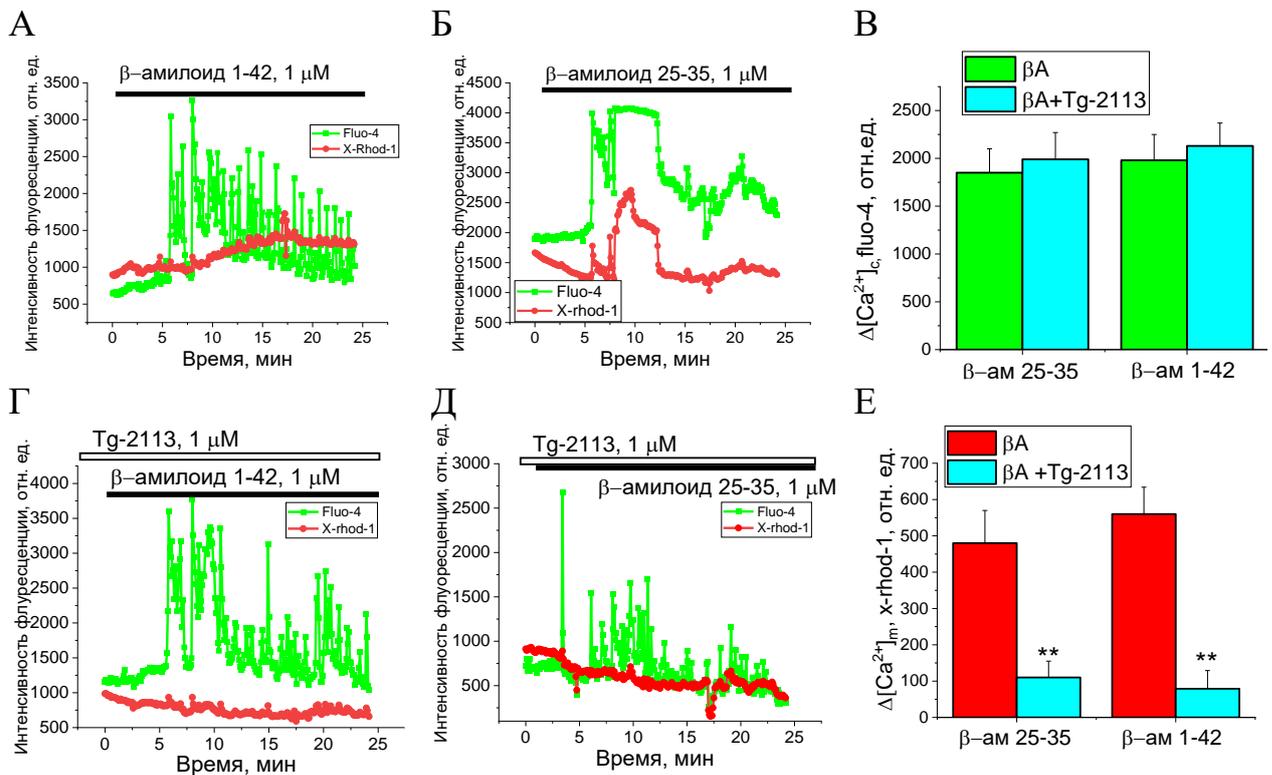


Рисунок 15 – Влияние ТГ-2113х на  $\beta$ A-индуцированное поглощение кальция митохондриями. А. Примеры кальциевого ответа в ответ на применение  $\beta$ A 1-42. Б. Примеры кальциевого ответа в ответ на добавку  $\beta$ A 25-35. В, Е. Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого сигнала на внесение  $\beta$ A 1-42 и  $\beta$ A 25-35 в присутствии ТГ-2113х и без него. Г-Д. Примеры кальциевого ответа после внесения  $\beta$ A 1-42 и  $\beta$ A 25-35 соответственно.  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Предварительная инкубация клеток с 0,5 мкМ ТГ-2113х не изменила амплитуду  $\beta$ A 1-42 или  $\beta$ A 25-35-индуцированного кальциевого сигнала в астроцитах (Рисунок 15 В). Однако  $\beta$ A-индуцированный кальциевый сигнал активировал митохондриальное поглощение кальция (Рисунок 15), которое ингибировалось инкубацией клеток с 0,5 мкМ ТГ-2113х (Рисунок 15 В, Г, Е). Таким образом, ТГ-2113х ингибирует митохондриальное поглощение кальция в астроцитах, что защищает клетки от  $\beta$ A-индуцированной митохондриальной деполяризации.

