

# Исследование характеристик внутриклеточной среды с использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии и анализа восстановления флуоресценции после локального фотообесцвечивания

*Белашов Андрей Владимирович<sup>1</sup>,*

*Жихорева А. А.<sup>1</sup>, Беляева Т. Н.<sup>2</sup>, Салова А. В.<sup>2</sup>, Литвинов И. К.<sup>2</sup>,*

*Корнилова Е. С.<sup>2</sup>, Семенова И. В.<sup>1</sup>, Васютинский О. С.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

*эл. почта: [belashov.andrey.93@gmail.com](mailto:belashov.andrey.93@gmail.com)*

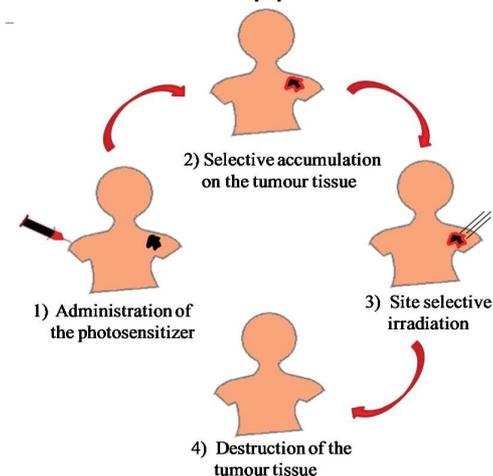
Санкт-Петербург — 2023



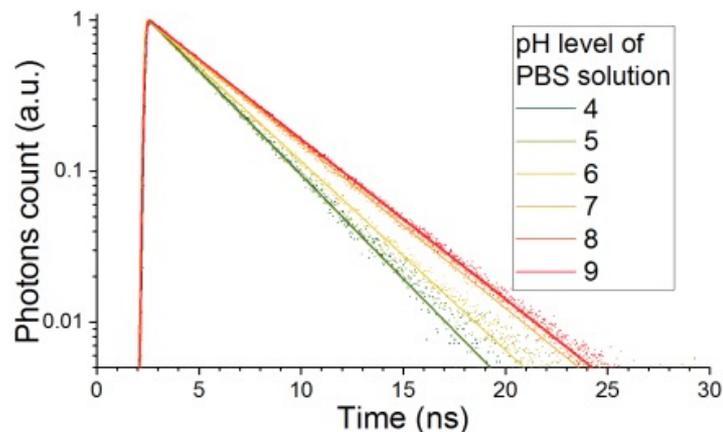
# Введение

Основная функция фотосенсибилизаторов (ФС) – генерация активных форм кислорода (АФК). Однако, анализ сигнала флуоресценции ФС может быть использован для:

- Определение внутриклеточной локализации ФС и его пространственного распределения
- Исследования связывания ФС с белками и макромолекулами
- Изучения процессов фотообесцвечивания ФС из-за взаимодействия с АФК
- Определения параметров микроокружения молекул ФС

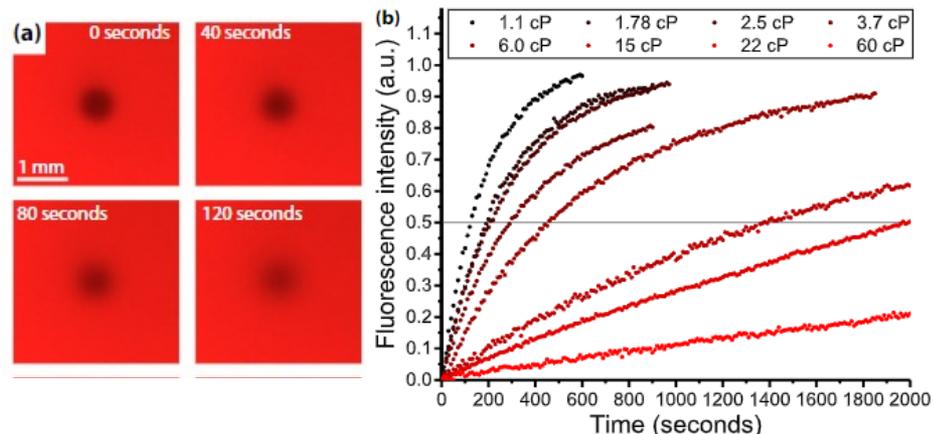


## Часть 1 – оценка pH



*Флуоресценция Радахлорина при изменении pH*

## Часть 2 – оценка вязкости

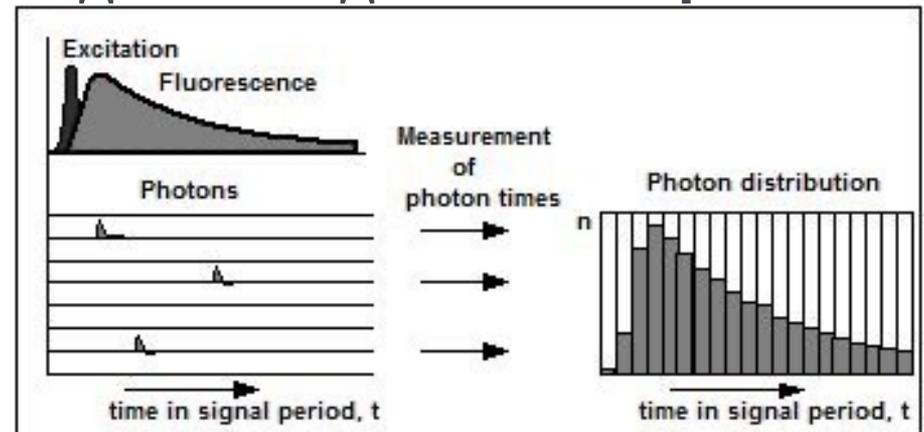
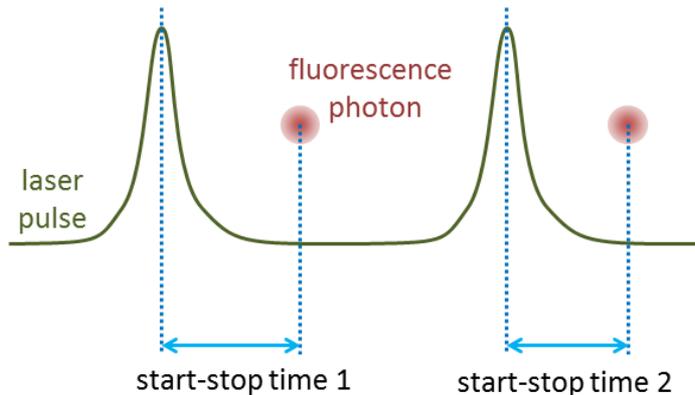


*Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания*

- Zhikhoreva, A.A., et al. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 228 (2022): 112395.
- Zhikhoreva, A.A. et al. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. Accepted (2022)

# Часть I: Анализ кислотности внутриклеточной среды посредством анализа времени затухания флуоресценции

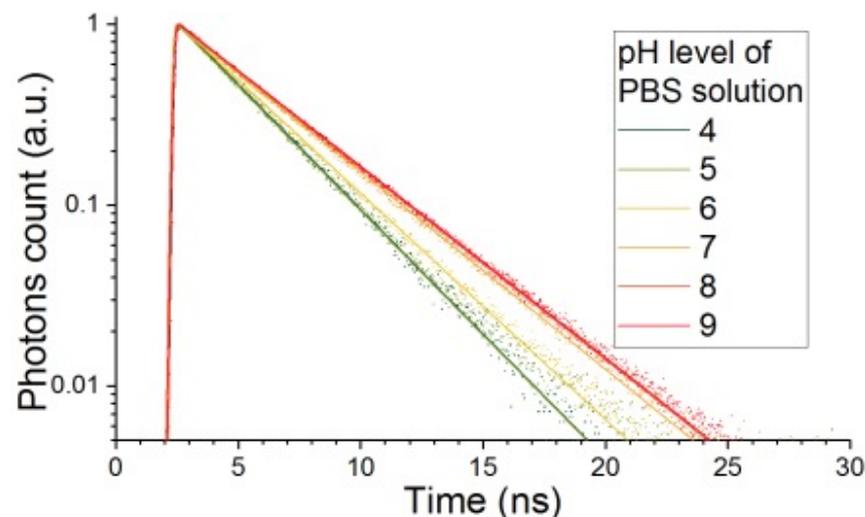
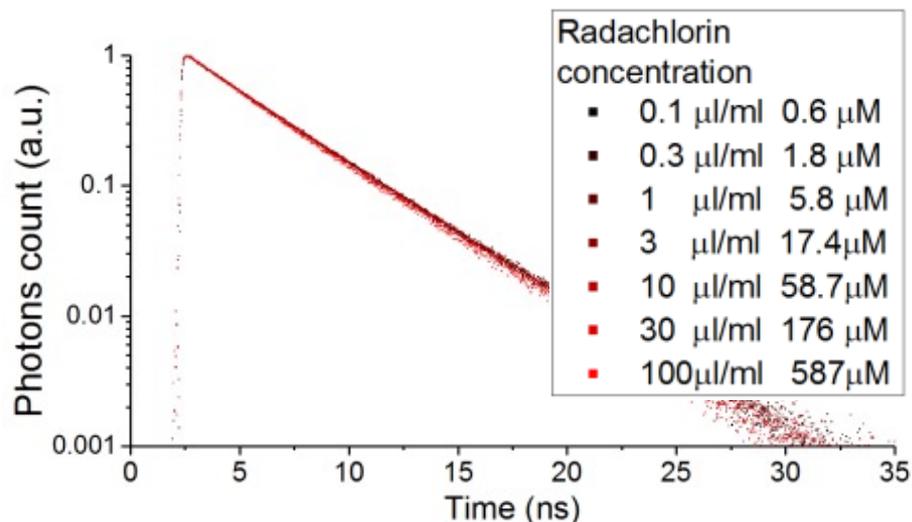
## Время-коррелированный метод счета единичных фотонов



После каждого импульса регистрируется единичный фотон, многократное повторение этого процесса позволяет построить статистическое распределение времени жизни возбужденного состояния молекулы

# Анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора

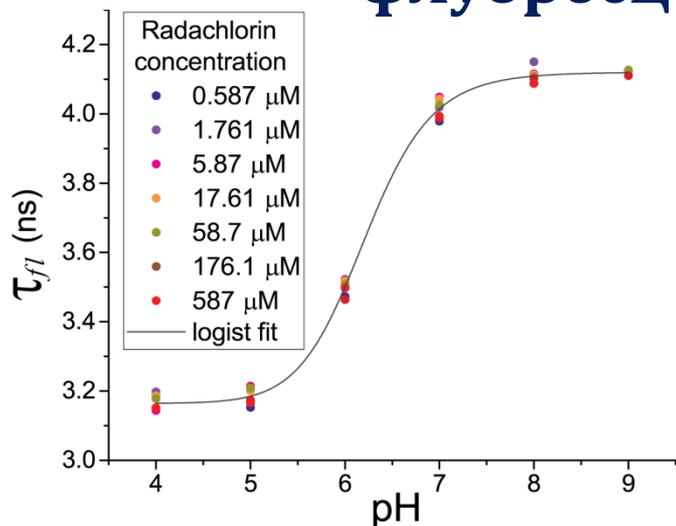
- Время-разрешенный сигнал флуоресценции Радахлорина хорошо фитируется одноэкспоненциальной функцией
- Время затухания флуоресценции зависит от кислотности растворителя и не зависит от концентрации фотосенсибилизатора**



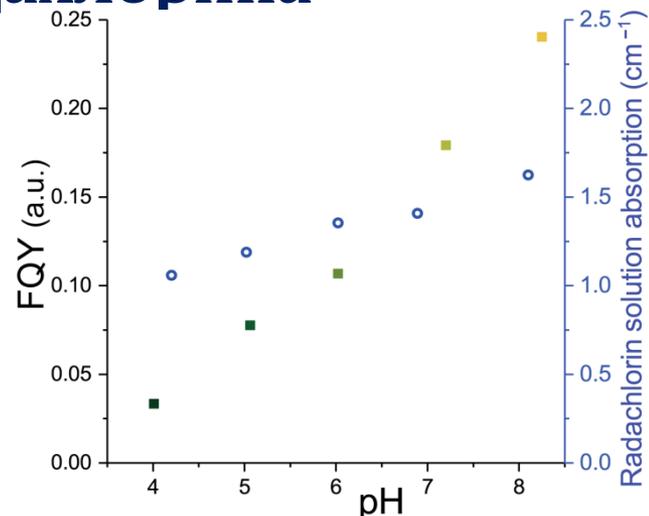
Концентрация ФС (мкМ)	Время затухания флуоресценции (нс) $\pm 0.15$
0.6	4.07
1.8	4.06
5.8	3.97
17.4	4.05
58.7	4.02
587	3.93

pH раствора $\pm 0.05$	Время затухания флуоресценции (нс) $\pm 0.15$
4.01	3.15
5.17	3.16
6.08	3.46
7.13	3.97
8.10	4.10
8.96	4.11

