

Изменение соотношения связанного и свободного ФАД при окислительном стрессе

Научный руководитель – Гудкова Виктория Родионовна

Кадочников Андрей Алексеевич

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биофизики, Москва, Россия

E-mail: andrykad@mail.ru

Окислительный стресс – это неблагоприятное состояние, которое может возникать в клетках при различных нарушениях метаболизма и других патологических состояниях, поэтому он является важным объектом для исследования. Диагностирование окислительного стресса с помощью флуоресцирующих меток на активные формы кислорода (АФК) является инвазивным и, нарушая естественное состояние клеток, может приводить к изменениям метаболизма [1]-[2]. Нашей задачей было разработать методику, которая позволила бы, не влияя на естественные условия клеток, выявить состояние окислительного стресса.

Как известно, в клетках есть автофлуоресцирующие молекулы ФАД, которые имеют разную длительность флуоресценции в свободном и связанном состояниях. Таким образом, длительность флуоресценции может нести информацию о состоянии молекул и их окружения, а метод FLIM (Fluorescence-lifetime Imaging Microscopy) позволяет создать визуализацию объекта на основе этих данных [3].

В ходе нашей работы окислительный стресс индуцировали с помощью фталоцианина цинка (8+) с холиниловыми заместителями, который является сильным окислителем и приводит к образованию синглетного кислорода. Методом флуоресцентной микроскопии мы показали увеличение флуоресценции химической ловушки на синглетный кислород H2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат) в клетках A431, прошедших инкубацию с фталоцианином. Также было замечено изменение морфологии клеток: округление и разрыв клеточной мембраны, что свидетельствует о нарушении нормального состояния клеток и об их переходе в апоптотическую или некротическую гибель. Данные признаки показывают возникновение окислительного стресса в клетках. Следующим этапом работы было изучение автофлуоресценции ФАД.

Результаты работы, полученные с помощью метода FLIM при аппроксимации кинетики затухания флуоресценции двумя экспонентами, показали, что при окислительном стрессе ФАД меняет свою длительность флуоресценции, так как переходит из свободной формы (измеренная длительность флуоресценции 2,6 нс) в связанную (измеренная длительность флуоресценции 0,3 нс). Таким образом, мы показали различие в соотношениях свободного и связанного ФАД в клетках при окислительном стрессе, что в дальнейшем может быть использовано для определения физиологического состояния клеток.

Источники и литература

- 1 L. Gómez-Virgilio, A. Luarte, D. P. Ponce, B. A. Bruna, and M. I. Behrens, doi: 10.3390/IJMS22126311.
- 2 V. Rani, G. Deep, R. K. Singh, K. Palle, and U. C. S. Yadav, doi: 10.1016/J.LFS.2016.02.002.
- 3 R. Datta, T. M. Heaster, J. T. Sharick, A. A. Gillette, and M. C. Skala, doi: 10.1117/1.JBO.25.7.071203.