

УДК 576.314:577.352.5

Мониторинг дзета-потенциала клеток человека при снижении их жизнеспособности и взаимодействии с полимерами

О. В. Бондарь*, Д. В. Сайфуллина, И. И. Мавлютова, Т. И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

*E-mail: oxanav.bondar@gmail.com

Поступила в редакцию 08.01.2012 г.

РЕФЕРАТ Изучены аналитические возможности метода динамического рассеяния света (ДРС) для оценки состояния цитоплазматической мембраны клеток человека. Методом ДРС с использованием анализатора Malvern Zetasizer предложено измерять дзета-потенциал клеточных линий и клеток крови в суспензии. При pH 7.4 дзета-потенциал варьирует от -19.4 ± 0.8 мВ у клеток HeLa до -31.8 ± 1.1 мВ у эритроцитов, что, по-видимому, обусловлено различиями в биохимическом составе мембран этих клеток. Тепловая обработка клеток HeLa приводила к смещению их дзета-потенциала в область отрицательных значений на 4.2 мВ. Изменение дзета-потенциала коррелировало с увеличением содержания фосфатидилсерина, одного из ранних маркеров апоптоза, на поверхности клеток. Метод ДРС применили для изучения особенностей взаимодействия с клетками мембранотропных полимеров – поликатионов и неионогенного плуроника.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА динамическое рассеяние света, дзета-потенциал, клетки линий HeLa, MCF-7, эритроциты, моноклеарные клетки, апоптоз, фосфатидилсерин, мембранотропные полимеры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДРС – динамическое рассеяние света; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Определение морфологических и биохимических особенностей клеток человека необходимо для объективной оценки функционирования различных органов и систем организма [1], создания лекарственных средств [2] и проведения фундаментальных исследований.

Параметры живых клеток в норме и при патологии изучают с использованием прямых спектроскопических методов, таких, как рамановская, диэлектрическая, ЯМР-спектроскопия [3]. Важнейший биофизический параметр клеток – их поверхностный заряд, который зависит от состава цитоплазматической мембраны и физиологического состояния клеток. Поверхностный заряд клеток оценивают, измеряя их электрокинетический потенциал (дзета-потенциал), характеризующий величину потенциала двойного электрического слоя на поверхности клеток. Для регистрации дзета-потенциала животных клеток традиционно используют микроэлектрофорез и капиллярный электрофорез [4], однако это трудоемкие и относительно слабо воспроизводимые методы. Перспективную альтернативу этим методам представляет основанный на динамическом рассеянии света (ДРС) метод электрофоретического рассеяния

света, в котором сдвиг частоты или фазы колебаний луча лазера зависит от подвижности частиц/клеток в переменном электрическом поле [5].

Ранее методом ДРС изучали в основном клетки микроорганизмов [5]. Для анализа дзета-потенциала животных клеток мы применили анализатор Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments»).

Цель представленной работы состояла в оценке аналитических возможностей метода ДРС для определения дзета-потенциала клеток человека в норме, при индукции апоптоза и в условиях обработки мембранотропными полимерами. Мы сравнили дзета-потенциал клеток крови человека (моноклеарных клеток и эритроцитов) и клеточных линий (HeLa, MCF-7), оценили влияние индукции апоптоза под воздействием тепловой обработки, а также адсорбции поликатионов и амфифильного неионогенно-го плуроника L121 на дзета-потенциал клеток HeLa.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты для работы с культурами клеток производства НПП «ПанЭко» (Россия). Клетки аденокарциномы шейки матки HeLa и клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной сыво-

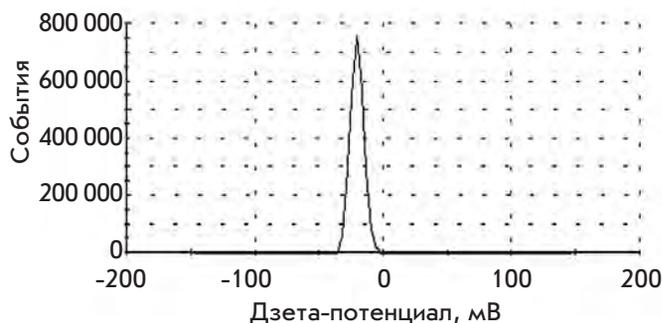


Рис. 1. Кривая распределения дзета-потенциала клеток HeLa (0.5×10^6 клеток/мл), измеренного методом динамического рассеяния света на анализаторе Malvern Zetasizer.