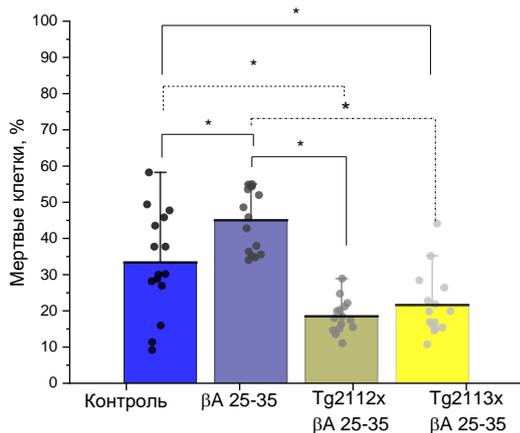


Рисунок 16 – Влияние Тg2113х и Тg2112х на индуцированную  $\beta$ A 25-35 клеточную смерть нейронов и астроцитов

активировал митохондриальное поглощение кальция (Рисунок 15), которое ингибировалось инкубацией клеток с 0,5 мкМ ТГ-2113х (Рисунок 15 В, Г, Е). Таким образом, ТГ-2113х ингибирует митохондриальное поглощение кальция в астроцитах, что защищает клетки от  $\beta$ A-индуцированной митохондриальной деполяризации.

24-часовая инкубация нейронов и астроцитов смешанной культуры коры с 5 мкМ  $\beta$ A 25-35 вызвала значительное увеличение числа погибших клеток (с  $20 \pm 6$  % в контроле,  $N=5$  экспериментов,  $n=600$  клеток; до  $45 \pm 8$  %,  $N = 5$ ;  $p < 0,005$ ; Рисунок 16).

Инкубация клеток с 0,5 мкМ ТГ-2112х или 0,5 мкМ ТГ-2113х эффективно подавляла  $\beta$ A-нейротоксичность. Так, ТГ-2113х снижал количество погибших клеток до  $18 \pm 3$  %,  $N = 5$ , ТГ-2113х – до

21±4 %, N = 5 (Рисунок 34). Таким образом, ТГ-2113х и ТГ-2112х защищают клетки от βА-индуцированной митохондриальной кальциевой перегрузки и митохондриальной деполяризации, что приводит к нейропротекции.

21±4 %, N = 5 (Рисунок 16). Таким образом, ТГ-2113х и ТГ-2112х защищают клетки от βА-индуцированной митохондриальной кальциевой перегрузки и митохондриальной деполяризации, что приводит к нейропротекции.

**5 Влияние лазерного излучения 1267 нм на первичные клетки нейронов и астроцитов в токсической модели болезни Альцгеймера.** Воздействие на нейроны и астроциты лазерным излучением на длине волны 1267 нм вызывает продукцию синглетного кислорода. Низкие дозы синглетного кислорода способны значительно улучшить эффективность митохондриальной биоэнергетики (*Sergei G Sokolovski et al. 2021*). Кроме этого данное воздействие может препятствовать самосборке мономеров β-амилоида, что приводит к снижению склонности к агрегации и связанной с этим нейротоксичности (*Du et al. 2021; Zakharov and Ivanov 1999*). Данный эффект может быть использован для создания перспективного метода коррекции патологического состояния митохондрий, наблюдаемого при нейродегенеративных заболеваниях в условиях амилоидной нейротоксичности.

Для выбора необходимой дозы лазерного излучения проводилась сравнительная оценка клеточной смерти в контрольной группе до и через 24 часа после воздействия лазера с длиной волны 1267 нм в группах, облученных одной мощностью 250 мВт и разных дозах (100 Дж/см<sup>2</sup>, 180 Дж/см<sup>2</sup> и 300 Дж/см<sup>2</sup>). При радиусе светового потока 0,17 см, плотность светового потока составила 2750 мВт/см<sup>2</sup>.

На рисунке 17 приведены результаты оценки влияния лазерного облучения на уровень клеточной смерти в смешанной культуре нейронов и астроцитов (N=6, n=600 клеток) без дополнительного воздействия и в присутствии фрагмента β-амилоида.