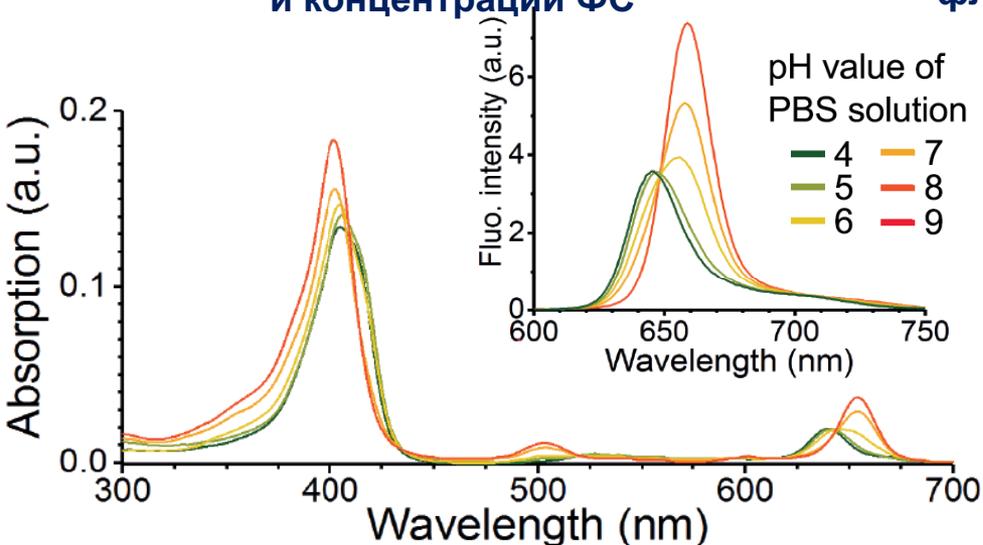
# Влияние кислотности растворителя на параметры флуоресценции Радахлорина



Изменение времени затухания флуоресценции от кислотности растворителя и концентрации ФС



Зависимость поглощения на  $\lambda_{\text{exc}}=405$  нм и относительного квантового выхода флуоресценции ФС при разных pH растворителя

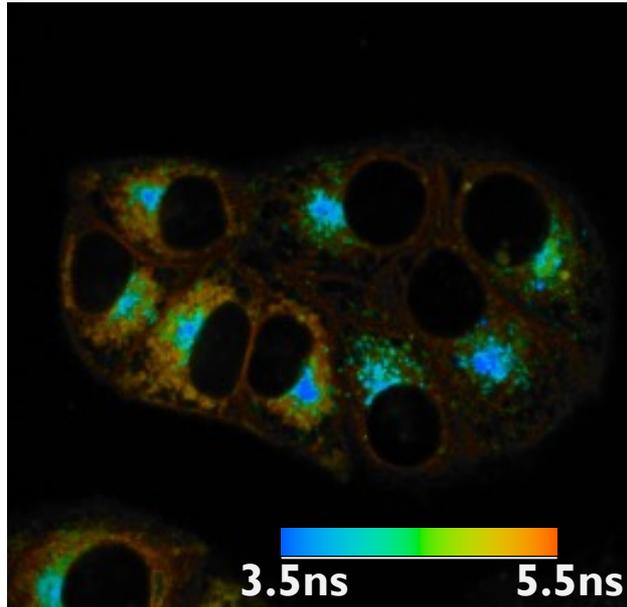


Спектры поглощения и флуоресценции ФС при разных pH растворителя

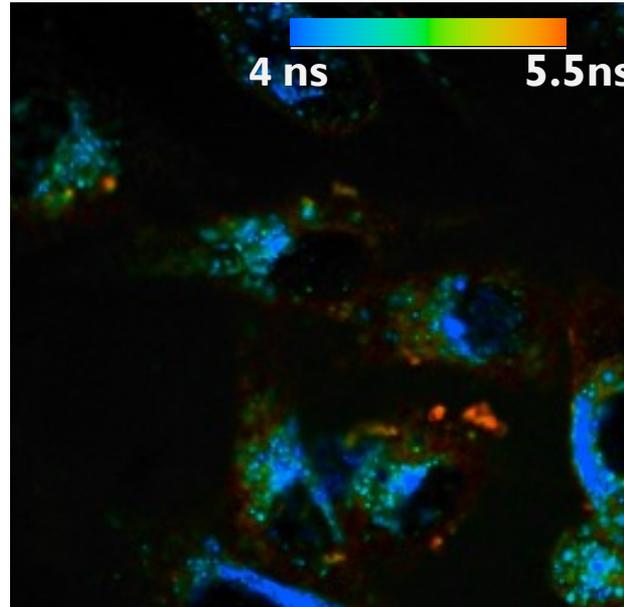
- Кислотность окружающей среды сильно влияет на квантовый выход флуоресценции Радахлорина и его время затухания флуоресценции, а также спектральные параметры
- Анализ времени затухания флуоресценции может быть использован для определения pH и квантового выхода флуоресценции Радахлорина, его концентрации

# Время затухания флуоресценции Радахлорина в клетках

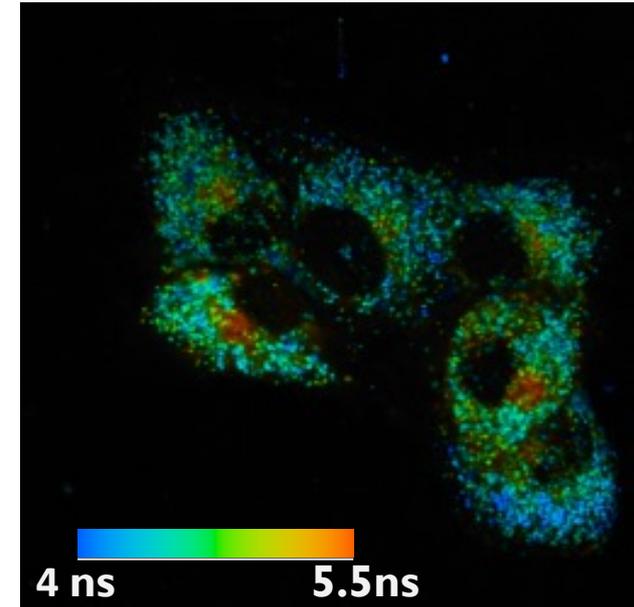
HeLa cells



A549 cells



3T3 cells



- Наиболее яркие области, расположенные вблизи ядра, имеют меньшее время жизни флуоресценции Радахлорина, они соответствуют лизосомам клеток, имеющим более низкий pH
- Параметры флуоресценции Радахлорина сильно различаются в различных внутриклеточных структурах

