

*На правах рукописи*

Серёгина Евгения Сергеевна

**Роль активных форм кислорода в поддержании жизнеспособности клеток  
головного мозга и мышц**

1.5.2. – Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**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

**Белослудцева Наталья Валерьевна**  
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), лаборатория митохондриального транспорта, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** **Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства; (г. Москва)**

Защита диссертации состоится 19 декабря 2024 года в 16ч 30 мин на заседании диссертационного совета **24.1.232.01** (Д 002.285.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3. и на сайте <https://www.pbcras.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга Васильевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Продукция активных форм кислорода (АФК) приводит к изменению окислительно-восстановительного баланса и запуску окислительно-восстановительной сигнализации в клетках. Последняя представляет собой элемент паракринной регуляции, в которой сигналы, вырабатываемые в клетке, активируют один или несколько каналов в соседних (целевых) клетках через цепочку медиаторов (Forman и др., 2014). История изучения окислительно-восстановительной сигнализации развивалась от рассмотрения роли оксидантов в патологии к пониманию их участия в нормальной передаче сигналов (Forman, 2016). Сигнал возникает в ответ на изменения в скорости образования АФК или окислительно-восстановительного (reduction-oxidation, редокс) состояния биологической системы (Collins и др., 2012). Окислительно-восстановительное состояние описывает баланс соотношений ключевых метаболитов, таких как окисленный и восстановленный глутатион, НАД<sup>+</sup>/НАДН, НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН, ФАД<sup>++</sup>/ФАДН<sub>2</sub> в биологических системах, что влияет на множество клеточных процессов (Allen, 1993). При работе электронтранспортной цепи (ЭТЦ) в митохондриях (МХ) происходит последовательная передача электронов от доноров, таких как НАДН и ФАДН<sub>2</sub>, к акцепторам, включая кислород. Этот процесс сопровождается изменением редокс-потенциалов соединений, что обеспечивает эффективное производство АТФ через окислительное фосфорилирование, что говорит о тесной связи окислительно-восстановительных процессов и биоэнергетики. Важно отметить, что баланс вовлеченных в этот процесс механизмов имеет решающее значение для поддержания клеточной функции и гомеостаза, и при сдвиге баланса в сторону увеличения продукции АФК может возникать окислительный стресс, приводящий к развитию различных патологий. Хотя клеточные механизмы, участвующие в окислительно-восстановительной сигнализации в основном идентифицированы, по-прежнему является не выясненным различия между продукцией АФК и запуском клеточной сигнализации (Pillay и др., 2016).

Головной мозг и мышцы представляют собой два важных органа человеческого организма, которые для обеспечения своей работы требуют огромного количества энергии, что может приводить к сдвигу окислительно-восстановительного баланса и изменению скорости производства АТФ (Mann и др., 1992; Westerblad и др., 2010). Нарушение механизмов обеспечения окислительно-восстановительного баланса и биоэнергетики вследствие различных генетических нарушений, приобретенных патологических процессов или естественного старения могут привести к развитию серьезных заболеваний.

С другой стороны, АФК могут выполнять сигнальную функцию, когда повышение продукции АФК не приводит к окислительному стрессу, и даже стимулирует защитные механизмы. Современные исследования направлены на выяснение того, как именно АФК участвуют в регуляции метаболических путей и как можно контролировать их уровень для достижения оптимального функционирования клеток. В этом контексте разработка способов регулирования окислительно-восстановительных систем является перспективным направлением, которое может существенно изменить подходы к лечению заболеваний, связанных с дисбалансом в окислительно-восстановительной сигнализации. Актуальность этих исследований продолжает возрастать на фоне глобальных проблем здравоохранения, связанных со старением населения и ростом заболеваемости, требующих поиска новых эффективных решений. Следовательно, акцент на окислительно-восстановительной

сигнализации и ее связи с энергетическим метаболизмом МХ и биоэнергетикой открывает новые горизонты в понимании клеточной физиологии и патологии.

**Цель исследования.** изучение роли АФК и окислительно-восстановительного сигнала в поддержании жизнеспособности клеток головного мозга и мышц в ответ на внешнее или внутреннее воздействие.

**Основные задачи исследования:**

1. Изучить влияние активации рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) на продукцию АФК, определить источник АФК и роль этого сигнала в поддержании жизнеспособности клеток головного мозга.

2. Исследовать взаимодействие энергетического метаболизма и окислительно-восстановительного баланса в механизме патологии Леша-Нихена, связанной с мутацией в гене белка HPRT1.

3. Изучить роль различных форм эндогенных синуклеинов в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток головного мозга.

4. Изучить способность митохондриальных субстратов воздействовать на энергетический метаболизм и окислительно-восстановительный баланс в клетках скелетных мышц.

**Научная новизна работы.**

Впервые выявлен нейропротекторный эффект активации RAGE коротким фрагментом V-домена данного рецептора (пептид 60-76), что обусловлено запуском продукции АФК ферментом НАДФН-оксидазой. Выявлено, что стимуляция RAGE-индуцированной продукции АФК в клетках не приводит к возникновению окислительного стресса. Напротив, проявляется защитный эффект короткого фрагмента RAGE в клеточной модели бета-амилоидной ( $A\beta$ ) токсичности, связанный с активацией RAGE и последующим запуском сигнального каскада через НАДФН-оксидазу.

Впервые было показано, что дефицит HPRT1 вызывает изменение митохондриального энергетического метаболизма клеток головного мозга. Было обнаружено, что в клетках мозга животных с данной мутацией наблюдается ингибирование митохондриального комплекса I, снижение потребления митохондриального НАДН и уменьшение митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ). Выявлено, что повышенная продукция АФК связана с митохондриальной дисфункцией, но не сопровождается снижением уровня восстановленного глутатиона (GSH) и окислительным стрессом. Продемонстрировано, что нарушение энергетического метаболизма нейронов и астроцитов, вызванное дефицитом HPRT1, потенциально может привести к энергетической недостаточности и стать основным пусковым механизмом развития патологии болезни Леша-Нихена.

Впервые показано, что генетическая инактивация генов, связанных с производством  $\alpha$ - и  $\beta$ - синуклеинов, приводит к изменению продукции АФК и изменению уровня GSH за счет влияния данных белков на работу НАДФН-оксидазы и моноаминоксидазы (MAO) в клетках среднего мозга.

Впервые было показано, что обеспечение митохондриальными субстратами на основе холина, сукцината и никотинамида улучшает энергетический метаболизм клеток скелетных мышц, активировать продукцию АФК, не понижая значительно уровня эндогенного антиоксиданта GSH, но защищает от возрастной саркопении в животной модели.

**Теоретическая и практическая значимость работы.**

Полученные результаты, показавшие защитный эффект для клеточной культуры на модели  $A\beta$ -токсичности позволили предположить возможность

использования короткого фрагмента RAGE (пептид 60-76) в качестве нейротектора на основании его способности к увеличению продукции АФК НАДФН-оксидазой через RAGE. Полученные результаты, показавшие защитный и стимулирующий эффект активации продукции АФК, позволяют расширить понимание роли окислительно-восстановительной сигнализации в физиологии и ряде патологических процессов. В частности, работе было показано, что в клетках головного мозга HPRT1-дефицитных мышей, являющихся моделью болезни Леша-Нихена, последствия мутации затрагивают как величину  $\Delta\Psi_m$ , так и увеличивают продукцию АФК, не вызывая окислительный стресс. Помимо этого, показана взаимосвязь  $\alpha$ - и  $\beta$ - синуклеинов с ферментами, связанными с образованием АФК. Также выявлена возможность улучшения митохондриального метаболизма и защитной функции клеток при использовании митохондриальных субстратов на основе дихолина сукцината и никотинамида.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Диссертационная работа была выполнена на первичной нейрон-глиальной культуре и переживающих срезах головного мозга, на клеточной культуре и переживающих срезах мышечной ткани крыс линии Wistar, на клеточной культуре, переживающих срезах и изолированных митохондриях CRISPR-изированных мышей с делецией TCG в первом экзоне (HPRT1del8Val) и мышей на основе линии C57Bl/6J с генетической инактивацией синуклеинов. Исследования проводились с применением современных методов конфокальной и флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов, а также методов оценки потребления кислорода при помощи электрода Кларка. Проведенная работа была выполнена в лаборатории клеточной физиологии и патологии Научно-технологического центра биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Компьютерную обработку серий изображений тканей и культур клеток, полученных с применением флуоресцентной и конфокальной микроскопии, проводили с помощью программ ZEN Microscopy Software и ImageJ. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab Corp., США) и MATLAB R2021a.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Активация RAGE в клетках головного мозга приводит к запуску продукции АФК НАДФН-оксидазой, что обеспечивает защиту клеток от гибели в условиях стресса, индуцированного А $\beta$ .

2. Делеция HPRT1 ингибирует комплекс I-зависимое митохондриальное дыхание, что приводит к увеличению митохондриального НАДН, падению  $\Delta\Psi_m$  и увеличению продукции АФК в МХ и цитозоле клеток, которое, однако, не приводит к возникновению окислительного стресса.

3.  $\alpha$ - и  $\beta$ - синуклеины регулируют производство АФК и уровень GSH в клетках головного мозга за счет регуляции НАДФН-оксидазы.

4.  $\beta$ -синуклеин регулирует производство АФК и уровень GSH в клетках головного мозга за счет регуляции MAO.

5. Митохондриальные субстраты улучшают энергетический метаболизм миотрубочек активируют окислительно-восстановительную сигнализацию и защищают ткань скелетных мышц животных от возрастной саркопении.

**Личный вклад автора.**

Личный вклад автора заключается в проведении обзора литературы об особенностях окислительно-восстановительного баланса, ферментах и механизмах, которые поддерживают данный баланс, и кальциевой сигнализации 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, получены 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.) и «Механизм нейродегенерации: древняя молекула как необходимый элемент физиологии и патологии клеток мозга» (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 № 075-15-2024-621). Отдельные этапы работы выполнены с участием сотрудников лаборатории клеточной физиологии и патологии «ОГУ имени И.С. Тургенева».

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов исследования подтверждена применением соответствующих поставленным целям и задачам современных методов исследования, приборов, реактивов и современного программного обеспечения для обработки полученных данных. Все полученные результаты имеют статистическую значимость и являются воспроизводимыми.