ротки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина. Клетки выращивали в полистироловых флаконах и после достижения монослоя переводили в суспензию при помощи 0.05% раствора трипсина в 0.53 мМ EDTA. Концентрацию клеток в суспензии в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (1.7 мМ KH_2PO_4 , 5.2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl) определяли на гемцитометре. Гибель клеток индуцировали, подвергая их тепловому шоку (суспензию клеток прогревали при 45°C в течение 30 мин).

Эритроциты и мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови условно здоровых доноров, в качестве антикоагулянта использовали 0.27% EDTA. Кровь отстаивали в пробирке в течение 60 мин для осаждения эритроцитов. Содержащую лейкоциты плазму разделяли в градиенте плотности (1.077 г/мл) фиколл-пака при 400g в течение 40 мин. Содержащий мононуклеарные клетки слой отбирали, промывали центрифугированием и суспендировали в ФСБ.

Дзета-потенциал интактных клеток и клеток, подвергнутых тепловой обработке или обработанных полимерами, регистрировали в суспензии (0.5×10^6 клеток/мл) методом электрофоретического светорассеяния на анализаторе Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments», Великобритания). Измерения проводили в U-образной кювете с позолоченными электродами при pH 7.4 и температуре 25°C в фосфатном буфере, не содержащем ионы хлора. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software 6.2 («Malvern Instruments»).

С целью изучения взаимодействия полимеров с клетками в суспензию клеток (0.5×10^6 клеток/мл) добавляли полиэтиленимин (60 кДа), поли(L-лизин)

(~20 кДа) или блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида – плуроник марки L121 («Sigma-Aldrich», США) в различных концентрациях (10, 20, 40, 50, 80 мкг/мл). Смесь инкубировали в течение 10 мин и определяли дзета-потенциал клеток.

Для проведения проточной цитометрии клетки обрабатывали смесью FITC-аннексина V и йодида пропидия в связывающем буфере в соответствии с протоколом производителя («BD Biosciences», США). Анализ проводили на цитометре BD FACSCalibur («BD Biosciences»); количество событий составляло > 20000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали суспензии клеток крови человека и клеточных линий HeLa и MCF-7. На примере клеток HeLa выяснено, что при pH 7.4 кривая распределения дзета-потенциала имеет максимум при -19.4 мВ (рис. 1). Регистрируемый дзета-потенциал служит мерой потенциала двойного электрического слоя на поверхности клетки [5], и его величина при постоянном составе растворителя должна зависеть от биохимического состава цитоплазмы.

Другие виды исследуемых клеток (MCF-7, мононуклеарные клетки) имели сходные с клетками HeLa значения дзета-потенциала, в то время как у эритроцитов величина дзета-потенциала составляла -31.8 мВ (таблица), что можно объяснить присутствием остатков сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов [6]. Отрицательные величины дзета-потенциала мембран клеток при физиологических значениях pH очевидно обусловлены присутствием ионогенных групп в составе фосфолипидов, белков

Значения дзета-потенциала (ζ) некоторых клеток человека и фосфатидилхолиновых липосом при pH 7.4

Клетки	ζ , мВ *
HeLa	-19.4 ± 0.8
MCF-7	-20.9 ± 0.4
Мононуклеарные клетки	-21.9 ± 0.2
Эритроциты	-31.8 ± 1.1
Липосомы (фосфатидилхолин)	-62.3 ± 1.5

*Дзета-потенциал клеток определяли в трех независимых экспериментах. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