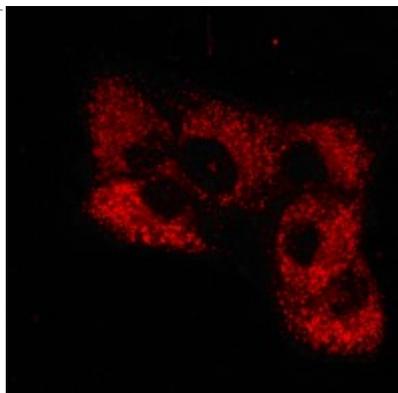
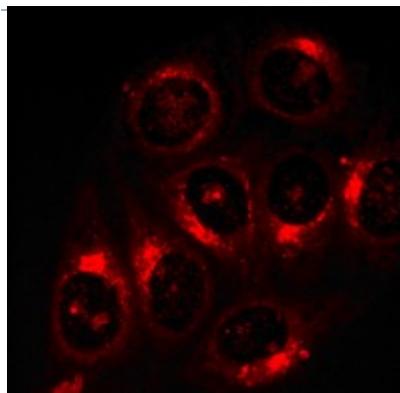


# Колоколизация распределений времени затухания флуоресценции ФС и флуоресценции лизотрекера

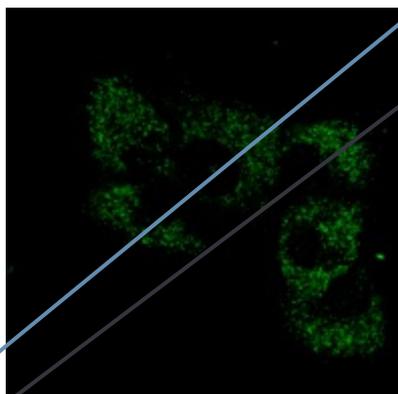
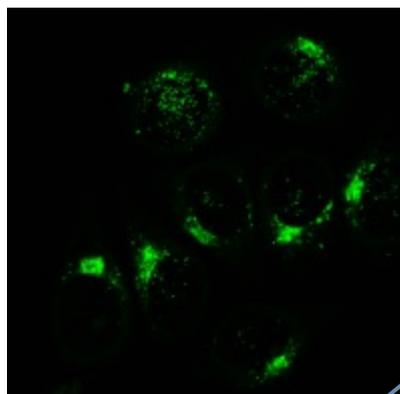
Клетки HeLa

Клетки 3T3

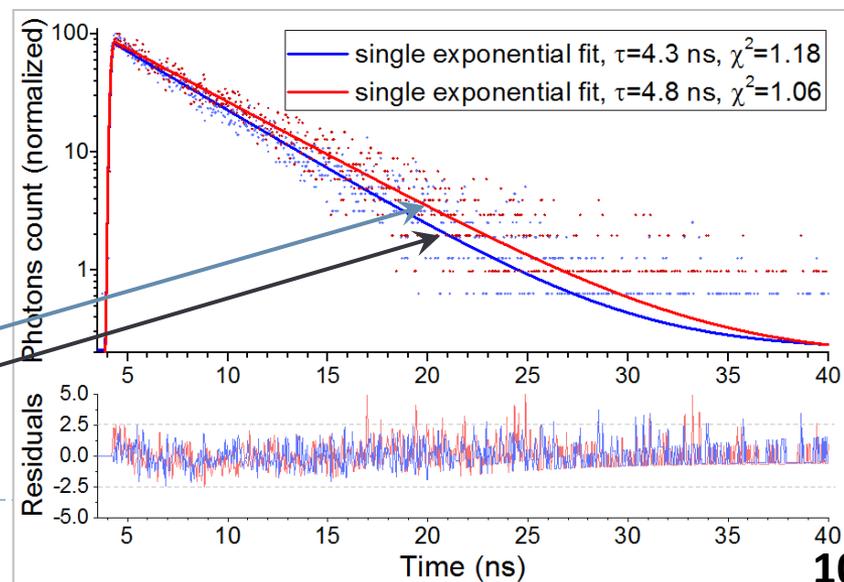
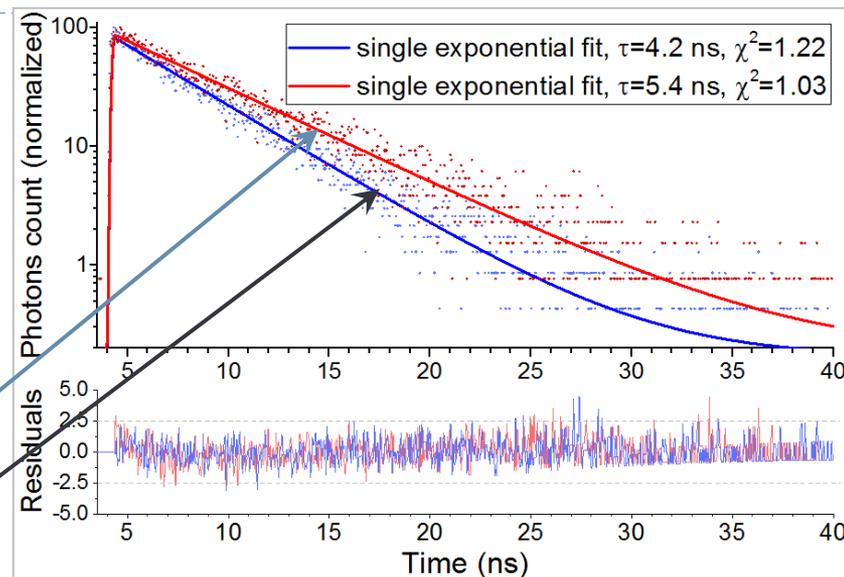
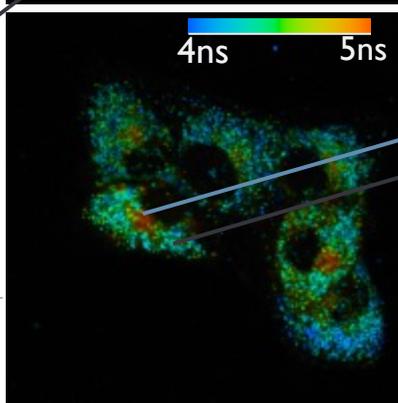
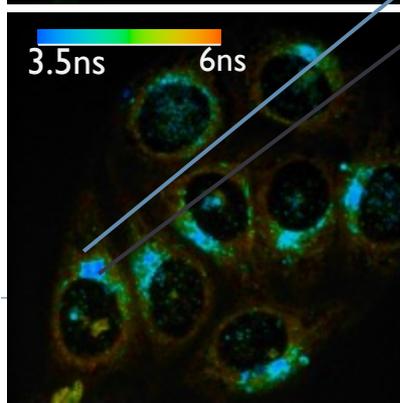
Флуоресценция  
Радахлорина



