

УДК 577.336

ОЦЕНКА ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ ОДИНОЧНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

О.С. Фильчак, Н.С.Кавок, А.М. Степаненко, И.А.Боровой

Институт сцинтилляционных материалов НТК Институт монокристаллов

НАН Украины, 61001, г. Харьков, Украина

Поступила в редакцию 5 июня 2009 г

Принята 23 июня 2009 г.

В работе в сравнительном аспекте исследовались характеристики связывания с гепатоцитами крыс новосинтезированных диалкильных (С4 и С18) производных зонда JC-1. Было установлено, что С4-производные характеризуются сходной с JC-1 динамикой аккумуляции в клетках. В то же время суммарная интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных С4 разновидностями и соотношение агрегатной и мономерной форм были ниже, чем при окрашивании JC-1 в тех же концентрациях. При оценке динамики выгорания С4-производного в режиме непрерывного наблюдения клеток была установлена его большая по сравнению с исходной формой фоточувствительность. Из всех исследуемых разновидностей зонда интенсивность флуоресценции клеток и соотношение агрегатной и мономерной форм было наиболее низким при окрашивании клеток длинноцепочечным (С18) производным при тех же концентрациях. При оценке параметров флуоресценции на фоне воздействия протонофора FCCP, чувствительность к изменениям митохондриального трансмембранного потенциала показана только для исходной формы красителя.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондриальный трансмембранный потенциал, флуоресцентные зонды, гепатоциты.

THE ESTIMATION OF TRANSMEMBRANE POTENTIALS SINGLE HEPATOCYTES BY MEANS OF FLUORESCENT PROBES

O.S. Filchack, N.S. Kavok, A.M. Stepanenko, I.A. Borovoy

Institute For Scintillation Materials National Academy Of Sciences Of Ukraine, 60 Lenin Ave., Kharkov, 61001

In work in comparative aspect characteristics of the binding with rats' hepatocytes newly synthesized dialkyl (C4 and C18) derivatives of probe JC-1 were investigated. It has been established, that C4-derivatives are characterized similar with JC-1 dynamics of accumulation in cells. In that time total intensity of cell fluorescence dyed by C4-variant and aggregate and monomer forms ratio were lower, than at the using JC-1 in the same concentration. At an estimation of dynamics of burning out C4-derivatives in a mode of continuous supervision of cells, it was shown that it more photosensitive in comparison with the initial form. From all investigated variant of a probe intensity of fluorescence of cells and aggregate and monomer forms ratio was the lowest at dyeing of cells by C18 derivatives. At an estimation of parameters of fluorescence under influence of protonophore FCCP, sensitivity to changes mitochondrial potential is shown only for the initial form of dye.

KEY WORDS: mitochondrial membrane potential, fluorescent probes, hepatocytes.

ОЦІНКА ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МИТОХОНДРИЙ ПОДИНОКИХ ГЕПАТОЦИТІВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ

О.С. Фильчак, Н.С.Кавок, А.М. Степаненко, И.А.Боровой

Институт сцинтилляционных материалов НТК Институт монокристаллов

НАН України, 61001, м. Харків, Україна

В роботі у порівняльному аспекті досліджувалися характеристики зв'язування з гепатоцитами шурів новосинтезованих діалкільних (С4 і С18) похідних зонду JC-1. Було встановлено, що С4-похідні характеризуються подібною до JC-1 динамікою акумуляції в клітинах. У той же час загальна інтенсивність флуоресценції клітин, забарвлених С4-різними формами і співвідношення агрегатної та мономерної форм були нижче, ніж при забарвленні JC-1 тієї ж концентрації. При оцінюванні динаміки вигорання С4-похідного у режимі безперервного спостереження клітин була встановлена його більша у порівнянні з вихідною формою фоточувствительність. Из всіх досліджуваних різновидів зонду інтенсивність флуоресценції клітин та співвідношення агрегатної та мономерної форм було набагато нижчим при забарвленні клітин довголанцюговим (С18) похідним тієї ж концентрації. При оцінюванні параметрів флуоресценції на тлі впливу протонофора FCCP чутливість до змін митохондриального трансмембранного потенціалу спостерігалася тільки для вихідної форми барвника.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: митохондриальний трансмембранный потенциал, флуоресцентні зонди, гепатоцити.