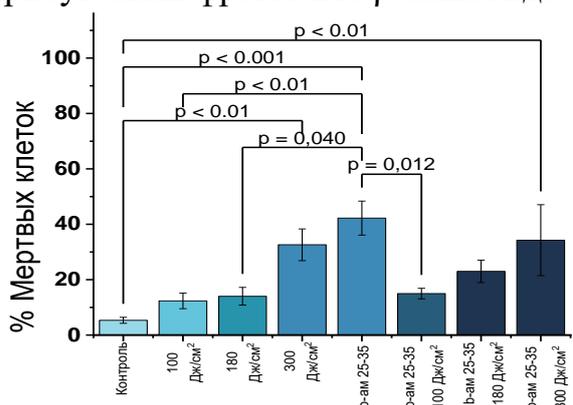


Рисунок 17 – Уровень клеточной смерти в со-культуре нейронов и астроцитов после воздействия лазерным излучением с разной дозой без дополнительного воздействия и в присутствии токсичных фрагментов 25-35 β-амилоида.  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

В результате исследования наблюдали повышение выживаемости клеток нейронов и астроцитов в присутствии токсичного фрагмента 25-35 β-амилоида при дозе излучения 100 Дж/см<sup>2</sup> более чем в два раза по сравнению с контролем без облучения, что может свидетельствовать о потенциальной возможности применения данного метода для достижения нейропротекторного эффекта.

Была проведена оценка воздействия лазерного излучения с дозой излучения 100 Дж/см<sup>2</sup> на сигналы Ca<sup>2+</sup> в клеточной культуре, вызванные внесением β-амилоида (N=4 эксперимента, n=80 клеток)(рисунки 18-19).

Поиск новых методов защиты нейронов при нейродегенеративных заболеваниях является одним из актуальных направлений в медицине. Воздействие на нейроны и астроциты лазерным излучением на длине волны 1267 нм вызывает продукцию синглетного кислорода и значительно улучшает эффективность митохондриальной биоэнергетики (Zakharov and Ivanov 1999).

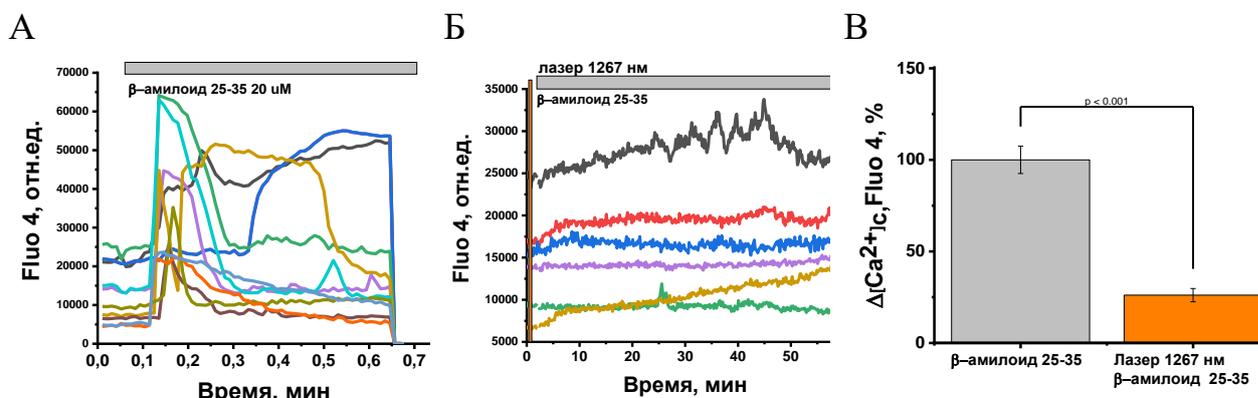


Рисунок 18 – Влияние лазерного излучения с длиной волны 1267 нм на  $\beta$ A-индуцированный кальциевый сигнал. А. Примеры кальциевого сигнала в ответ на добавку  $\beta$ A 25-35. Б. Кальциевый сигнал в ответ на применение  $\beta$ A 25-35 после предварительной обработки первичной нейроглиальной культуры лазером 1267 нм (100 Дж/см<sup>2</sup>). В. Анализ лазерного воздействия с длиной волны 1267 нм на  $\beta$ A-индуцированный кальциевый сигнал. Данные амплитуды кальциевого сигнала в ответ на  $\beta$ A 25-35 приняты за 100 %.  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

На рисунке 19 представлено снижение амплитуды сигнала кальциевого ответа в результате предварительной обработки нейроглиальной со-культуры (100 Дж/см<sup>2</sup>). Для оценки влияния лазерного излучения с длиной волны 1267 нм на регуляцию кальциевых сигналов были произведены косвенные сравнения относительной величины содержания митохондриального Ca<sup>2+</sup> по отличиям интенсивности флуоресценции зонда X-Rhod 1 (Рисунок 19).

