

УДК 57.085.23, 577.359

ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЛАВОПРОТЕИНОВ В УРОВЕНЬ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФАД МЕТОДОМ FLIM

Попов Д.Ю. (ОГУ им. И.С. Тургенева), Горюнов И.А. (ОГУ им. И.С. Тургенева),
Шуплецов В.В. (ОГУ им. И.С. Тургенева)

Научный руководитель – кандидат технических наук, Винокуров А.Ю. (ОГУ им. И.С.
Тургенева)

Введение. В середине прошлого века была установлена связь между состоянием окислительно-восстановительных ферментов и эффективностью метаболизма митохондрий *in vitro*, что положило основу для использования баланса в редокс-процессах для оценки состояния биологических систем [1]. Среди различных клеточных коферментов весьма надежными индикаторами клеточного метаболизма являются ФАД и НАДН, поскольку они, с одной стороны, выступают основными переносчиками электронов в метаболических окислительно-восстановительных реакциях, а с другой способны к автофлуоресценции соответственно в сине-зеленой и синей области спектра [2]. В связи с этим методы оценки автофлуоресценции биологических молекул сегодня используется в биологии и медицине как для фундаментальных исследований, так и для решения задач диагностики [3]. Так показано, что уровень автофлуоресценции ФАД может давать информацию о состоянии клеточного метаболизма и/или развитии патологического состояния клеток [4]. Поскольку ФАД входит в состав многих белковых агрегатов, например, сукцинатдегидрогеназы, являющейся комплексом II дыхательной цепи; электронпереносящего флавопротеина (ETF), участвующего в реакциях окисления жирных кислот; моноаминоксидазы (МАО), регулирующей метаболизм моноаминов и др., это может вызывать сложности в случае оценки отдельных элементов, вносящих вклад в общий сигнал автофлуоресценции ФАД. Существуют методы, основанные на использовании ингибиторного анализа, позволяющие вычлнить из общей массы отдельный ФАД-содержащий компонент для оценки его состояния *in vitro* [5]. Учитывая это, актуальной задачей является возможность неинвазивной оценки вклада отдельных флавопротеинов в общий уровень сигнала автофлуоресценции ФАД *in vivo* время-разрешенными флуоресцентными методами.

Основная часть. Время-разрешенная флуоресценция – один из современных подходов в арсенале методов визуализации с богатой историей [6]. Сегодня выделяется два основных подхода измерения флуоресценции с временным разрешением: регистрация времени жизни во временной (TD) и частотной областях (FD). При измерениях в частотной области существует ряд преимуществ: высокая скорость передачи пикселей, реализованная за счет параллельного детектирования камерой пикселей при синхронизации с источником излучения, что совместно с методами обработки сигнала позволяет получать изображения в реальном времени; вычитание фоновых сигналов, вызванных внутренней флуоресценцией оптических компонентов или несовершенством электрического экранирования; динамический диапазон, обеспечиваемый обработкой сигнала, который позволяет визуализировать образцы с большим разбросом интенсивности флуоресценции [7]. Однако, неразрешенными остаются вопросы по соотношению параметров, получаемых при регистрации времени жизни TD и FD методами.

На первом этапе нашего исследования мы оценивали автофлуоресценцию, используя оба подхода для оценки коррелированности параметров, получаемых TD и FD методами. В качестве первого применяли метод время-коррелированного счета одиночных фотонов, реализованный на базе модуля счета фотонов SPC-130-EMN (Becker&Hickl, Германия), а для второго использовали камеру для визуализации времени жизни флуоресценции pco.flim (PCO AG, Германия), реализующую измерения в частотной области с модуляцией возбуждающего излучения на частоте 40 МГц. Первые исследования проведены на суспензии митохондрий, т.к. она представляет собой относительно простую модель, поскольку содержит два основных белка, содержащих ФАД – комплекс II и МАО. Были использованы химические соединения,

который позволили максимизировать или, наоборот, минимизировать вклад в флуоресценцию отдельных ФАД-содержащих комплексов: FCCP, разобщитель митохондрий, для ускорения дыхания митохондрий, в результате чего нефлуоресцирующий ФАДН₂ в составе комплекса II, переходит в флуоресцирующую форму ФАД; KCN, ингибитор комплекса IV, нарушающий движение электронов по дыхательной цепи; селегилин – ингибитор MAO типа Б; а также субстраты MAO – дофамин и адреналин, позволяющие увеличить вклад MAO в общий сигнал автофлуоресценции ФАД.

Выводы. Результаты первого этапа исследований позволяют говорить о том, что параметры, получаемые двумя основными подходами регистрации времени жизни флуоресценции: в временной и частотной областях определенным образом соотносятся между собой. Была выявлена разница во времени жизни флуоресценции митохондриальных флавопротеинов – комплекса II и моноаминоксидазы. Полученные результаты, в дальнейшем, позволят применять флуоресцентную визуализацию с временным разрешением для мало- или неинвазивной оценки состояния ФАД-содержащих белков в клетках и тканях *in vivo*.

Список использованных источников:

1. Chance B. Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells // Nature. Nature, 1952. Vol. 169, № 4293. P. 215–221.
2. Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD // Antioxid. Redox Signal. Mary Ann Liebert, Inc., 2019. Vol. 30, № 6. P. 875.
3. Zherebtsov E.A. et al. Fluorescence lifetime needle optical biopsy discriminates hepatocellular carcinoma // Biomed. Opt. Express. Optica Publishing Group, 2022. Vol. 13, № 2. P. 633.
4. Bryanskaya E.O. et al. High levels of FAD autofluorescence indicate pathology preceding cell death // Biochim. Biophys. acta. Gen. Subj. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2024. Vol. 1868, № 1. P. 130520.
5. Barilani M. et al. Age-related changes in the energy of human mesenchymal stem cells // J. Cell. Physiol. John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Vol. 237, № 3. P. 1753–1767.
6. König K. Brief history of fluorescence lifetime imaging // Multiphot. Microsc. Fluoresc. Lifetime Imaging Appl. Biol. Med. Walter de Gruyter GmbH, 2018. P. 3–16.
7. Serafino M.J., Applegate B.E., Jo J.A. Direct frequency domain fluorescence lifetime imaging using field programmable gate arrays for real time processing // Rev. Sci. Instrum. American Institute of Physics, 2020. Vol. 91, № 3.