Основные материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях, в частности на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия 2021, 2023), международной научной конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (Курск, Россия 2022), школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, Россия, 2022), VIII Всероссийском конкурсе Научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в рамках Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего - Наука молодых» 2023 г., «Ломоносов-2024» и др.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 20 работ, из которых 3 в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, а также 17 тезисов докладов на научных конференциях всероссийского и международного уровней.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация содержит следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и список работ автора. Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста и содержит одну таблицу и 30 рисунков. Список литературы включает 411 источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Объектами исследований служили переживающие срезы и первичная нейрон-глиальная культура головного мозга и скелетных мышц крыс. Кроме этого, были использованы первичная нейрон-глиальная культура и изолированные митохондрии мышцей с полной дисфункцией HPR1 и мышцей дикого типа (ДТ). Помимо этого, часть исследований проводилась на острых срезах и нейрон-глиальной культуре мышцей с генетической инактивацией генов, связанных с синуклеинами. 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 установку на основе инвертированного микроскопа Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония), а также полярографии с помощью кислородного электрода Кларка Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания).

**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 ± стандартная ошибка среднего. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$  по результатам ANOVA с тестом Тьюки.

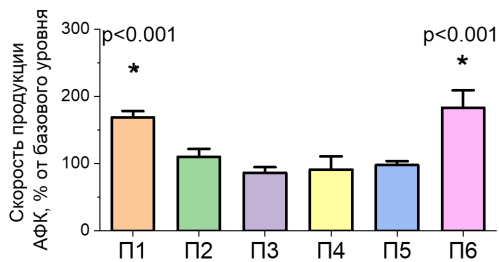
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **RAGE вызывает физиологическую активацию НАДФН-оксидазы в нейронах и астроцитах и нейропротекцию**

В рамках первой задачи данной работы была изучена роль активации RAGE в регуляции окислительно-восстановительного баланса клеток головного мозга. В данном разделе нами рассмотрено, как влияет селективная активация RAGE короткими фрагментами данного рецептора на внутренние механизмы регуляции клеточного метаболизма и поддержание жизнеспособности клеток.

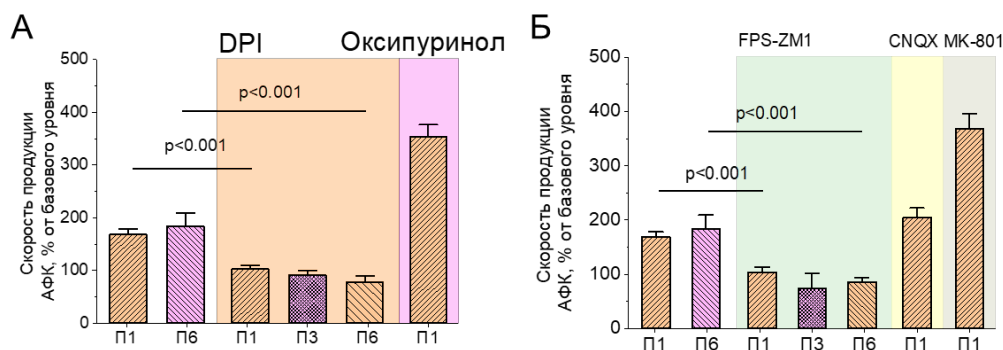
Для определения возможности активации выработки АФК при использовании коротких фрагментов пептидов – синтетических фрагментов участка V-домена RAGE (60-76) – был использован зонд дигидроэтидий (HEt) в концентрации 5 мкМ. После регистрации базового увеличения флуоресценции вносили растворы пептидов RAGE П1-П6 в концентрации 10 мкМ. Степень активации продукции АФК пептидами рассчитывали в процентах от базового уровня. Как можно судить из представленных данных (рисунок 1), в наибольшей степени изменение скорости роста флуоресценции окисленной формы HEt происходило под влиянием пептидов 1 и 6 (П1 (60-76) и П6 (Ac-60-76-NH<sub>2</sub>)). Они демонстрируют 1,7- и 1,8-кратную активацию продукции АФК, тогда как в случае остальных фрагментов значительного изменения скорости окисления HEt не отмечено. Стоит отметить, что оба пептида представляют собой полноразмерные фрагменты 60-76, но в случае П6 имеет место химическая модификация функциональных групп С- и N-конца.

Таким образом, для дальнейшего исследования были выбраны два наиболее активных пептида – П1 и П6. Неактивный короткий пептид П3 был использован в качестве отрицательного контроля.



**Рисунок 1. Влияние фрагментов RAGE на скорость окисления HEt в клетках первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга крыс. Результаты статистической обработки данных изменения скорости окисления HEt при внесении пептидов.)**

Среди внутриклеточных источников АФК наиболее вероятной причиной стимуляции пептидами окисления HEt в цитозоле представляется активация НАДФН-оксидазы или ксантиноксидазы. Для определения роли этих ферментов в изменении редокс-баланса под влиянием пептидных фрагментов RAGE первичную нейроглиальную культуру клеток инкубировали в течение 30 мин с ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодоний хлоридом (DPI) (0,5 мкМ) и ингибитором ксантиноксидазы оксипуринолом (20 мкМ) перед экспериментами (рисунок 2 А). Проведенные расчеты показали отсутствие увеличения продукции АФК в присутствии DPI в случае пептидов П1 и П6, а также контроля П3. В то же время ингибирование ксантиноксидазы оксипуринолом не оказывало влияния на способность пептида RAGE (60-76) активировать скорость продукции АФК (рисунок 2 А).



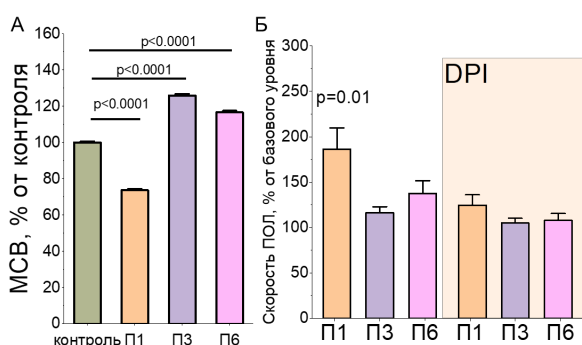
**Рисунок 2. Влияние фрагментов пептида RAGE на скорость окисления HEt при предварительном инкубировании клеток первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга крыс в присутствии ингибиторов и антагонистов. А - Результаты при предварительном инкубировании клеток в присутствии ингибитора НАДФН-оксидазы и ксантиноксидазы; Б - Результаты при предварительном инкубировании клеток в присутствии антагониста RAGE, AMPA и NMDA рецепторов.**

Основанное на работе НАДФН-оксидазы увеличение продукции АФК после воздействия пептидов RAGE может быть результатом прямой активации RAGE или опосредовано другими внутриклеточными сигнальными путями. Целью следующего этапа был поиск ответа на вопрос, является ли увеличение продукции АФК НАДФН-оксидазой результатом взаимодействия пептидов именно с RAGE. Предварительная инкубация клеток с селективным антагонистом RAGE FPS-ZM1 (1 мкМ) (рисунок 2 Б) эффективно блокировала увеличение продукции АФК, индуцированное пептидами П1 и П6, и не влияла на стимулирующий эффект форбол-12-миристат-13-ацетата. Предварительная инкубация (20 мин) нейронов и астроцитов с CNQX (10 мкМ) и МК-801 (10 мкМ), ингибиторами AMPA/каинатных и NMDA-рецепторов соответственно, не изменила эффекта активации RAGE НАДФН-оксидазой, а применение П1 привело



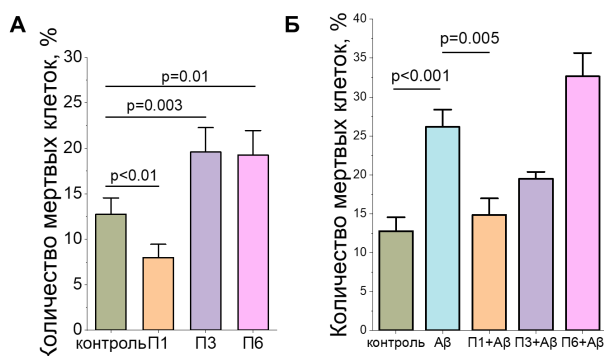
к двукратному и четырехкратному увеличению скорости окисления HEt в присутствии ингибиторов AMPA/каинатных, а также NMDA-рецепторов, соответственно (рисунок 2 Б).

Чтобы выявить возможные изменения окислительно-восстановительного баланса после активации RAGE пептидом, было исследовано влияние пептидов на уровень GSH (рисунок 3 А) и скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) (рисунок 3 Б). Двухчасовая инкубация первичной культуры коры с П1 привела к незначительному снижению содержания GSH ( $73,7 \pm 0,7\%$  от контрольных клеток) и увеличению скорости ПОЛ ( $187 \pm 23\%$  от базового уровня), которые также могут быть заблокированы DPI (рисунок 3 Б). В клетках коры головного мозга, инкубированных с П3 и П6 не наблюдается снижения содержания GSH и ускорения ПОЛ. Однако незначительные изменения уровня GSH и ПОЛ на П1 и отсутствие изменений на П6 не говорит однозначно о развитии окислительного стресса, приводящего к гибели клеток.



**Рисунок 3. Активация RAGE приводит к снижению уровня восстановленного глутатиона.** А – интенсивность флуоресценции MCV в клетках коры головного мозга после прединкубации с пептидами нормированная на уровень клеток контрольной группы без инкубации. Б - Изменение скорости окисления C-11 BODIPY 581/591 после добавления только пептидов и после предварительной инкубации с ингибитором DPI (0,5 мкМ)

Для изучения влияния пептидов на жизнеспособность было выполнено измерение количества мертвых клеток при помощи инкубации с 5 мкМ Hoechst 33342 и 20 мкМ йодида пропидия в течение 30 мин в присутствии пептидов. П1 не увеличивал процент мертвых клеток ( $8,0 \pm 1,4\%$ ), по сравнению с клетками без воздействия ( $12,8 \pm 1,7\%$ ) (рисунок 4 А). Уровень мертвых клеток в культуре, обработанной П6, был выше, чем в контрольном эксперименте ( $19,3 \pm 2,6\%$ ), но равным уровню в культуре, инкубированной с П3 ( $19,6 \pm 2,6\%$ ). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии патологических последствий активации продукции АФК фрагментами RAGE.



**Рисунок 4. Активация RAGE защищает клетки коры головного мозга от клеточной гибели.** А – доля мертвых клеток, при инкубации с пептидом. Б – Влияние Aβ и пептидов на выживаемость клеток. количественное определение доли PI-позитивных клеток после различных условий воздействия

Инкубация клеток первичной нейрон-глиальной культуры с Aβ и П1 приводит к статистически значимому снижению уровня мертвых клеток по сравнению с

клетками только с Аβ (14,8±9,7% и 26,2±16,8%) (рисунок 4 Б). Применение контроля ПЗ, а также П6 не показало значительного снижения процента мертвых клеток (19,5±2,8% и 32,6±16,7%, соответственно).

