

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FRET-МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ И МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС ПРИ ИНКУБАЦИИ В ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

(г. Харьков)

Работа выполнена в соответствии с тематикой НИР отдела криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем «Свойства эндокринных тканей в условиях криоконсервирования и трансплантации экспериментальным животным» (№ гос. регистрации 0106U002163) и «Исследование механизмов криоконсервированных органных культур эндокринных тканей» (№ гос. регистрации 0101U003478).

Вступление. Одним из повреждающих факторов при замораживании-отогреве клеточных суспензий является действие гипертонических растворов солей [2]. В работе было показано увеличение базального уровня секреции гормонов клетками коры надпочечников (ККН) после их инкубации с гипертоническими растворами хлорида натрия. При этом автор указывал, что механизм такого стимулирующего влияния остался неясным [5].

Известно, что источником для синтеза стероидных гормонов является холестерин экзогенного и эндогенного происхождения, а также холестерин, синтезированный *de novo* [11, 12]. В стероидпродуцирующих клетках надпочечников запасы холестерина накапливаются в виде эфиров в специальных органеллах – липидных каплях (ЛК). Считают, что в случае стимуляции процесса стероидогенеза, ЛК образуют с митохондриями единую функциональную единицу (субстрата + место синтеза гормонов) [7]. Однако подобного рода результаты были получены с помощью рутинных методов электронной или иммунофлуоресцентной микроскопии, которые предусматривают фиксацию клеток, что может изменять реально существующую картину. FRET технологии позволяют изучать со-локализованные органеллы в живых клетках на молекулярном уровне [9]. В связи с этим является актуальным изучение взаимодействия между органеллами, участвующих в процессе стероидогенеза, в режиме реального времени на отдельных клетках, в том числе и при действии изменяющихся условий среды, например, в случае замены изотонических сред на гипертонические

среды (фактор, который реализуется при замораживании и вызывает повреждение клеток).

Целью исследования было оценить влияние 0,75 М раствора NaCl на расстояние между липидными каплями и митохондриями клеток коры надпочечников (ККН) с использованием FRET технологии.

Объект и методы исследования. Суспензию ККН от половозрелых крыс получали ферментативным способом [6], помещали на 1,5 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ для прикрепления ко дну лунки планшета с коллагеновым покрытием. Микроскопические исследования проводили с помощью конфокального микроскопа Axio Observer. Z1 (Carl Zeiss, Германия). Обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Axio Vision. В работе применяли флуоресцентные зонды Mitotracker Green (MTG) и Нильский красный (NR). Используемая длина волны возбуждения для MTG составляла 490 нм, а для эмиссии – 516 нм. Для NR соответствующие длины имели величины 543 и 630 нм. MTG ковалентно связывается с белками митохондриального матрикса и выступает в качестве флуорофора-донора, а NR окрашивает ЛК и служит флуорофором-акцептором. Эффективность FRET была рассчитана по методу Wouters et al. [8] и выражалась в виде процентного соотношения сигнала MTG до и после фотообесцвечивания по формуле:

$$E\% = \frac{\Delta MTG}{MTG_i} \times 100;$$

где $E\%$ – эффективность FRET; ΔMTG – разница в интенсивности MTG до и после обесцвечивания NR; MTG_i – интенсивность после обесцвечивания NR.

Фоторазрушение осуществляли при помощи лазера (длина волны 543 нм) со 100 % мощностью в выбранной области интереса (ROI), включающей в себя ЛК. Используя данный лазер, без

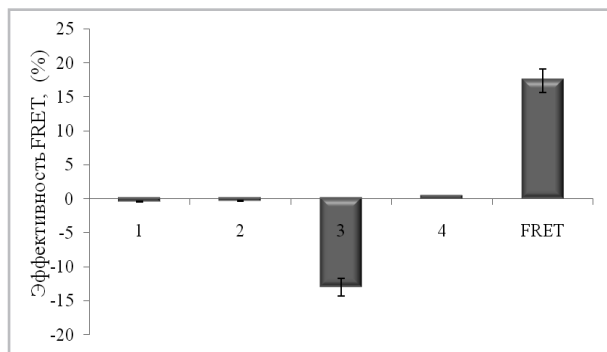


Рис. 1. Эффективность FRET при взаимодействии митохондрий и липидных капель, окрашенных MTG и NR. 1- опытный контроль (обесцвечивание зоны интереса лазером с длиной волны 633нм); 2- контроль при повторном обесцвечивании лазером с длиной волны 543 нм зоны интереса; 3 – контроль при обесцвечивании зоны интереса лазером с длиной волны 488 нм; 4 – опытный контроль при обесцвечивании лазером с длиной волны 543 нм липидных капель вдали от митохондрий; FRET – обесцвечивание лазером 543 в зоне интереса, n = 10.