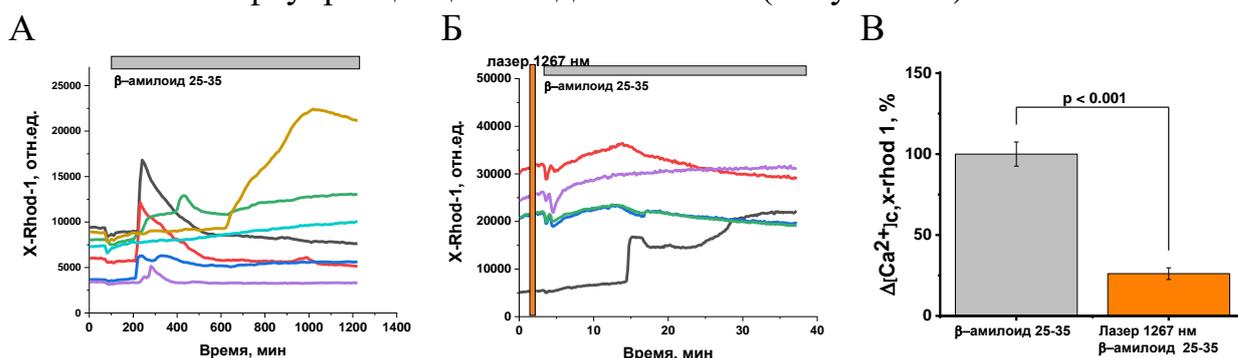


Рисунок 19 – Влияние лазерного воздействия с длиной волны 1267 нм на  $\beta$ A-индуцированное поглощение кальция митохондриями. А. Накопление кальция митохондриями в ответ на внесение токсичного фрагмента  $\beta$ -амилоида 25-35. Б. Накопление Ca<sup>2+</sup> митохондриями после обработки клеточной культуры лазером 1267 нм (100 Дж/см<sup>2</sup>) с дальнейшим внесением  $\beta$ -амилоида. В. Анализ лазерного воздействия с длиной волны 1267 нм на  $\beta$ A-индуцированное накопление Ca<sup>2+</sup> митохондриями. Данные амплитуды поглощения Ca<sup>2+</sup>

митохондриями в ответ на  $\beta$ A 25-35 приняты за 100 %.  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

$\beta$ A-индуцированный кальциевый сигнал активировал поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями (Рисунок 19 А), которое снижалось предварительной обработкой лазерным излучением с длиной волны 1267 нм ( $100 \text{ Дж/см}^2$ ) (Рисунок 19 Б, 28 Б). Таким образом, облучение лазером с длиной волны 1267 нм дозой излучения  $100 \text{ Дж/см}^2$  защищает клетки от  $\beta$ A-индуцированной кальциевой перегрузки.

$\beta$ A-индуцированная деполяризация митохондрий зависит от избыточного производства АФК при недостатке эндогенного антиоксиданта и митохондриального поглощения кальция. С этой целью была проведена оценка относительного уровня содержания эндогенного глутатиона в нейроглиальных клетках до и после воздействия лазерным излучением по различиям интенсивности флуоресценции зонда МСВ (Рисунок 20).