Флуоресценция  
Лизотрекера

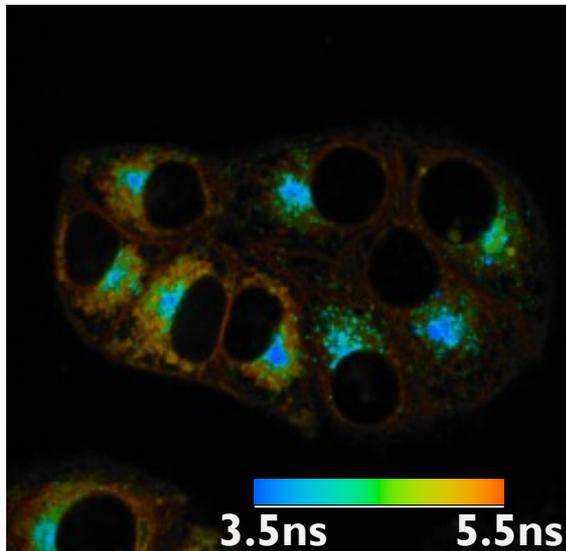


Время затухания  
флуоресценции ФС

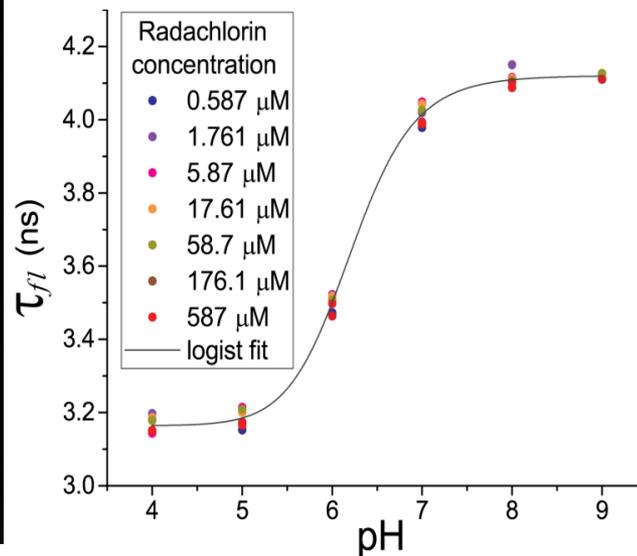


# Времена затухания флуоресценции фотосенсибилизатора в водных растворах, в клетках и при связывании с BSA

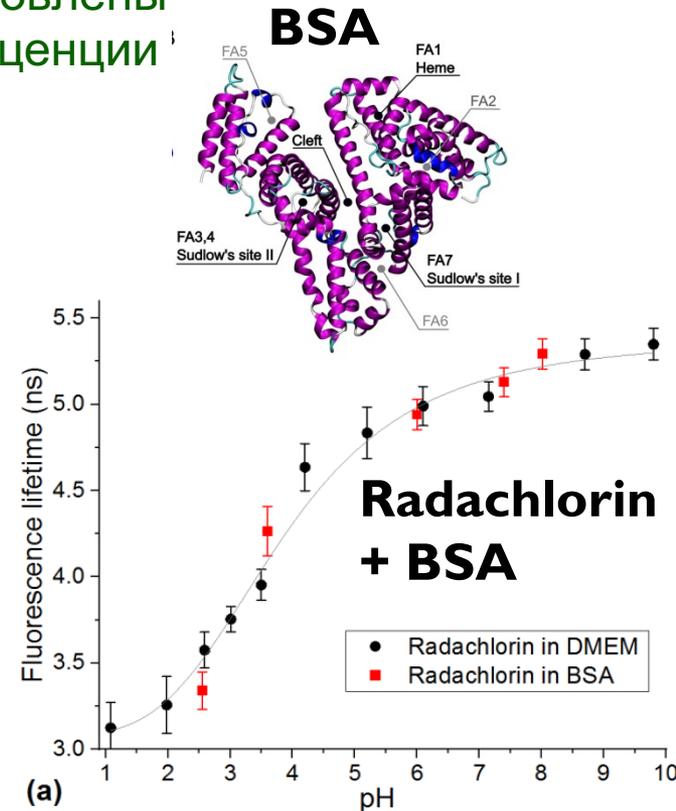
- Типичный диапазон времен затухания флуоресценции фотосенсибилизатора [3.4 – 5.4 нс.] в клетках значительно превосходит диапазон времен затухания флуоресценции, наблюдаемый в воде [3.1 – 4.2 нс.]
- Культуральная среда клеток содержит **бычий сывороточный альбумин (BSA)**, с которым может происходить связывание молекул фотосенсибилизатора, в кислой среде происходит открепление, чем и обусловлены различия в диапазонах времени затухания флуоресценции