Изменения функционального состояния клеток коррелятивно связаны с изменением мембранного потенциала, что выражается в регуляции транспорта ионов, направлении отдельных потоков субстратов и метаболитов. Поэтому оценка потенциалов живой клетки является одним из наиболее адекватных методов исследования ее функционального состояния. Полагают, что мембранный потенциал может являться полифункциональным регулятором активности локализованных в мембране белков-ферментов, показателем гормонального эффекта на уровне клетки [1].

Митохондриальный трансмембранный потенциал $\Delta\psi_m$ - разность потенциалов между матриксом митохондрий и внутриклеточной средой, многократно превышает потенциал плазматической мембраны. Он тесно связан с функционированием митохондрий. Митохондрии являются уникальными клеточными органеллами, способными создавать трансмембранный электрический потенциал, достигающий 200 мВ, при этом заряд внутри митохондрий отрицательный и величина рН внутреннего пространства составляет около 8. Как следствие митохондрии способны аккумулировать проникающие компоненты катионного характера, а также слабые кислоты в их анионной форме. Митохондриальный мембранный потенциал часто используют как маркер митохондриальной активности и жизнеспособности клеток, а также как один из критериев, свидетельствующих об активации апоптоза в клетке [2].

Флуоресцентная микроскопия с использованием флуоресцентных зондов позволяет изучать митохондриальную функцию на уровне одиночных клеток. Наиболее широкое применение находят в подобных исследованиях потенциалчувствительные красители, индикаторы кальция и рН, зонды для определения активных форм кислорода. Серьезным ограничением в интерпретации полученных данных является неравномерность в распределении красителей между клеточными компартментами. Однако использование конфокальной микроскопии позволяет получать флуоресцентный сигнал непосредственно от митохондрий *in situ* [3]. Малая применимость метода для изучения процессов в больших клеточных популяциях, поскольку дает возможность одновременной оценки лишь для небольшого количества клеток в тоже время может являться значительным преимуществом при исследовании тонких механизмов, определяющих индивидуальные особенности клеточной реакции на регуляторные воздействия.

Показано, что при определении различий $\Delta\psi_m$ на уровне одиночных клеток и изолированных органелл по сравнению с производными родаминов и карбоцианинов большими преимуществами обладает липофильный катион 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин йодид (JC-1) (Рис. 1).

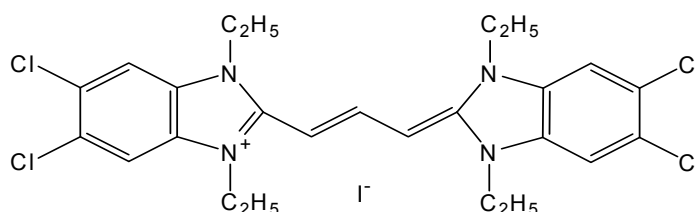


Рис. 1. Химическая структура JC-1: 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин йодид

Данное соединение избирательно накапливается в митохондриях, и при возрастании мембранного потенциала (свыше 80-100мВ) происходит обратимое изменение цвета флуоресценции зонда с зеленого на оранжевый.

Эти изменения обусловлены обратимым образованием J-агрегатов красителя при поляризации мембраны, что сопровождается сдвигом длин волн испускаемого

света с 520 нм (флуоресценция мономерной формы JC-1) до 590 нм (эмиссия J-агрегатов) при возбуждении светом 490 нм.

JC-1 в качестве молекулы-репортера применялся при анализе $\Delta\Psi_m$ в различных клетках млекопитающих и человека [4, 5, 6]. Показано, что образование J-агрегатов происходит при определенных концентрациях красителя, определенных pH (внутримитохондриальный диапазон pH 8.0-8.2) и определенной ионной силе по сравнению с внутримитохондриальным окружением [7]. Липофильные молекулы флуорохрома аккумулируются в матриксе митохондрий. В живой клетке JC-1 присутствует в виде мономеров при значениях потенциала (от положительных до -60-80 mV), гиперполяризация мембраны выше этих значений сопровождается образованием агрегатов. JC-1 позволяет изучать локальные изменения $\Delta\Psi_m$ и, в отличие от других красителей, визуализировать митохондрии с низким и высоким потенциалом. Образование и стабилизация агрегатов красителя в митохондриях зависит от интактности митохондрий и поддержания $\Delta\Psi_m$. Агенты и лекарственные соединения, разрушающие электрохимический градиент вызывают деполяризацию мембраны и потерю красной флуоресценции J-агрегатов. Результаты, полученные с помощью JC-1, свидетельствуют о значительных различиях $\Delta\Psi_m$ между типами клеток и о существовании внутриклеточных митохондриальных субпопуляций с различным потенциалом и даже указывают на различия в пределах хондриома одной клетки [8, 9, 10].