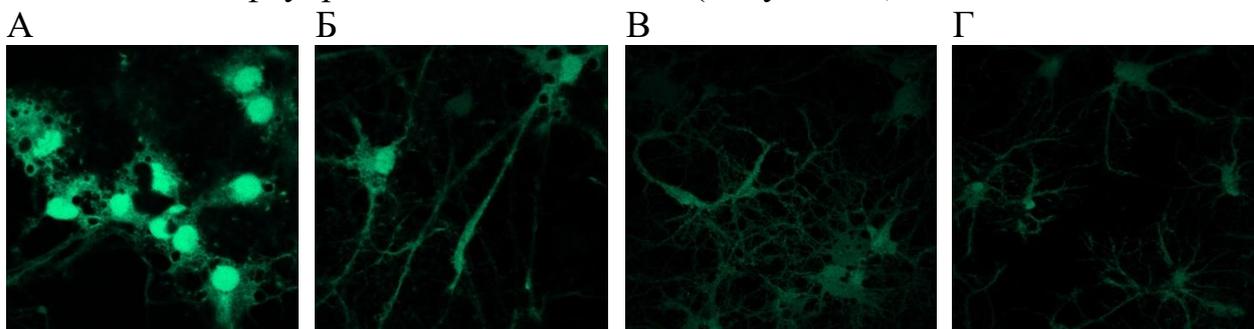


Рисунок 20 – Примеры конфокальных изображений флуоресценции МСВ в нейроглиальной со-культуре. А. Контрольные клетки. Б. Нейроглиальные клетки, инкубированные с  $\beta$ -амилоидом 25-35. В. Нейроглиальные клетки, инкубированные с  $\beta$ -амилоидом 25-35 и предварительно обработанные лазером 1267 нм ( $100 \text{ Дж/см}^2$ ). Г. Клетки, обработанные лазером 1267 нм ( $100 \text{ Дж/см}^2$ )

При проведении статистической обработки было выявлено, что воздействие лазерным излучением снижало относительную величину восстановленного глутатиона в сравнении с контролем и клетками с коротким фрагментом  $\beta$ -амилоида 25-35 ( $p \leq 0,001$ ) (N=6 эксперимента, n=236) (Рисунок 20).

Снижение уровня глутатиона на 50% от после лазерного воздействия с длиной волны 1267 нм ( $100 \text{ Дж/см}^2$ ) связано с выработкой синглетного кислорода (Рисунок 20).

Кратковременное лазерное облучение с длиной волны 1267 нм способствует снижению токсического эффекта  $\beta$ -амилоида на первичную со-культуру, что в свою очередь уменьшает кальциевую нагрузку митохондрий и снижает клеточную смерть (Рисунок 17).

Данное воздействие не было связано с изменением относительной величины митохондриального мембранного потенциала и активацией антиоксидантной системы клеток, что может свидетельствовать о воздействии на структуру агрегатов  $\beta$ -амилоида 25-35. В ходе исследования была выявлена способность кратковременного лазерного облучения предотвращать перегрузку митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$  в условиях  $\beta$ -амилоидной токсичности. Данный эффект вызывает интерес и требует дополнительных исследований для

понимания механизмов, протекающих внутри клетки в ответ на воздействие лазерного излучения 1267 нм.

## ВЫВОДЫ

Флуоресцентная микроскопия — современный инструмент в биологических исследованиях, обеспечивающий специфичность зондирования во время экспериментов на живых клетках при относительно минимальном воздействии на биологические образцы по сравнению со многими конкурирующими биофизическими методами. Однако данный метод позволяет получить относительные величины исследуемых параметров.

1. Обнаружено, что полученные данные на переживающих срезах и первичных со-культурах нейронов и астроцитов среднего мозга, гиппокампа, мозжечка, коры и ствола мозга показывают, что относительная величина  $\Delta\Psi_m$  в нейронах был значительно выше, чем в астроцитах. Уровень митохондриального НАДН в клетках среднего мозга был значительно выше по сравнению с относительной величиной митохондриального НАДН в клетках коры, гиппокампа, ствола мозга и срезов мозжечка мозга крыс. Выявлена самая высокая относительная величина скорости продукции НАДН в митохондриях клеток переживающих срезов среднего мозга, что также объясняет повышенную относительную величину окислительно-восстановительного потенциала НАДН в клетках этой области.

2. Обнаружено, что нейроны среднего мозга потребляют АТФ гораздо быстрее, чем нейроны коры и мозжечка. При этом астроциты из разных областей мозга быстрее потребляли АТФ, несмотря на схожий базовый уровень АТФ. Относительная величина НАДН в клетках первичной со-культуры среднего мозга, а также относительная величина скорости продукции НАДН были повышены и, возможно, связаны с такой же или более высокой скоростью митохондриального метаболизма.