FLIM изображение  
клеток

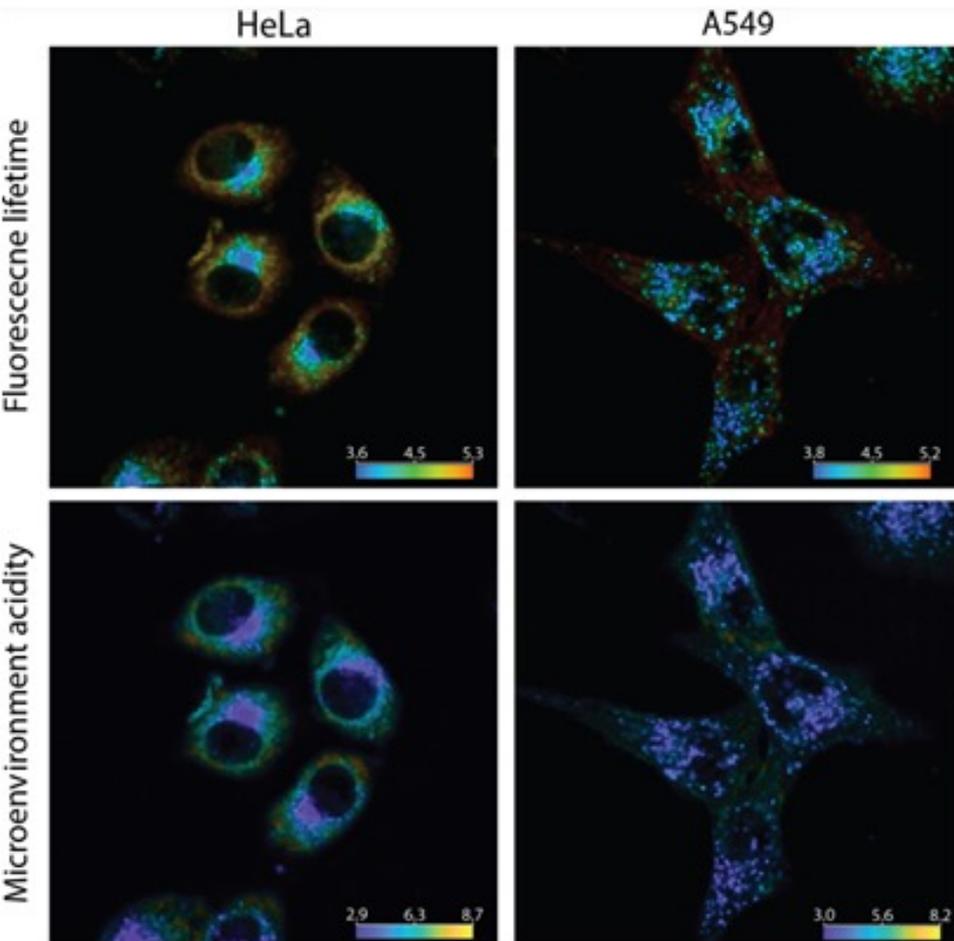


Radachlorin в воде



# Анализ кислотности внутриклеточной среды посредством анализа время-разрешенных сигналов флуоресценции

- Кривая зависимости времени затухания флуоресценции Радахлорина связанного с BSA от кислотности может быть использована как калибровочная кривая для оценки pH среды в клетках

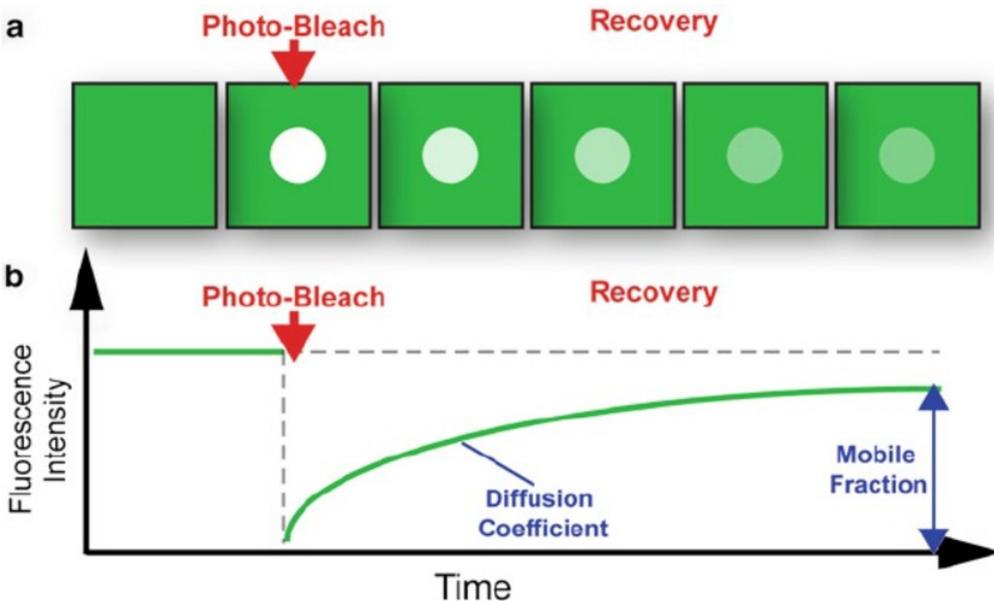


Результаты оценки среднего pH в клетках с помощью представленного метода

Тип клеток	Лизосомы	Цитоплазма
HeLa	4.3	8.3
A549	4.2	7.0
Макрофаги	3.9	7.3

# Часть II: Анализ вязкости посредством анализа восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания

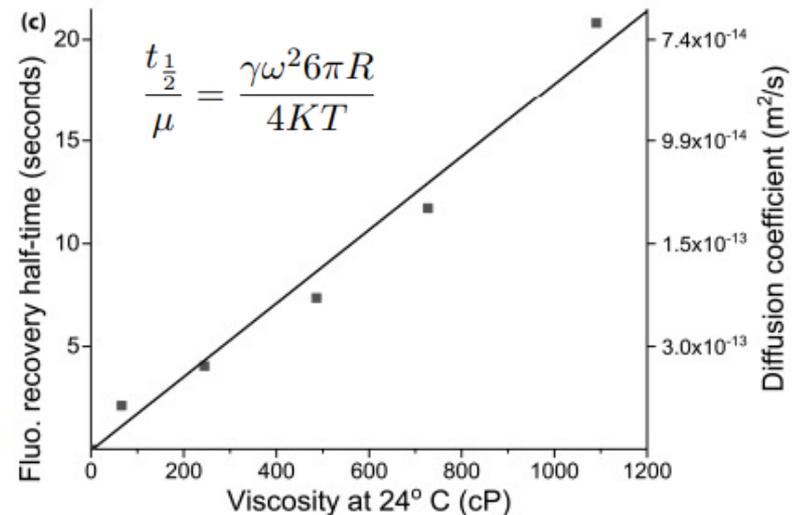
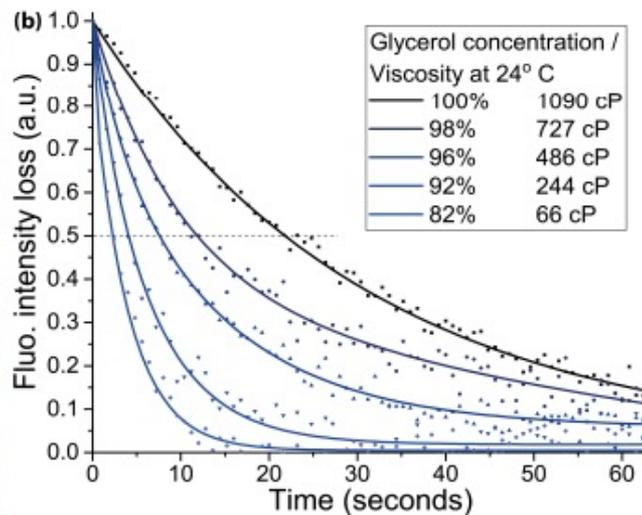
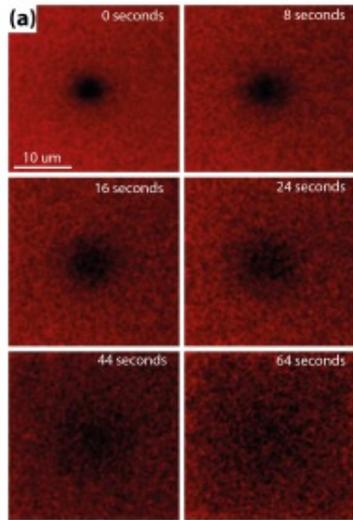
## FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)