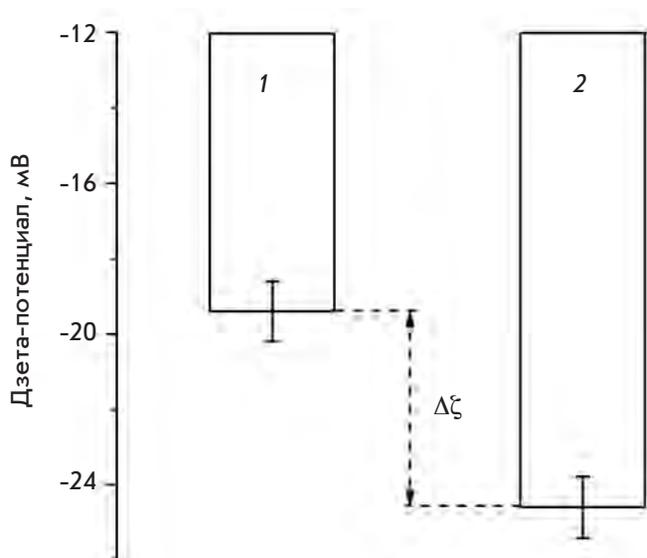


Рис. 2. Величина дзета-потенциала клеток HeLa до и после тепловой обработки (45°C, 30 мин). 1 – Интактные клетки; 2 – клетки, подвергнутые тепловой обработке, $\Delta\zeta$ – величина сдвига дзета-потенциала клеток под воздействием теплового шока.

и их конъюгатов с полисахаридами. Для сравнения в *таблице* приведено значение дзета-потенциала липосом из фосфатидилхолина (преобладающего липида мембран животных клеток), в аналогичных условиях равное почти -62 мВ. Это указывает на значительный вклад липидов в суммарный отрицательный заряд клеточной мембраны.

Далее мы проанализировали изменение дзета-потенциала клеток HeLa, подвергнутых тепловому шоку. Жизнеспособность клеток оценивали на проточном цитометре с использованием смеси красителей FITC-аннексина V, обладающего аффинностью к фосфатидилсерину, и йодида пропидия (PI), окрашивающего некротические клетки. По данным проточной цитометрии, инкубация клеток при 45°C в течение 30 мин приводила к появлению 68% FITC-позитивных клеток и 62% PI-позитивных клеток, что свидетельствует об индукции апоптоза и некроза клеток.

По данным метода ДРС, после подобной обработки среднее значение дзета-потенциала прогретых клеток сдвигалось в область отрицательных значений почти на 4.2 мВ по сравнению с интактными (рис. 2). По-видимому, это связано с перераспределением фосфатидилсерина, несущего отрицательно заряженную карбоксильную группу, из внутреннего липидного слоя плазмалеммы во внешний. Появление фосфатидилсерина в наружном липидном монослое клеточной мембраны является одним из ранних

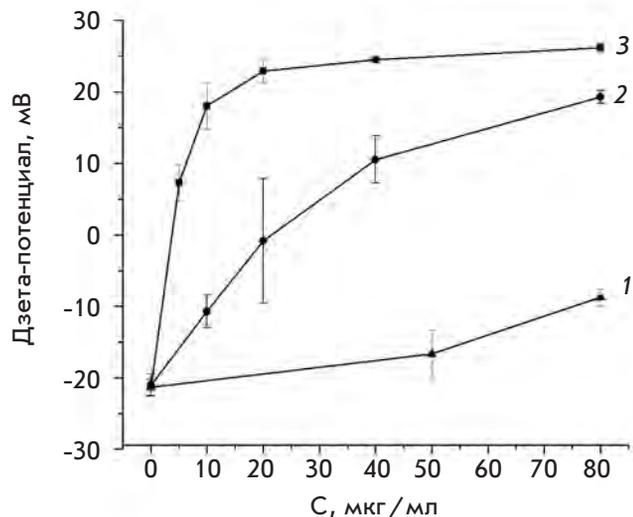


Рис. 3. Изменение величины дзета-потенциала клеток HeLa, обработанных мембранотропными полимерами. 1 – Плуроник L121; 2 – поли(L-лизин); 3 – полиэтиленимин.

маркеров апоптоза и снижения жизнеспособности клеток [6].

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода ДРС для определения изменений биохимического состава мембран клеток человека и, в частности, для выявления фосфатидилсерина во внешнем липидном слое клеток при индукции апоптоза. Предложенный подход не требует использования дорогостоящих красителей и отличается простотой в исполнении.

Представляло интерес методом ДРС оценить как влияют на дзета-потенциал клеток мембранотропные полимеры, используемые в клеточных технологиях и для доставки лекарственных средств. Нами изучено взаимодействие с клетками HeLa модельных поликатионов – полиэтиленимина и поли(L-лизина), широко используемых для конденсации и доставки ДНК в клетки, а также для получения биоадгезивных покрытий для культивирования клеток [7]. Другой полимер – плуроник L121 – представляет собой неионогенный амфифильный блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида. Подобные блок-сополимеры способны обратимо взаимодействовать с клеточными мембранами и изменять активность мембранных транспортеров, что используется для повышения эффективности доставки лекарств в клетки [8].

