

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-177

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ МОЛЕКУЛ NADH
В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ОБОБЩЕНИЯ МЕТОДА ED-FRAP
И ДЕТЕКЦИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ***

**STUDY OF THE PHOTOBLEACHING DYNAMICS OF NADH MOLECULES IN CARDIAC TISSUE
FOR GENERALIZATION OF THE ED-FRAP METHOD AND DETECTION OF ISCHEMIC DAMAGE**

М. М. Слотвицкий¹⁻³, М. С. Медведев^{1,2}, Г. С. Пашинцев^{1,2}, В. А. Грязнов²,
В. С. Качан^{1,2}, К. И. Агладзе^{2,3}, В. А. Цвеляя¹⁻³

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

M. M. Slotvitsky¹⁻³, M. S. Medvedev^{1,2}, G. S. Pashintsev^{1,2}, V. A. Gryaznov²,
V. S. Kachan^{1,2}, K. I. Agladze^{2,3}, V. A. Tsvelaya¹⁻³

¹ ITMO University, Saint Petersburg

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny

³ Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute

✉ slotvitsky.mm@gmail.com

Аннотация

В настоящей работе мы показываем, что оптический метод ED-FRAP (*enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching*) может быть использован для неинвазивной детекции очагов ишемии сердечной ткани. В экспериментах на клеточных моделях мы показали, что анализ флуоресценции NADH методом ED-FRAP позволяет спрогнозировать влияние ишемии на скорость проведения возбуждения по сердечной ткани.

Abstract

In this paper, we demonstrate that the optical method ED-FRAP (*enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching*) can be used for noninvasive detection of ischemic foci in cardiac tissue. In experiments on cell models, we showed that NADH fluorescence analysis by the ED-FRAP method allows us to predict the effect of ischemia on the excitation conduction velocity in cardiac tissue.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) — причина ~ 50 % смертей в развитых странах [1]. Трансплантация сердца остается ключевым методом лечения терминальных стадий, но ее применение ограничено дефицитом донорских органов. Около 60 % сердец признаются непригодными к пересадке, в том числе из-за ишемических повреждений (тепловая и холодная ишемия), что повышает риск послеоперационных осложнений [1, 2]. Наибольшей перспективой для изучения функциональности сердечной ткани обладают оптические методы, такие как оптическое картирование волны возбуждения, однако они не применимы при кардиоплегической остановке сердца. Чтобы восполнить имеющийся пробел и дополнить методы оптического картирования сердца вариацией для оценки метаболического состояния, мы исследовали метод фермент-зависимого восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания для молекул NADH (ED-FRAP, *enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching*) [3–6]. Сложность применения данного метода сводится к неоднозначности интерпретации сигнала ED-FRAP: основным источником информации является фаза восстановления флуоресценции, однако она может зависеть не только от активности ферментов, восстанавливающих NAD⁺ до NADH (преимущественно глутамат-дегидрогеназы, GDH), но и от локальных свойств поглощения и отражения возбуждающего излучения (ближний ультрафиолет, 365 нм) поверхностью ткани, снижающих эффективность предварительного фотообесцвечивания [3].

В настоящей работе мы провели математическое описание процесса фотообесцвечивания NADH до NAD⁺ и обратного восстановления под действием фермента GDH с учетом необратимых потерь молекул NADH. Это обобщение позволило модифицировать методику обработки экспериментальных записей таким образом, чтобы не зависеть от оптических свойств исследуемого образца — мы смогли свести к общей статистике эксперимен-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-21-00162).

© М. М. Слотвицкий, М. С. Медведев, Г. С. Пашинцев, В. А. Грязнов, В. С. Качан, К. И. Агладзе, В. А. Цвеляя, 2025

тальные записи ED-FRAP из исследований [4–6], напрямую сравнив активность GDH в разных экспериментальных моделях сердечной ткани. Далее мы проверили гипотезу, что протокол ED-FRAP может быть сокращен с двух фаз (фотообесцвечивание и восстановление) до одной фазы с одновременным протеканием обоих процессов, что позволяет снизить общую экспозицию возбуждающего излучения на ткань. Такая модификация ED-FRAP позволила нам впервые из сходных исследований [4–6] оценить прогностическую способность анализа активности GDH: на монослоях желудочковых кардиомиоцитов человека, полученных дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, мы показали прямую корреляцию активности GDH и изменения скорости проведения волны возбуждения после длительной ишемии.

Литература

1. McCartney S. L., Patel C., Del Rio J. M. Long-term outcomes and management of the heart transplant recipient // *Best Practice Res. Clin. Anaesthesiol.* 2017. Vol. 31, No. 2. P. 237–248.
2. Beuth J. et al. New strategies to expand and optimize heart donor pool: ex vivo heart perfusion and donation after circulatory death: a review of current research and future trends // *Anesthesia Analgesia.* 2019. Vol. 128, No. 3. P. 406–413.
3. Tornmalm J. et al. Local redox conditions in cells imaged via non-fluorescent transient states of NAD (P) H // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, No. 1. P. 15070.
4. Moreno A. et al. Enzyme-dependent fluorescence recovery of NADH after photobleaching to assess dehydrogenase activity of isolated perfused hearts // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, No. 1. P. 45744.
5. Joubert F. et al. NADH enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP): applications to enzyme and mitochondrial reaction kinetics, in vitro // *Biophys. J.* 2004. Vol. 86, No. 1. P. 629–645.
6. Combs C. A., Balaban R. S. Direct imaging of dehydrogenase activity within living cells using enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP) // *Biophys. J.* 2001. Vol. 80, No. 4. P. 2018–2028.