Производится стимулированное фотообесцвечивание флуорофора в небольшой области, после чего наблюдается восстановление флуоресценции, характеризующее вязкость и мобильность флуорофора

# Калибровка FRAP Радахлорина в растворах разной вязкости

- Анализ кинетики восстановления флуоресценции после локального фотообесцвечивания может быть использован для оценки вязкости окружающей среды. Вязкость можно оценить как из уравнений, так и из калибровочных экспериментов.



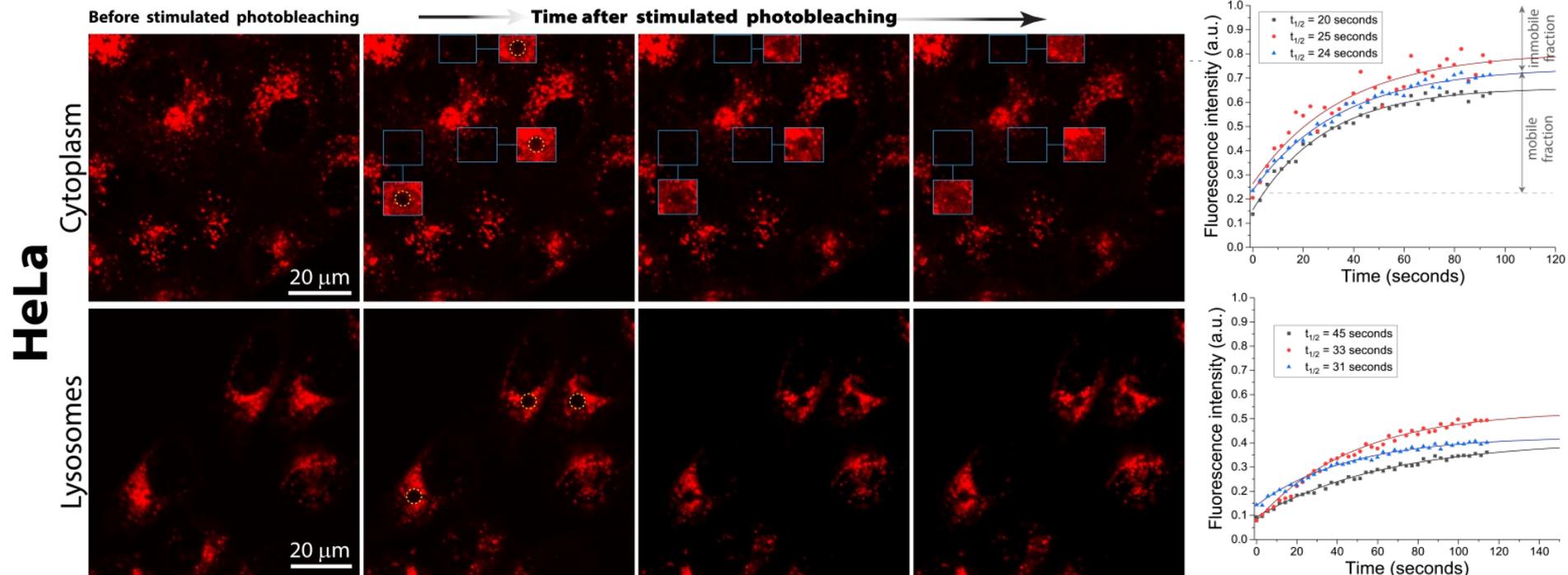
$$D = \frac{\gamma \omega^2}{4t_{1/2}}$$

где  $\gamma$  - корректировочная константа, связанная с долей выцветшего фотосенсибилизатора в локальной области (в нашем случае принята равной 0.88),  $\omega$  - радиус блицинга.

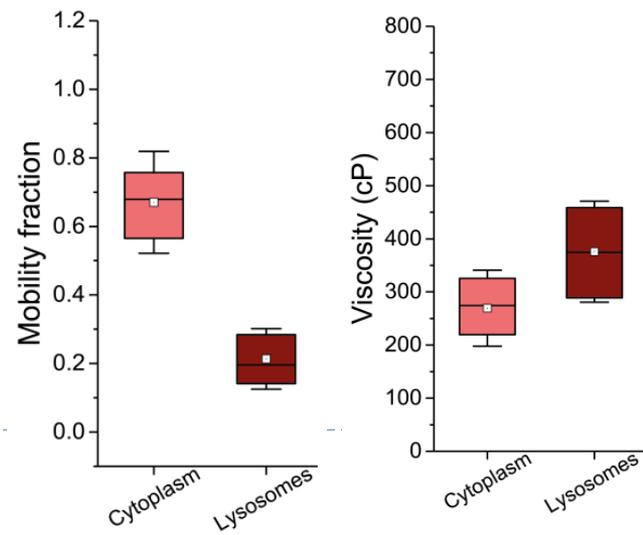
$$D = \frac{KT}{6\mu\pi R}$$

D - коэффициент диффузии, K - константа Больцмана, T - температура,  $\mu$  - вязкость, R - радиус молекулы