JC-1 применяется в биологических исследованиях с использованием различных техник и подходов – флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, флуоресцентной спектроскопии [11, 12, 13, 14]. В настоящих исследованиях нами с помощью микрофлуориметрии одиночных клеток в сравнительном аспекте изучались особенности окрашивания изолированных гепатоцитов новыми синтезированными производными JC-1 с различной длиной алкильных заместителей для оценки преимуществ новых красителей в исследовании митохондриальных процессов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Зонд JC-1 и его производные (C4 и C18) синтезировали в лаборатории нанокристаллических материалов ИСМА НАН Украины (г. Харьков). Исходный (1 мМ) раствор исследуемого зонда в ДМСО разводили непосредственно перед экспериментом до необходимой концентрации.

Исследования проводили на изолированных гепатоцитах крыс-самцов популяции Вистар 3 и 20 мес возраста. Клетки выделяли неферментативным методом, жизнеспособность клеток определяли по прокрашиванию трипановым синим. Инкубацию клеток с разновидностями красителя JC-1 (10^{-6} М) проводили в среде Игла pH 7,4 при концентрации $5 \cdot 10^5$ кл/мл. Протонофор FCCP вносили в среду инкубации в конечной концентрации 5 мкМ.

Наблюдение и фотографирование клеток осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX71 и цифровой камеры Olympus C-5060. Для мономеров всех разновидностей красителя JC-1 полоса возбуждения составляла 450-490 нм, полоса люминесценции 500 нм и выше. Для агрегатов эти параметры составляли - 510-560 нм и - 570 нм и выше. Оценивали интегральную интенсивность флуоресценции клеток нормированную к фону. Алгоритм получения данных о количественных изменениях флуоресценции в одиночных клетках и разработанные нами дополнительные компоненты программного обеспечения позволяли проводить обработку изображений в полуавтоматическом режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отработке метода окрашивания гепатоцитов крыс митохондриальным зондом JC-1 нами было установлено, что инкубация изолированных клеток на желатиновой подложке оказывает положительное влияние на их жизнеспособность. При этом повышалась способность клеток аккумулировать краситель. К первому часу эксперимента было обнаружено достоверное увеличение интенсивности суммарной флуоресценции связанного с клетками красителя, причем более выраженные изменения отмечались для его агрегатной формы (Рис.2). С учетом полученных данных, этот подход применяли для создания оптимальных условий для окрашивания клеток в дальнейших исследованиях.

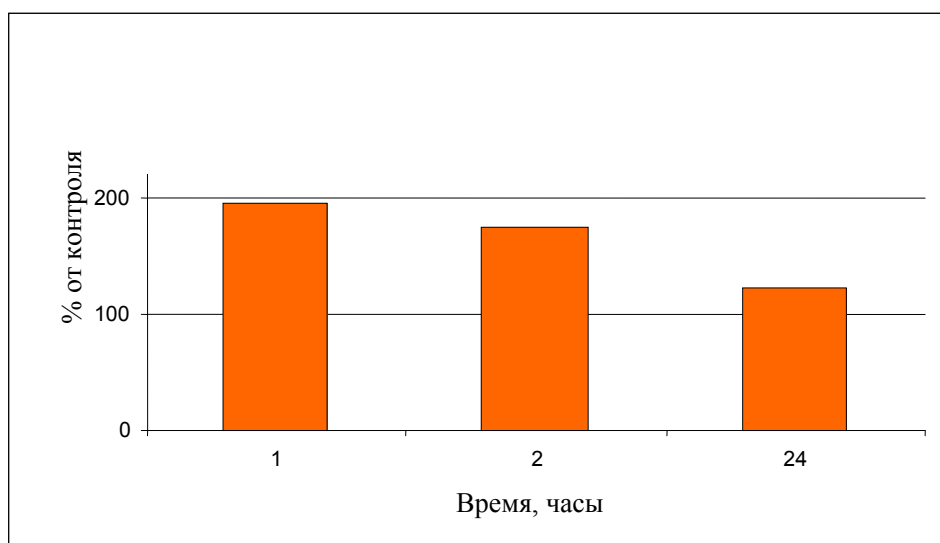


Рис.2. Окрашивание клеток зондом JC-1 в зависимости от условий инкубации.