Можно говорить о том, что фрагмент пептида 1 обладает нейропротекторными свойствами на основании его способности при активации продукции АФК сохранять окислительный баланс клеток и защищать от патологического действия Аβ. Механизм защитного воздействия П1 может быть основан как на связывании с Аβ на ранней стадии формирования олигомеров, либо на нейтрализации Аβ на более поздних стадиях.

Пептид 6 по химическому строению подобен пептиду 1, но имеет защитную группу. Исходя из данных по скорости окисления HEt (рисунок 2), активация продукции АФК пептидами 1 и 6 статистически не отличается, однако наличие пептида 6 увеличивает количество мертвых клеток и приводит к патологическому снижению общей жизнеспособности клеток в присутствии Аβ. Возможно, наличие защитной группы лишает пептид возможности нейтрализовать действие Аβ на ранних этапах его олигомеризации и активирует механизмы, включающие состояние окислительного стресса в клетках.

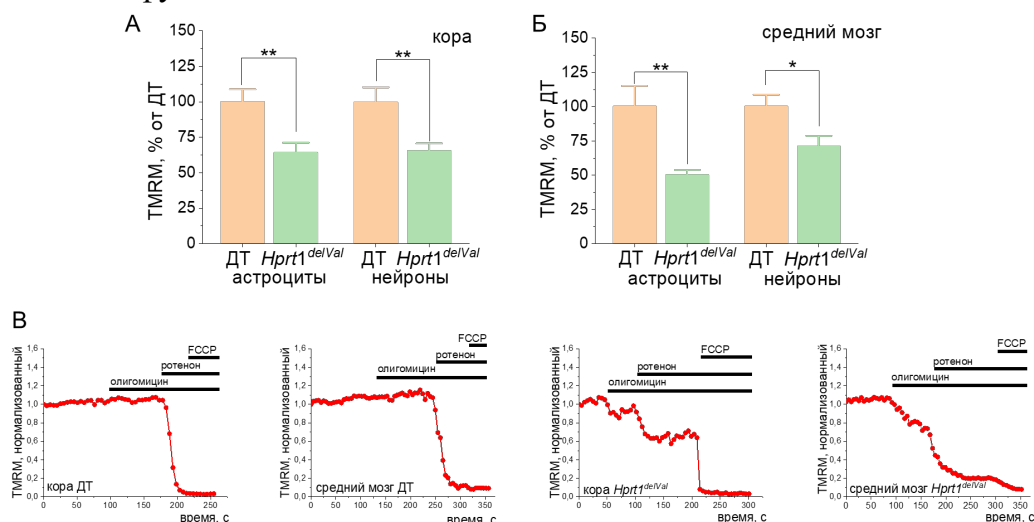
### **Дефицит HPRT1 вызывает изменение энергетического метаболизма митохондрий в головном мозге**

Наряду с показанной активацией RAGE еще одним важным механизмом поддержания нормального окислительно-восстановительного баланса является работа фермента HPRT1, который контролирует активность ксантиноксидазы. Сама активность ксантиноксидазы зависит от энергетического метаболизма и синтеза мочевой кислоты, и в рамках исследований проводилась оценка изменений в окислительно-восстановительном балансе и энергетическом метаболизме организма с мутацией в гене HPRT1<sup>del8Val</sup>, приводящей к синдрому Леша-Нихена.

ΔΨ<sub>m</sub> является показателем функции МХ и может быть использован для выявления возможного влияния мутации гена HPRT1<sup>del8Val</sup> на митохондриальный метаболизм. Мы использовали флуоресцентный потенциал-зависимый зонд TMRM для измерения ΔΨ<sub>m</sub> в первичной нейрон-глиальной культуре мышей ДТ и с мутацией (рисунок 5).

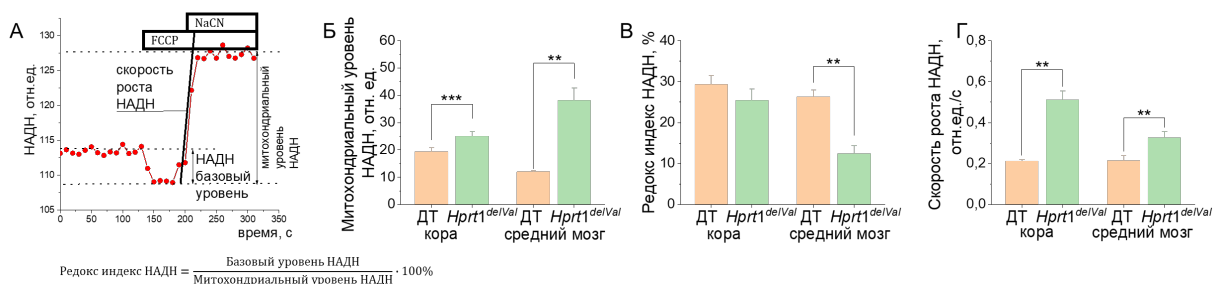
Было обнаружено, что нейроны и астроциты коры и среднего мозга с мутацией HPRT1 характеризуются более низким ΔΨ<sub>m</sub> по сравнению с астроцитами и нейронами ДТ (рисунок 5 А, Б). ΔΨ<sub>m</sub> поддерживается в основном за счет функционирования комплексов ЭТЦ. Снижение ΔΨ<sub>m</sub> в мутантных клетках может быть результатом изменения функции ЭТЦ вследствие функционального подавления активности гена HPRT1<sup>del8Val</sup>. Добавление ингибитора АТФ-синтазы F0-F1 олигомицина (2 мкг/мл) к клеткам коры и среднего мозга ДТ демонстрирует типичное для контроля отсутствие эффекта на ΔΨ<sub>m</sub> или индукцию небольшой гиперполяризации (рисунок 5 В). Последующее внесение ингибитора комплекса I ротенона (3 мкМ) вызывало почти полную деполяризацию в этих клетках, что подтверждалось отсутствием реакции на митохондриальный разобщитель FCCP (2 мкМ). Клетки коры и среднего мозга с мутацией HPRT1<sup>del8Val</sup> демонстрируют снижение интенсивности флуоресценции TMRM после добавления олигомицина (рисунок 5 В), что убедительно свидетельствует о том, что этот фермент работает в обратном режиме для поддержания ΔΨ<sub>m</sub> путем перекачки протонов за счет энергии АТФ. Следует отметить, что в клетках коры и среднего мозга мутантных животных ротенон вызывает лишь частичное снижение флуоресценции TMRM по сравнению с контролем. Последующее применение FCCP к этим клеткам вызывает снижение

общего сигнала TMRM, что в отсутствие какого-либо другого донора электронов может быть обусловлено только активностью комплекса II. Таким образом,  $\Delta\Psi_m$  в клетках с мутацией  $HPRT1^{del8Val}$  частично поддерживается комплексами II и АТФазой из-за снижения функции комплекса I.



**Рисунок 5. Дефицит  $HPRT1$  снижает мембранный потенциал митохондрий в нейронах и астроцитах и изменяет механизм поддержания  $\Delta\Psi_m$ . А, Б –  $\Delta\Psi_m$  в клетках мозга мутантных и ДТ мышей. В - Нормализованная интенсивность флуоресценции TMRM в клетках коры и среднего мозга ДТ и в клетках коры и среднего мозга мышей  $HPRT1^{del8Val}$  после применения олигомицина (1 мкг/мл), ротенона (5 мкМ) и FCCP (1 мкМ). \*\* $p < 0,001$**

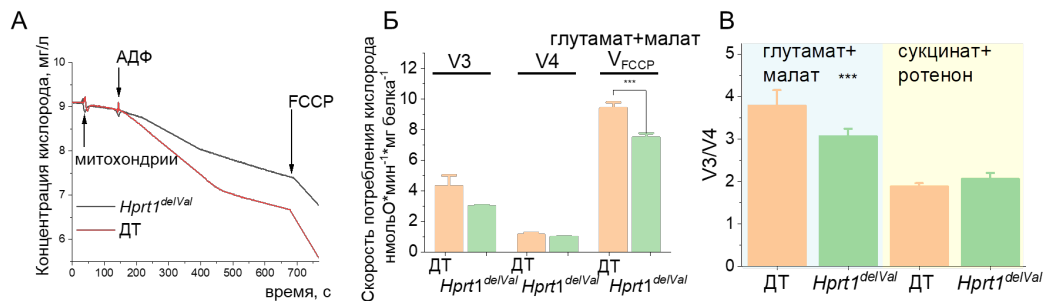
Митохондриальный метаболизм в живых клетках и тканях можно также оценить с помощью измерения митохондриального окислительно-восстановительного индекса. Для этого мы измерили автофлуоресценцию НАДН в переживающих срезах коры и среднего мозга. Для отделения митохондриального НАДН от НАДФН и немитохондриального НАДН использовали протонификатор FCCP (для максимального увеличения скорости дыхания и потребления НАДН, принимается за 0) и ингибитор комплекса IV NaCN (для блокирования дыхания и потребления НАДН, принимается за 100) (рисунок 6). Эти измерения позволили оценить 3 характеристики, связанные с НАДН: содержание митохондриального НАДН, редокс-индекс и скорость производства НАДН в цикле Кребса, определяемую по скорости увеличения автофлуоресценции после NaCN. Митохондриальный уровень НАДН в срезах коры и среднего мозга мышей с мутацией  $HPRT1^{del8Val}$  был в 1,3 и 3,2 раза выше по сравнению с ДТ. Срезы коры мутантных мышей характеризовались практически одинаковым редокс-индексом НАДН по сравнению с ДТ, тогда как в срезах среднего мозга было обнаружено значительное снижение редокс-индекса НАДН в срезах мозга мышей с дефицитом  $HPRT1$  ( $12,5 \pm 1,8\%$  и  $26,3 \pm 1,7\%$  у мутантных и ДТ животных, соответственно). В соответствии с более высоким уровнем НАДН в мозге мутантных животных, скорость образования НАДН в цикле Кребса была значительно выше как в коре (в срезах мозга мутантных мышей  $0,5 \pm 0,04$ , ДТ –  $0,2 \pm 0,01$ ), так и в среднем мозге (в срезах мозга мутантных животных  $0,3 \pm 0,03$ , ДТ –  $0,2 \pm 0,02$ ).



