

УДК

МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ В ОЦЕНКЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ОДИНОЧНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АДРЕНАЛИНА**Н.С. Кавок, А.М. Степаненко, И.А. Боровой, М.Ю. Малюкина***Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, 61001, г. Харьков, Украина*

Поступила в редакцию 1 июля 2008 г.

Принята 3 ноября 2008 г.

Методом микрофлуориметрии одиночных клеток, с использованием карбоцианинового зонда Н 510 (3,3-диэтилоксикарбоцианин бромида) оценивали мембранный потенциал интактных и стимулированных адреналином гепатоцитов. Значения потенциала рассчитывали по формуле Нернста, преобразованной в отношении катионных липофильных флуоресцентных зондов. Полученная в данном методе оценки, величина трансмембранного потенциала гепатоцитов составила $-48,3 \pm 6,9$ mV, данная величина не изменялась в присутствии протонофора FCCP (250 нМ), но снижалась при деполяризации мембранного потенциала под влиянием 140 мМ K^+ . Адреналин (10^{-6} М) вызывал фазные изменения потенциала – деполяризация достигала $+10,3 \pm 2,55$ mV, гиперполяризация составляла $-10,0 \pm 1,83$ mV. Гиперполяризующий эффект не обнаруживался при воздействии более низких концентраций гормона, а также альфа-адреномиметика фенилэфрина (10^{-6} М). Данные свидетельствуют о возможности оценки абсолютной величины и амплитуды изменений трансмембранного потенциала плазматической мембраны на уровне одиночных клеток с использованием данного производного карбоцианинов.

Ключевые слова: микрофлуориметрия одиночных клеток трансмембранный потенциал, гормональный сигнал

Известно, что величина трансмембранных потенциалов является важным показателем общего уровня метаболической активности клеток, их способности адекватно реагировать на воздействие или же свидетельствует о нарушениях в механизмах контроля внутриклеточных процессов. Метод флуоресцентных зондов позволяет проследить характер изменений мембранных потенциалов на уровне одиночных клеток и субклеточных частиц [1]. В данном методе оценки наряду с другими потенциал-чувствительными зондами находят применение производные карбоцианинов [2]. Известно, что распределение между клеточными компартментами положительно заряженных при нейтральных рН зондов происходит по электрохимическому градиенту в соответствии с уравнением Нернста. В сравнении с другими катионными зондами, которые стандартно используются в подобных исследованиях, производные карбоцианинов имеют более высокий квантовый выход и относительно фотостабильны. Однако их липофильность является существенным недостатком и может вызывать отклонения от распределения в клетках в соответствии с уравнением Нернста. Повышение флуоресценции зонда, обусловленное связыванием с мембранами может вносить дополнительные погрешности в расчет потенциала. Учитывая подобные характеристики зондов данного класса, полагают, что их использование для измерений потенциала плазматической мембраны требует внесения в расчеты поправки на липофильность, а также менее предпочтительно, в оценке митохондриального потенциала по сравнению с водорастворимыми зондами, такими как сафранин [3].

Поскольку мембранный потенциал может являться показателем гормонального эффекта на уровне клетки, его оценка имеет особое значение при исследовании электрофизиологии клеточной активации. Двухфазный характер изменений

(деполяризация – гиперполяризация) мембранного потенциала клеток печени крысы в ответ на стимуляцию адреналином был показан ранее с помощью электрофизиологического метода на целой печени [4]. Однако данные полученные на изолированных клетках носят достаточно противоречивый характер. Метод флуоресцентных зондов позволяет обнаруживать фазные изменения мембранного потенциала. В настоящих исследованиях для оценки потенциала плазматической мембраны был применен подход, предложенный в работе Ehrenberg et al [5] с использованием микрофлуориметрии одиночных клеток. Эффекты адреналина на данный параметр изучались в динамике.

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, жизнеспособность оценивали по исключению трипанового синего. Клетки концентрацией $5 \cdot 10^5$ кл/мл инкубировали с зондом Н510 в концентрациях от 10^{-8} М до 10^{-6} М. В зависимости от поставленной цели инкубацию проводили в калиевой среде (140 мМ K^+) или в буфере с добавками FCCP (250 нМ), валиномицина (500 нМ). В данной модельной системе оценивали эффекты адреналина в концентрациях от 10^{-8} до 10^{-6} М и альфа-адреномиметика фенилэфрина.

