

Высокая интенсивность автофлуоресценции ФАД как индикатор для выявления клеточной патологии

Брянская Е.О.^{1*}, Долгих А.И.¹, Винокуров А.Ю.¹, Дунаев А.В.¹

¹Лаборатория клеточной физиологии и патологии научно-технологического центра биомедицинской фотоники, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева;
bryanskayae@mail.ru

Оптическая визуализация с использованием эндогенной флуоресценции ФАД, который участвует в процессах окисления жирных кислот, цикле Кребса и других окислительно-восстановительных реакциях, является одним из перспективных способов изучения метаболического статуса клеток. Возможность простого и неинвазивного определения ФАД основана на его автофлуоресценции, имеющей спектр возбуждения в диапазоне длин волн 350-500 нм с двумя пиками - при 370 и 450 нм, а спектр излучения приходится на область 500-600 нм с максимумом при 525 нм.

Согласно литературным источникам, клетки в разных физиологических состояниях имеют разные уровни интенсивности ФАД в зелено-синем спектре. Для определения физиологического состояния клеток по разнице в интенсивности сигнала ФАД в данной работе изучалась клеточная культура фибробластов кожи, после 20-дневного культивирования в питательной среде на основе DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% фетальной бычьей сыворотки (Biological Industries LTD, Израиль), пенициллин (100 ед/мл) (Gibco, США), стрептомицин (100 мкг/мл) (Gibco, США), в CO₂-инкубаторе (Thermo Scientific) при 37°C, относительной влажности 100% и содержании CO₂ 5% (Eppendorf AG). Исследования проводились с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss AG, Германия) при длине волны 488 нм.

На первом этапе исследования производилась посадка фибробластов на покровные стекла толщиной 0,5 мм с предварительно нанесенной сеткой для определения местоположения отдельных клеток. Как показывает выполненный анализ, в клеточной культуре присутствовали клетки как с высокой, так и с низкой интенсивностью флуоресценции. Это можно было бы объяснить тем фактом, что клетки имели разный метаболический статус и находились на разных стадиях развития. Это позволило на основе интенсивности сигнала автофлуоресценции разделить клетки на две подгруппы: – с высоким сигналом автофлуоресценции (предположительно стареющие или патологические) и клетки с низким сигналом.

Спустя 24 часа долю некротических в культуре клеток анализировали с помощью двойного окрашивания Hoechst 33342 (5 мкм) и йодидом пропидия (20 мкм) в течение 30 мин при 37°C. Для подсчета общего количества клеток использовали Hoechst 33342, который окрашивает ядра клеток в любом физиологическом состоянии. Йодид пропидия, не способный проникать через целые мембраны и окрашивать жизнеспособные клетки, применяли для окрашивания и подсчета некротических клеток.

Согласно полученным данным, доля некротических клеток среди клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции ФАД составила 47,4%, тогда как среди клеток с низким сигналом автофлуоресценции ФАД – 27,3%. Интенсивный сигнал ФАД может быть связан с сильно окисленным состоянием кофермента, входящего в структуру окислительно-восстановительных ферментов.

На следующем этапе исследования для определения структуры сигнала ФАД производилось поочередное внесение растворов адренилина (10 мкМ) для активации моноаминоксидазы (МАО-А), селегиллина (20 мкМ) для ингибирования данного фермента, FCCP (2 мкМ), который является протонофором и приводит к разобщению дыхания митохондрий, а после – KCN (1мМ), который является ингибитором комплекса IV электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). Это позволило определить уровень сигнала ФАД, связанного с МАО, а также общий пул ФАД комплекса II митохондрий. Было выявлено, что у клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции уровень МАО составил $12,3\% \pm 2,1$ от общего сигнала автофлуоресценции, тогда как у клеток с низкой интенсивностью – $6,4\% \pm 0,9$. Сочетание в клетках более высокого уровня пула МАО и пониженного уровня пула митохондриального ФАД может быть следствием образования при окислительном дезаминировании моноаминов соответствующих альдегидов, которые, как показывает анализ литературы, могут ингибировать сукцинатдегидрогеназу, в результате чего экспрессия данного фермента снижается. Таким образом, можно сделать вывод о нарушении работы комплекса II ЭТЦ.

Таким образом, данное исследование показывает возможность ранней диагностики различных заболеваний путем обнаружения сигнала автофлуоресценции ФАД и обнаружения клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции, которые преимущественно некротизированы. Низкий уровень жизнеспособности клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции в зелено-синем спектре может служить маркером, позволяющим осуществлять раннюю диагностику различных заболеваний, определяя точную локализацию и распространенность патологии в ткани. При этом повышенный сигнал ФАД обусловлен высокой активностью МАО, что позволяет в дальнейшем найти инструменты воздействия на данный фермент, предотвращая развитие патологического состояния клеток. Предложенный подход имеет важные преимущества,

включая неинвазивность, высокую чувствительность, безопасность и может быть применен для ранней диагностики различных заболеваний и мониторинга реакции пациентов на терапевтические вмешательства, в том числе в режиме реального времени.