**Рисунок 6. Уровень и продукция митохондриального НАДН в клетках мозга, лишенных HPRT1.** А - Репрезентативная кривая автофлуоресценции НАДН с объяснением расчета митохондриального уровня НАДН, редокс-индекса НАДН и скорости производства НАДН. Митохондриальный уровень НАДН (Б), редокс-индекс НАДН (В) и скорость производства НАДН (Г) в переживающих срезах мозга мышей ДТ и мозга мышей с мутацией  $HPRT^{del8Val}$  \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,05$

Таким образом, более высокий уровень митохондриального уровня НАДН и повышенная скорость продукции НАДН в митохондриях срезов мозга с мутацией в гене белка HPRT1 позволяют предположить, что наблюдаемое в экспериментах с измерениями  $\Delta\Psi_m$  ингибирование активности комплекса I не связано с ограничением НАДН в качестве митохондриального субстрата.

Для оценки скорости потребления кислорода в изолированных МХ мозга был использован электрод Кларка. Для оценки параметров дыхания в качестве субстратов комплекса I использовали глутамат (5 мМ) и малат (1 мМ). МХ мозга мутантных мышей HPRT1 имели значительно более низкую скорость АДФ-зависимого (V3, на 30,2%) и в меньшей степени АДФ-независимого дыхания (рисунок 7).

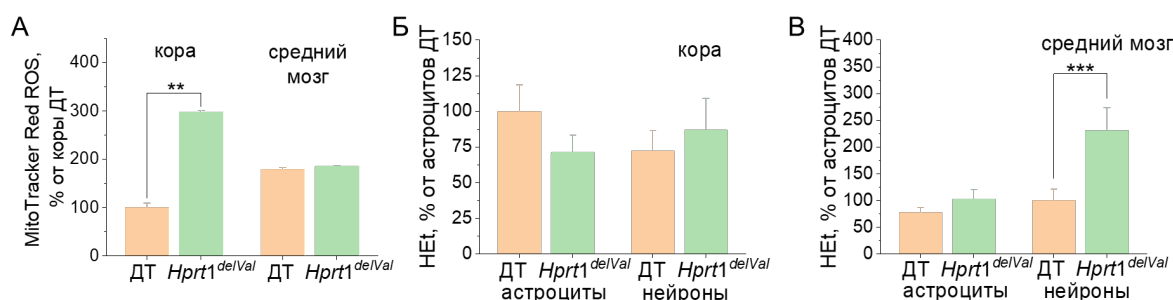


**Рисунок 7. Дефицит HPRT1 вызывает ингибирование связанного с комплексом I дыхания МХ мозга.** А – репрезентативные кривые АДФ-зависимого (V3) и АДФ-независимого (V4) потребления кислорода в МХ мозга ДТ и HPRT1-дефицитных мышей; V3, V4 и  $V_{FCCP}$  дыхание (Б), отношение дыхательного контроля (V3/ V4) (В) и отношение АДФ/О (Г) МХ из животных ДТ и HPRT1-дефицитных животных.  $del8Val$  мозга мышей в среде глутамат (5 мМ)+малат (5 мМ) или сукцинат (5 мМ)+ротенон (5 мкМ). Данные представлены как среднее±стандартная ошибка. \*\*\* $p < 0.05$

В результате дыхательный коэффициент был снижен на 18,4% (рисунок 7). Важно отметить, что максимальная скорость дыхания МХ, индуцированного 0,5 мкМ FCCP, была значительно ниже у мутантных мышей HPRT1 по сравнению с контрольными МХ, что подтверждает ингибирование комплекса I-зависимого дыхания.

Фармакологическое или молекулярное ингибирование комплекса I может приводить к увеличению продукции митохондриальной АФК (Abramov et al., 2010; Abramov & Angelova, 2019). Чтобы выяснить, увеличивает ли ингибирование комплекса I в клетках мозга животных с мутацией  $HPRT1^{del8Val}$  продукцию митохондриальной АФК, был использован зонд MitoTracker™Red CMXRos в качестве флуоресцентного индикатора АФК в МХ (рисунок 8 А). Было обнаружено, что дефицит  $HPRT1$  значительно увеличивает скорость продукции митохондриальных АФК в первичных нейронах и астроцитах (рисунок 8 А). Следует отметить, что эффект мутации  $HPRT1^{del8Val}$  на митохондриальные АФК был в 3 раза выше в кортикальных нейронах и астроцитах в переживающих срезах мозга мутантных мышей по сравнению со срезами мозга ДТ.

Для оценки скорости образования АФК использовали флуоресцентный зонд HEt. Для дифференциации сигнала от разных типов клеток в первичных нейрон-глиальных культурах в ходе эксперимента вносили АТФ (для астроцитов) и глутамат (для нейронов) (рисунок 8 Б, В). Все данные по скорости продукции АФК сравниваются со скоростью продукции АФК в кортикальных астроцитах ДТ. Отмечено снижение уровня базальной продукции АФК в астроцитах коры мутантных мышей ( $70,7 \pm 12,8\%$  от ДТ астроцитов), в то время как скорость продукции АФК в нейронах несколько повышена ( $86,8 \pm 22,2\%$  и  $72,1 \pm 14,3\%$  в клетках мутантных животных и ДТ, соответственно) (рисунок 8 Б). В среднем мозге обнаружено увеличение скорости окисления HEt (на  $32,0\%$  в астроцитах и на  $129,9\%$  в нейронах по сравнению с клетками ДТ) (рисунок 8 В).

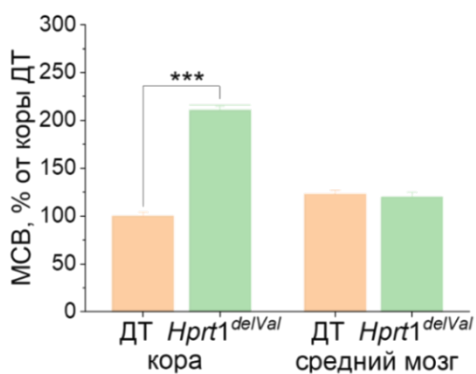


**Рисунок 8. Дефицит  $HPRT1$  приводит к увеличению продукции АФК в митохондриях и цитозоле клеток мозга.** А – интенсивность флуоресценции MitoTracker Red ROS в переживающих срезах мозга, нормализованная к уровню срезов коры ДТ. Б, В – скорость увеличения флуоресценции HEt в астроцитах и нейронах коры (Б) и среднего мозга (В) мышей ДТ и мутантных животных, нормализованная к уровню астроцитов коры ДТ. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. \*\*\* $p < 0.05$

Повышенная продукция АФК может привести к повреждению липидов мембран, белков, ДНК и развитию окислительного стресса, но это происходит только в случае дисбаланса между генерацией АФК и их нейтрализацией. Содержание GSH в клетках определяли с помощью MCB, который образует с ним флуоресцентные конъюгаты (рисунок 9). Содержание GSH в клетках коры головного мозга мутантных мышей было более чем в 2 раза выше по сравнению с клетками коры головного мозга ДТ. Статистически значимой разницы в содержании GSH между клетками среднего мозга животных с мутацией  $HPRT1^{del8Val}$  и клетками среднего мозга ДТ не было ( $119,9 \pm 4,9\%$  и  $123,3 \pm 3,7\%$ , соответственно).

Таким образом, для клеток мозга мутантных животных характерен баланс между производством и нейтрализацией АФК и не выявлен окислительный стресс.





**Рисунок 9. Дефицит *HPRT1* повышает уровень *GSH*.** В – интенсивность флуоресценции *MCV* в клетках мозга *DT* и *HPRT1*-дефицитных мышей, нормализованная к уровню клеток коры *DT* ( $n = 6$  стекла на область мозга;  $N = 44-81$  клеток на область мозга). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. \*\*\* $p < 0.001$

Дефицит *HPRT1* приводит к изменениям в митохондриальном метаболизме, что приводит к снижению  $\Delta\Psi_m$  в нейронах и астроцитах. При этом изменяется не только величина  $\Delta\Psi_m$ , но и механизм поддержания потенциала от ЭТЦ в контроле до частичной компенсации активности ЭТЦ с обратным режимом (перекачка  $H^+$  с использованием АТФ, образующейся преимущественно в гликолизе) в АТФазе  $F_0-F_1$  (рисунок 5). Следует отметить, что подобный тип компенсации  $\Delta\Psi_m$  в нейронах показан для многих патологий, включая нейродегенерацию и нейроны с патологией комплекса I (Abramov et al., 2010; Esteras et al., 2016).

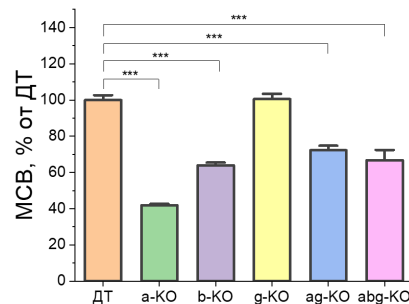
Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит *HPRT1* приводит к ингибированию комплекса I, что было подтверждено в экспериментах с изолированными МХ мозга, снижению потребления митохондриального НАДН и уменьшению  $\Delta\Psi_m$ . Можно предположить, что митохондриальная дисфункция в нейронах и астроцитах при дефиците *HPRT1* индуцируется более сложным эффектом, чем изменениями внутриклеточной или внеклеточной концентрации мочевой кислоты. Было также показано, что скорость выработки НАДН была выше в клетках с дефицитом *HPRT1*, что говорит о том, что ингибирование комплекса I в этих клетках не вызвано недостатком субстратов, и что в нейронах и астроцитах не нарушен метаболизм глюкозы, который может быть даже выше за счет более высокой гликолитической активности для производства АТФ.

### **Регуляция окислительно-восстановительной сигнализации белками-синуклеинами и её взаимодействие с другими компонентами внутриклеточной сигнализации**

Как было сказано ранее, одним из способов изучения нормальной физиологической функции генов, кодирующих экспрессию белков синуклеинов, является их генетическая инактивация. Поэтому для дальнейшего анализа была выбрана модель животных с генетической инактивацией. Для формирования экспериментальных групп использовали самцов линии мышей с генетической инактивацией генов синуклеинов: одиночный нокаут по гену  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -синуклеина ( $\alpha$ -КО,  $\beta$ -КО,  $\gamma$ -КО), двойной нокаут по  $\alpha$ - и  $\gamma$ -синуклеину ( $\alpha\gamma$ -КО, функциональный только  $\beta$ -синуклеин), тройной нокаут по генам  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -синуклеину ( $\alpha\beta\gamma$ -КО), а в качестве контрольной группы были выбраны мыши линии C57Bl/6J без генетических модификаций, полученные при становлении линий нокаутов синуклеинов (*DT*). Эксперименты были проведены на нейрон-глиальной культуре клеток среднего мозга мышей и на переживающих срезах головного мозга (*ex vivo*), что позволяет получить более физиологически релевантные данные по сравнению с изолированными клетками и гомогенатами.

