

UDC 57.085.2:577.336

Спектрально-люминесцентные свойства производных скварилиевых зондов при взаимодействии с изолированными клетками печени крыс

Т. Н. Ткачева, Н. С. Кавок, И. А. Боровой, Е. Н. Обухова,
С. А. Климов, Ю. В. Малюкин

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

tkacheva@isma.kharkov.ua

Цель. Поиск подходов к исследованию функционального состояния клетки с помощью новых скварилиевых зондов. **Методы.** Зависимость параметров флуоресценции скварилиевых и полиметиновых красителей от свойств их микроокружения в биомембранах изучали методом микроспектрофлуориметрии. Для оценки процессов накопления зондов в клетках и исследования динамики фоторазрушения красителей применяли количественную микрофлуориметрию одиночных клеток. **Результаты.** Показано, что хромофорная часть молекул скварилиевых зондов в отличие от катионных полиметиновых зондов локализована в биомембранах преимущественно в более полярном микроокружении, что определяется анионными свойствами зондов. **Выводы.** Хромофор анионного скварилиевого зонда в нативных мембранах находится в поверхностном слое мембраны в области полярных головок фосфолипидов, тогда как катионные зонды могут погружаться на большую глубину мембраны. Наивысшая устойчивость к фотоповыцветанию среди исследуемых зондов обнаружена у скварилиевого анионного зонда SqSC_r.

Ключевые слова: спектры люминесценции, скварилиевые зонды, полиметиновые зонды, биомембраны.

Введение. Известно, что разнообразие процессов в биомембранах в значительной степени определяется физическими свойствами липидного бислоя: поверхностным зарядом, дипольным потенциалом, степенью гидратации, текучестью, способностью к фазовым переходам и др. В свою очередь, эти свойства изменяются в зависимости от состава компонентов мембраны, их соотношения и взаимодействия на молекулярном уровне. Поскольку спектрально-люминесцентные характеристики цианиновых зондов чувствительны к вариациям микроокружения хромофора, оценка флуоресцентных свойств красителей при связывании с клеточными мембранами позволяет судить о преимущественной молекулярной локализации хромофорной части молекулы, а так-

же о возможных структурно-функциональных перестройках биомембран при адаптации клеток к внешним воздействиям.

Группа скварилиевых зондов сравнительно мало изучена по сравнению с полиметиновыми красителями в приложении к биологическим объектам. В то же время имеющиеся данные свидетельствуют об их перспективности в биомедицинских исследованиях [1–3]. Особого внимания заслуживают скварилиевые зонды, люминесцирующие в длинноволновой области спектра, в качестве генераторов активных форм кислорода в фотодинамической терапии рака и для получения флуоресцентного изображения *in vivo* [4, 5].

В данной работе оценивали спектрально-люминесцентные свойства синтезированных скварилиевых зондов в сравнении с полиметиновыми зондами.

