

# Детекция редуکتивного стресса в клетках церебрального эндотелия методом FLIM-микроскопии: новые подходы к оценке эндотелиальной дисфункции

© Н.А. Колотьева<sup>1</sup>, С.В. Новикова<sup>1</sup>, Н.А. Розанова<sup>1</sup>, В.И. Макаров<sup>2</sup>, А.В. Рябова<sup>2</sup>, А.К. Бердников<sup>1</sup>, А.Н. Лукьянчук<sup>1,3</sup>, Р.С. Мударисова<sup>1</sup>, Л.В. Николаева<sup>3</sup>, Ю.К. Комлева<sup>1</sup>, А.Б. Салмина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Российский центр неврологии и нейронаук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО „Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого“ Минздрава России, Красноярск, Россия

e-mail: kolotyeva.n.a@neurology.ru

Поступила в редакцию 13.11.2025 г.

В окончательной редакции 02.12.2025 г.

Принята к публикации 24.03.2025 г.

Нейродегенеративные процессы усиливаются изменением окислительно-восстановительного потенциала клетки. Редуکتивный стресс, преобладание восстановленных форм коферментов NADH, NADPH, GSH нарушает функции клеточных органелл, таких как митохондрии. Целью исследования является определение путей воздействия редуکتивного стресса на клетки церебрального эндотелия. В исследовании впервые изучено влияние редуکتивного стресса на функции митохондрий и метаболический профиль клеток церебрального эндотелия *in vitro* с использованием флуоресцентной микроскопии с измерением времени жизни флуоресценции (FLIM-микроскопия). 24h инкубация с 500 μM дитиотреитола (DTT) не изменила митохондриальный потенциал и содержание суммарного пула NAD<sup>+</sup> и NADH, но увеличила концентрацию супероксид-аниона, указывая на возникновение окислительного стресса. Исследования с фазор-FLIM выявили увеличение короткоживущей NADH-компоненты уже через 1h инкубации, что свидетельствует о метаболических перестройках. Результаты предполагают адаптацию клеточного метаболизма в пользу усиленного гликолиза, что при длительном воздействии может нарушить проницаемость гематоэнцефалического барьера и ускорить нейродегенеративные процессы. Полученные данные раскрывают ранние механизмы метаболической перестройки клеток церебрального эндотелия при редуکتивном стрессе и демонстрируют потенциал FLIM-микроскопии в поиске терапевтических мишеней, направленных на сохранение целостности гематоэнцефалического барьера.

**Ключевые слова:** редуکتивный стресс, церебральный эндотелий, FLIM-микроскопия, функция митохондрий, NADH.

DOI: 10.61011/OS.2026.05.63335.60-25

## Введение

В последние годы в биомедицинской оптике и нейрофизиологии всё большее внимание уделяется метаболической пластичности клеток нейроваскулярной единицы (НВЕ) — функционального комплекса, включающего эндотелиоциты церебральных микрососудов, астроциты, перициты, нейроны и глиальные клетки. Эта пластичность обеспечивает динамическую адаптацию энергетического метаболизма к локальным потребностям нейронов и играет ключевую роль в поддержании гомеостаза центральной нервной системы (ЦНС) [1–3]. Особое значение в структуре НВЕ имеет гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), селективная проницаемость которого регулируется согласованной активностью всех компонентов НВЕ. Нарушение функции ГЭБ — это ранний и критический маркер патогенеза нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона и болезнь

Альцгеймера [4,5]. Важным механизмом формирования патологической проницаемости ГЭБ является развитие митохондриальной дисфункции в клетках церебрального эндотелия, приводящее к снижению энергопродукции и нарушению структурной целостности барьера [6].

Следствием нарушения активности митохондрий является изменение окислительно-восстановительного (редокс) гомеостаза в клетках. Наряду с традиционно изучаемым окислительным стрессом, вызванным избытком активных форм кислорода (АФК), всё большее значение приобретает редуکتивный стресс — состояние, характеризующееся патологическим накоплением восстановленных коферментов: восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH), восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) и восстановленного глутатиона (GSH) [7]. Такое гиперовосстановленное состояние приводит к „электронному затору“ в дыхательной цепи митохондрий, что может

вызывать обратный ток электронов и, парадоксальным образом, усиливать продукцию АФК [8]. Таким образом, редуктивный и окислительный стрессы не исключают друг друга, а взаимно усиливают деструктивные процессы, лежащие в основе нейродегенерации [9–11].

Однако прямое измерение редуктивного стресса сопряжено со значительными методологическими трудностями. Ключевые редокс-пары — NAD<sup>+</sup>/NADH, NADP<sup>+</sup>/NADPH и GSSG/GSH динамически изменяются, что невозможно зафиксировать стандартными биохимическими методами без разрушения клетки. Более того, отсутствует единый специфический биомаркер, позволяющий однозначно идентифицировать редуктивный стресс [12]. В этих условиях особую ценность приобретают оптические методы, основанные на регистрации аутофлуоресценции эндогенных метаболитов.

Среди таких методов наибольшую информативность демонстрирует флуоресцентная микроскопия с измерением времени жизни флуоресценции (FLIM). FLIM позволяет в режиме реального времени, без введения внешних зондов, количественно оценивать редокс-состояние отдельных клеток по параметрам флуоресценции пиридиновых (NADPH) и флавиновых (FAD) нуклеотидов [13,14]. В отличие от интенсивности флуоресценции время жизни флуоресценции не зависит от концентрации флуорофора, оптической плотности среды, что делает FLIM инструментом выбора для исследования метаболической гетерогенности в сложных клеточных системах, таких как НВЕ.