Одной из главных характеристик окислительно-восстановительного баланса в головном мозге является уровень эндогенного антиоксиданта – GSH. Для того, чтобы оценить возможные изменения в окислительно-восстановительном балансе при отсутствии определенных синуклеинов мы измеряли уровень GSH, используя флуоресцентный индикатор MCB.

Было обнаружено, что уровень различных синуклеинов напрямую связан с уровнем GSH. Согласно данным, представленным на рисунке 10, недостаток  $\alpha$ -синуклеина приводит к значительному снижению (до 40%) от значений уровня GSH контрольной группы. Следует отметить, что все комбинации недостатка  $\alpha$ -синуклеина – как тройной нокаут (abg-KO) или двойной нокаут (ag-KO) – снижали уровень GSH до 60%. Не изменял уровень GSK только нокаут по  $\gamma$ -синуклеину.

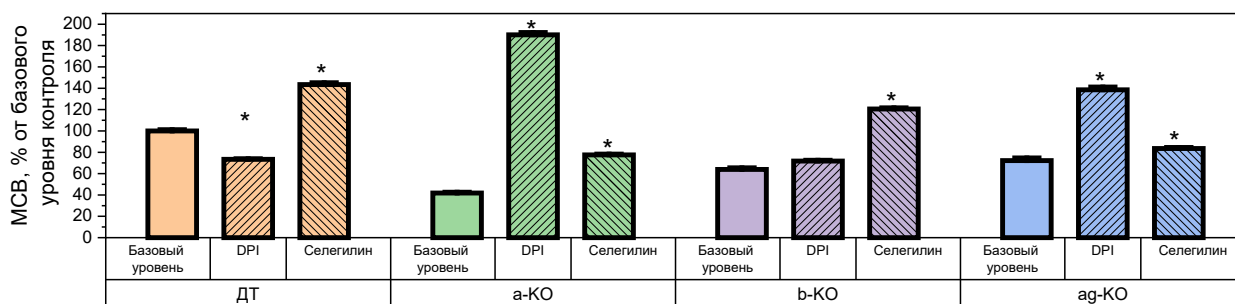


**Рисунок 10. Влияние синуклеинов на уровень GSH.** Интенсивность флуоресценции MCB в срезах головного мозга нормированная на уровень флуоресценции в группе ДТ.  
\*\*\*  $p = 0,0001$

Таким образом, можно сделать вывод о том, что отсутствие синуклеинов влияет на окислительно-восстановительный баланс, позволяя предположить, что сами белки семейства синуклеинов регулируют синтез основных антиоксидантов или продукцию АФК в этих клетках.

Для определения возможного влияния на источники АФК в клетках головного мозга мы использовали предобработку срезов ингибиторами НАДФН-оксидазы (DPI 0,5 мкМ) и MAO (селегилин (20 мкМ)). Данная концентрация селегилина была выбрана в связи с тем, что именно в такой концентрации он блокирует MAO-A и MAO-B. Было обнаружено, что обработка ингибитором НАДФН-оксидазы имела достаточно небольшой эффект на ткани животных ДТ и лишенных  $\beta$ -синуклеина. Но при этом ингибирование НАДФН-оксидазы приводило к значительному повышению уровню GSH в срезах групп нокаута по  $\alpha$ -синуклеину (a-KO) и нокаута по  $\alpha$ - и  $\gamma$ -синуклеину (ag-KO). Важно, что предобработка селегилином повышала уровень GSH как в срезах ДТ, так и в срезах группы b-KO. Что предполагает влияние  $\beta$ -синуклеина на продукцию АФК в MAO, а  $\alpha$ -синуклеина – в НАДФН-оксидазе.

Подводя итоги, можно сказать о том, что в случае нокаута  $\alpha$ -, или  $\beta$ -синуклеинов или тройного нокаута отсутствие синуклеинов коррелирует с изменением содержания восстановленной формы глутатиона. Большую роль синуклеины играют в работе НАДФН-оксидазы и MAO. Несмотря на то, что в рамках изучения БП более интересен  $\alpha$ -синуклеин, результаты показали, что работа всех белков взаимосвязана. Особый интерес представляет  $\beta$ -синуклеин, который является гомологичным  $\alpha$ -синуклеину, и при его отсутствии также присутствует нарушение окислительно-восстановительного баланса, как в случае нокаута  $\alpha$ -синуклеина.



**Рисунок 11. Влияние синуклеинов в присутствии ингибитора MAO на уровень GSH различно. Представлена интенсивность флуоресценции MCV в срезах головного мозга нормированная на уровень флуоресценции в группе DT. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка \*  $p = 0,001$**

Совокупность полученных данных о продукции АФК в тканях исследованных групп модельных животных позволяет говорить о весьма сложной регуляции окислительно-восстановительного баланса с участием синуклеинов и высокой взаимосвязи между их функциями, в результате чего связанные с мутациями отсутствие или дисфункция одного из синуклеинов может привести к компенсации со стороны другого или, наоборот, стать причиной патологических процессов, приводящих к нарушениям состояния клеток.

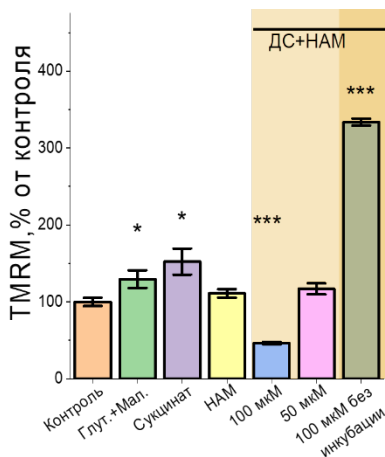
Таким образом, можно сделать предположение о том, что в физиологических условиях  $\alpha$ - и  $\beta$ -синуклеины могут принимать участие в развитии окислительно-восстановительных процессов, отвечающих за регуляцию клеточного метаболизма, и отключение их функций, приводящее к уменьшению продукции АФК, вызывает соответствующее падение уровня GSH. При этом в случае  $\gamma$ -синуклеина происходит значительное смещение в стороны восстановительных условий внутриклеточной среды. Эффект двойного нокаута  $\alpha$ - и  $\gamma$  синуклеина, вероятно, связан с нарушениями обеспечения антиоксидантной системы клеток, что выражается в превалировании образования АФК над их нейтрализацией.

### **Обеспечение митохондриальными субстратами улучшает энергетический метаболизм мышечных клеток и защищает крыс от возрастной саркопении**

Возрастная саркопения может служить еще одним примером заболевания, связанным с нарушениями биоэнергетики и дисбалансом окислительно-восстановительной сигнализации. В рамках решения данной задачи мы исследовали возможность использования митохондриальных субстратов и субстратов цикла Кребса для улучшения состояния мышечных клеток

Основной показатель функционального состояния МХ,  $\Delta\Psi_m$ , поддерживается преимущественно за счет работы ЭТЦ митохондрий (Cheng et al., 2021). Для оценки  $\Delta\Psi_m$  в культуре миоцитов мы использовали TMRM в качестве флуоресцентного индикатора. Применение митохондриального разобщителя FCCP (2 мкМ) вызывало деполяризацию МХ, и разница между базальным уровнем TMRM и флуоресценцией после добавления протонофора принималась за  $\Delta\Psi_m$  в разных клетках (рисунок 12). В качестве митохондриальных субстратов помимо глутамата, малата и сукцината были использованы соединения дихолина сукцината (ДС) и никотинамида (НАМ).

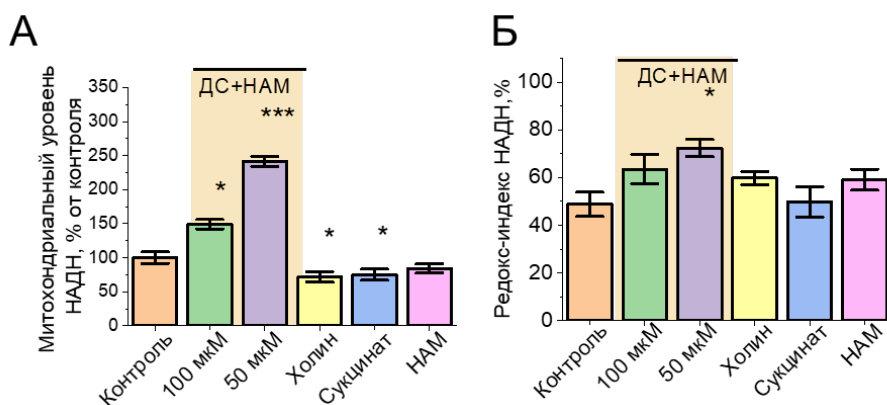




**Рисунок 12. Влияние митохондриальных субстратов и их комбинации на  $\Delta\Psi_m$  миотрубочек.** Инкубация клеточной культуры миотрубочек с субстратами. Длительная инкубация снижает  $\Delta\Psi_m$ , но добавление ДС+НАМ приводит к немедленному значительному увеличению  $\Delta\Psi_m$ .  
\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Влияние митохондриальных субстратов изучали после 24-часовой инкубации (рисунок 12). В скелетных миотрубочках 24-часовая инкубация с 5 мМ глутамата (глут.)+5 мМ малата (мал.), 5 мМ сукцината или никотинамида только глут.+мал. значительно повышала  $\Delta\Psi_m$  (129,5±11,4% от контроля). Комбинации митохондриальных субстратов ДС+НАМ в концентрациях 100 мкМ и 50 мкМ снижали  $\Delta\Psi_m$  после 24-часовой инкубации (46,4±1,5% от контроля). Однако применение 100 мкМ ДС+НАМ без предварительной инкубации вызвало значительное увеличение  $\Delta\Psi_m$  миотрубочек (333,8±4,4% от контроля).

Одним из способов оценки митохондриального метаболизма в живых клетках и тканях является измерение митохондриального окислительно-восстановительного индекса, или редокс-индекса (Bryanskaya et al., 2024; Vinokurov, Dremin, et al., 2021). Это можно сделать с помощью измерения автофлуоресценции НАДН или ФАД. Добавление ДС+НАМ к клеточной культуре в двух концентрациях (100 мкМ и 50 мкМ) приводило к увеличению редокс-индекса (63,5±6,2%; 72,4±3,6%) и митохондриального уровня НАДН по сравнению с контролем (150,2±7,0% от контроля; 241,4±7,7% от контроля) (рисунок 13 А, Б). Эксперименты с митохондриальными субстратами – холином, сукцинатом и НАМ – снижали уровень НАДН (71,7±7,6%; 74,9±8,2%; 84,0±6,7%) и редокс-индекс (59,8±2,6%; 49,7±6,4%; 59,1±4,4%) по сравнению с условиями использования комплекса веществ (рисунок 13). Это позволяет сделать вывод о том, что ДС+НАМ был гораздо эффективнее, чем однократное применение субстратов.

