

УДК 577.336

ЭФФЕКТЫ АДРЕНАЛИНА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ОДИНОЧНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПРИ ОЦЕНКЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Н.С. Кавок, М.Ю. Малюкина, И.А. Боровой, Н.Л. Погребняк.

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, пр. Ленина, 60, 61001, г. Харьков, Украина

Поступила в редакцию 28 ноября 2008г.

Принята 17 декабря 2008 г.

Методом микрофлуориметрии одиночных клеток, с использованием карбоцианинового зонда Н 510 (3,3-диэтилоксикарбоцианин бромида) оценивали величину плазматического потенциала гепатоцитов крыс, а также его изменений в динамике ответа клеток на краткосрочное воздействие адреналина. Значения потенциала рассчитывали по формуле Нернста, преобразованной в отношении катионных липофильных флуоресцентных зондов. Обнаружен фазовый характер изменений потенциала (фаза деполяризации и фаза гиперполяризации). Микрофлуориметрия одиночных клеток выявила наличие раннего пика гиперполяризации, предшествующего падению потенциала, на первых минутах стимуляции гормоном. На фоне общих тенденций отмечены индивидуальные различия в реакции отдельных клеток на гормональную стимуляцию.

Ключевые слова: микрофлуориметрия одиночных клеток, трансмембранный потенциал, гормональный сигнал, гепатоцит, адреналин.

Мембранный потенциал ($\Delta\Psi$) – физиологический параметр, который связан с проявлением различных сторон жизнедеятельности клетки – функциями роста, развития и дифференцировки. Он может служить высокочувствительным показателем клеточной функциональной активности. Обнаружено также, что деполяризация мембраны может являться одним из признаков раннего апоптоза [1, 2, 3]. $\Delta\Psi$ составляет важный параметр в исследованиях электрофизиологии клеточной активации при воздействии разнообразных стимулов. Известно, что в течение первых секунд и минут, следующих за лиганд-рецепторным взаимодействием, происходят изменения мембранной проницаемости к ионам одного или нескольких типов, включая Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , K^+ и Na^+ . Кроме того, могут происходить переходы этих ионов между внутриклеточными компартментами. Изменения ионных концентраций обычно сопровождаются изменениями трансмембранных потенциалов и внутриклеточного рН. На разных типах клеток с помощью различных техник и подходов было установлено, что не зависимо от природы действующего агониста (гормоны, антигены, нейротрансмиттеры, лекарственные соединения, лектины, или другие лиганды) типичными чертами, характеризующими клеточную активацию, является изменение мембранного потенциала и внутриклеточной концентрации ионов кальция. Таким образом, методы быстрой детекции клеточного ответа, основанные на определении одного или обоих параметров, дают ценную информацию об особенностях реализации гормонального эффекта в клетках мишенях, а также имеют значение для установления причин регуляторных нарушений при тех или иных патологических состояниях.

При изучении механизмов сигнальной передачи в настоящее время особый акцент делается на исследования в одиночных живых клетках. Значительные успехи в данной области достигнуты с применением оптических индикаторов – зондов, реагирующих на изменения мембранного потенциала изменениями интенсивности флуоресценции или смещением спектрального максимума [4, 5]. В отличие от ранее применявшегося прямого метода измерений с помощью микроэлектродной техники данный метод обладает целым рядом преимуществ.

В настоящей работе впервые было исследовано изменение трансмембранного плазматического потенциала, начиная с первых секунд стимуляции гормоном (катехоламином). При этом применялся метод флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов. Методы с применением микроэлектродной техники, пользовавшиеся популярностью ранее, не позволяли регистрировать столь ранние процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Зонд Н 510 синтезировали в лаборатории нанодисперсных материалов ИСМА НАН Украины (г. Харьков). Исходный (1 мМ) раствор исследуемого зонда в ДМСО разводили непосредственно перед экспериментом до необходимой концентрации.

В работе использовали изолированные гепатоциты печени крыс самцов (популяции Вистар) 3-х месячного возраста. Клетки выделяли неферментативным методом [6], жизнеспособность оценивали по исключению трипанового синего. Клетки ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) инкубировали с зондом Н 510 в концентрации 10^{-6} М. Инкубацию клеток проводили в HBSS (HEPES – buffered saline solution) буфере рН 7,4, при температуре 22°C. В данной модельной системе оценивали эффекты адреналина (10^{-6} М).

Наблюдение и фотографирование люминесцирующих объектов осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX71 и цифровой камеры Olympus C-5060. Полоса возбуждения для красителей Н 510 оставляла 450-490 нм. Динамику краткосрочных процессов изучали с помощью микрофлуориметрии одиночных клеток, осуществляя съемку люминесцирующих объектов в режиме непрерывного фотографирования. Оценивали интегральную флуоресценцию клетки, нормированную в отношении к фону. Обработку полученных данных проводили с помощью специализированного пакета прикладных программ. Расчет клеточного потенциала осуществляли по формуле Нернста адаптированной для измерений с помощью потенциал-чувствительных катионных красителей[7].