3. Обнаружено, что относительная величина скорости продукции активных форм кислорода была наиболее высокой в стволе головного мозга и мозжечке, что главным образом связывается с активностью глиальных клеток. Активация нейронов и глии нейроглиотрансмитерами в данных отделах мозга приводит к максимальной скорости продукции АФК в сравнении с остальными отделами. Различия в скорости производства АФК, которые были обнаружены в отделах мозга, наблюдались только в астроцитах (подтверждено ответом на АТФ), но не в нейронах (подтверждено ответом на глутамат). При этом продукция АФК в митохондриях имеет лишь незначительный вклад в общее производство АФК. скорость перекисного окисления липидов выше в среднем мозге и гиппокампе, в то время как относительная величина восстановленного глутатиона одинаков в большинстве областей мозга, с самым низким уровнем ПОЛ в среднем мозге.

4. Получены данные, определяющие порог кальциевой чувствительности к индукции апоптоза через открытие mPTP. Было обнаружено, что для индукции апоптоза в фибробластах необходим наименьший процент митохондрий с открытыми mPTP в сравнении с нейроглиальными клетками мозга крыс.

5. Соединения ТГ-2112х и ТГ-2113х ограничивают, но не блокируют полностью поглощение кальция митохондриями и защищают нейроны от  $\beta$ -амилоидной гибели в первичных нейрональных со-культурах.

6. Выработка синглетного кислорода при облучении лазером с длиной волны 1267 нм снижает нейротоксичность и уменьшает процент гибели нейронов. Снижение уровня глутатиона на 50% от после лазерного воздействия с длиной волны 1267 нм (100 Дж/см<sup>2</sup>) связано с выработкой синглетного кислорода.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. Shevtsova, E.F. Pharmacological sequestration of mitochondrial calcium uptake protects against dementia and  $\beta$ -amyloid neurotoxicity [Text] / E.F. Shevtsova, P.R. Angelova, **O.A. Stelmashchuk**, N. Esteras, Vasil'eva N.A, Maltsev A.V., Shevtsov P.N., Shaposhnikov A.V., Fisenko V.P., S.O. Bachurin, A.Y. Abramov // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12(1) – 1-17.

2. Cheng X. Variability of mitochondrial energy balance across brain regions [Text] / X. Cheng, A. Vinokurov, E. Zherebtsov, **O. Stelmashchuk**, P. Angelova, N. Esteras, A. Abramov // Journal of Neurochemistry– 2022. – Vol. 157. – №. 4. – С. 1234-1243.

3. Vinokurov A. Y. Brain region specificity in reactive oxygen species production and maintenance of redox balance [Text] / A. Y. Vinokurov, **O. A. Stelmashchuk**, P. A. Ukolova, E. A. Zherebtsov, A. Y. Abramov // Free Radical Biology and Medicine – 2021. – Vol.174 – 195-201.

4. Komilova, N. R. Metabolically induced intracellular pH changes activate mitophagy, autophagy, and cell protection in familial forms of Parkinson's disease [Text] / N. R. Komilova, P. R. Angelova, A. V. Berezhnov, **O. A. Stelmashchuk**, U. Z. Mirkhodjaev, H. Houlden, A.V. Gourine, N. Esteras, A. Y. Abramov // The FEBS Journal – 2021. – Vol. 289(3) – 699-711.

5. Piavchenko G. complex morphofunctional approach for zinc toxicity evaluation in rats [Text] / Piavchenko G., Alekseev A., **Stelmashchuk O.**, Seryogina E., Zherebtsov E., Kuznetsova E., Dunaev A., Volkov Yu., Kuznetsov S. // Heliyon – 2020. – Vol. 6(4).

6. Vinokurov A. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential and NADH Redox State in Acute Brain Slices [Text] / A. Vinokurov, V. Dremin, G. Piavchenko, **O. Stelmashchuk**, P. Angelova, A. Abramov // Mitochondrial Medicine. Volume 2: Assessing Mitochondria. – 2021. – 193-202.

7. **Stelmashchuk O.** Noninvasive control of the transport function of fluorescent coloured liposomal nanoparticles [Text] / O Stelmashchuk, E Zherebtsov, A Zherebtsova, E Kuznetsova, A Vinokurov, A Dunaev, A Mamoshin, I Snimshchikova, A Borsukov, A Bykov // Laser Physics Letters. – 2017. – Т. 14. – №. 6. – С. 065603.