Развернутая динамика накопления агрегатов красителя JC-1 в гепатоцитах представляла собой кривую с выходом на плато к 40 минутам от начала эксперимента (Рис.3). При оценке трансмембранных потенциалов с помощью зондов медленного типа, как известно уравнивание системы является обязательным условием. Исходя из полученных результатов, окрашивание гепатоцитов зондом в настоящих экспериментах проводилось не менее 1 часа.

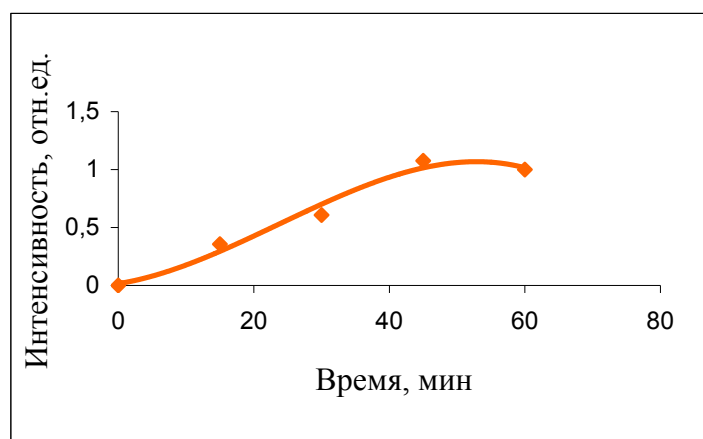


Рис.3. Динамика накопления агрегатов JC-1 в гепатоцитах

Сходную динамику имел процесс накопления агрегатов С4-производного зонда (Рис.4). Однако анализ параметров суммарной флуоресценции и флуоресценции отдельных форм, сравниваемых зондов выявил определенные различия. Так во всех случаях интенсивность флуоресценции исходного зонда оказывалась выше, чем показатели его производного. По-видимому, неспецифическое связывание зонда не только с клетками, но и окрашивание компонентов внеклеточной среды приводит к наблюдаемому снижению интенсивности флуоресценции клеток по отношению к фоновым значениям.

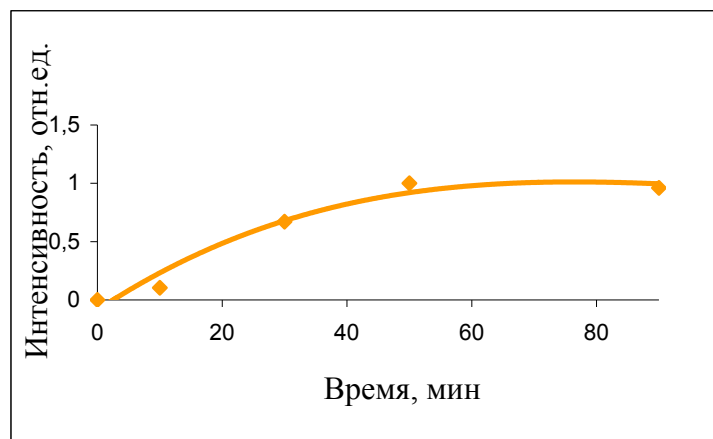


Рис.4. Динамика накопления агрегатов С4- производного JC-1

Известно, что одной из проблем флуоресцентной микроскопии является проблема фоточувствительности красителей. В настоящих исследованиях для всех разновидностей зонда JC-1 динамика выгорания агрегатов оценивалась при наблюдении в условиях освещения и фотографирования клеток через короткие, интервалом 30 секунд, промежутки времени. При данном режиме фотосъемки резкое падение флуоресценции С4-производного отмечалось уже с первых минут наблюдения, тогда как выгорание JC-1 происходило с меньшей скоростью (Рис.5).