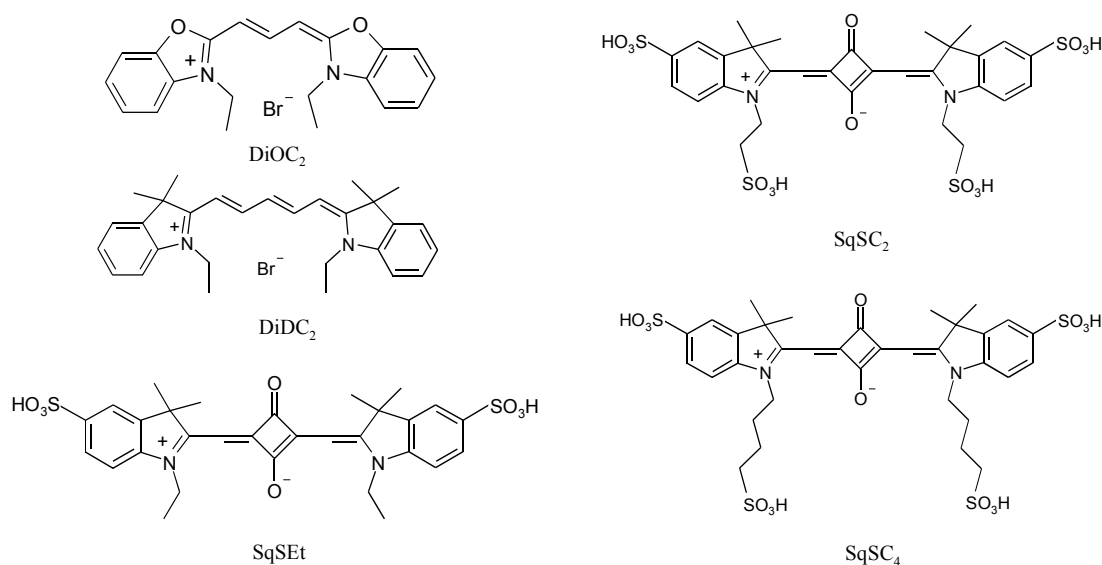


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых красителей

Материалы и методы. Использовали зонды, синтезированные в лаборатории нанодисперсных материалов ИСМА НАН Украины. Чистоту зондов контролировали ВЭЖХ, структуру доказывали с помощью ¹H-ЯМР.

Скварилиевые красители получены по методике [6] кипячением в пиридине смеси эквивалентных количеств 3,4-дигидроксициклобутен-1,2-диона и соответствующего сульфоната 1-*R*-2,3,3-триметил-5-индолия (где *R* = этил, 2-сульфоэтил или 4-сульфобутил). Полученные красители очищали колоночной хроматографией на Lichroprep RP-18, в качестве элюента использовали водные растворы метанола (0–5 %). Строение полученных соединений подтверждено данными ¹H-NMR.

SqSEt: ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆), δ, ppm: 7.67 (2H, s, аром.), 7.61 (2H, d, аром., 8.3 Hz), 7.26 (2H, d, аром., 8.3 Hz), 5.80 (2H, s, CH), 4.25–4.04 (4H, m, NCH₂), 1.68 (12H, s, (CH₃)₂), 1.28 (6H, t, 6.9 Hz, NCH₂CH₃).

SqSC₂: ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆), δ, ppm: 7.66 (2H, s, аром.), 7.61 (2H, d, аром., 8.2 Hz), 7.14 (2H, d, аром., 8.2 Hz), 5.83 (2H, s, CH), 4.36–4.18 (4H, m, NCH₂), 2.84 (4H, m, CH₂SO₃H), 1.67 (12H, s, (CH₃)₂).

SqSC₄: ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆), δ, ppm: 7.69 (2H, s, аром.), 7.61 (2H, d, аром., 8.2 Hz), 7.35 (2H, d, аром., 8.2 Hz), 5.87 (2H, s, CH), 4.22–4.01 (4H, m, NCH₂), 2.72–2.58 (4H, m, CH₂SO₃H), 1.87–1.50 (8H, m, (CH₂)₂), 1.68 (12H, s, (CH₃)₂).

Исходный (1 мМ) раствор исследуемого зонда в ДМСО разбавляли непосредственно перед экспериментом до необходимой концентрации.

Исследования проводили на изолированных гепатоцитах печени самцов крыс популяции Вистар трехмесячного возраста. Клетки выделяли неферментативным методом [7]. Концентрация клеток составляла 5·10⁵ кл/мл; концентрация зондов в инкубационной среде – 10⁻⁶ М.

Спектрально-люминесцентные свойства скварилиевых зондов бис(1-сульфоэтил-3,3-диметил-5-сульфоиндолиденил)сквараин (SqSC₂), бис(1-сульфобутил-3,3-диметил-5-сульфоиндолиденил)сквараин (SqSC₄), бис(1-этил-3,3-диметил-5-сульфоиндолиденил)сквараин (SqSEt) оценивали в сравнении с полиметиновыми зондами 3,3-диэтил-оксакарбоцианин бромид (DiOC₂) и 1,1'-диэтил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин бромид (DiDC₂) (рис. 1). Использовали спектрофлуориметр Cary Eclipse («Varian», Австралия), длина волны возбуждения для скварилиевых красителей равна 590 нм, для DiDC₂ – 630 нм, DiOC₂ – 470 нм. Микроспектрофлуориметрию одиночных клеток проводили, применяя спектрометр USB4000 («Ocean Optics», США), соединенный волоконным световодом с микроскопом Olympus IX71. Программное обеспечение Ocean Optics SpectraSuite® Spectrometer Operating Software.