Несмотря на растущий интерес к редуктивному стрессу, его роль в патофизиологии церебрального эндотелия, формирующего структурную основу ГЭБ, остаётся практически неизученной. В настоящей работе мы впервые применяем FLIM-микроскопию для оценки состояния эндотелиальных клеток при экспериментально индуцированном редуктивном стрессе *in vitro*. Цель исследования — выявить метаболические и редокс-изменения в клетках церебрального эндотелия, которые могут предшествовать нарушению целостности ГЭБ и служить основой для поиска новых биомаркеров начальных стадий нейродегенеративных заболеваний.

## Материалы и методы

Первичные культуры клеток церебрального эндотелия получали и культивировали в соответствии со стандартным протоколом [15], с модификацией (RU2774603C1) [16]. Материал забирали от 14-дневных крыс линии Wistar под анестезией. Извлечение головного мозга с последующим удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов осуществляли методом роллинга на стерильной фильтровальной бумаге. Далее проводили выделение коры головного мозга, удаляли крупные сосуды в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Измельчённую кору центрифугировали 3 min

при 1000 rpm. К полученному осадку добавляли двукратный объём 25% раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, США) и проводили механическую диссоциацию пипетированием. Полученную клеточную суспензию центрифугировали 10 min при 2000 rpm при комнатной температуре. Нижний слой осадка, содержащий фрагменты микрососудов, переносили в коническую пробирку объёмом 15 mL. Процедуры механической диссоциации и центрифугирования повторяли трижды для повышения чистоты выделения. Затем проводили ферментативную обработку осадка 0.1% раствором коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 min при 37 °С в роллере. По окончании инкубации добавляли несколько миллилитров тёплого раствора Хенкса, после чего проводили центрифугирование при 1000 rpm в течение 5 min. Осадок ресуспендировали в модифицированной среде Игла (DMEM-F12, GIBCO Invitrogen Corporation, США), дополненной 20% эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, Австрия), 2 mM глутамин (GlutaMAX, Gibco, Великобритания) и 16.6 mM глюкозы, и высевали на пластиковые чашки Петри диаметром 40 mm (Медполимер, Россия), предварительно покрытые матригелем (Corning, США). Смену культуральной среды осуществляли дважды в неделю. Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (RWD Life Science, Китай) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и относительной влажности 98%. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (Servicebio, Китай) по 100 µL суспензии на лунку, другую часть — на покровные стекла в чашках Петри по 200 µL суспензии с плотностью  $2 \times 10^5$  cells/mL. Подсчёт клеток и оценку жизнеспособности выполняли с использованием автоматического счётчика Countess (Invitrogen). Текущее состояние культур контролировали методом фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Olympus СКХ41 (Япония).

Иммунофенотипирование культуры клеток церебрального эндотелия проводили методом иммунофлуоресцентного окрашивания при достижении 90%-ной конфлюэнтности монослоя, выращенного в 96-луночном плейте и на стекле. Фиксацию клеток проводили охлажденным 5% раствором параформальдегида (PFA, Sigma, Германия) в 0.01 M натрий-фосфатном буфере (PBS; ЭКО сервис, Россия) в течение 15 min при комнатной температуре. Далее пятикратно промывали образцы фосфатно-солевым буфером. Для усиления диффундирования антител в клетки образцы обрабатывали 0.1% Triton X-100 (Calbiochem Biochemicals, США) в течение 10 min при +4 °С. Для предотвращения неспецифического связывания антител клетки блокировали в растворе 5% козьей сыворотки (Sigma, Германия) в течение 60 min. Клетки инкубировали с первичными антителами mouse anti-CD31 antibody (1:500, BF0611, Affinity Biosciences) в течение 6 h при температуре +4 °С во влажной камере. Разведение первичных и вторичных антител производили в ИHCDiluent (Leica) согласно протоколу производителя. Образцы пятикратно

промывали PBS для удаления не связавшихся первичных антител. Далее инкубировали со вторичными антителами Goat anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor 594) (1:350, ab150116, Abcam) в 0.1% растворе Triton X-100 с PBS в течение 2 h на вращающейся платформе при комнатной температуре. Промывали от несвязавшихся вторичных антител раствором PBS. Клетки заключали под покровное стекло контрастным ядерным 4',6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлоридом (Fluoroshield with DAPI; Sigma) в течение 15 min. Визуализировали с помощью системы EVOS M7000 (ThermoFisher Scientific, США). Выполняли подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих целевую метку, в 5 полях зрения. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ, версия 1.47 (Research Services Branch, США).

**Индукцию редуктивного стресса** проводили при достижении 90% конfluenceности монослоя эндотелиальных клеток в бессывороточной среде (DMEM-F12 (GIBCO Invitrogen Corporation, США) с добавлением 2 mM глутамина (GlutaMAX, Gibco, Великобритания) и 16.6 mM глюкозы). В качестве индуктора редуктивного стресса использовали дитиотреитол (DTT) в конечной концентрации 500 мкМ, клетки инкубировали при 37 °С в течение 1 и 24 h [8,17]. Выбранная концентрация DTT была определена в ходе предварительных дозозависимых экспериментов с оценкой жизнеспособности клеток с использованием МТТ-теста. Было сформировано три группы: экспериментальная — клетки церебрального эндотелия с заменой среды на бессывороточную и добавлением DTT, 500 мкМ; контрольная — клетки церебрального эндотелия с заменой среды на бессывороточную без добавления DTT; интактная — клетки, культивируемые в стандартных условиях без замены среды на бессывороточную и добавления DTT.