Наблюдение и фотографирование люминесцирующих объектов осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX71 и цифровой камеры Olympus C-5060. Полоса возбуждения для красителя Н 510 составляла 450-490 нм. Оценивали интегральную флуоресценцию клетки, нормированную по отношению 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 [5].

Интенсивность флуоресценции гепатоцитов в суспензии измеряли на спектрофлуориметре Hitachi в кювете толщиной 1 мм. При длинах волн возбуждения 470 нм и эмиссии 504 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку при данном способе измерения трансмембранных потенциалов оперируют с равновесными концентрациями зонда, на начальном этапе исследовалась динамика связывания флуоресцентного красителя с клетками. По данным микрофлуориметрии и спектрофлуориметрии уравнивание системы и выход показателей на плато происходил после 20 минут инкубации клеток с красителем при его концентрации (10^{-6} М) (Рис 1).

Согласно данным литературы для оценки потенциала клеток с помощью потенциал-чувствительных зондов необходимо стремиться к использованию красителя в наиболее низкой концентрации. Поэтому для выбора оптимальной концентрации в микрофлуориметрических исследованиях была определена концентрационная зависимость связывания зонда с клетками (Рис 2).

Окрашивание клеток при концентрации 10^{-6} М в инкубационной среде позволяло четко видеть наблюдаемые объекты. С другой стороны, при данной концентрации

красителя, проявлялся эффект воздействия на трансмембранный потенциал внешнего фактора.

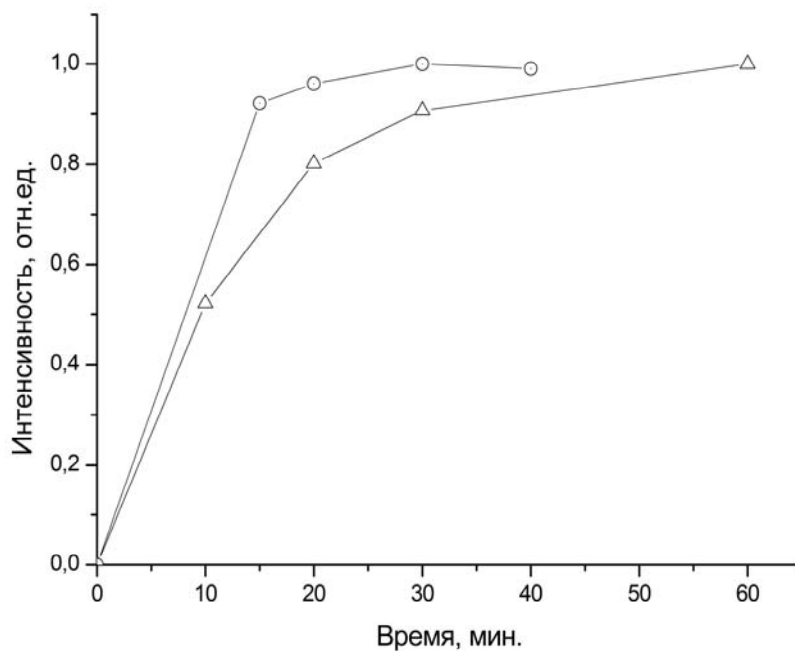


Рис 1. Динамика аккумуляции зонда Н 510 в одиночных клетках и суспензии гепатоцитов.

