

IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЯ УВЕЛИЧЕНИЯ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФАД КАК СИГНАЛА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИИ, ПРИВОДЯЩЕЙ К ГИБЕЛИ КЛЕТОК

БРЯНСКАЯ Е.О.¹, ВИНОКУРОВ А.Ю.¹, ДУНАЕВ А.В.¹, АНГЕЛОВА П.Р.²,
АБРАМОВ А.Ю.^{1,2}

¹Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орёл, Россия,
bryanskayae@mail.ru

²UCL Queen Square Institute of Neurology, г. Лондон, Великобритания

В настоящее время оптическая визуализация с использованием эндогенной автофлуоресценции является одним из самых безопасных способов изучения метаболического статуса клеток и динамических изменений функций клеток и тканей как *in vitro*, так и *in vivo*.

Наиболее важными обуславливающими автофлуоресценцию хромофорами являются никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), флавинадениндинуклеотид (ФАД), ароматические аминокислоты и некоторые белки. Согласно литературным источникам, клетки в разных физиологических состояниях имеют разные уровни интенсивности автофлуоресценции ФАД. При этом высокий уровень сигнала может служить диагностическим критерием для выявления клеток с различным типом патологии.

В качестве объекта исследования выбраны первичная совместная культура нейронов и астроцитов и фибробласты кожи человека. Автофлуоресценцию ФАД контролировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 900. Для возбуждения использовалась линия аргонового лазера с длиной волны 488 нм, а флуоресценцию излучения в интервале 505-550 нм.

Чтобы определить, повреждены или мертвы клетки с высоким уровнем автофлуоресценции ФАД, применялся йодид пропидия. Для выявления клеток с апоптозом использован флуоресцентный субстрат для каспазы-3 – NucView 488. Было установлено, что на начальном этапе появление высокой автофлуоресценции ФАД характерно для интактных клеток без экспериментально обнаруживаемых признаков некроза или апоптоза.

Однако изученные на первом этапе клетки демонстрировали активацию клеточной смерти путем апоптоза или некроза в течение 24 часов после первоначальных измерений. Так, например, обнаружено, что процент некротических клеток в первичной смешанной культуре кортикальных нейронов и астроцитов был равен $59\pm 7\%$ и $56\pm 5\%$ соответственно.

При этом очень высокая автофлуоресценция ФАД является результатом гиперактивации комплекса II митохондриальной электронтранспортной цепи и активности моноаминоксидаз. Так, митохондриальный уровень ФАД был примерно в 2,5 раза выше в нейронах, астроцитах и фибробластах с более высоким общим сигналом ФАД. Повышенный уровень доли окисленной формы кофермента свидетельствовал об увеличении потребления ФАДН₂ и ускорении митохондриального дыхания, связанного с комплексом II. Следует также отметить, что уровень ФАД, связанного с МАО (определенный по снижению автофлуоресценции при применении моноаминов), в клетках с повышенной общей автофлуоресценцией ФАД был выше по сравнению с клетками с более низкой общей автофлуоресценцией ФАД.

Таким образом, высокий уровень ФАД в клетках может быть использован в качестве маркера патологии, которая приводит к гибели клеток. Предложенный подход имеет важные преимущества для ранней диагностики заболеваний (например, патологий тканей ротовой полости), включая неинвазивность, высокую чувствительность и безопасность.

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