

Изменения клеточных мембран при апоптозе и методы их идентификации

А.П. ДЕМЧЕНКО

Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины, Киев

Changes of Cellular Membranes during Apoptosis and Methods of Their Detection

A.P. DEMCHENKO

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Апоптоз является очень сложным клеточным явлением, участвующим в различных физиологических и патологических процессах. Апоптоз – это ключевой фактор, за которым можно вести наблюдение, если живые организмы или их клетки и ткани подвергаются различным стрессам, в том числе вызванным низкими температурами. Важным является мониторинг апоптоза с использованием неинвазивных методов контроля и визуализации. Перспективным подходом в этом направлении является тестирование свойств клеточных мембран, в которых происходят характерные изменения [Демченко, 2012].

Флуоресценция известна как наиболее чувствительный и малодеструктивный метод в клеточных исследованиях. Соответствующие флуоресцентные красители могут встраиваться в мембрану и давать информацию об изменениях текучести, полярности, электростатического потенциала и т.д. [Демченко, Мелу и соавт., 2009]. Идея автора о распознавании этих апоптотических изменений привели к новому методу их идентификации. Молекула исходного красителя 3-гидроксифлавона была модифицирована таким образом, чтобы спонтанно включаться в клеточную мембрану, изменяя спектр флуоресценции [Шинкарь, Клименко и соавт., 2007]. В настоящее время один из этих красителей – F2N12S – лицензирован и распространяется фирмой «Invitrogen» (США). Большими преимуществами этого метода являются как относительно низкая цена реагентов, так и возможность изучения апоптоза с использованием спектроскопии клеточных суспензий, проточной цитометрии и конфокальной или двухфотонной микроскопии. Презентация фосфатидилсерина на внешней оболочке клеточной мембраны влияет на электростатический потенциал и гидратацию, а краситель F2N12S обеспечивает прямую идентификацию этих изменений. Данный подход развивали путем разработки нового зонда на основе нильского красного (NR12S) с аналогичной F2N12S функциональностью с эмиссией в длинноволновой области.

В докладе будет представлен сравнительный анализ новых и традиционных технологий. В связи с небольшим размером молекул зонда его связывание занимает несколько минут. Это позволяет наблюдать за развитием апоптоза на самом раннем этапе. Встраивание зонда происходит с высокой тропностью ко всем типам клеток (живые, апоптотические или мертвые), что позволяет идентифицировать эти клетки по шкале сравнения интенсивности флуоресценции, анализируя только их отличительный ратиометрический сигнал при отсутствии фонового сигнала зонда. Самокалибровка сигнала апоптоза на молекулярном уровне позволяет регистрировать степень и пространственное распределение апоптотических изменений на клеточных плазматических мембранах. Становится возможным изучение генерации и распространения сигнала апоптоза на мембранах отдельных клеток. Сочетая в себе высокое пространственно-временное разрешение, чувствительность и простоту в использовании, эта методика открыта для дальнейшего развития.

Apoptosis is a very complex cellular phenomenon involved in a wide variety of physiological and pathological processes. It is the key factor that can be monitored when the living organisms or their cells and tissues are subjected to different stress conditions, including treatment by low temperatures. The ability to monitor apoptosis using noninvasive sensing and imaging techniques are a great challenge. The promising approach in this direction is testing the properties of cell membranes demonstrating characteristic changes [Demchenko, 2012].

Fluorescence is known as the most sensitive and low destructive method in cellular research. The smart designed fluorescent dyes can incorporate into the membrane and report on its changes in terms of fluidity, polarity, electrostatic potential, etc. [Demchenko, Mely *et al.* 2009]. The author's idea of recognizing these apoptotic changes has resulted in a new method of its detection. The parent 3-hydroxyflavone dye molecule is modified in such a way that it incorporates spontaneously into cell membrane providing the change of fluorescence emission color [Shynkar, Klymchenko *et al.* 2007]. One of these dyes is presently known as F2N12S and it is licensed and distributed by Invitrogen (USA) (Cat. No A35137). The great advantages of this method are both relatively low price of reagents and the ability to study apoptosis by combine using spectroscopy of cell suspensions, flow cytometry and confocal or two-photon microscopy. The phosphatidylserine exposure on the outer leaflet of cell membrane involves electrostatic potential and hydration, and the F2N12S dye allows providing direct probing of these changes. This approach was further extended by developing a new probe based on Nile Red (NR12S) with analogous to F2N12S functionalization but which emits fluorescence strongly shifted to longer wavelengths.

The presentation will provide comparative analysis of new and traditional technologies. Due to small probe molecular size, its binding occupies several minutes only. This allows observing development of apoptosis process from very early steps. Incorporation of probe occurs with high affinity to all types of cells (living, apoptotic or dead), which allows detecting these cells on comparable scale of fluorescence intensity analyzing only their distinguishing ratiometric signal with the absence of background probe signal. Self-calibration of apoptotic signal on molecular scale allows recording the degree and the spatial distribution of the apoptotic changes over the cell plasma membranes. The studying of generation and propagation of apoptotic signal over the membranes of individual cells becomes possible. Combining high spatiotemporal resolution, sensitivity, and ease of use, this methodology is opened for further development.