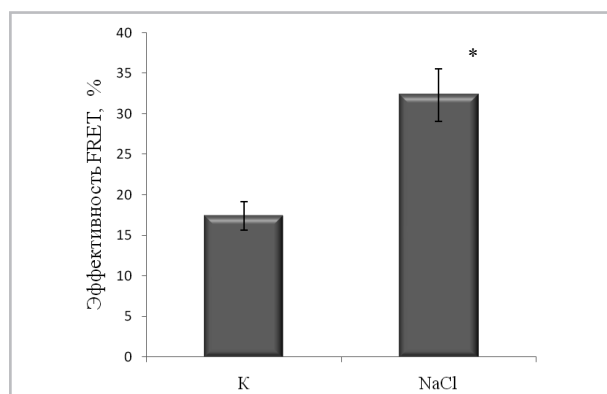


Рис. 2. Эффективность FRET между MTG-NR, окрашивающие митохондрии и липидные капли в клетках коры надпочечников, при инкубации в гипертоническом растворе NaCl. К – свежее выделенные клетки в среде культивирования. NaCl- клетки, в растворе 0,75 M NaCl. * – отличия достоверны относительно контрольных значений ($p < 0,05$); n = 10.

возбуждения MTG, можно было обесцветить почти весь сигнал, излучаемый NR в интересующем нас поле зрения. Для минимизации приобретаемого «выцветания» флуорофора-донора был использован лазер с мощностью 4 %. Изображения после процесса обесцвечивания получали с интервалом в одну секунду на протяжении 3-х минут. Полученные изображения линейно разъединяли, используя записанные ранее спектральные полосы при окрашивании одним из зондов. Результаты FRET были получены на отдельных клетках KKH (n = 10).

Из полученных значений эффективности FRET были рассчитаны расстояния между зондами [10, 13].

В работе в качестве гипертонического раствора использовали 0,75 M NaCl. Данная концентрация была выбрана, исходя из полученных ранее данных по регидратации KKH из гипертонических растворов. Согласно которым ЛК оставались приближенными к митохондриям на фоне восстановления клеточного объема [3], а по данным других исследователей при этой концентрации происходило изменение уровня секреции гормона после инкубации KKH [5]. К прикрепленным клеткам по каплям добавляли раствор NaCl и производили FRET измерения.

Статистическую обработку результатов проводили по методу однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента [1]. Данные представляли как среднее значений $\pm$ стандартное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Значения эффективности FRET в KKH в изотоническом растворе представлены на **рис. 1** вместе с результатами измерений ряда контрольных проб. В этой серии экспериментов зону интереса подвергали фоторазрушению лазером при длине волны 633 нм. Эффективность FRET при таких условиях составила 0 %. Во избежание возможности повторного восстановления флуоресценции ЛК зону интереса обесцвечивали дважды лазером с длиной волны 543 нм. В этом случае эффективность FRET также составила 0 %, что подтверждало отсутствие восстановления флуоресценции NR. Далее зону интереса обесцвечивали лазером с длиной волны возбуждения для MTG (488 нм). Значение эффективности FRET в этом случае составило $-14 \pm 1,3$ % (флуоресцентный сигнал угасал), что было доказательством того, что изменения FRET не происходят за счет спектральных изменений в результате обесцвечивания MTG. В качестве заключительного контроля производили обесцвечивание лазером с длиной волны 543 нм в области митохондрий, которые от липидных капель, когда MTG не связан с NR. В данном случае нами не было зарегистрировано существенного увеличения сигнала для MTG.

В зоне интереса эффективность FRET составила $16,9 \pm 1,1$ %. Это означало, что в результате фоторазрушения акцептора возможно наблюдать эффект, при котором значительно снижается сигнал NR и увеличивается сигнал MTG. Результаты эффективности FRET, позволили установить, что в KKH митохондрии и связанные с ними ЛК находятся друг от друга на расстоянии около 10 нм. Данный факт является доказательством существования на молекулярном уровне истинной со-локализации митохондрий и ЛК.

