УДК 576.08

МЕТОДОЛОГИЯ КОЛОКАЛИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ НА ПРИМЕРЕ МИТОФАГИИ В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

ПАЛАЛОВ А.А.[1], МАХМАТЗАМОНОВА А.В.[1], ЗАТОЛОКИНА М.А.[1,2], ВИНОКУРОВ А.Ю.[1]

[1]Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орёл, Россия, d.alexanderpalalov@yandex.ru

[2]Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия

Колокализационный анализ – распространенный метод в биомедицинских исследованиях, позволяющий оценить взаиморасположение различных белков, органелл или других внутриклеточных компонентов. Ввиду низкой воспроизводимости качественной оценки колокализации, был предложен ряд коэффициентов для количественного анализа. Наиболее часто используются коэффициент пространственной колокализации (CC), взвешенный коэффициент колокализации Мандерса (MCC), коэффициент корреляции Пирсона (PCC), коэффициент перекрытия Мандерса (MOC). При этом выбор конкретного метода является предметом дискуссии. Также следует отметить, что использование дополнительного программного обеспечения, усиливающего разрешающую способность (например, Airyscan), может затруднить оценку колокализации.

В качестве примера колокализационного анализа методом конфокальной микроскопии оценивался уровень митофагии в клетках первичной нейроглиальной культуры (в контрольной линии и после добавления индуктора митофагии CCCP, 100 μM), фибробластах (в контрольной культуре и в культуре с дефектом PINK1/Parkin, каноничных регуляторов митофагии) и MDCK (в контрольной культуре в конфокальном режиме и с помощью системы Airyscan 2). Митофагию оценивали с помощью колокализации зондов MitoTrackerGreen FM и LysoTrackerRed DND-99, окрашивающих митохондрии и лизосомы. Для более объективной оценки Threshold устанавливался по методу Costes. Расчет коэффициентов производили в программе ZEN 3.1 и ImageJ.

При оценке митофагии с использованием CCCP в клетках первичной нейроглиальной культуры, статистически значимая разница была получена только с использованием PCC (0,2±17 vs 0,5±0,3, $p<0,05$), тогда как CC, MCC и MOC не выявили различий между экспериментальной и контрольной группами. В фибробластах статистически значимая разница между контрольной культурой и культурой с заведомо дефектной митофагией (PINK/Parkin) была выявлена с помощью PCC (0,09±0,12 vs 0,18±0,12, $p<0,05$) и MOC (0,51±0,18 vs. 0,55±0,17, $p<0,05$), CC и MCC не продемонстрировали различий. В культуре MDCK при оценке колокализации с помощью конфокальной микроскопии и с дополнительным использованием системы Airyscan 2 (снимки осуществлялись в одних и тех же полях зрения) была обнаружена статистически значимая разница для всех перечисленных коэффициентов.

По результатам исследования, наиболее достоверным при изучении митофагии с помощью колокализации флуоресцентных зондов, является PCC, менее надежным – MOC (продемонстрировавший статистически значимую разницу лишь в одном измерении). CC и MCC не выявили различий между выборками с заведомо различным уровнем митофагии. Также использование Airyscan существенно повлияло на все изученные коэффициенты, что ставит под сомнение возможность применения данной системы при расчете параметров колокализации. Полученные данные могут быть использованы при выборе метода колокализационного анализа для некоторых задач клеточной биологии.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2022-1095.

© Палалов А.А., Махматзамонова А.В., Затолокина М.А., Винокуров А.Ю., 2023