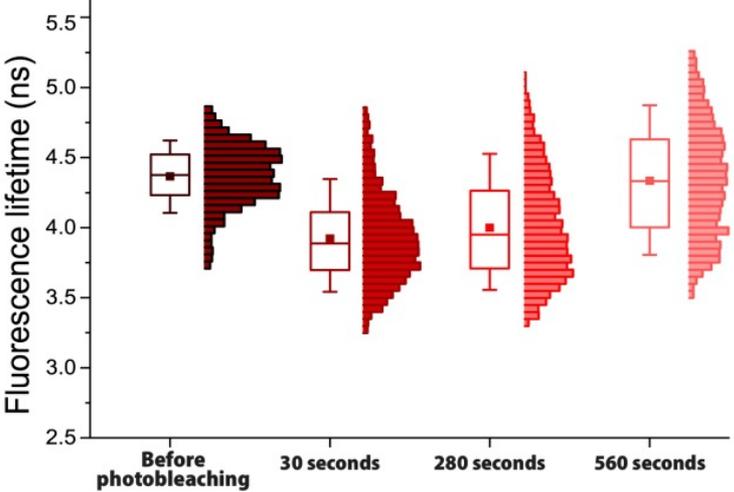
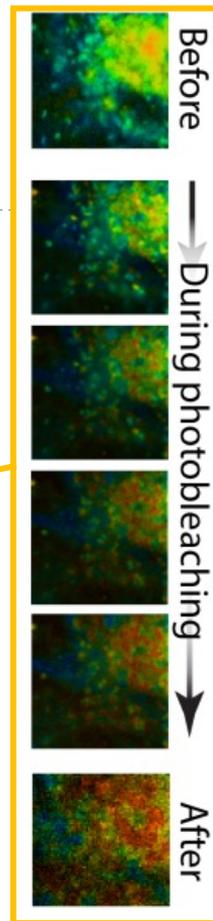
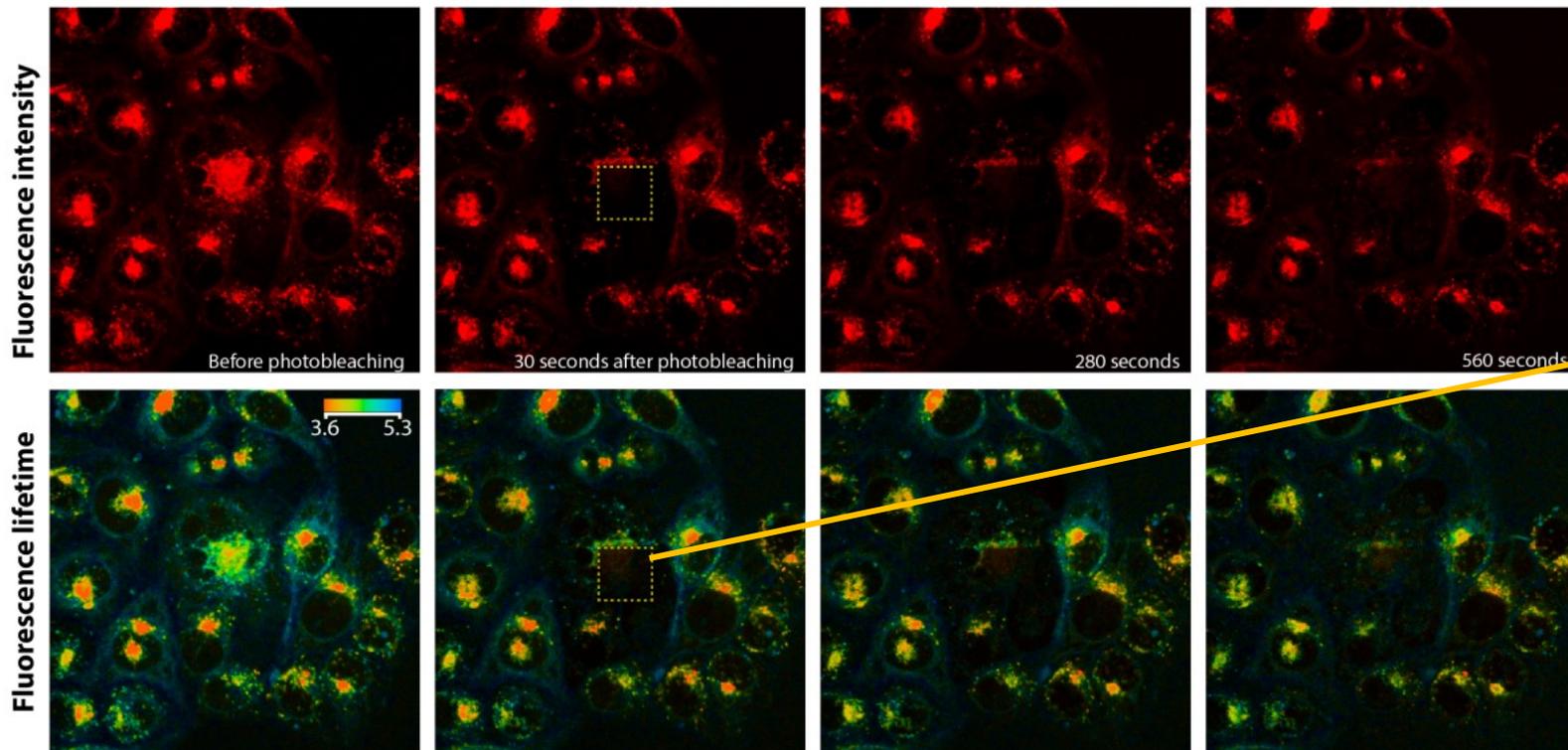
# FRAP Радахлорина в клетках



- Вязкость микроокружения комплексов Радахлорин-BSA в лизосомах и нелизомах клеток несколько различается.
- Сильно отличаются доли мобильной фракций в этих типах структур. Отчасти это может быть связано с невозможностью быстрого проникновения фотосенсибилизатора в лизосомы клеток



# FRAP-FLIM Радахлорина в клетках



- Время затухания флуоресценции Радахлорина изменяется в процессе локального стимулированного фотообесцвечивания
- Со временем это время восстанавливается до исходных значений, однако скорость восстановления может не совпадать со скоростью восстановления интенсивности флуоресценции

# Выводы

---

- При анализе параметров флуоресценции Радахлорина в клетках необходимо учитывать связывание молекул фотосенсибилизатора с бычьим сывороточным альбумином (BSA).
- Анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в клетках может быть использован для оценки кислотности микроокружения молекул фотосенсибилизатора.
- Значительная зависимость квантового выхода флуоресценции Радахлорина от pH свидетельствует о необходимости учета кислотности среды для корректной оценки его накопления.
- Анализ восстановления флуоресценции после локального фотообесцвечивания позволяет оценивать вязкость и мобильность Радахлорина.



---

**Спасибо за внимание**

**Работа выполнена при поддержке Российского  
Научного Фонда, проект №21-72-10044**