Добавление к клеткам полилизина в концентрации 20 мкг/мл вызывает нейтрализацию отрицательного

дзета-потенциала клеток, очевидно, вследствие электростатической адсорбции поликатиона на поверхности отрицательно заряженной мембраны (рис. 3). При более высоких концентрациях полилизина (больше 20 мкг/мл) дзета-потенциал клеток изменяется на положительный и достигает максимальных значений в присутствии 80 мкг/мл полилизина. По сравнению с полилизином полиэтиленимин «перезаряжает» клетки при значительно более низкой концентрации (около 5 мкг/мл), а в насыщающей концентрации сдвигает дзета-потенциал клеток до 26 мВ (рис. 3). Более выраженный эффект полиэтиленимина на величину дзета-потенциала клеток объясняется тем, что этот поликатион обладает большей плотностью положительного заряда, чем полилизин.

Дополнительно оценено влияние плуроника L121 на поверхностный заряд клеток. Плуроник L121 имеет низкое соотношение гидрофильной и липофильной частей молекулы, а его полипропиленоксидный блок проявляет сродство к липидному бислою [9]. В буферном растворе плуроник L121 образует наноразмерные мицеллы, которые, по нашим данным, характеризуются слабоотрицательным дзета-потенциалом (около -6.7 мВ).

Установлено, что обработка клеток HeLa плуроником L121 сопровождается заметным сдвигом поверхностного заряда клеток в положительную область пропорционально концентрации плуроника (рис. 3). Наблюдаемые изменения можно объяснить адсорбцией неионогенного плуроника на поверхности клеток и его встраиванием в мембрану своим гидрофобным блоком [10], что приводит к изменению потенциала двойного электрического слоя на поверхности клеток. Обработка клеток плуроником L121 в использованном диапазоне концентраций не приво-

дила к полной нейтрализации заряда клеток, как это наблюдалось в случае поликатионов. Сходные изменения дзета-потенциала клеток в присутствии полимеров наблюдали в клетках других типов (MCF-7, мононуклеарные клетки крови), что указывает на неспецифический характер взаимодействия использованных полимеров с клетками человека.

ВЫВОДЫ

Методом ДРС определены величины дзета-потенциала клеток крови (эритроциты, мононуклеары) и клеток линий HeLa и MCF-7. Показана возможность выявления на поверхности клеток фосфатидилсерина, раннего маркера апоптоза и снижения жизнеспособности клеток, по увеличению их суммарного отрицательного заряда. Добавление поликатионов и амфифильного плуроника L121 нейтрализует отрицательный дзета-потенциал клеток пропорционально концентрации полимеров.

Полученные результаты показывают, что метод динамического рассеяния света можно применять для изучения свойств мембран животных клеток, изменений их биохимического состава и взаимодействия с мембранотропными полимерами в различных условиях. Метод ДРС может использоваться в клеточной биологии для анализа состояния мембран различных клеток, оценки действия лекарственных средств и мембранотропных материалов. ●

Работа частично финансировалась в рамках проекта по развитию инновационной инфраструктуры в Казанском (Приволжском) федеральном университете по постановлению Правительства Российской Федерации № 219.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004. V. 5. P. 763–769.
2. Boros L.G., Cascante M., Lee W.N. // Drug discovery today. 2002. V. 7. P. 364–372.
3. Fang J., Palanisami A., Rajapakshe K. // Biosensors. 2011. V. 1. P. 13–22.
4. Kuo Y.-C., Lin T.-W. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. № 5. P. 2202–2208.
5. Wilson W., Wade M., Holman S., Champlin F.R. // J. Microbiol. Meth. 2001. V. 43. P. 153–164.
6. Eylar E.H., Madoff M.A., Brody O.V., Oncley J.L. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 1992–2000.
7. Pack D.W., Hoffman A.S., Stayton S.P., Stayton P.S. // Nat. Rev. Drug Disc. 2005. V. 4. P. 581–593.
8. Firestone M.A., Wolf A.C., Seifert S. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 1539–1549.
9. Bryskhe K., Schillen K., Loéfroth J.E., Olsson U. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2001. V. 3. P. 1303–1309.
10. Erukova V.Yu., Krylova O.O., Antonenko Yu.N., Melik-Nubarov N.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1468. P. 73–86.