**Трансмембранный митохондриальный потенциал** в культуре клеток церебрального эндотелия оценивали в условиях редуктивного стресса и в контроле с применением флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда — перхлората этилового эфира тетраметилродамина (TMRE, Sigma, США). Интенсивность флуоресценции TMRE зонда характеризует изменение мембранного потенциала митохондрий и энергообеспеченность клеток [18]. Клетки инкубировали с TMRE в рабочей концентрации 500 нМ в течение 15 min при 37 °С, после чего трижды отмывали модифицированным раствором Рингера–Локка. Интенсивность митохондриальной флуоресценции измеряли на микропланшетном ридере SpectraMax Reader (Molecular Devices, США) с использованием программного обеспечения SoftMax Pro 7 при возбуждении/эмиссии 560/590 nm в режиме флуоресценции. Для нормализации значений флуоресценции каждое значение делили на среднюю величину флуоресценции контроля в соответствующем планшете и умножали на 100%.

**Митохондриальную продукцию супероксид-аниона** в живых клетках определяли с помощью высокоселектив-

ного флуоресцентного зонда MitoSOX<sup>TM</sup> Green (MSG, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Данный зонд специфически накапливается в митохондриях и избирательно окисляется супероксидом, что сопровождается появлением ярко-зелёной флуоресценции. MSG не реагирует с другими активными формами кислорода или азота, а его окисление ингибируется супероксиддисмутазой. Клетки инкубировали с MSG в концентрации 1 мкМ в течение 30 min при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего трижды отмывали тёплым HBSS-буфером, содержащим Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Флуоресценцию регистрировали на микропланшетном ридере SpectraMax Reader (Molecular Devices, США) с использованием SoftMax Pro 7 при длине волны возбуждения/эмиссии 488/510 nm. Для нормализации значений флуоресценции каждое значение делили на среднюю величину флуоресценции контроля в соответствующем планшете и умножали на 100%.

**Содержание суммарного NAD<sup>+</sup> и NADH в культуре клеток эндотелия** определяли с использованием коммерческого набора NAD<sup>+</sup>/NADH Colorimetric Assay Kit (Elabscience, Китай). Принцип метода основан на хромогенной ферментативной реакции, в которой NAD<sup>+</sup> восстанавливается до NADH, в свою очередь NADH восстанавливает WST-8 до оранжевого формазана с пиком максимального поглощения при 450 nm, которое измеряли на спектрофотометре Inno-S (LTeK, Китай). Образование формазана пропорционально общему количеству NAD<sup>+</sup> и NADH в лизате клеток. Диапазон определения 0.02–5.0 мкМ. Содержание NAD<sup>+</sup> и NADH нормализовали на концентрацию белка, разделив среднее значение технических повторений каждого образца на среднюю концентрацию белка в нём.

## Методы FLIM-микроскопии и анализа данных

Временно-разрешённые флуоресцентные изображения эндогенной флуоресценции регистрировали при двухфотонном возбуждении титан-сапфировым фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II (Coherent, США) на длине волны 740 nm. Измерения проводили на конфокальном комплексе LSM-710 NLO (Zeiss) с подключённым модулем FLIM (Becker & Hickl, Германия). Система включала модуль временной корреляции одиночных фотонов (TCSPC) SPC-150 и гибридный фотодетектор GaAsP HPM-100-07; первичная сборка и контроль качества сырых данных выполнялись в программном обеспечении SPCImage (Becker & Hickl, версия 8.x). Для спектрального разделения сигналов использовали полосовые фильтры FB450-40 и FB550-40 (Thorlabs, США) для каналов NADH и FAD соответственно; фактические спектральные диапазоны анализа были ограничены приблизительно 410–490 nm для NADH и 510–590 nm для FAD. Для каждого экспериментального образца регистрировали по 2–3 FLIM-изображения; каждое изображение включало не менее 15 зрелых клеток цере-

брального эндотелия и использовалось для независимого анализа.

Все измерения организовывались в рамках трёх экспериментальных групп образцов: „DTT“ — клетки подвергали обработке дитиотреитолом (DTT) в условиях, описанных в разделе „Индукция редуцированного стресса“; „Control“ — клетки измеряли в бессывороточной среде (serum-free) и использовали как базовый контроль; „Intact“ — клетки измеряли в полноценной питательной среде DMEM.

Предварительная обработка FLIM-изображений выполнялась в SPCImage: проводились оценка качества по числу зарегистрированных фотонов на пиксель и отбраковка шумовых пикселей по порогу, настройка коррекции фона и базовая фильтрация. Для интерпретации временных характеристик флуоресценции в спектральных диапазонах NADH и FAD применяли фазорный подход (phasor analysis) без параметрического фиттинга согласно протоколу Ranjit et al. (Nat. Protoc. 2018). В этом представлении каждый пиксель описывается координатами  $G$  и  $S$  — действительной и мнимой частями первого гармонического компонента преобразования Фурье функции затухания флуоресценции. В дополнение к фазорному анализу без фиттинга, для количественной оценки метаболического статуса и упрощённой биологической интерпретации мы извлекали из временных кривых также параметрические величины — соотношение амплитуд компонент и средние времена жизни. В частности, для NADH выполняли биэкспоненциальную деконволюцию времён жизни в программном обеспечении SPCImage (Becker & Hickl) с априорно заданными компонентами  $\tau_1 \approx 0.4$  ns (короткая компонента, „свободный“ NADH) и  $\tau_2 \approx 2.5$  ns (длинная компонента, „связанный“ NADH); из результатов фиттинга получали предэкспоненциальные коэффициенты  $a_1$  и  $a_2$  и рассчитывали отношение  $a_1/a_2$ . Увеличение этого параметра интерпретировали как возрастание относительного вклада короткой компоненты (увеличение доли „свободного“ NADH относительно связанного), что в биологическом контексте принято рассматривать как повышение цитозольного пула  $NAD^+$  и NADH и как признак смещения метаболизма в сторону гликолитических путей или редуцированного состояния. Для наглядности и сопоставимости с фазорными координатами значение  $a_1/a_2$  усредняли по ROI (интенсивностно-взвешенное среднее) и использовали в качестве „метаболического индекса“ в текстах результатов и на графиках.