Метод количественной флуоресцентной микроскопии описан ранее [8]. Микрофлуориметрию одиночных клеток осуществляли с помощью инвер-

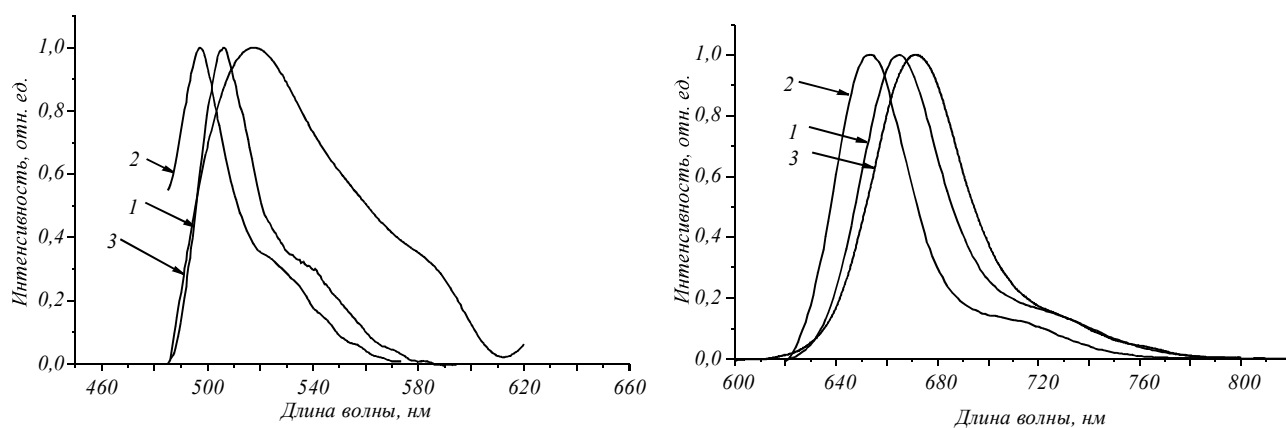


Рис. 2. Спектры люминесценции цианиновых красителей: а – DiOC_2 (1 – ДМСО (506); 2 – вода (498); 3 – одиночный гепатоцит (516)); б – DiDC_2 (1 – ДМСО (665); 2 – вода (655); 3 – одиночный гепатоцит (673)) в различном микроокружении

тированного люминесцентного микроскопа Olympus IX71 («Olympus», Япония), оснащенного цифровой камерой (C-5060, «Olympus»), программное обеспечение – DP-soft 5.0 software («Olympus»). Программа обработки цифровых изображений (по серому уровню (gray level) пикселей) позволяет рассчитать для каждой клетки интегральную интенсивность флуоресценции, нормированную к фону. Наблюдение за клетками, окрашенными красителем DiOC_2 , проводили с использованием фильтров возбуждения 450–490 нм и люминесценции от 500 нм.

Для красителей группы сквараинов и полиметинового красителя DiDC_2 применяли интерференционные фильтры с характеристиками полос возбуждения и люминесценции 545–580 и 610–800 нм соответственно.

При оценке устойчивости красителей к фотоцветанию в течение 30 с с интервалом в 5 с получали серию последовательных изображений, окрашенных красителями клеток, с интегральным временем для каждого изображения 1 с. Строили кривые выгорания, на начальном линейном участке экспоненциальной зависимости определяли изменение флуоресценции клеток в отн. ед. за 1 с ($\Delta F/c$).

Результаты и обсуждение. Оценивали особенности влияния микроокружения на параметры флуоресценции синтезированных скварилиевых красителей в сравнении с полиметиновыми зондами.

При исследовании спектральных свойств DiOC_2 установлен сдвиг максимума люминесценции в коротковолновую область с возрастанием полярности растворителя (рис. 2, а). Положение максимума

люминесценции при связывании зондов с изолированными гепатоцитами дает представление о микроокружении зонда в клеточных структурах. При этом следует учитывать, что существует возможность локализации хромофора на разной глубине биомембран (выделяют четыре зоны локализации – области полярных головок, глицериновых остатков и метиленовых цепочек, а также центр бислоя) [9].

В одиночных клетках (как определено ранее для суспензии гепатоцитов [10]) максимум флуоресценции зонда DiOC_2 смещается в область, соответствующую гидрофобному микроокружению.