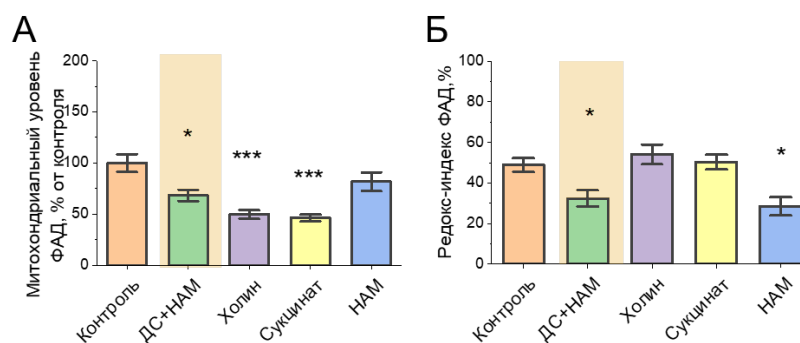


**Рисунок 13. ДС+НАМ повышает уровень митохондриального НАДН в скелетных миотрубочках.** Изменения митохондриального уровня НАДН (А) и редокс-индекса НАДН (Б) в миотрубочках после введения различных субстратов. Данные представлены как среднее±SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Таким образом, сочетание митохондриальных субстратов в виде ДС+НАМ в двух различных концентрациях вызывало увеличение уровня НАДН и окислительно-восстановительных показателей НАДН, в отличие от экспериментов, в которых применялся только один митохондриальный субстрат. Полученные данные могут свидетельствовать об активации энергетического метаболизма в миотрубочках при добавлении ДС+НАМ.

ФАДН входит в состав флавопротеинов, играющих важную роль донора электронов и субстрата митохондриального комплекса II. Таким образом, уровень ФАДН также свидетельствует о функциональности МХ (рисунок 14).

ФАД<sup>++</sup> обладает способностью к флуоресценции, которую мы использовали для оценки митохондриального уровня ФАД и редокс-индекса. 1 мкМ FCCP и 2 мМ КСН использовали для максимальной активации потребления ФАДН и его блокировки так же, как и при исследовании флуоресценции НАДН, за исключением того, что ответы зеркально отражали эффекты НАДН, поскольку ФАД автофлуоресцирует, а ФАДН<sub>2</sub> – нет (рисунок 14). Полученные данные позволили оценить биоэнергетическое состояние клеток по содержанию кофермента ФАД в миотрубочках. При добавлении ДС+НАМ наблюдалось снижение уровня ФАД (68,5±5,5%) и редокс-индекса (32,3±4,0%) по сравнению с контрольным экспериментом. Добавление митохондриальных субстратов холина и сукцината показало статистически значимое снижение уровня (49,7±4,2%; 46,3±3,2%), но при этом редокс-индекс не меняется при добавлении субстратов (рисунок 14 А, Б). Однако НАМ, являющийся предшественником кофермента комплекса I, приводит к статистически значимому снижению редокс-индекса (28,4±4,5%), тогда как уровень ФАД (81,8±9,2%) остается сопоставимым с контролем.

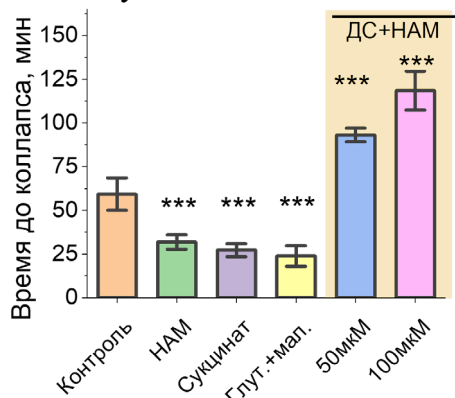


**Рисунок 14. Влияние митохондриальных субстратов на уровень ФАД и окислительно-восстановительный индекс в скелетных миотрубочках. Изменения уровня ФАД (А) или окислительно-восстановительного индекса ФАД (Б) в миотрубочках. Данные представлены как среднее±стандартная ошибка. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .**

Таким образом, комбинация митохондриальных субстратов в виде ДС+НАМ снижает уровень и редокс-индекс ФАД.

Энергетическая емкость клетки определяется как время между прекращением производства АТФ и моментом энергетического коллапса из-за полного истощения АТФ (рисунок 15) и неспособности поддерживать гомеостаз кальция (Abramov et al., 2007; Yao et al., 2011). Для оценки относительного базового уровня АТФ первичной культуры миоцитов использовали визуализацию живых клеток с помощью флуоресцентного зонда MagFura-2 AM. АТФ находится в клетках в виде магниево-

соли. При гидролизе АТФ из комплекса  $Mg^{2+}$ , АТФ высвобождается  $Mg^{2+}$ , поэтому измерение изменений в клеточном свободном магнии с помощью  $Mg^{2+}$  чувствительного флуоресцентного зонда MagFura-2 может быть использовано в качестве косвенного репортера скорости потребления АТФ (Leysens et al., 1996). Применение ингибиторов гликолиза и/или окислительного фосфорилирования блокирует производство АТФ в клетках, что приводит к утилизации имеющегося в клетке АТФ и последующему высвобождению  $Mg^{2+}$ . Помимо связывания с  $Mg^{2+}$ , зонд MagFura-2 также является низкоаффинным индикатором  $Ca^{2+}$ , что позволяет обнаружить высокий подъем цитозольного кальция в момент лизиса клетки, то есть энергетический коллапс, вызванный полным истощением АТФ в клетке и неспособностью клетки поддерживать гомеостаз  $Ca^{2+}$ . Это позволяет оценить энергетическую емкость клетки.



**Рисунок 15. Инкубация миотрубочек с субстратами митохондриального метаболизма изменяет энергетическую емкость этих клеток. Время от введения олигомицина и ИАА до коллапса миотрубочек. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. \*\*\*  $p < 0,0001$ .**

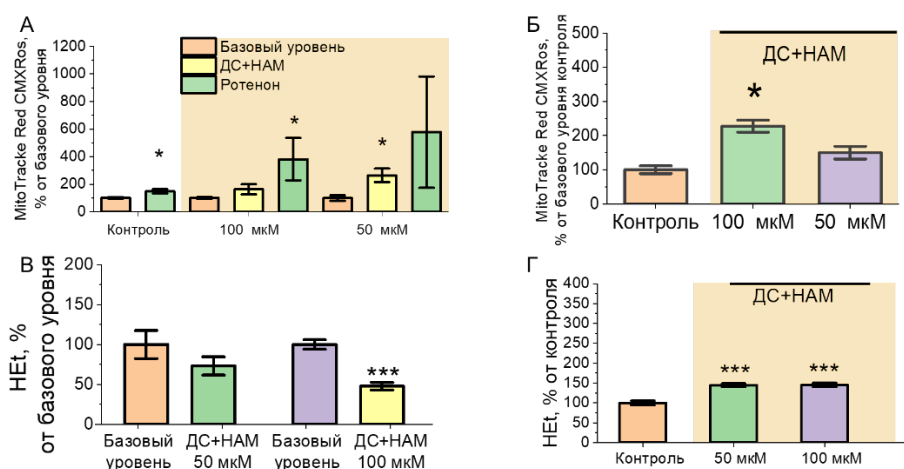
24-часовая инкубация миотрубочек с митохондриальными субстратами: НАМ, сукцинатом, глутаматом и малатом (рисунок 15) неожиданно снизила энергетическую емкость миотрубочек ( $31,9 \pm 0,8$  мин,  $27,2 \pm 0,8$  мин,  $23,9 \pm 1,2$  мин) по сравнению с контролем ( $59,2 \pm 1,8$  мин). Однако 24-часовая инкубация миотрубочек с комплексом митохондриальных субстратов ДС+НАМ в двух концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) увеличивала время коллапса клеток ( $93,1 \pm 0,8$  мин,  $118,5 \pm 2,2$  мин), что убедительно свидетельствует о повышении энергетической емкости этих клеток по сравнению с необработанными клетками. Таким образом, введение в клетки комбинации ДС+НАМ для энергетического метаболизма повышало уровень АТФ и увеличивало энергетическую емкость миотрубочек.

Производство АФК в МХ зависит от потенциала митохондриальной мембраны и метаболического состояния клеток (Angelova & Abramov, 2016). Учитывая глубокое влияние митохондриальных субстратов на  $\Delta\Psi_m$  митохондрий в миотрубочках, мы предположили, что они могут оказывать влияние и на продукцию АФК в митохондриях. В контрольных миоцитах применение ингибитора митохондриального комплекса I ротенона (5 мкМ) вызывало увеличение скорости продукции митохондриальной АФК (рисунок 16). Добавление ДС+НАМ к клеткам миотрубочек в ходе эксперимента привело к увеличению скорости продукции АФК в МХ миотрубочек при концентрации 100 мкМ ( $163,0 \pm 36,5\%$  от базового уровня) и еще большему увеличению продукции АФК при концентрации 50 мкМ ДС+НАМ ( $263,5 \pm 49,1\%$  от базового уровня). Последующее применение ротенона к этим клеткам вызвало дальнейшее увеличение скорости продукции АФК при 100 мкМ ДС+НАМ ( $381,9 \pm 154,5\%$  от базового уровня по сравнению с контролем  $148,7 \pm 14,2\%$ ) и в меньшей степени при 50 мкМ ДС+НАМ ( $175,0 \pm 42,7\%$  от базового уровня).

24-часовая инкубация миотрубочек с ДС+НАМ также приводит к увеличению скорости продукции АФК митохондриями в концентрации 100 мкМ ( $227,5 \pm 17,6\%$  от

контроля без обработки) или 50 мкМ ( $150,1 \pm 18,4\%$  от контроля) (рисунок 16). Длительная инкубация клеток с ДС+НАМ также усиливала ротенон-индуцированную продукцию АФК в МХ при концентрациях 100 мкМ ( $299,0 \pm 104,9\%$  от контроля) и 50 мкМ ( $300,3 \pm 55,9\%$  от контроля;) (рисунок 16).