Аналогично для FAD рассчитывали среднее время жизни  $\tau_{mean}$  как интенсивностно-взвешенное среднее по компонентам, полученным при трехэкспоненциальном фиттинге (типичный  $\tau_i$  для FAD:  $\tau_1 \approx 0.25$  ns,  $\tau_2 \approx 1.4$  ns,  $\tau_3 \approx 5.0$  ns). Для NADH среднее время жизни вычисляли по формуле  $\tau_{mean} = (a_1\tau_1 + a_2\tau_2)/(a_1 + a_2)$ , для FAD — по аналогичной взвешенной сумме по трём компонентам. Изменения  $\tau_{mean}$  используются как дополнительный маркер смещения редокс-состояния: направление и величина изменения  $\tau_{mean}$  визуализировались совместно с

фазорными центроидами для демонстрации траекторий смещения в фазорном пространстве (например, переход в сторону более коротких/длинных средних времён жизни соответствует перемещению центроидов вдоль дуги фазорной полуокружности).

Все амплитудные коэффициенты и  $\tau_{mean}$  получались на уровне пикселя и затем агрегировались по ROI/изображению; при агрегировании применялась интенсивностная взвешенность, чтобы учесть вклад ярких пикселей. Поскольку фазорный подход изначально применяется как метод без фиттинга, использование  $a_1/a_2$  и  $\tau_{mean}$  рассматривалось как комплементарный анализ, повышающий биологическую интерпретируемость наблюдаемых сдвигов. Сопоставление результатов фазорного анализа и параметрических метрик служило дополнительной мерой устойчивости выводов: основные тренды (изменения центроидов  $G$ ,  $S$ ) подтверждались направлением и величиной изменений параметров  $a_1/a_2$  и  $\tau_{mean}$ .

Алгоритмы построения фазорных диаграмм, вычисления плотностей и центроидов, а также визуализации реализованы на языке программирования Julia с использованием библиотек KernelDensity и Makie. Перед статистической обработкой дополнительно применяли фильтрацию по интенсивности: отбирали верхние 1–25% точек по интенсивности (величина фильтрации варьировала в зависимости от качества конкретного набора изображений), чтобы минимизировать влияние фонового шума и артефактов.

**Статистический анализ** данных и построение графиков были выполнены с использованием программного пакета GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, США) и языка программирования R. Нормальность распределения и равенство дисперсий полученных данных проверяли с помощью тестов Шапиро-Уилка и Левене соответственно. Для сравнения групп в случае нормального распределения данных и соблюдения условия гомоскедастичности применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим post-hoc-тестом Тьюки. Если данные не соответствовали предположениям о нормальности или гомоскедастичности, для сравнения групп использовали непараметрический тест Краскела-Уоллиса с последующим post-hoc-тестом Данна.

Для попарных сравнений фазорных распределений между группами (DTT vs Control, Intact vs Control, DTT vs Intact) использовали непараметрический тест Манна-Уитни (Mann–Whitney U); для многомерных сравнений при необходимости применяли MANOVA с последующими поправками на множественные сравнения. Кроме  $p$ -значений, для оценки практической значимости рассчитывали коэффициент перекрытия (overlap metric) распределений в диапазоне 0–1, где 1 соответствует полному перекрытию.

Данные представлены как  $M \pm SD$  либо как медиана  $\pm IQR$ , где  $M$  — это среднее,  $SD$  — среднеквадратическое отклонение,  $IQR$  — межквартильный размах в зависимости от формы распределения; различия считали

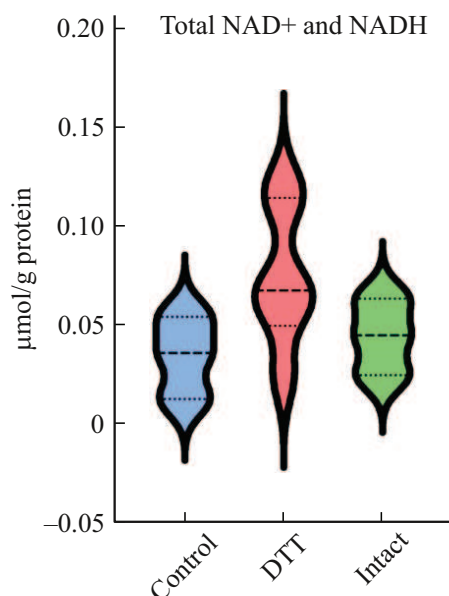
статистически значимыми при  $p < 0.05$ , если не указано иное.

## Результаты

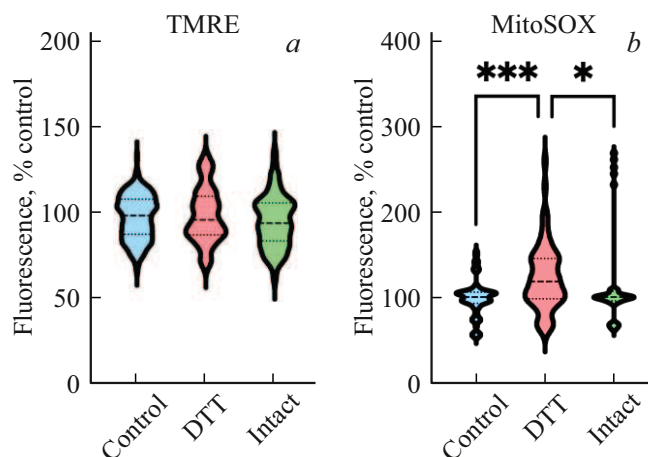
Моделирование восстановительного стресса в культуре клеток церебрального эндотелия экспериментальных животных проводили с использованием низкомолекулярного восстанавливающего агента дитиотреитола (DTT), основная функция которого заключается в предотвращении образования дисульфидных связей в молекулах белков, особенно внутримолекулярных и межмолекулярных связей между остатками цистеина белков. Методом иммуноокрашивания было показано преобладание CD31-иммунопозитивных клеток (88%), экспрессирующих характерные для эндотелия микрососудов головного мозга мембранные белки клеточной адгезии, что подтверждает качество полученных клеточных культур, и они могут быть использованы для оценки эффектов редуктивного стресса.