Анализ спектральных свойств зонда DiDC_2 как в растворах, так и в одиночных гепатоцитах (рис. 2, б) выявил те же закономерности в смещении максимума люминесценции, что и для зонда DiOC_2 . Эти общие закономерности для индокарбоцианина DiDC_2 и оксокарбоцианина DiOC_2 при связывании с клетками печени указывают на то, что именно особенности мембранной структуры клеток и структура хромофора обуславливают характер микроокружения хромофора, вследствие чего меняются спектральные свойства зондов.

Оценивали особенности влияния микроокружения на параметры флуоресценции синтезированных скварилиевых зондов. Для всех анионных скварилиевых зондов отмечена подобная закономерность в смещении максимума люминесценции в зависимости от полярности растворителя, т. е. сдвиг в коротковолновую область при увеличении полярности растворителя (рис. 3). В одиночных клетках печени положение максимумов люминесценции для

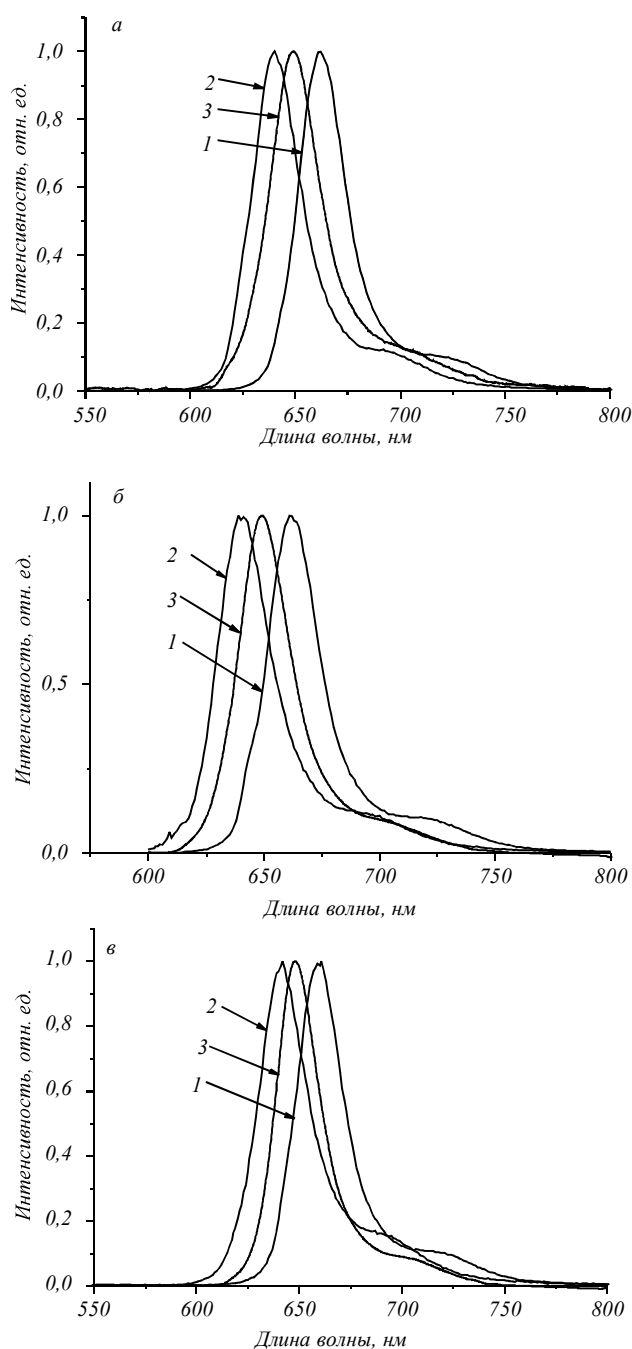


Рис. 3. Спектры люминесценции анионных скварилиевых красителей: а – SqSC₂ (1 – ДМСО (663); 2 – вода (641); 3 – одиночный гепатоцит (649)); б – SqSC₄ (1 – ДМСО (663); 2 – вода (642); 3 – одиночный гепатоцит (650)); в – SqSEt (1 – ДМСО (660); 2 – вода (642); 3 – одиночный гепатоцит (650)) в различном микроокружении

зондов SqSC₂, SqSC₄ и SqSEt существенно не различалось и было промежуточным между максимумами флуоресценции в ДМСО и воде. Это свидетель-

ствует о том, что в клетках полярность микроокружения зондов находится в области промежуточных значений между полярностью ДМСО и воды.