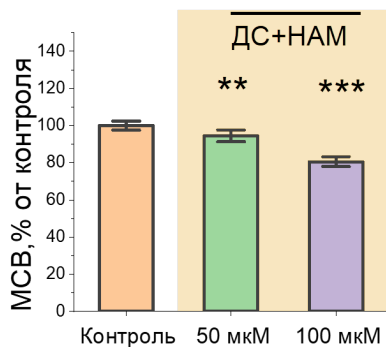
Митохондриальные субстраты могут влиять на АФК-продуцирующие ферменты не только в митохондриях, но и в цитозоле (Vinokurov, Stelmashuk, et al., 2021). Для оценки скорости продукции цитозольных АФК использовали флуоресцентный индикатор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для определения возможности активации выработки АФК добавляли комплекс ДС+НАМ в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ после регистрации базового уровня флуоресценции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рисунок 16). Применение ДС+НАМ в обоих случаях приводит к снижению уровня флуоресценции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Причем статистически значимое снижение скорости продукции АФК наблюдается при концентрации 100 мкМ ( $47,7 \pm 4,8\%$  от базового уровня).



**Рисунок 16. ДС+НАМ увеличивает продукцию митохондриальных и цитозольных АФК в скелетных миотрубочках.** Количественная оценка изменений в скорости продукции митохондриальных АФК без инкубации (А) и после 24-часовой инкубации с различными концентрациями ДС+НАМ (Б). Количественная оценка изменений в скорости продукции цитозольных АФК без инкубации (В) и после 24-часовой инкубации с различными концентрациями ДС+НАМ (Г) \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Однако 24-часовая инкубация миотрубочек с ДС+НАМ привела к противоположному эффекту (рисунок 16). Скорость продукции АФК увеличивалась при использовании ДС+НАМ в концентрации 50 мкМ ( $144,5 \pm 4,5\%$  от контроля,  $p < 0,0001$ ) и 100 мкМ ( $145,3 \pm 5,2\%$  от контроля) по сравнению с контрольными клетками.

Содержание GSH в миотрубочках определяли с помощью МСВ (рисунок 17) через 24 часа инкубирования с ДС+НАМ. Воздействие ДС+НАМ снижало уровень GSH: как при концентрации 50 мкМ ( $94,5 \pm 3,2\%$  от контроля), так и при концентрации 100 мкМ ( $80,6 \pm 2,6\%$  от контроля).

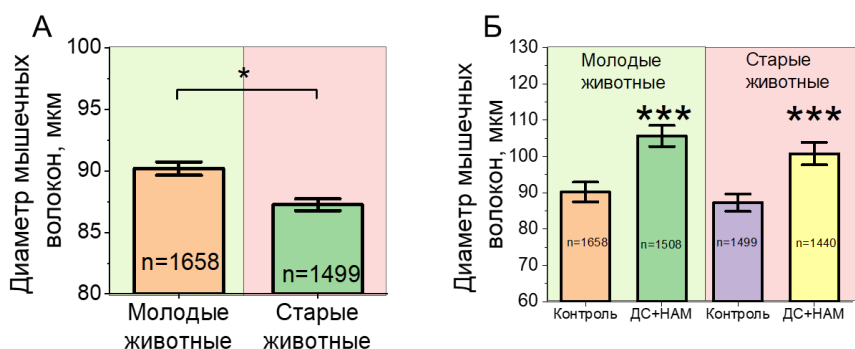


**Рисунок 17. Количественная оценка интенсивности флуоресценции GSH-MCV в миотрубочках. Инкубация с ДС+НАМ в течение 24 часов снижает уровень восстановленного глутатиона**  
 \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$

Таким образом, инкубация скелетных миотрубочек с энергетическими субстратами индуцирует продукцию АФК в МХ и цитозоле, но с минимальным влиянием на эндогенный антиоксидант GSH.

Систематическая интенсивная работа мышц способствует увеличению массы мышечной ткани. Это явление называется мышечной гипертрофией. В основе гипертрофии лежит увеличение массы цитоплазмы мышечных волокон, что приводит к увеличению диаметра каждого волокна. Одновременно с этим в мышцах активизируется синтез нуклеиновых кислот и белков, увеличивается содержание веществ, доставляющих энергию, используемую при сокращении мышц – АТФ и креатинфосфата, а также гликогена. В результате увеличивается сила и скорость сокращения гипертрофированной мышцы. Для оценки возможности митохондриальных субстратов снижать степень мышечной атрофии использовалась возрастная модель саркопении (Xie et al., 2021).

Животные получали ДС+НАМ через питьевую воду *ad libitum* в концентрации 100 мкМ в течение 7 дней. Для анализа диаметра мышечных волокон переживающие срезы поперечнополосатых мышц задних лап инкубировали в физиологическом растворе в присутствии флуоресцентного зонда Fluo-4 AM (5 мкМ) в течение 30 минут. Ожидается, что у животных в возрастной группе (рисунок 18 А) диаметр мышечных волокон меньше по сравнению с молодой группой, что согласуется со снижением мышечной массы с возрастом. В среднем диаметр мышечных волокон у 1-летних (молодая группа) крыс составил  $90,2 \pm 0,5$  мкм, что выше, чем в группе пожилых (1,5- летних, старая группа) животных  $87,2 \pm 0,5$  мкм ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 18. Комбинация ДС+НАМ увеличивает диаметр мышечных волокон у пожилых и молодых животных. А - Статистически значимая разница между диаметром мышечных волокон в двух группах. Б - Изменение диаметра мышечных волокон при лечении ДС+НАМ в питьевой воде *ad libitum* в концентрации 100 мкМ в течение 7 дней. Диаметр мышечных волокон статистически значимо увеличился в группах старых и молодых животных. \*\*\*  $p < 0,0001$**



В группах, получавших смесь субстратов, наблюдалось увеличение диаметра мышечных волокон по сравнению с контрольной группой до  $105,6 \pm 0,6$  мкм и  $100,7 \pm 0,6$  мкм для молодых и пожилых групп соответственно, что показано на рисунке 18 Б.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований было выявлено, что короткие фрагменты V-домена стимулируют RAGE-индуцированную продукцию АФК в НАДФН-оксидазе. Эти результаты подтверждают, что фермент НАДФН-оксидаза в клетках головного мозга может быть активирован RAGE и что продукция АФК этим ферментом играет роль в физиологической окислительно-восстановительной сигнализации, а не в индукции патологии и гибели клеток. Также было показано, что фрагменты V-домена RAGE защищают нейроны от Аβ-индуцированной токсичности (рисунок 4). Эти защитные эффекты могут быть вызваны связыванием пептида с Аβ и/или прямым связыванием пептида с RAGE. Активация НАДФН-оксидазы через RAGE в наших экспериментах приводила к снижению уровня GSH и активации ПОЛ, что может быть принято за окислительный стресс. Однако эта активация приводила к снижению гибели клеток и защите от гибели клеток Аβ. Защитный эффект короткого пептида проявляется через связывание с возможным агонистом RAGE (включая Аβ) и активацию RAGE после активации сигнального каскада и НАДФН-оксидазы, что менее вероятно при применении полного экзогенного пептида RAGE.

Также было показано, что дефицит HPRT1 приводит к изменениям в митохондриальном метаболизме, что приводит к изменению не только величины ΔΨ<sub>m</sub>, но и механизма поддержания потенциала за счет частичной компенсации дисфункции ЭТЦ работой АТФ-синтазы в противоположном направлении (рисунок 5). По нашим данным, дефицит HPRT1 приводит к ингибированию митохондриального комплекса I, что было подтверждено в экспериментах с изолированными МХ мозга, и снижению потребления митохондриального НАДН. Гиперпродукция митохондриальных АФК в HPRT1-дефицитных клетках типична для клеток с ингибированием комплекса I и осуществляется в ЭТЦ несколькими потенциальными механизмами, включая обратный поток электронов. Цитозольная продукция АФК в HPRT1-дефицитных кортикальных нейронах и астроцитах (рисунок 8) потенциально может быть связана с повышенным уровнем ксантина, который приводит к продукции супероксид аниона в ксантиноксидазе, аналогично тому, как он образуется в нейронах при ишемии. Несмотря на относительно высокую продукцию АФК в МХ и цитозоле HPRT1-дефицитных клеток, она не вызывала снижения уровня GSH и дальнейшего развития окислительного стресса. Одним из возможных объяснений этого эффекта может быть способность мочевой кислоты утилизировать пероксинитрит и, возможно, супероксид анион, что в некоторых исследованиях обеспечивало нейропротекцию при гипоксии. Он также может быть вызван повышением уровня НАДФН, что было показано при дефиците HPRT1, который может привести к увеличению синтеза GSH. Таким образом, нарушение энергетического метаболизма нейронов и астроцитов среднего мозга, вызванное дефицитом HPRT1, может привести к энергетическому голоданию в условиях потребления АТФ (например, при чрезмерном воздействии глутамата или ишемии) и стать основным пусковым механизмом развития патологии.

Совокупность полученных данных об уровне GSH в тканях исследованных животных с различной комбинацией нокаута генов белков синуклеинов позволяет говорить о весьма сложной регуляции окислительно-восстановительного баланса с участием синуклеинов и высокой взаимосвязи между их функциями, в результате

чего связанные с мутациями отсутствие или дисфункция одного из синуклеинов может привести к компенсации со стороны другого или, наоборот, стать причиной патологических процессов, приводящих к нарушениям состояния клеток. Так, в случае отсутствия только  $\gamma$ -синуклеина (рисунок 10), регуляция окислительно-восстановительного баланса не нарушается, что может говорить об отсутствии его вклада в работу, связанную с продукцией и утилизацией АФК. Однако в данные процессы вовлечены  $\alpha$ - и  $\beta$ -синуклеины. При отсутствии хотя бы одного из них в организме происходит снижение уровня GSH. Это может свидетельствовать как об изменении продукции АФК, так и о нарушении работы антиоксидантной системы/Эффект двойного нокаута  $\alpha$ - и  $\gamma$  синуклеина, вероятно, связан с нарушениями обеспечения антиоксидантной системы клеток, что выражается в превалировании образования АФК над их нейтрализацией. Более детальное изучение механизмов, в которые вовлечены  $\alpha$ -и  $\beta$ -синуклеин показывают влияние данных белков на работу основных источников продукции АФК – НАДФН-оксидазы и MAO (рисунок 11). Вовлеченность  $\alpha$ -синуклеина в работу НАДФН-оксидазы, а  $\beta$ -синуклеина – MAO указывает на сложные процессы внутриклеточной регуляции, связанные с компенсацией изменения продукции АФК антиоксидантной системой.