Мы обнаружили, что содержание суммарного NAD<sup>+</sup> и NADH в культуре эндотелия при добавлении DTT составило  $0.075 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$  белка, что на 55% выше, чем в контроле ( $0.034 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$  белка), однако эти данные статистически не значимы ( $p = 0.174$ ) (рис. 1).

Инкубация с DTT в течение 24 h значимо не изменяет трансмембранный митохондриальный потенциал в культуре клеток церебрального эндотелия (рис. 2, *a*) во всех исследуемых группах ( $p = 0.2843$ ). Отмечается достоверное увеличение митохондриальной продукции супероксида в клетках, культивируемых с добавлением



**Рис. 1.** Содержание суммарного пула NAD<sup>+</sup> и NADH в клетках культуры церебрального эндотелия при индукции редуктивного стресса *in vitro*. Данные представлены в виде медиана  $\pm$  IQR.

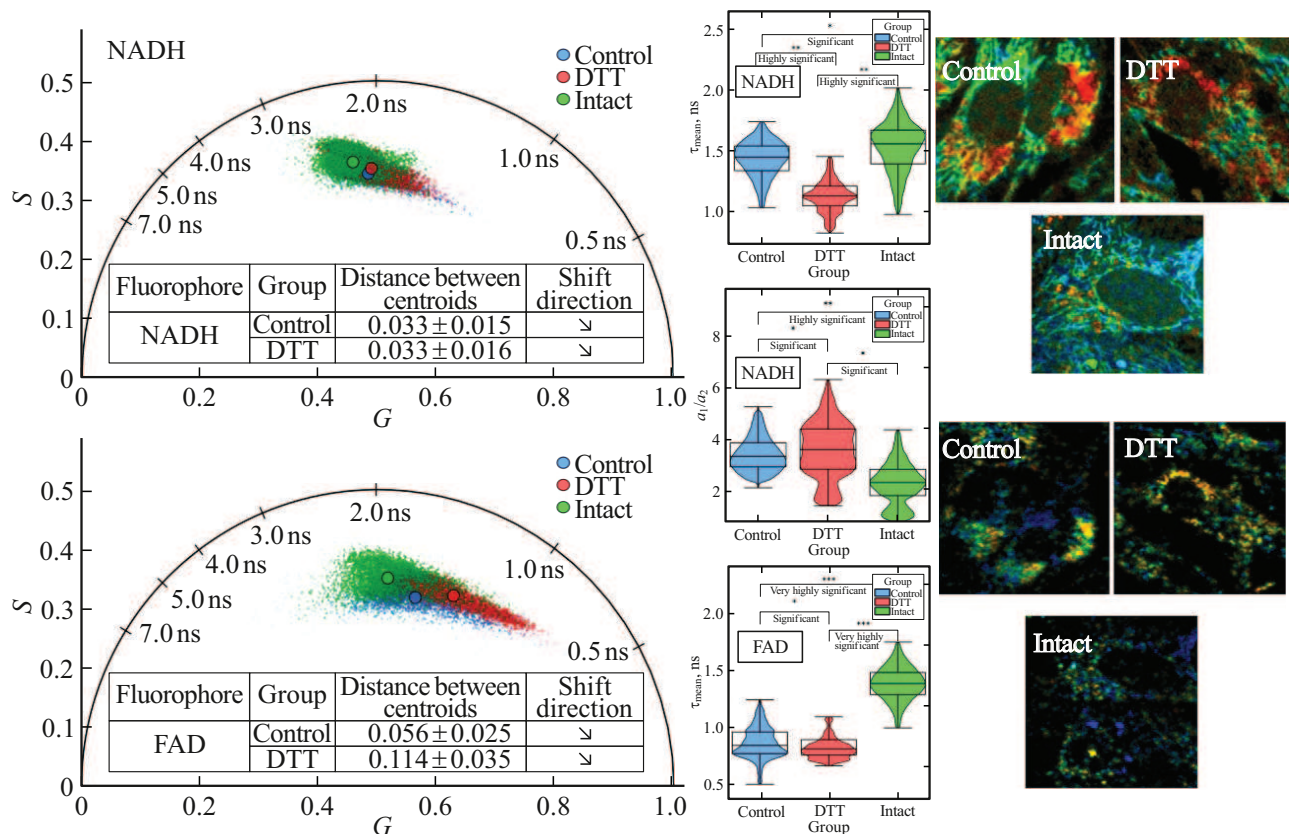


**Рис. 2.** (а) Уровень трансмембранного митохондриального потенциала; (б) оценка митохондриальной продукции активных форм кислорода в культуре клеток церебрального эндотелия в условиях моделирования редуктивного стресса (DTT, 24 h). Данные представлены в виде медиана  $\pm$  IQR; \*\*\* —  $p < 0.001$ , \* —  $p < 0.05$ .

DTT ( $123.7 \pm 38.24$ ) по сравнению как с контрольной ( $99.83 \pm 20.95$ ,  $p = 0.0004$ ), так и с интактной ( $119.3 \pm 59.25$ ,  $p = 0.0408$ ) группами (рис. 2, *b*). Таким образом, моделирование редуктивного стресса запускает развитие окислительного стресса, однако это не сопровождается функциональным изменением митохондрий церебрального эндотелия *in vitro*.