При этом нужно отметить, что положение максимумов люминесценции катионных зондов DiOC₂ и DiDC₂ в клетках печени по сравнению со значениями в растворе ДМСО смещено в красную область. Положение максимумов люминесценции анионных скварилиевых зондов в клетках печени, напротив, смещено в синюю область. Такое положение максимумов флуоресценции определяется анионными свойствами исследуемых скварилиевых зондов и может свидетельствовать о выталкивании хромофорной части молекулы из гидрофобных областей в поверхностные слои мембраны, а именно – в область полярных головок фосфолипидов. Это происходит, по-видимому, за счет противодействия между анионными группами зонда и отрицательным зарядом поверхности клеточной мембраны.

Одним из необходимых свойств зондов, используемых для люминесцентного анализа клеток, является их фотоустойчивость. При микрофлуориметрической оценке динамики фоторазрушения зондов в условиях непрерывного наблюдения за одиночными клетками при максимальной интенсивности возбуждающего света отмечено (рис. 4), что наименьшая величина $\Delta F/c$ (при оценке на линейном участке кривой выгорания) – зарегистрирована для скварилиевого зонда SqSC₄.

Выводы. При анализе спектров люминесценции полиметиновых (DiOC₂ и DiDC₂) и скварилиевых (SqSC₂, SqSC₄, SqSEt) красителей показано, что с увеличением полярности растворителя происходит смещение максимумов люминесценции зондов в коротковолновую область спектра. Положение максимумов люминесценции исследуемых скварилиевых зондов в клетках по сравнению с полиметиновыми указывает на преимущественное их перераспределение в более полярные области плазматической мембраны, что может определяться анионными свойствами скварилиевых красителей и особенностями распределения зарядов на мембране живой клетки. Наибольшую устойчивость к фоторазрушению выявил зонд SqSC₄, что дает ему преимущество в исследуемой группе скварилиевых и полиметиновых зондов DiOC₂ и DiDC₂ при дли-

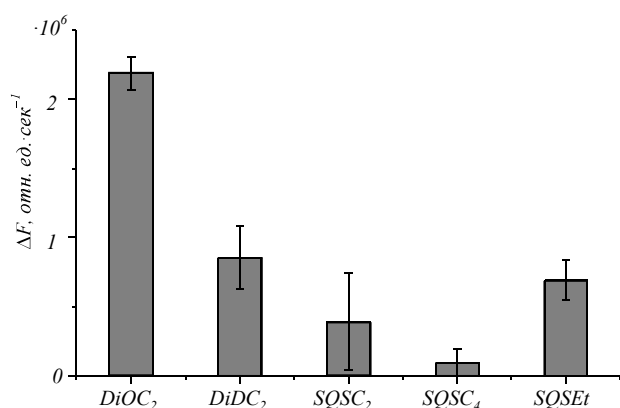


Рис. 4. Падение уровня флуоресценции зондов (ΔF , отн. ед. \cdot с⁻¹) при их фоторазрушении

тельном наблюдении за процессами в одиночных живых клетках.

T. N. Tkachova, N. S. Kavok, I. A. Borovoy, O. M. Obukhova, S. A. Klimov, Yu. V. Malyukin

Spectral-luminescent properties of derivatives of squaraine probes at interaction with the isolated rat liver cells

Institute for Scintillation Materials, NAS of Ukraine
60, Lenin Ave., Kharkiv, Ukraine, 61001

Summary

Aim. To find out approaches for studying cellular functional state using new fluorescent squaraine probes. **Methods.** Dependence of fluorescence parameters of squaraine and polymethine dyes on the properties of their microenvironment in biomembranes was studied by microspectrofluorimetry. The quantitative microfluorimetry of single cells was applied for the evaluation of probes accumulation in cells and for investigation of dynamics of dyes photobleaching. **Results.** The data obtained evidence that a chromophoric part of the squaraine dyes molecules is mainly localized in a more polar microenvironment in biomembranes, as compared to the cationic polymethine probes. **Conclusions.** Chromophore of anionic squaraine probe in native membranes is located in the upper membrane layer in the region of polar phospholipids heads, while the cationic probes can penetrate deeper into the membrane. The anionic squaraine probe SqSC₄ was determined as the most photostable dye among the investigated probes.