8. Tarakanchikova Y. Allocation of rhodamine-loaded nanocapsules from blood circulatory system to adjacent tissues assessed in vivo by fluorescence spectroscopy [Text] / Y. Tarakanchikova, **O. Stelmashchuk**, E. Seryogina, G.

Piavchenko, E. Zherebtsov, A. Dunaev, A. Popov, I. Meglinski // Laser Physics Letters. – 2018. – Т. 15. – №. 10. – С. 105601.

9. Долгих А.И. Регистрация параметров времени жизни флуоресценции для оценки патологического состояния клеток при нейродегенеративных заболеваниях [Текст] / А. И. Долгих, **О. А. Стельмашук**, Е. А. Жеребцов // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии – 2022. – № 3(353) – 127-134.

10. Стельмашук О.А. Технология транскутанной оценки активности моноаминоксидаз на основе анализа параметров флуоресценции [Текст] / **О.А. Стельмашук**, В.В. Шуплецов, Е.А. Жеребцов // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии – 2022. – № 3(353) – 118-126.

11. Серёгина Е.С. Оценка влияния янтарной кислоты и соединений цинка на параметры метаболизма головного мозга крыс методом флуоресцентной спектроскопии [Текст] / Е.С. Серёгина, **О.А. Стельмашук**, Г.А. Пьявченко, А.Г. Алексеев, Е.В. Воробьёв, Е.А. Кузнецова, Е.А. Жеребцов, А.В. Дунаев // Технологии живых систем – 2018. – № 5 (15) – 37-46.

12. Пьявченко Г.А. Оценка токсического действия сукцината цинка на кору больших полушарий головного мозга крыс [Текст] / Г. А. Пьявченко, А. Г. Алексеев, Е. С. Серёгина, **О. А. Стельмашук**, Е. А. Жеребцов, А. В. Дунаев, С. Л. Кузнецов // Сеченовский вестник. – 2019. – Т. 10. – №. 2. – С. 29-35.

#### **Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов**

13. **Стельмашук О.А.** Кальций-зависимая активация продукции митохондриальных АФК в клетках первичной культуры головного мозга [Текст] **О.А. Стельмашук**, А.Ю. Винокуров // Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России: в 2 томах, том 1 – Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023 - С. 166-167.

14. Крицкая К. А. Митохондриальная мегалопора (mPTP) и процесс клеточной гибели [Текст] / К. А. Крицкая, **О.А. Стельмашук**, А.В. Бережнов, А.Ю. Абрамов// Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России: в 2 томах, том 2 – Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023 - С. 222.

15. **Стельмашук О.А.** Влияние  $\beta$ -амилоидной нейротоксичности на внутриклеточный кальций в токсической модели болезни Альцгеймера *in vitro* [Текст] / **О.А. Стельмашук** // Клеточные технологии в экспериментальной медицине: сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции (Курск, 30 сентября 2022 года) / – Курск: КГМУ, 2022. – 51-52

16. **Стельмашук О.А.** Роль митохондриального кальция и синглетного кислорода в механизмах защитного эффекта в условиях амилоидной нейротоксичности [Текст] / **О.А. Стельмашук**, А.Ю. Абрамов, Е.Ф. Шевцова // Международная научная конференция молодых ученых «Наука и инновации»: сборник научных трудов (Ташкент 20 октября 2022 года) / Министерство инновационного развития Республики Узбекистан, Центр передовых технологий. - Т.: «Калеон пресс», 2022. – 150-152.

17. **Стельмашук О.А.** Различия параметров митохондриального метаболизма в клетках разных отделов головного мозга / **О.А. Стельмашук**,

А.Ю. Винокуров, Е.А. Жеребцов, А.Ю. Абрамов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1, 2021. – С. 372-377.

18. **Stelmashchuk O.A.** Calcium dependent activation of mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes [Text] / **O.A. Stelmashchuk**, A.Y. Vinokurov, A.Y. Abramov // FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, NOVOKEN 07030-5774, NJ USA : WILEY, 2021. – Т. 11. – С. 493-493 .

19. Долгих А.И. Измерение восстановленного глутатиона с помощью МСВ [Текст] / А.И. Долгих, **О.А. Стельмашук**, Е.А. Жеребцов // Сборник научных трудов I международной научно-практической конференции. – Карачев, Карачевский филиал ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева», 3 марта 2020 г. – С. 21-23.