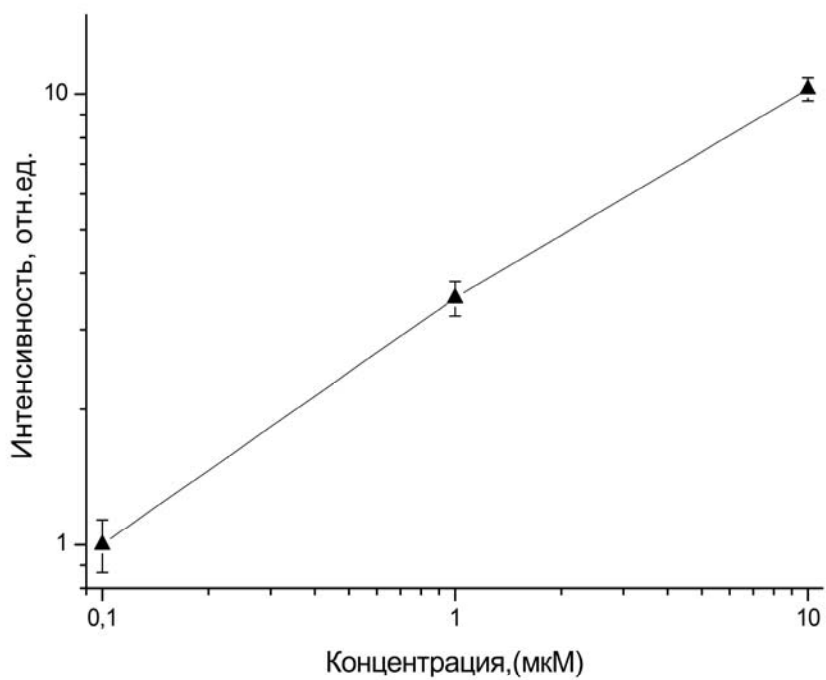


Рис 2. Концентрационная зависимость связывания зонда Н 510 в одиночных клетках.

Так падение потенциала, по сравнению с контролем, в высоко-калиевой среде при окрашивании зондом в концентрации 10^{-6} М составило $28,6 \pm 3,28$ мВ, а при концентрации 10^{-5} М только $3,96 \pm 1,04$ мВ.

Расчет трансмембранного потенциала по флуоресценции связанного с клетками зонда проводился по результатам микрофлуориметрических измерений. Известно, что мембранный потенциал целых клеток в отличие от изолированных органелл оценить с помощью оптических индикаторов гораздо сложнее, поскольку клетки содержат множество субклеточных компартментов и необходимо дифференцировать изменения оптических свойств, связанных с состоянием плазматической мембраны и любой другой мембранной структуры. Интенсивное окрашивание митохондрий цианиновыми красителями, проникающими через мембрану катионами, может исказить результаты измерений потенциала плазматической мембраны. Для исключения влияния данного фактора применялся протонофор FCCP, рассеивающий трансмембранный потенциал внутренней митохондриальной мембраны и инкубация в калиевой среде, которая приводит к снижению трансмембранного потенциала плазматической мембраны. Величина потенциала интактных гепатоцитов полученная в данном способе оценки составила $-48,3 \pm 6,9$ мВ. При добавлении протонофора FCCP (250 нМ) данная величина практически не изменилась ($-46,4 \pm 2,7$ мВ), тогда как при инкубации клеток в калиевой среде отмечалось снижение потенциала ($-30,2 \pm 3,7$ мВ). В исследованиях других авторов также было отмечено, что применение метаболических ингибиторов, угнетающих митохондриальные процессы, приводило к снижению флуоресцентного сигнала при окрашивании клеток карбоцианиновыми зондами не более чем на 15-20 % [1, 6]. Таким образом, можно утверждать, что полученные в настоящих исследованиях, значения, отражают величину трансмембранного потенциала плазматической мембраны клеток.

При оценке эффекта адреналина на трансмембранный потенциал гепатоцитов в динамике, был обнаружен фазный характер изменений (Рис 3).