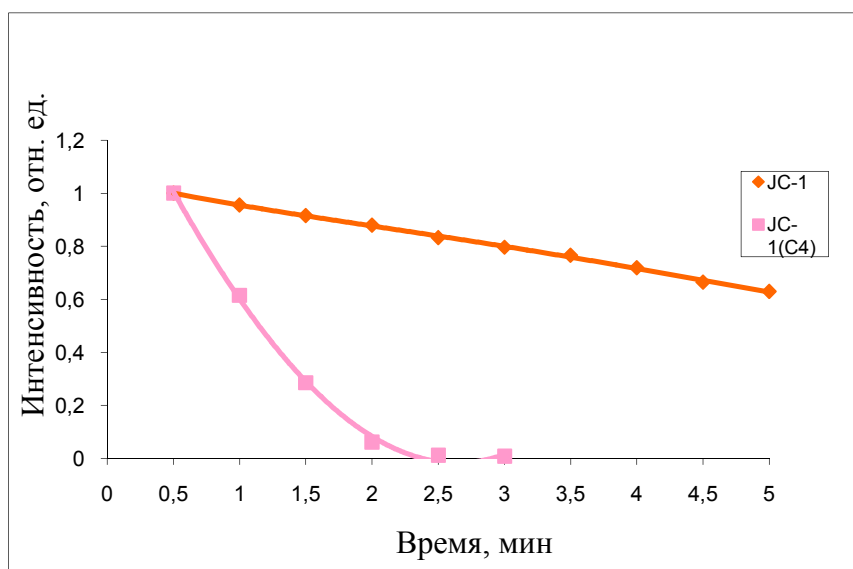


Рис.5. Динамика выгорания агрегатов разновидностей JC-1

При внесении в инкубационную среду протонофора FCCP было отмечено падение флуоресценции агрегатов JC-1, в то же время протонофор не влиял на эти показатели при окрашивании гепатоцитов C4 разновидностью красителя (Рис.6). Эти данные указывают на слабую чувствительность производного, в отличие от исходной формы, к изменениям трансмембранного потенциала.

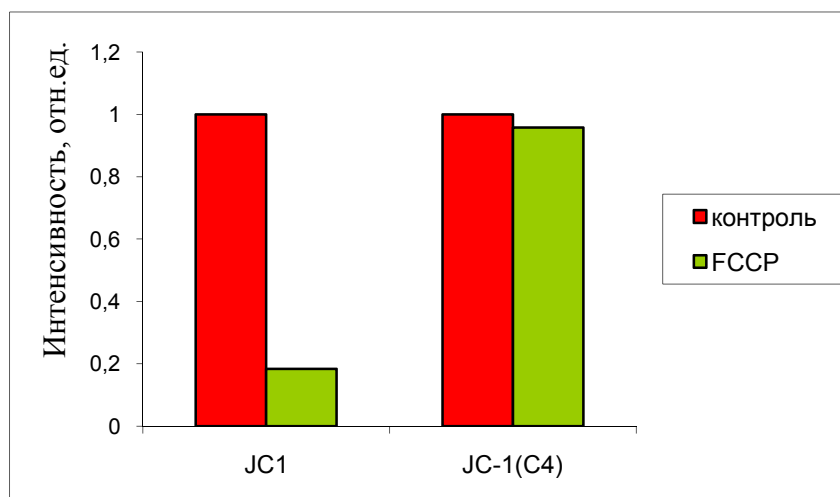


Рис.6. Чувствительность разновидностей JC-1 к действию протонофора FCCP

Все исследуемые показатели свидетельствовали о слабой аккумуляции длинноцепочечного (C18) производного зонда JC-1. Интенсивность флуоресценции данной разновидности даже при длительной инкубации клеток в присутствии зонда (к 150 минутам эксперимента) была значительно снижена (Рис.7).