При исследовании возрастной саркопении было показано, что всего за семь дней поддерживающего питания животных с ДС+НАМ увеличивается диаметр волокон как у крыс среднего возраста, так и у пожилых крыс. Следует отметить, что хотя ДС+НАМ увеличивает диаметр миотрубочек у животных обоих возрастов, наиболее важным является вывод о том, что возрастная саркопения может быть связана с недостатком энергии и частично компенсирована с помощью энергетических субстратов. Интересно, что комбинация субстратов энергетического метаболизма (ДС+НАМ) гораздо эффективнее по сравнению с использованием отдельных компонентов или других субстратов. Вероятно, это можно объяснить более низкой проницаемостью плазматических мембран для сукцината. Следует отметить, что влияние ДС+НАМ на большинство оцениваемых параметров зависит от концентрации. Более выраженный эффект 50 мкМ смеси субстратов был выявлен при остром применении (исключая измерения  $\Delta\Psi_m$ ), в то время как после 24-часовой инкубации 100 мкМ ДС+НАМ оказывали более стимулирующее действие, особенно в случае времени до коллапса клеток при блокировании гликолиза и окислительного фосфорилирования (рисунок 12), указывающего на энергетическую емкость АТФ. Сравнение полученных данных с результатами аналогичных исследований с нейронами показывает более высокую чувствительность миотрубочек к добавке ДС+НАМ, что связано с высокой метаболической пластичностью мышечных клеток. Хотя в наших экспериментах усиление энергетического метаболизма приводило к увеличению продукции АФК в МХ и цитозоле миотрубочек, это может оказывать регулирующее влияние на энергетический метаболизм и активность миотрубочек.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что активация RAGE в клетках мозга активирует НАДФН-оксидазу и продукцию АФК, играя важную роль в окислительно-восстановительной сигнализации. Короткие пептиды из V-домена RAGE способны стимулировать продукцию АФК, не вызывая гибели клеток, и проявляют защитные свойства против А $\beta$ -токсичности. Активация НАДФН-оксидазы через RAGE может способствовать изменению окислительно-восстановительного баланса, приводя к снижению клеточной гибели, предполагая потенциальную физиологическую роль этой системы в нейропротекции.

2. Дефицит HPRT1 вызывает заметные изменения в митохондриальном метаболизме. Изменения затрагивают как величину  $\Delta\Psi_m$ , так и механизмы его поддержания, включая переход к частичной компенсации активности ЭТЦ через использование АТФ, в основном образующегося в результате гликолиза. Также установлено, что перепроизводство АФК в HPRT1-дефицитных клетках происходит при ингибировании комплекса I, однако этот процесс не сопровождается снижением уровня восстановленного глутатиона и окислительным стрессом, что может быть связано с защитными свойствами мочевой кислоты и повышением уровня НАДФН.

3. Впервые было показано, что генетическая инактивация генов, связанных с производством,  $\alpha$ - и  $\beta$ - синуклеинов приводит к увеличению продукции АФК и уменьшению восстановленного глутатиона в клетках и тканях среднего мозга. Ингибиторный анализ показал зависимость уровня восстановленного глутатиона в клетках без  $\alpha$ -синуклеина от НАДФН-оксидазы, а при отсутствии  $\beta$ -синуклеина – от моноаминоксидазы

4. Было показано, что применение как отдельных компонентов митохондриальных субстратов (глутамат, сукцинат, никотинамид), так и в комбинации (дихолина сукцината и никотинамида) улучшает энергетический метаболизм мышечных клеток. Увеличение  $\Delta\Psi_m$ , изменение редокс-индекса НАДН и ФАД приводит к повышению энергетической емкости скелетных миоцитов. Помимо этого, сопутствующее увеличение продукции АФК в митохондриях и цитозоле не приводило к значительному снижению уровня восстановленного глутатиона и, напротив, при длительном применении на группах животных приводило к увеличению диаметра мышечных волокон.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. **Seryogina E.S.**, Kamynina A. V., Koroev D.O., Volpina O.M., Vinokurov A.Y., Abramov A.Y. (2024) RAGE induces physiological activation of NADPH oxidase in neurons and astrocytes and neuroprotection. *FEBS Journal*, p. 1–14. <https://doi.org/10.1111/febs.17086>

2. Vinokurov A.Y., Soldatov V.O., **Seregina E.S.**, Dolgikh A.I., Tagunov P.A., Dunaev A. V. et al. (2023) HPRT1 Deficiency Induces Alteration of Mitochondrial Energy Metabolism in the Brain. *Molecular Neurobiology*, Springer. **60**, p. 3147–57. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03266-2>

3. **Серёгина Е.С.**, Стельмашук О.А., Пьявченко Г.А., Алексеев А.Г., Воробьёв Е.В., Кузнецова Е.А. et al. (2018) Оценка влияния янтарной кислоты и соединений цинка на параметры метаболизма головного мозга крыс методом флуоресцентной спектроскопии. *Технологии Живых Систем*, **15**, с. 37–46.

### Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

4. **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю., Абрамов, А.Ю. (2023) Изучение роли рецептора RAGE в патогенезе нейродегенерации. *Современные Методы Исследования в Клеточной Биологии и Медицине: Сборник Трудов Всероссийской Конференции, г Орёл: ОГУ Имени ИС Тургенева*, с. 23.

5. Винокуров, А.Ю., **Серёгина, Е.С.**, Камынина, А.В., Абрамов, А.Ю. (2023) Роль селективной активации рецептора конечных продуктов гликирования в изменении окислительно-восстановительного баланса и обеспечении жизнеспособности клеток головного мозга. *Нейрокампус 2023: Эволюция Нейротехнологии Будущего Тезисы Участников Конференции*, с. 36–40.



6. **Серёгина Е.С.**, Винокуров А.Ю., Чапров К.Д., Абрамов А.Ю. (2023) Изучение вклада различных источников АФК в редокс-баланс клеток головного мозга мышей с нокаутом генов синуклеинов. *Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация Сборник Статей Том 1*, с. 496–501.
7. **Серёгина, Е.С.**, Ляхова, О.Л. (2022) Роль синуклеинов в редокс-регуляции сигналов в тканях головного мозга. *Клеточные Технологии в Экспериментальной Медицине: Сборник Научных Трудов По Материалам II Международной Научно-Практической Конференции*, с. 63–5.
8. Долгих, А.И., Тагунов, П.А., **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю. (2022) Роль Rage-рецепторов в клеточной смерти, индуцируемой  $\beta$ -амилоидом. *Клеточные Технологии в Экспериментальной Медицине: Сборник Научных Трудов По Материалам II Международной Научно-Практической Конференции*, с. 66–68.
9. **Серёгина, Е.С.**, Уколова, П.А., Палалов, А.А., Чапров, К.Д., Дунаев, А.В. (2022) Роль синуклеинов в редокс сигнале клеток головного мозга. *25-Ая Пушкинская Школа-Конференция Молодых Ученых с Международным Участием «Биология – Наука XXI Века»*, с. 330.
10. Долгих, А.И., Тагунов, П.А., **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю. (2022) Роль RAGE-рецепторов в окислительно-восстановительном балансе клеток мозга. *Фундаментальная и Прикладная Медицина Материалы Всероссийской Конференции Молодых Ученых Редколлегия: СИ Куреев (Отв Редактор), АС Фалькович, АВ Полиенко*, с. 98–9.
11. Kozlov, I.O., Serov, D.A., **Seryogina, E.S.**, Astashev, M.E., Tankanag, A. V., Chaprov, K.D. et al. (2022) Oscillation processes in synuclein-KO mouse skin microcirculation: a pilot study. In: Genina EA., Tuchin V V., editors. *Optical Technologies for Biology and Medicine*, SPIE. p. 42. <https://doi.org/10.1117/12.2626412>
12. Palalov, A.A., Gorlin, P.M., **Seryogina, E.S.**, Gorbunova, M. V., Alekseev, A.G., Zherebtsov, E.A. et al. (2021) NADH growth rate evaluation in different rat brain regions by fluorescence spectroscopy. In: Tuchin V V., and Genina EA, editors. *Saratov Fall Meeting 2020: Optical and Nanotechnologies for Biology and Medicine*, SPIE. p. 44. <https://doi.org/10.1117/12.2590803>
13. **Серёгина, Е.С.**, Уколова, П.А., Винокуров, А.Ю., Дунаев, А.В., Абрамов, А.Ю. (2021) Перепродукция активных форм кислорода в фибробластах с мутацией PINK1. *Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация Сборник Статей*, с. 141–5.
14. **Серёгина, Е.С.**, Волтов, А.А., Ветров, И.А., Шуплецов, В.В., Брянская, Е.О., Абрамов, А.Ю. (2020) Исследование содержания митохондриальных форм надн в тканях отделов головного мозга крыс. В Сборнике: *Физика и Радиоэлектроника в Медицине и Экологии - ФРЭМЭ'2020 Труды XIV Международной Научной Конференции с Научной Молодежной Школой Им ИИН Спиридонова*, с. 89–92.
15. Пьявченко, Г.А., Алексеев, А.Г., **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Жеребцов, Е.А., Кузнецова, Е.А. et al. (2019) Оценка токсического действия сукцината цинка на крыс-самцов линии Wistar. *Сборник Статей Всероссийской Юбилейной Научно-Практической Конференции с Международным Участием Посвященной 100-Летию ОГУ Имени ИС Тургенева и 20-Летию Медицинского Института «Андреевские Чтения Трансляционная Медицина Опыт Научных Исследований в Клине, ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»*, Орёл. с. 460–4.
16. **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А., Воробьев, Е.В., Кузнецова, Е.А., Алексеев, А.Г. et al. (2018) Оценка влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы клеток головного мозга методом флуоресцентной спектроскопии. *Физика и Радиоэлектроника в Медицине и Экологии*

*Труды XIII Международной Научной Конференции с Научной Молодежной Школой Имени ИИ Спиридонова В 2-х Книгах, с. 62–6.*

17. **Серёгина, Е.С.,** Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А., Алексеев, А.Г., Воробьёв, Е.К., Кузнецова, Е.А. et al. (2018) Применение флуоресцентной спектроскопии для оценки влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы коры головного мозга. *БИОЛОГИЯ -НАУКА XXI ВЕКА: 22-я Международная Пуцинская Школа-Конференция Молодых Ученых, 23-27 Апреля 2018 г, с. 235.*

18. **Серёгина, Е.С.,** Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А. (2018) Оценка функционального состояния структур коры головного мозга при помощи флуоресцентной спектроскопии. *Труды VII Всероссийского Конгресса Молодых Ученых.*

19. **Seryogina, E.,** Stelmashchuk, O., Piavchenko, G. (2017) Fluorescence spectroscopy usage possibilities for the laboratory rats metabolism evaluation. *Summer School on Optics & Photonics 2017 - Book of Abstract (June 1-3).*

20. **Серёгина, Е.С.,** Стельмашук, О.А. (2017) Возможности применения флуоресцентной спектроскопии для оценки метаболических процессов лабораторных крыс. *Труды Международной Научной Конференции Студентов, Аспирантов и Молодых Ученых «Ломоносов - 2017».*