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

Дальний транспорт в регуляции фотосинтеза у харовых водорослей

Алова А.В.^{1*}, Булычев А.А.¹, Черкашин А.А.¹, Крупенина Н.А.¹, Шапигузов С.Ю.¹, Еремин А.², фон Рюлинг Ф.², Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

²Университет им. Отто фон Герике в Магдебурге, Институт Физики;

annaalova@gmail.com

Фотосинтез тесно связан с дальним транспортом и межклеточным распределением ассимилятов и сигнальных молекул. Дальний перенос веществ и преодоление межклеточных барьеров могут служить узким звеном в общем процессе и лимитировать фотосинтетическую продукцию. Наличие множественных межклеточных барьеров в листьях высших растений лимитирует латеральный обмен реагентами и продуктами реакций между клетками мезофилла. По этой причине начальные стадии (при $t < 10$ с) индукционных изменений флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл), измеряемые на ограниченном участке листа, не зависят от освещения или затемнения окружающих областей. Вместе с тем, измерения Фл Хл на временах 100–400 с при широком и узком поле освещения препарата позволяют выявить индукционные процессы фотосинтеза, связанные с дальними межклеточными взаимодействиями. В гигантских клетках харовых водорослей воздействие дальнего транспорта метаболитов на фотосинтез и Фл Хл должно быть особенно заметным, поскольку перенос в латеральном направлении (параллельно слою неподвижных хлоропластов) облегчен за счет быстрого ротационного течения цитоплазмы. Однако до настоящего времени не определены расстояния, на которые могут распространяться фотометаболиты с потоком цитоплазмы, нет достаточных сведений о роли дальних взаимодействий хлоропластов в индукции Фл Хл. Мало что известно о селективности транспорта метаболитов через межклеточные поры плазмодесмы. Данная работа посвящена выявлению роли дальнего внутри- и межклеточного транспорта в регуляции процессов фотосинтеза.

Дальний транспорт и дистанционные взаимодействия при фотосинтезе можно изучать по изменениям Фл Хл в ответ на локальное освещение участков растительного объекта, расположенных вдали от микрообласти регистрации Фл. Второй подход состоит в сравнении индукционных изменений Фл Хл при разной площади освещения объекта с использованием узкопольного и широкопольного освещения. Расхождения индукционных кривых Фл в этих вариантах обусловлены обменом метаболитов между областью измерения флуоресценции (ОИФ) и прилегающими частями исследуемого объекта. В данной работе эти подходы были применены для изучения дальних внутриклеточных и межклеточных взаимодействий в междуузлиях водорослей *Chara australis* и *Nitelloporosis obtusa*.

Показано, что фотометаболиты, экспортируемые из хлоропластов в области яркого локального освещения, распространяются с потоком цитоплазмы на расстояния до 10 мм и вызывают сравнительно быстрые переходное возрастание Фл Хл в ОИФ спустя долгое время (~120 с) после завершения светового стимула. Поскольку водоросли *N. obtusa* устойчивее к засолению, чем *C. australis*, мы предполагаем, что микрофлюидная сигнализация действует как у чувствительных, так и у устойчивых к действию солей харофитов.

Показано, что индукционные изменения Фл Хл, вызываемые освещением всей клетки, резко отличаются от варианта с освещением только ОИФ и прилегающих площадей, однако эти различия исчезают после остановки движения цитоплазмы в присутствии цитохалазина D. Для выяснения роли светозависимых транспортеров оболочки хлоропластов в индукционных изменениях Фл Хл использовали переходы от зонального (локального) к общему освещению препарата. Показано, что при таком переходе стадия S-M-T в индукционной кривой Фл определяется как внутренними процессами в хлоропластах ОИФ, так и обменом метаболитами между ОИФ и участками, лежащими за пределами этой области. Амплитуда и положение стадии S-M-T зависели от состояния активируемых светом ферментов, которые участвуют в транспорте фотометаболитов через мембраны оболочки хлоропластов. Установлено, что экспорт фотометаболитов из хлоропластов после перехода темнота-свет начинается значительно (на 50–60 с) раньше, чем поступление метаболитов из цитоплазмы в строму. Результаты указывают на участие дальних взаимодействий в индукционных переходах при фотосинтезе.

Проведены количественные оценки проникновения фотометаболитов через плазмодесмы *Chara*. Показано, что воздействие интенсивного локального светового импульса при низкой и повышенной интенсивностях фонового освещения вызывает появление в потоке цитоплазмы метаболитов двух типов, вызывающих