Keywords: emission spectra, squaraine probes, polymethine probes, biomembranes.

T. M. Ткачова, Н. С. Кавок, І. А. Боровий, О. М. Обухова,
С. А. Клімов, Ю. В. Малукін

Спектрально-люмінесцентні властивості похідних скварилієвих зондів при взаємодії з ізольованими клітинами печінки щурів

Резюме

Мета. Пошук підходів до вивчення функціонального стану клітини за допомогою нових похідних скварилієвих зондів. **Методи.** Залежність параметрів флуоресценції скварилієвих і поліметинових

вих барвників від властивостей їхнього мікрооточення в біомембранах досліджували методом мікроспектрофлуориметрії. Для оцінки процесів накопичення зондів у клітинах і при дослідженні динаміки фоторуйнування барвників застосовували кількісну мікроспектрофлуориметрію поодиноких клітин. **Результати.** Показано, що хромофорна частина молекул скварилієвих зондів на відміну від катіонних поліметинових зондів локалізована в біомембранах переважно у полярнішому мікрооточенні, що визначається аніонними властивостями зондів. **Висновки.** Хромофор аніонного скварилієвого зонда у нативних мембранах знаходиться в поверхневому шарі мембрани в області полярних голівок фосфоліпідів, тоді як катіонні зонди можуть занурюватися на більшу глибину мембрани. Найвищу стійкість до фотовицвітання серед досліджуваних зондів виявлено у скварилієвого аніонного зонда SqSC₄.

Ключові слова: спектри люмінесценції, скварилієві зонди, поліметинові зонди, біомембрани.

REFERENCES

1. Ioffe V. M., Gorbenko G. P., Tatarskiy A. L., Patsenker L. D., Terpechning E. A. Examining protein-lipid interactions in model systems with a new squarylium fluorescent dye // J. Fluoresc.—2006.—**16**, N 4.—P. 547–554.
2. Jisha V. S., Arun K. T., Hariharan M., Ramaiah D. Site-selective interactions: squaraine dye-serum albumin complexes with enhanced fluorescence and triplet yields // J. Phys. Chem. B.—2010.—**114**, N 17.—P. 5912–5919.
3. Arun K. T., Ramaiah D. Near-infrared fluorescent probes: synthesis and spectroscopic investigations of a few amphiphilic squaraine dyes // J. Phys. Chem. A.—2005.—**109**, N 25.—P. 5571–5578.
4. Santos P. F., Reis L. V., Almeida P., Oliveira A. S., Vieira Ferreira L. F. Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.—2003.—**160**, N 3.—P. 159–161.
5. Gayathri Devi D., Cibin T. R., Ramaiah D., Abraham A. Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl) squaraine: A novel candidate in photodynamic therapy for skin cancer in vivo // J. Photochem. Photobiol. B.—2008.—**92**, N 3.—P. 153–159.
6. Oswald B., Patsenker L., Duschl J., Szmacinski H., Wolfbeis O. S., Terpetschnig E. Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels // Bioconjug. Chem.—1999.—**10**, N 6.—P. 925–931.
7. Kanaeva I. P., Karjakin A. V., Alenicheva T. V., Burmantova G. A., Alimov G. A., Archakov A. I., Zenkevich G. D. Respiration and oxidative phosphorylation in isolated liver cells // Cytology.—1975.—**17**, N 5.—P. 545–551.
8. Vigo J., Salmon J. M., Lahmy S., Viallet P. Fluorescent image cytometry: from qualitative to quantitative measurements // Anal. Cell. Pathol.—1991.—**3**, N 3.—P. 145–165.
9. Dobretsov G. E. Fluorescent sondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov.—Moskva: Nauka, 1989.—277 p.
10. Malyukin Y. V., Borovoy I. A., Kavok N. S., Gerashchenko A. V., Pogrebnyak N. L., Efimova S. L., Lebedenko A. N. Accumulation of oxacarbocyanine dyes with different alkyl chain length in bone marrow cells and hepatocytes // Biophysics.—2007.—**52**, N 4.—P. 667–677.

Received 28.06.11