Редокс-дисбаланс, возникающий вследствие нарушения равновесия между прооксидантными и антиоксидантными системами клетки, может привести к смещению в сторону восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов — снижению уровня NAD<sup>+</sup> и накоплению NADH. Для оценки последствий такого дисбаланса в клетках церебрального эндотелия был применен высокочувствительный метод — микроскопия с визуализацией времени жизни флуоресценции (FLIM), позволяющий количественно анализировать редокс-состояние на основе аутофлуоресценции метаболических коферментов NADH и FAD. На рис. 3 представлены фазовые диаграммы, отражающие изменения в спектральных диапазонах NADH и FAD до и после инкубации с DTT.

На FLIM-картах и фазовых диаграммах (рис. 3) заметно, что после инкубации с восстановителем DTT в части митохондрий, расположенных вблизи ядра, усиливается сигнал короткоживущей компоненты — времени жизни NADH (отмечено красным на изображениях). Локальное увеличение вклада короткой компоненты интерпретируется как возрастание доли „свободного“ NADH и соответственно как повышение соотношения NADH/NAD<sup>+</sup> — характерный маркер редуктивного стресса. Параллельно наблюдаемая „размытость“ и утрата чёткости митохондриальных границ может отражать не только накопление NADH в матриксе органелл, но и его частичную буферизацию или перемещение



**Рис. 3.** Фазорный и параметрический анализ FLIM-данных для NADH (NADH, верхние панели) и FAD (FAD, нижние панели) в церебральных эндотелиальных клетках при трёх экспериментальных условиях („Intact“ — среда с сывороткой, „Control“ — бессывороточная среда, „DTT“ — обработка дитиотрептолом). Слева — фазорные диаграммы  $G-S$  с распределением пикселей по группам (синий — Control, красный — DTT, зелёный — Intact) и отмеченными интенсивностно-взвешенными центроидами; полукруг соответствует моноэкспоненциальному затуханию, деления на дуге служат ориентиром для эквивалентных времён жизни. Вложенные таблицы в левых панелях приводят евклидовы расстояния между центроидами групп и направленность суммарного сдвига (стрелки). Справа представлены репрезентативные пространственные карты времён жизни (phasor-mapping) для условий „Intact“, „Control“ и „DTT“ (цветовое кодирование времён жизни) и соответствующие графики распределений ключевых метрик: интенсивностно-взвешенные  $\tau_{\text{mean}}$  для NADH и FAD и параметр  $a_1/a_2$  для NADH (параметр  $a_1/a_2$  отражает отношение амплитуд короткой и длинной компонент NADH). Данные представлены в виде  $M \pm SD$  либо как медиана  $\pm IQR$  в зависимости от формы распределения; \*\*\* —  $p < 0.001$  и overlap  $< 0.2$ ; \*\* —  $p < 0.001$  и перекрытие 0.2–0.4 либо  $p < 0.01$  и overlap  $< 0.3$ ; \* — другие комбинации  $p < 0.05$ .

в цитозоль, что согласуется с нарушением компарментализации нуклеотидных пулов при расстройстве митохондриального гомеостаза.

Ключевым наблюдением является то, что схожие изменения — усиление короткой NADH-компоненты и снижение морфологической дифференциации митохондрий — фиксируются и в контрольной группе, культивируемой в бессывороточной среде. Это свидетельствует о значительном вкладе условий культивирования (в частности, отсутствия сывороточных факторов) в формирование редокс-дисбаланса: „свободная“ культура может сама по себе индуцировать фенотип, частично имитирующий эффект восстановителей, что делает обязательным строгий контроль состава среды при интерпретации FLIM-параметров как маркеров патологического состояния.

В отношении FAD на представленных данных наблюдается сокращение  $\tau_{\text{mean}}$  в обеих группах (DTT и Control). Снижение  $\tau_{\text{mean}}$  FAD соотносится с метаболическим смещением в сторону усиления механизмов регенерации NAD<sup>+</sup>, прежде всего гликолитической регенерации (например, через активность лактатдегидрогеназы), и тем самым отражает компенсаторное метаболическое переключение клеток в ответ на избыток восстановленных эквивалентов. В сумме изменения по NADH и FAD формируют картину „метаболического сдвига“, объединяющего локальный редуктивный стресс и системную активацию гликолитических путей.

Практическое значение полученных результатов состоит в том, что фазор-FLIM адекватно и пространственно разрешённо отображает функциональную неоднородность редокс-состояния в популяции церебральных

эндотелиальных клеток и чувствительно выявляет как прямые восстановительные воздействия (ДТТ), так и фоновые эффекты, индуцируемые условиями культивирования. Для чёткой дифференциации адаптивного метаболического переключения и истинной митохондриальной дисфункции необходимы дополнительные контрольные измерения, в частности прямая оценка пула  $\text{NAD}^+$  и  $\text{NADH}$ , измерения лактата, а также функциональные тесты митохондрий (OCR, мембранный потенциал) и морфологическая валидация органелл.

## Дискуссия

В работе впервые проведена оценка функционального состояния митохондрий и метаболического профиля клеток церебрального эндотелия при моделировании редуکتивного стресса *in vitro* с использованием ДТТ в качестве восстанавливающего агента. Показано, что 24 h инкубация с ДТТ не приводит к достоверным изменениям трансмембранного митохондриального потенциала и общего содержания  $\text{NAD}^+$  и  $\text{NADH}$  в клетках церебрального эндотелия, однако наблюдается увеличение митохондриальной продукции супероксиданиона, что свидетельствует о возникновении признаков окислительного стресса на фоне сохранения структурно-функциональной целостности митохондрий в условиях редокс-дисбаланса. Это, в целом, соответствует представлениям о сопряженном характере развития редуکتивного и окислительного стресса в клетках [8], в том числе в контексте повреждения клеток эндотелия при старении [19].