20. Dolgikh A. Measurements of mitochondrial NADH pool and NADH production rate in acute brain slices and primary cell cultures using live cell imaging [Text] / A. Dolgikh, **O. Stelmashchuk**, A. Vinokurov, E. Zherebtsov, A. Abramov // Proc. SPIE 11845, 2021, 118450L.

21. **Stelmashchuk O.** Use of fluorescent optical fibre probe for recording parameters of brain metabolism in rat model [Text] / **O. Stelmashchuk**, E. Seryogina, G. Piavchenko, A. Alekseyev, E. Zherebtsov, A. Dunaev, E. Vorobyev, A. Kuznetsova, E. Kuznetsova, E. Rafailov, I. Rafailov //Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI. – SPIE, 2018. – Т. 10685. – С. 745-750.

22. **Stelmashchuk O.** Noninvasive control of rhodamine-loaded capsules distribution in vivo [Text] / **O. Stelmashchuk**, Y. Tarakanchikova, E. Seryogina, G. Piavchenko, E. Zherebtsov, A. Dunaev, A. Popov, I. Meglinski //Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX. – SPIE, 2018. – Т. 10716. – С. 322-327.

23. Piavchenko G. A. Brain metabolism changes in cases of impaired breathing or blood circulation in rodents evaluated by real time optical spectroscopy methods [Text] / G. Piavchenko, E. Seryogina, K. Kandurova, V. Shupletsov, I. Kozlov, D. Stavtsev, **O. Stelmashchuk**, E. Zherebtsov, V. Dremin, A. Alekseyev, S. Kuznetsov, A. Dunaev, I. Meglinski //Optical Biopsy XVIII: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis. – SPIE, 2020. – Т. 11234. – С. 92-98.

24. Серёгина Е.С. Применение флуоресцентной спектроскопии для оценки влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы коры головного мозга [Текст] / Е.С. Серёгина, **О.А. Стельмашук**, Г.А. Пьявченко, А.Г. Алексеев, Е.К. Воробьёв, Е.А. Кузнецова, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов //БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 23-27 апреля 2018 г., Пущино. Сборник тезисов, 2018. – С. 235.

25. Серёгина Е.С. Оценка функционального состояния структур коры головного мозга при помощи флуоресцентной спектроскопии [Текст] / Е.С. Серёгина, **О.А. Стельмашук**, Г.А. Пьявченко // Труды VII Всероссийского конгресса молодых ученых – СПб: Университет ИТМО, 2018.

26. **Stelmashchuk O.** Use of fluorescence spectroscopy for assessment of brain metabolism parameters in the rat model [Text] / **O. Stelmashchuk**, E. Seregina, G. Piavchenko, E. Vorobyev, E. Kuzntetsova // IV Summer School "Photonics Meets Biology" – Tarragona, Spain, September 19-22, 2017. – С.73.

27. Seryogina E. Fluorescence spectroscopy usage possibilities for the laboratory rats metabolism evaluation [Text] / E. Seryogina, **O. Stelmashchuk**, G. Piavchenko//Summer school on optics & photonics 2017 – Oulu, Finland, June 1-3, 2017. – С.57.

28. **Stelmashchuk O.** Imaging of rhodamine-loaded capsules distribution in vivo by fluorescence spectroscopy [Text] / **O. Stelmashchuk**, E. Seryogina, G. Piavchenko, E. Zherebtsov, Y. Tarakanchikova, A. Dunaev, A. Popov // Summer school on optics & photonics 2017 – Oulu, Finland, June 1-3 2017. – С.61.

#### **Свидетельства о регистрации способа**

29. Патент № 2783111 Российская Федерация, МПК А61N 5/067, А61В 18/20. Способ защиты нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и устройство для его осуществления / **Стельмашук О.А.**, Новикова И.Н., Потапова Е.В., Дремин В.В., Абрамов А.Ю., Жеребцов Е.А., Дунаев А.В.– заявл. 28.07.2021; опубл. 09.11.2022 Бюл. № 31

Подписано в печать 29 сентября 2023 г. Формат 60x84 1/16. Усл. печ. л.  
1,3. Тираж 80 экз. Заказ № \_\_\_\_ . -----  
----- Отпечатано с готового оригинал-макета на  
полиграфической базе ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» 302026, г.  
Орёл, ул. Комсомольская, 95.