

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ С ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕМ К ДИФФУЗИИ В НЕОДНОРОДНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СРЕДАХ

Кузьмин Е. М.¹, Дмитриев А. Э.¹, Бородина Л. Н.¹, Вениаминов А. В.¹

Научный руководитель – Бородина Л. Н.¹

¹Университет ИТМО

georgekuzminkuzmin@yandex.ru

Введение

Определение коэффициента диффузии молекулярных и наноразмерных зондов позволяет судить о локальной вязкости и является важной компонентой понимания процессов, происходящих в неоднородных, в частности клеточных, средах при разработке способа доставки лекарств, создании внутриклеточных наносенсоров. Привлекательным методом определения коэффициента диффузии в жидких и аморфных средах представляется метод восстановления люминесценции после фотообесцвечивания FRAP [1].

Основная часть

Основной задачей работы была оценка коэффициента диффузии молекул кальцеина в нефиксированных клетках колоректального рака. Для этого был использован метод FRAP в реализации sFRAP (Stripe Fluorescence Recovery After Photobleaching), описанной в работе [2]. С помощью конфокального микроскопа получены люминесцентные изображения клеток, после чего узкая полоса клетки подвергнута экспонированию лазерным пучком и сделана серия снимков, по которым построены профили интенсивности люминесценции в направлении, перпендикулярном полосе, выполнена их аппроксимация супергауссовой функцией и определена ширина полосы обесцвечивания. Зависимость её квадрата от времени не линейна, как при диффузии в однородных растворах, а экспоненциальна. Это связывается с пространственной неоднородностью клеточной среды, диффузия в которой не описывается одним коэффициентом [3]. Эффективный коэффициент диффузии молекул, пропорциональный производной зависимости, уменьшался со временем от 46 до 3 мкм²/с, что соответствует диапазону микровязкости среды от 1,3 мПа·с до 16 мПа·с. Эффективный размер молекулы кальцеина 0,6 нм определён в контрольном эксперименте с его водным раствором, который продемонстрировал линейную зависимость квадрата ширины фотоиндуцированной полосы от времени, свойственную нормальной диффузии красителя.

Выводы

С помощью метода sFRAP экспериментально подтвержден аномальный характер молекулярной диффузии в клетках колоректального рака, на что указывает различие эффективного коэффициента диффузии молекулярного зонда и, следовательно, микровязкости его окружения.

Литература

1. Braeckmans K. et al. Line FRAP with the confocal laser scanning microscope for diffusion measurements in small regions of 3-D samples // Biophysical journal. 2007. Vol. 92, no. 6. P. 2172–2183. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099838>.
2. Бородина Л. Н., Борисов В. Н., Вениаминов А. В. Фотоиндуцированное изменение коэффициента диффузии в голографической релаксометрии и лазерной

сканирующей микроскопии // Оптика и спектроскопия. 2024. Т. 132. №. 9. С. 964–974. <https://doi.org/10.61011/OS.2024.09.59195.6730-24>.

3. Sprague B. L., McNally J. G. FRAP analysis of binding: proper and fitting // Trends in cell biology. 2005. Vol. 15. no. 2. P. 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.12.001>.