При инкубации KKH в гипертоническом растворе NaCl (0,75M) нами было зарегистрировано (**рис. 2**) увеличение значения эффективности FRET между двумя флуорофорами MTG и NR, оно составило $33,7 \pm 2,1$ %. Следует также указать, что исходя из значений эффективности FRET, расстояние между

зондами складало 60Е, що відповідає подвійній ширині фосfolіпидного біслоя мітохондрій. Таке змінення досліджуваного показателя свідчить про просторовому зближенні органелл. Це дає можливість передположити, що збільшення секреції кортикостероїдів, показане раніше іншими дослідниками [4], скоріше всього, обумовлено зближенням на молекулярному рівні ЛК і мітохондрій (субстрата з місцем синтезу гормонів).

Висновки.

1. Мітохондрії і ліпідні краплі ККН в ізотонічному розчині знаходяться в межах відстані, при якому реалізується FRET. Ефективність FRET при цьому складала $16,9 \pm 1,1\%$.

2. При інкубації ККН з 0,75М розчином хлориду натрію показатель ефективності FRET збільшувався до $33,7 \pm 2,1\%$, а відстань між зондами складала 60Е, що відповідає подвійній ширині фосfolіпидного біслоя мітохондрій.

Перспективи дальніших досліджень. В дальнішому планується оцінити взаємодію ліпідних крапель і мітохондрій при інкубації з криозащитними середовищами різного складу і при дії стимуляторів гормонотропів з використанням FRET мікроскопії.

**Виразуємо вдячність співробітнику
ІПКіК НАН України
к. б. н. Коваленко І. Ф.
за проведення мікроскопічних
досліджень**

Література

1. Атраментова Л. А. Статистическі методи в біології / Л. А. Атраментова, О. М. Утевська. – Горловка : Видавництво Ліхтар, 2008. – 248с.
2. Белоус А. М. Кріобіологія / А. М. Белоус, В. І. Грищенко. – Київ, Наукова думка, 1994. – 432 с.
3. Влияние инкубации в гипертонических растворах хлорида натрия на изменения объема адренокортикоцитов и расположение в них липидных капель / Т. А. Юрчук, Н. А. Чернобай, Г. А. Божок [и др.] // Проблемы кріобіології. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 282 – 288.
4. Регидратированные адренокортикоциты как модель кріоконсервированных стероидпродуцирующих клеток / Г. В. Дудецкая, Т. А. Юрчук, В. Д. Устиченко [и др.] // Проблемы кріобіології. – 2006. – Т. 16, №4. – С. 432.
5. Устиченко В. Д. Морфологічні характеристики клітин надниркових залоз при дії різних режимів заморожування : дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук : спец. 03. 00. 19 «Кріобіологія та кріомедицина» / Вікторія Дмитрівна Устиченко. – Харків, 2006. – 170 с.
6. Функциональная активность адренокортикоцитов крыс после инкубации в криозащитных средах на основе ДМСО, содержащих эмбриональную телячью сыворотку / Т. А. Юрчук, Г. А. Божок, Н. М. Алабадегарим [и др.] // Проблемы кріобіології. – 2014. – Т. 1, № 1. – С. 47 – 58.
7. Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells / G. Almahbobi, L. J. Williams, X-G. Han [et al.] // Journal of reproduction and Fertility. – 1993. – Vol. 98, № 1. – P. 209 – 217.
8. FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes / F. S. Wouters, P. I. Bastiaens, K. W. Wirtz [et al.] // EMBO Journal. – 1998. – № 17. – P. 7179 – 7189.
9. Jares-Erijman E. A. FRET imaging / Jares-Erijman E. A., Jovin T. M. // Nat. Biotechnol. – 2003. – Vol. 21, № 11. – P. 387 – 395.
10. Rahul R. A practical guide to single-molecule FRET / R. Rahul, H. Sungchul, H. Taekjip // Nature Methods. – 2008. – Vol. 5, №6. – P. 507 – 516.
11. Sanderson J. T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals / J. T. Sanderson // Toxicological Sciences. – 2006. – Vol. 94, № 1. – P. 3 – 21.
12. Spdt A. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways / A. Spdt, L. Hunyady // Physiol. Rev. – 2004. – Vol. 84, № 1. – P. 489 – 539.
13. Tinoco J. I. Biological mechanisms, one molecule at a time / J. I. Tinoco, L. Ruben, J. Gonzalez // Genes and Development. – 2011. – № 25. – P. 1205–1231.

УДК 612. 43. 014. 1. 085. 23. 086. 3:577. 336

ВИКОРИСТАННЯ FRET-МЕТОДУ ДЛЯ ОЦІНКИ ВЗАЄМОДІЇ ЛІПІДНИХ КРАПЕЛЬ ТА МІТОХОНДРІЙ У КЛІТИНАХ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ЩУРІВ ПРИ ІНКУБАЦІЇ У ГІПЕРТОНІЧНОМУ РОЗЧИНІ ХЛОРИДУ НАТРІЮ.