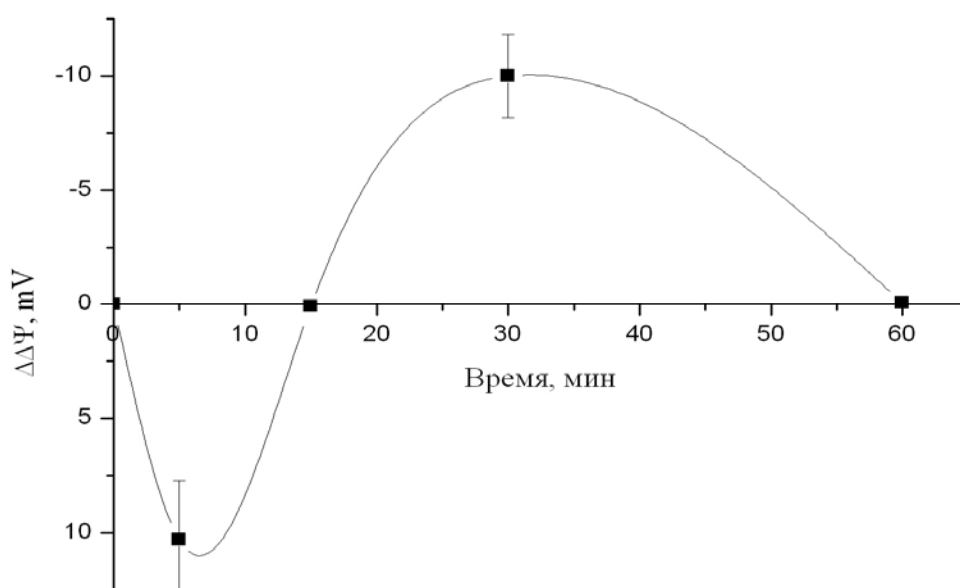


Рис 3. Динамика изменений трансмембранного потенциала одиночных клеток при стимуляции адреналином.

Учитывая, что максимальный эффект адреналина в концентрации 10^{-6} М проявлялся в гепатоцитах на 30 минуте воздействия гормона, в данной временной точке оценивалось действие более низких концентраций гормона и альфа-адреномиметика – фенилэфрина в концентрации 10^{-6} М (Рис 4). Отсутствие гиперполяризующего эффекта фенилэфрина, по-видимому, можно объяснить его более слабым, чем для адреналина, взаимодействием с рецепторами, при одинаковых концентрациях, либо иной динамикой процесса клеточной активации.

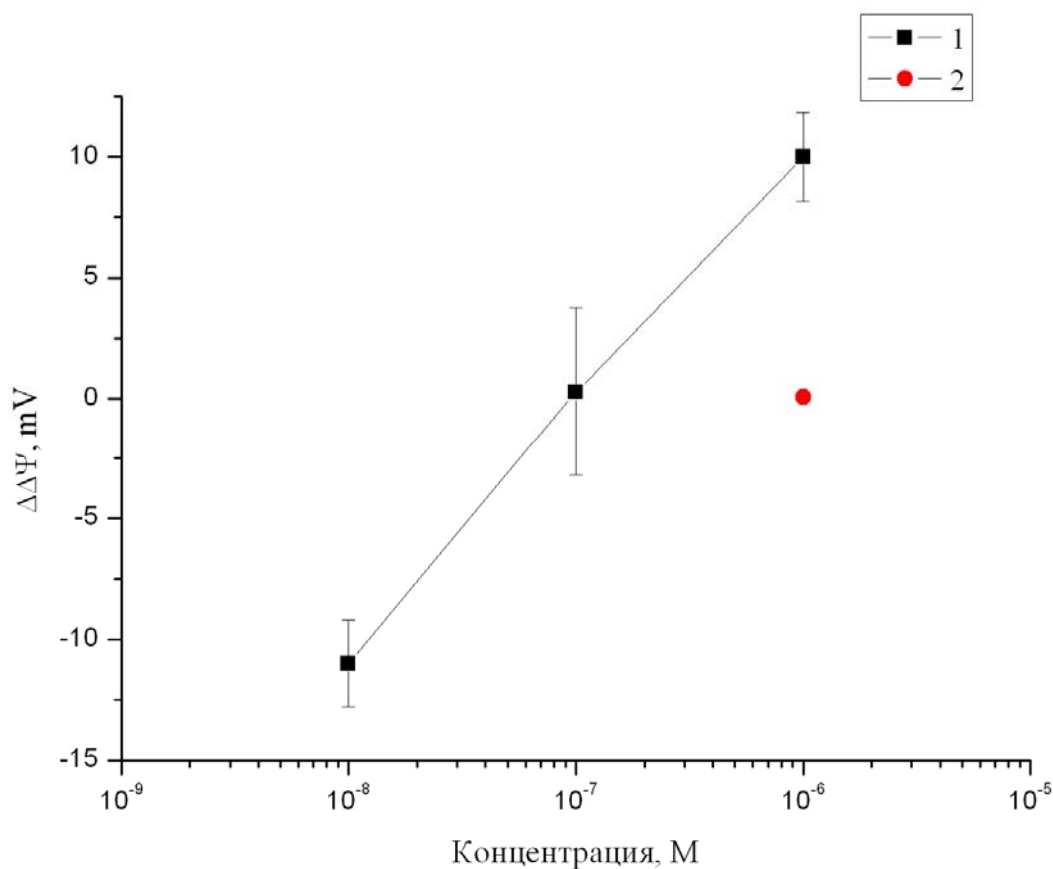


Рис 4. Эффекты адреналина (1) и фенилэфрина (2) на потенциал гепатоцитов в зависимости от концентрации.