Полученные данные подтверждают высокую информативность фазор-FLIM для выявления ранних метаболических перестроек в церебральных эндотелиальных клетках: уже через 1 h после экспозиции ДТТ отмечается заметное увеличение вклада короткоживущей компоненты  $\text{NADH}$  — параметра, который традиционно интерпретируют как отражение „свободного“ (включая цитозольный) пула кофермента и соответственно как индикатор повышения соотношения  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Такая пространственно-разрешённая интерпретация без фиттинга времён жизни хорошо описана в методологии фазорного подхода и служит надёжным инструментом для анализа без фиттинга распределений  $\tau$  в тканях и культурах [20].

Параллельное сокращение  $\tau_{\text{mean}}$  FAD и согласованные смещения фазорных координат указывают на согласованное смещение метаболического профиля в сторону усиления путей регенерации  $\text{NAD}^+$ , в первую очередь гликолитической регенерации, что следует трактовать как адаптивное метаболическое переключение клеток при избытке восстановительных эквивалентов, а не однозначно как первичную острую дисфункцию дыхательной цепи. Аналогичные переходы в метаболическом статусе при различном метаболическом стрессе описаны и ранее

при применении фазор-FLIM для различения метаболических состояний [21].

Критически важно, что сходная картина (увеличение вклада короткой  $\text{NADH}$ -компоненты и уменьшение  $\tau_{\text{mean}}$  FAD) наблюдалась также в контрольной группе, культивируемой в бессывороточной среде. Это подчёркивает существенный вклад условий культивирования (в частности, отсутствия сывороточных факторов) в формирование редокс-дисбаланса и указывает на необходимость строгого контроля состава среды при интерпретации FLIM-параметров в моделях редокс-стресса.

Наконец, следует учитывать, что сокращение  $\tau_{\text{mean}}$  не всегда однозначно отражает только перераспределение „свободного“/„связанного“  $\text{NADH}$ : недавние исследования демонстрируют, что изменения  $\tau_{\text{mean}}$  могут частично зависеть и от изменения общего пула  $\text{NADH}$ , что вносит дополнительную нюансность в интерпретацию данных FLIM. В частности, визуализация субклеточных изменений пула  $\text{NADH}$  с применением FLIM недавно продемонстрирована в экспериментальных работах, что следует принимать во внимание при анализе сокращения  $\tau_{\text{mean}}$  в моделях редуکتивного стресса [14].

Таким образом, клетки церебрального эндотелия сохраняют жизнеспособность и функциональную целостность митохондрий при экспериментальном моделировании редуکتивного стресса *in vitro*, однако их энергетический метаболизм быстро перестраивается в сторону усиленного гликолиза. Это переключение, по-видимому, представляет собой компенсаторный ответ на избыток восстановленных эквивалентов, однако при длительном действии может стать фактором риска, способствующим нарушению проницаемости ГЭБ. Важно подчеркнуть, что энергетический кризис в эндотелиоцитах церебральных микрососудов рассматривается как один из ключевых патогенетических механизмов повреждения ГЭБ и прогрессирования нейродегенеративных заболеваний [22–25].

## Выводы

В настоящей работе с использованием метода микроскопии с измерением времени жизни флуоресценции впервые показано, что клетки церебрального эндотелия проявляют пластичность к экзогенно индуцированному редуکتивному стрессу: при сохранении митохондриального мембранного потенциала и на фоне окислительного повреждения они демонстрируют быструю метаболическую перестройку — смещение энергетического метаболизма в сторону гликолиза. Это указывает на то, что компенсаторная перестройка метаболизма, а не митохондриальная дисфункция является ключевым ранним маркером редокс-дисбаланса в эндотелии ГЭБ. Полученные данные подчёркивают высокую чувствительность FLIM к субклиническим изменениям редокс-гомеостаза. Важно, что FLIM позволяет выявлять изменения в

редокс-состоянии задолго до появления морфологических или функциональных признаков повреждения клеток.

Несмотря на общий прогресс в понимании редокс-регуляции, изучение редуктивного стресса в клетках НВЕ и ГЭБ остаётся недостаточно разработанным. Ключевые ограничения включают отсутствие стандартизированных *in vitro* и *in vivo* моделей редуктивного стресса, специфичных для клеток ЦНС; трудности интерпретации эффектов экзогенных восстановителей из-за влияния условий культивирования (в частности, бессывороточной среды); ограниченную доступность методов для точной оценки редокс-статуса и митохондриальной функции в реальном времени. Перспективными направлениями являются разработка физиологически релевантных моделей НВЕ/ГЭБ, применение генетически кодируемых редокс-сенсоров для динамического мониторинга соотношений NAD<sup>+</sup>/NADH и GSSG/GSH *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, FLIM-спектроскопия представляет собой инструмент для неинвазивного, количественного и пространственно разрешённого мониторинга редокс-метаболического статуса в клетках НВЕ и ГЭБ. Результаты работы расширяют представления о редокс-пластичности ГЭБ и открывают возможности для разработки новых оптических биомаркеров ранних стадий нейродегенеративных заболеваний. В перспективе интеграция FLIM с генетически кодируемыми сенсорами и физиологически релевантными моделями НВЕ позволит терапевтических агентов и персонализированной нейропротекции.

### Соблюдение этических стандартов

Все эксперименты с использованием лабораторных животных проведены в строгом соответствии с этическими нормами, установленными законодательством Российской Федерации, принципами Базельской декларации, одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ РЦНН (протокол № 10-9/23 от 20.12.2023 г.).