В отдельных экспериментах измеряли флуоресценцию клеток в суспензии на спектрофлуориметре Hitachi.

Данные представляли как среднее \pm ошибка среднего, достоверность различия между группами с применением параметрического критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящих исследованиях были оценены как долгосрочные эффекты адреналина на плазматический потенциал одиночных гепатоцитов, так и краткосрочные эффекты гормона на первых секундах и минутах стимуляции.

Поскольку при данном способе измерения трансмембранных потенциалов оперируют с равновесными концентрациями зонда, на начальном этапе исследовалась динамика связывания флуоресцентного красителя с клетками. Спектрофлуориметрические исследования включения зонда Н510 в гепатоциты показали, что процесс носит линейный характер приблизительно в течение 15-20 минут после внесения красителя в клеточную суспензию. Затем происходит уравнивание системы и выход показателей флуоресценции на плато. Подобная динамика связывания зонда Н510 с гепатоцитами была подтверждена с применением метода люминесцентной микроскопии клеток с последующей цифровой обработкой полученных фотографий. Опираясь на полученные результаты, в дальнейшем окрашивание гепатоцитов зондом Н510 проводили в течение 20 минут.

При измерении величины потенциала плазматической мембраны гепатоцитов крыс (3-х месячного возраста) с использованием зонда Н 510 полученные значения совпадали со значениями, полученными с применением микроэлектродной техники. Так, значение плазматического потенциала для крыс 3-х месячного возраста составило $-48,3 \pm 6,9 \text{ mV}$. Таким образом, результаты, получаемые с применением флуоресцентного зонда Н 510, можно считать адекватными.

При исследовании динамики изменений потенциала с помощью зонда Н 510 при стимуляции гепатоцитов адреналином в ранее проведенном исследовании был выявлен фазовый характер процесса и оценены его возрастные особенности. В настоящей работе было проведено более детальное исследование обнаруженных эффектов.

С помощью микрофлуориметрии одиночных клеток при использовании зонда Н510 фазовый характер изменений потенциала обнаруживался уже на начальном этапе клеточной активации (Рис. 1).

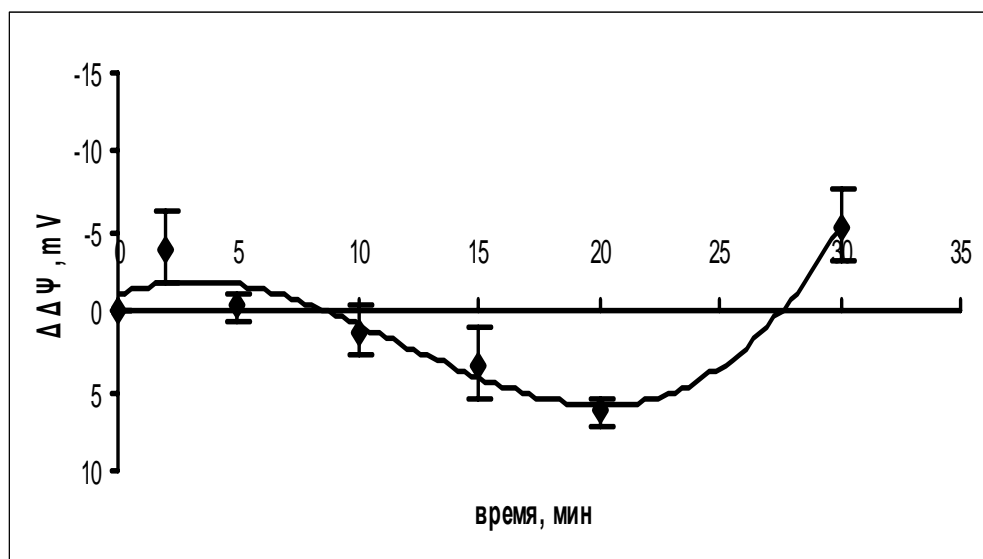


Рис. 1. Динамика изменения потенциала при стимуляции гепатоцитов крыс (3 месяца) адреналином для зонда Н 510.

Для исследования наиболее ранних процессов клеточной активации был применен подход на основе микрофлуориметрии одиночных клеток в условиях непрерывного наблюдения. Полученные данные подтвердили наличие первого пика гиперполяризации для молодых животных на первых минутах адреналинового воздействия (Рис. 2).