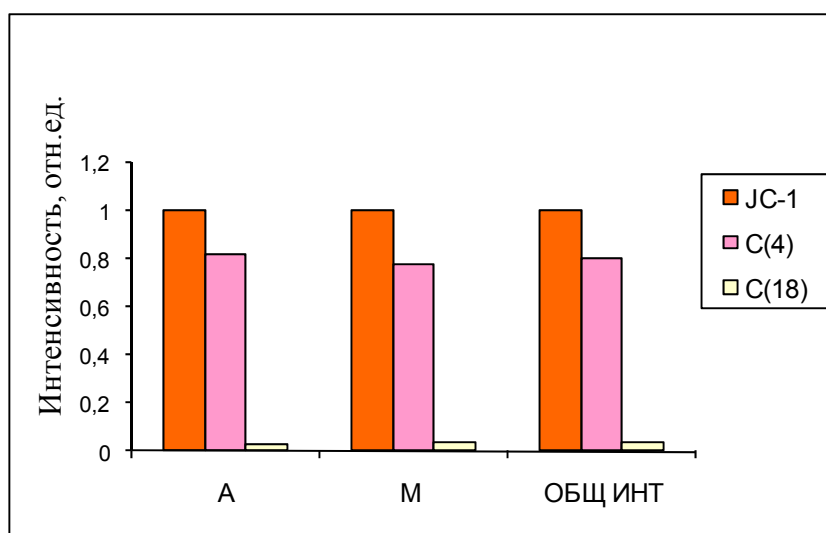


Рис.7. Аккумуляция гепатоцитами C4 и C18 разновидностей зонда JC-1

Соотношение агрегатов к мономерам часто используется в качестве одного из показателей при оценке изменений трансмембранного потенциала с помощью митохондриального зонда JC-1. Повышение данного отношения свидетельствует об активации митохондриальных процессов, тогда как при неблагоприятных воздействиях на клетку и снижении ее жизнеспособности происходят противоположные изменения. Сравнение исследуемых производных с использованием данного параметра также

выявило существенные различия между ними (Рис.8). Для интактных клеток данная величина при окрашивании красителем JC-1 была выше единицы, что согласуется с данными литературы. Для производного С4 эти значения были близки к единице и в случае окрашивания длинноцепочечным производным наблюдалось обратное соотношение.

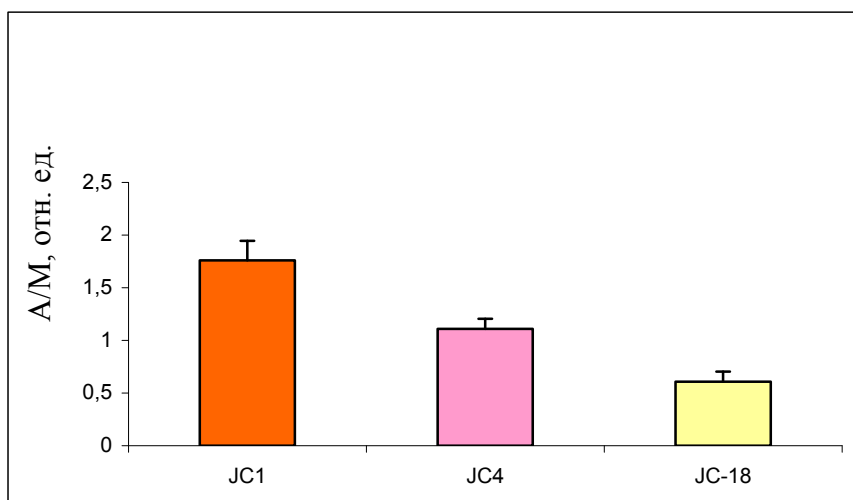


Рис.8. Величина соотношения флуоресценции агрегатов к мономерам (A/M) для интактных гепатоцитов, окрашенных разновидностями зонда JC-1.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные исследования показали, что способность к образованию J-агрегатов, обусловленная структурой и свойствами хромофорной части молекулы, не зависит от присутствия алкильных заместителей. В то же время длина углеродных цепей алкильных заместителей существенно влияет на процессы аккумуляции зондов в клетках и чувствительность параметров их флуоресценции к изменениям митохондриального мембранного потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Szewczyk A, Wojtczak L Mitochondria as a pharmacological target//Pharmacological reviews. 2002. 54: 101-127.
3. Lemasters JJ, Nieminen A-L Mitochondria in pathogenesis 2001.540
4. Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A (1996) Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. Exp Cell Res 222:84-94.
5. Reers M, Smith TW, Chen L (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. Biochemistry 30: 4480-4486.

6. Reers M, Smiley ST, Mottola- Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen L(1995) mitochondrial membrane potential monitored by JC-1. *Methods Enzymol* 260: 406-417.
7. Reers M, Smith TW, Chen L (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30: 4480-4486.
8. Smiley ST, Reers M, Mottola- Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Chen L (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potential revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3671-3675.
9. Petit PX, O'Connor JE, Grunwald D, Brown SC (1990) Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondrial by flow cytometry and possible applications. *Eur J Biochem* 194: 389-397.
10. Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A (1996) Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Exp Cell Res* 222:84-94.
11. Ankarcrona M, Dypbykt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipto SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973.
12. Ankarcrona M, Dypbykt JM, Orrenius S, Nicotera P (1996) Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett* 394: 321-324.
13. Holtsberg FW, Steiner MR, Keller JN, Mark RJ, Mattson Mr, Steiner SM (1998) Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in Hippocampal neurons. *J Neurochem* 70: 66-76.
14. Cossarizza A, Savioli S, Franceschi C (1997) Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) with fluorescent probes. *Postepy Biol Komorki* 24: 575-585.