### Финансирование работы

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования в рамках государственного задания „Аберрантная метаболическая пластичность клеток нейроваскулярной единицы при патологии головного мозга“, № 1023101100004-9-3.1.8;3.1.4.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] O.L. Lopatina, Y.K. Komleva, N.A. Malinovskaya, Y.A. Panina, A.V. Morgun, A.B. Salmina. *Front. Immunol.*, **11** (2020). DOI: 10.3389/fimmu.2020.585294
- [2] A.B. Salmina, E.V. Kharitonova, Y.V. Gorina, E.A. Teplyashina, N.A. Malinovskaya, E.D. Khilazheva, A.I. Mosyagina, A.V. Morgun, A.N. Shuvaev, V.V. Salmin, O.L. Lopatina, Y.K. Komleva. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (9), 4661 (2021). DOI: 10.3390/ijms22094661
- [3] A.B. Salmina. *Neurochem. J.*, **17** (3), 325–337 (2023). DOI: 10.1134/S1819712423030157
- [4] E.A. Pozhilenkova, O.L. Lopatina, Y.K. Komleva, V.V. Salmin, A.B. Salmina. *Rev. Neurosci.*, **28** (4), 397–415 (2017). DOI: 10.1515/revneuro-2016-0071
- [5] U.H. Lengen, S. Ayloo, C. Gu. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **35** (1), 591–613 (2019). DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062608
- [6] D.N. Doll, H. Hu, J. Sun, S.E. Lewis, J.W. Simpkins, X. Ren. *Stroke*, **46** (6), 1681–1689 (2015). DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.009099
- [7] Y. Wang, J. Wu, J. Wang, L. He, H. Lai, T. Zhang, X. Wang, W. Li. *Mitochondrion*, **69**, 71–82 (2023). DOI: 10.1016/j.mito.2023.01.007
- [8] W.-X. Ma, C.-Y. Li, R. Tao, X.-P. Wang, L.-J. Yan. *OMCL*, 1–11 (2020). DOI: 10.1155/2020/5136957
- [9] J.J. Heindel, B. Blumberg, M. Cave, R. Machtinger, A. Mantovani, M.A. Mendez, A. Nadal, P. Palanza, G. Panzica, R. Sargis, L.N. Vandenberg, F. vom Saal. *Reprod. Toxicol.*, **68**, 3–33 (2017). DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.10.001
- [10] E.J. Anderson, M.E. Lustig, K.E. Boyle, T.L. Woodlief, D.A. Kane, C.-T. Lin, J.W. Price, L. Kang, P.S. Rabinovitch, H.H. Szeto, J.A. Houmard, R.N. Cortright, D.H. Wasserman, P.D. Neuffer. *J. Clin. Invest.*, **119** (3), 573–581 (2009). DOI: 10.1172/JCI37048
- [11] Y.-H. Wu, H.-L. Hsieh. *Antioxidants*, **12** (10), 1816 (2023). DOI: 10.3390/antiox12101816
- [12] A. Krakowiak, S. Pietrasik. *Biology*, **12** (6), 875 (2023). DOI: 10.3390/biology12060875
- [13] T.S. Blacker, Z.F. Mann, J.E. Gale, M. Ziegler, A.J. Bain, G. Szabadkai, M.R. Duchon. *Nat. Commun.*, **5** (1), 3936 (2014). DOI: 10.1038/ncomms4936
- [14] A. Song, N. Zhao, D.C. Hilpert, C. Perry, J.A. Baur, D.C. Wallace, P.M. Schaefer. *Commun. Biol.*, **7** (1), 428 (2024). DOI: 10.1038/s42003-024-06123-7
- [15] Y. Liu, Q. Xue, Q. Tang, M. Hou, H. Qi, G. Chen, W. Chen, J. Zhang, Y. Chen, X. Xu. *Microvasc. Res.*, **90**, 199–205 (2013). DOI: 10.1016/j.mvr.2013.08.004
- [16] М.Р. Капкаева, А.Б. Салмина, Е.Д. Хилажева, Д.Н. Воронков. Способ выделения эндотелия микрососудов мозга крысы [Электронный ресурс]. URL: [https://www.fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet](https://www.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet)
- [17] L. Yan, W. Liu, H. Zhang, C. Liu, Y. Shang, Y. Ye, X. Zhang, W. Li. *J. Cell Sci.*, (2014). DOI: 10.1242/jcs.135293
- [18] R.C. Scaduto, L.W. Grotyohann. *Biophys. J.*, **76** (1), 469–477 (1999). DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77214-0
- [19] M. Mladenov, L. Lubomirov, O. Grisk, D. Avtanski, V. Mitrokhin, I. Sazdova, M. Keremidarska-Markova, Y. Danailova, G. Nikolaev, R. Konakchieva, H. Gagov. *Antioxidants*, **12** (5), 1126 (2023). DOI: 10.3390/antiox12051126

- [20] S. Ranjit, L. Malacrida, D.M. Jameson, E. Gratton. *Nat. Protoc.*, **13** (9), 1979–2004 (2018). DOI: 10.1038/s41596-018-0026-5
- [21] C. Stringari, A. Cinquin, O. Cinquin, M.A. Digman, P.J. Donovan, E. Gratton. *PNAS*, **108** (33), 13582–13587 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1108161108
- [22] L.S.S. Ferreira, C.S. Fernandes, M.N.N. Vieira, F.G. De Felice. *Front. Neurosci.*, **12** (2018). DOI: 10.3389/fnins.2018.00830
- [23] A. Sędzikowska, L. Szablewski. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (18), 9987 (2021). DOI: 10.3390/ijms22189987
- [24] O.L. Lopatina, Y.A. Panina, N.A. Malinovskaya, A.B. Salmina. *Rev. Neurosci.*, **32** (2), 131–142 (2021). DOI: 10.1515/revneuro-2020-0077
- [25] A.S. Averchuk, M.V. Ryazanova, T.I. Baranich, A.V. Stavrovskaya, N.A. Rozanova, S.V. Novikova, A.B. Salmina. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **175** (3), 315–320 (2023). DOI: 10.1007/s10517-023-05859-2