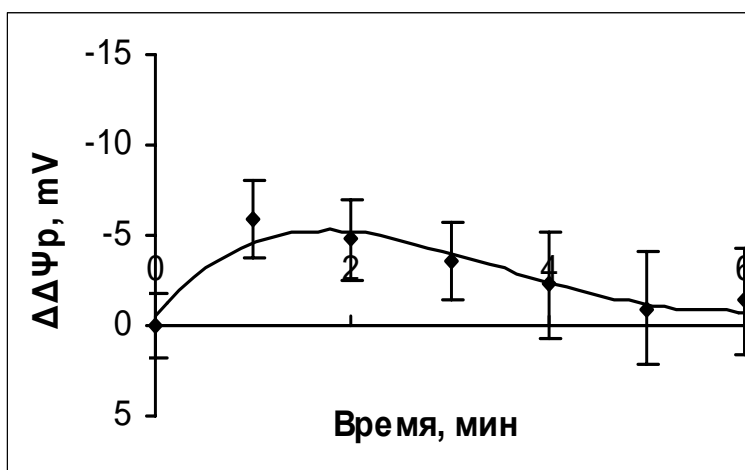


Рис. 2. Действие адреналина на мембранный потенциал гепатоцитов крыс (3 месяца) в краткосрочном эксперименте.

Также нами было отмечено, что между отдельными клетками на фоне общих тенденций существуют также индивидуальные различия в амплитуде изменений и даже ходе кривых (Рис.3).

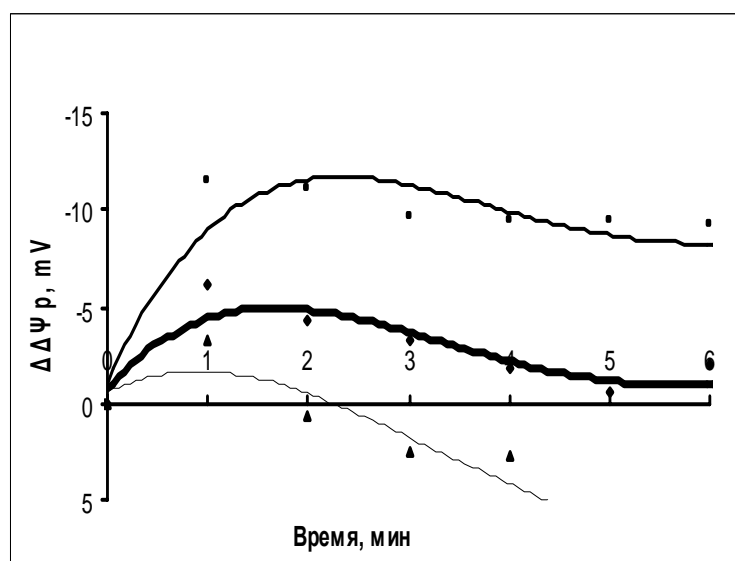


Рис. 3. Изменения мембранного потенциала в индивидуальных гепатоцитах крыс (3 месяца) при стимуляции адреналином.

Выявленные в данном методе оценки индивидуальные различия между клетками могут иметь значение при исследованиях динамики асинхронных процессов в клетках, например таких, как апоптоз. Отмечается, что возможность оценивать и визуализировать процессы в одиночных клетках относится к одному из наиболее важных преимуществ метода микрофлуориметрии, тогда как цитофлуориметрия имеет ряд существенных ограничений. Среди этих ограничений наиболее существенным является необходимость анализа большого массива клеток. И усреднение показателей. Кроме того, в отличие от широкого диапазона, используемого во флуоресцентной микроскопии, в цитометрии длина волны возбуждения ограничена параметрами люминесценции аргонового лазера.

ВЫВОДЫ

Таким образом, использованные подходы, основанные на микрофлуориметрии одиночных клеток, позволили выявить ранние эффекты адреналина на трансмембранный потенциал гепатоцитов и оценить индивидуальные различия в реакции клеток на регуляторный сигнал. Физиологическое значение изменений трансмембранного потенциала связано с процессами глюконеогенеза, поскольку известно значение гиперполяризации в активации транспорта глюконеопластических аминокислот и метаболитов для процессов глюконеогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bortner CD, Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in apoptosis mediated by the inactivation of the Na^+/K^+ - ATPase//J. Biol. Chem. 2001. 276:4304-4314.
2. Deckers CL, Lyons AB, Samuel K, Sanderson A, Maddy AH. Alternative pathways of apoptosis induced by methylprednisolone and valinomycin analyzed by flow cytometry//Exp Cell Res. 1993. 208: 342-370.
3. Mann C, Cidlowski JA. Glucocorticoids regulate the plasma membrane potential of primary thymocytes *in vivo* and *in vitro* //Endocrinology 2001. 142: 421-429.
4. Freedman J.C., Laris P.C. Electrophysiology of cells and organelles: studies with optical potentiometric indicators//Intern. Rev. Cytol. 1981. 12.:177-246.
5. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.-М.: Наука1989.-277с.
6. Канаева И.П., Карякин А.В., Аленичева Т.В., Бурмакова Г.А., Алимов Г.А., Арчанов А.М., Зинкович Г.Д. // Цитология. 1975. Т. 17. с. 545-551.
7. Ehrenberg B, Montana V, Wei M., Wuskell JP, Loew LM. Membrane potential can be determined in individual cells from the Nernstian distribution of cationic dyes//Biophys. J. 1988.53. 785-794.