В адреналин-стимулированных клетках амплитуда ответа трансмембранного потенциала на фоне протонифора не изменялась. Иная картина наблюдалась при действии адреналина в калиевой среде, эффект гиперполяризации отсутствовал, это указывает, что действие гормона реализуется на уровне потенциала плазматической мембраны (Рис 5).

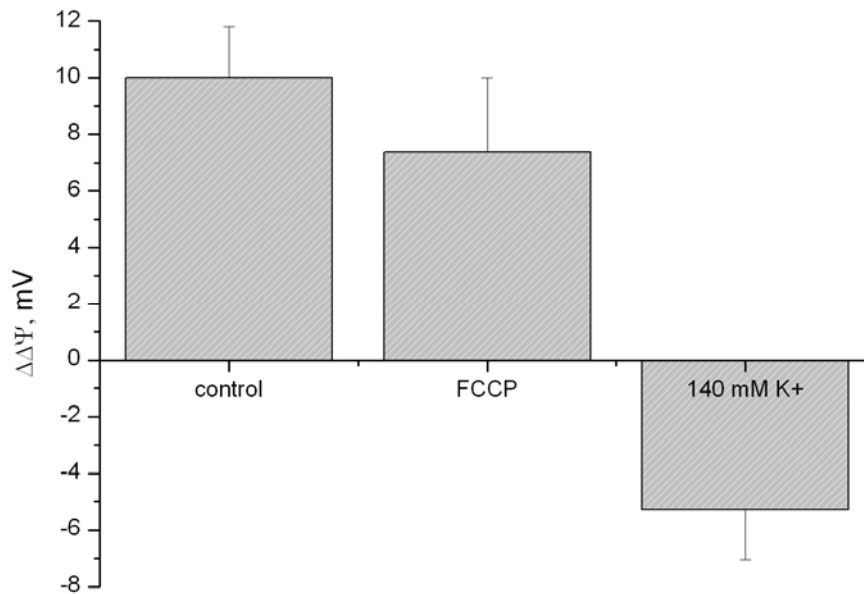


Рис 5. Изменения трансмембранного потенциала одиночных клеток при стимуляции адреналином на фоне рассеивающих потенциал воздействий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящих исследованиях на данной экспериментальной модели была продемонстрирована возможность измерений трансмембранного потенциала плазматической мембраны клеток с помощью флуоресцентного зонда Н 510, синтезированного на основе карбоцианинов. Показано, что динамика изменений флуоресценции адекватно отражает как амплитуду, так и направленность процесса поляризации плазматической мембраны, что можно использовать при оценке клеточной реакции на воздействие разнообразных регуляторных факторов и для выяснения тонких механизмов этого влияния.

Список литературы:

1. Shapiro H.M. Flow Cytometric probes of early events in cell activation// *Cytometry* 1981. Vol.1 1, N5. P.301-315.
2. Plášek J, Sigler K Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis//*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. -1996. Vol. 33, N2. P.101-124
3. Åkerman KE, Järvisalo JO. Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranin method//*Biochem. J.* 1980. Vol.192. P. 183-190.
4. Новикова А.И., Макогон Н.В. мембранный потенциал как показатель гормонального эффекта у животных разного возраста//Новые исследования по возрастной физиологии и биохимии, природе гетерозиса и экологии животных. – Вестн. Харьк. ун-та, № 226. – Харьков: Вища школа. Изд-во при Харьк. Ун-те, 1982. С.9-11.
5. Eherenberg B et al. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes//*Biophys J.* 1988. Vol. 53. N5.. P. 785-794.
6. Shapiro H.M. Membrane potential estimation by flow cytometry//*Methods*. 2000. Vol. 21. N 3. P. 271-279.