Юрчук Т. О., Бондаренко Т. П.

Резюме. У роботі використано новий підхід для оцінки взаємодії ліпідних крапель та мітохондрій клітин кори наднирників (ККН) при інкубації в гіпертонічному розчині хлориду натрію. Показано, що досліджувані органели ККН у фізіологічному розчині знаходяться у межах відстані, при якій реалізується FRET. При цьому ефективність FRET складала $16,9 \pm 1,1\%$. У випадку інкубації ККН з 0,75М розчином хлориду натрію показник ефективності FRET збільшувався до $33,7 \pm 2,1\%$, а відстань між зондами складала 60 Е, що відповідає подвійній ширині фосfolіпидного біслоя мембрани мітохондрій.

Ключові слова: мітохондрії, ліпідні краплі, ефективність FRET, стероїдогенез, кріоконсервування.

УДК 612. 43. 014. 1. 085. 23. 086. 3:577. 336

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FRET-МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ И МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС ПРИ ИНКУБАЦИИ В ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ

Юрчук Т. А., Бондаренко Т. П.

Резюме. В работе использован новый подход для оценки взаимодействия липидных капель и митохондрий клеток коры надпочечников (ККН) при инкубации в гипертоническом растворе хлорида натрия. Показано, что исследуемые органеллы ККН в изотоническом растворе находятся в пределах расстояния, при котором реализуется FRET. При этом эффективность FRET составила $16,9 \pm 1,1\%$. В случае инкубации ККН с 0,75М раствором хлорида натрия показатель эффективности FRET увеличивался до $33,7 \pm 2,1\%$, а расстояние между зондами составило 60 Е, что соответствует двойной ширине фосфолипидного бислоя мембраны митохондрий.

Ключевые слова: митохондрии, липидные капли, эффективность FRET, стероидогенез, криоконсервирование.

UDC 612. 43. 014. 1. 085. 23. 086. 3:577. 336

Using of Fret-Method for Evaluation of Lipid Droplets and Mitochondria Interaction in Rat Adrenal Cortex Incubated in a Hypertonic Solution of Sodium Chloride

Yurchuk T. A., Bondarenko T. P.

Abstract. Introduction. One of damaging factors during freezing-thawing of adrenal cell suspension is the effect of hypertonic salt solutions, which can be shown not only in a change of cell volume and permeability of the plasma membrane, but also affect on the intracellular organelle interactions involved in the steroidogenesis- mitochondria and lipid droplets (LD).

It has been shown the increase of the basal level of hormone secretion by the adrenal cortex cells (ACCs) after incubation with a hypertonic sodium chloride solution. The mechanism of such stimulating effect remains unclear. In this regard the study of interactions between the organelles involved in the process of steroidogenesis in real time is actual and can be performed using FRET-method.

The research objective was to evaluate the effect of 0.75 M sodium chloride solution on the distance between lipid droplets and mitochondria of the adrenal cortex cells using FRET technology.

The methods. The present work utilized acceptor bleaching FRET. Adrenal cortex cells were attached to the collagen coated plate and stained with Mitotracker Green (MTG) and Nile red (NR). Using a fast scan speed and low resolution (512x512), we were able to record images rapidly whilst minimizing acquisitional bleach using a confocal microscope Axio Observer. Z1 and Axio Vision program.

Once acquired, all the images were linearly unmixed using pre-obtained spectral sticks. Bleaching of the NR within the region of interest (ROI) and any associated increase in MTG signal were observed. FRET efficiency was calculated as a percentage increase in MTG signal intensity before and after photobleaching. The distance between the probes and FRET efficiency was calculated by the Wouters method.

The 0.75 M NaCl was used as a hypertonic solution in the work. This concentration was chosen cause of the rehydration after incubation of ACCs with this solution led to approximate LD to mitochondria while cell volume was restored to the initial level. The hypertonic solution was added to the adherent cells by droplets and the FRET measuring was occurred.

Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA method and Student t-test.

The results. FRET efficiency in isotonic solution was $16.9 \pm 1.1\%$ in the ROI of the ACCs. This was a result of the acceptor photobleaching and observed as the effect of the significantly reducing of the NR signal and increasing of the MTG signal. The result of FRET efficiency revealed that mitochondria and LD were associated in the distance about of 10 nm in the ACCs. This fact is the evidence of true co-localization existence between the mitochondria and LD at the molecular level.

FRET efficiency index increased to $33.7 \pm 2.1\%$ during the incubation of ACCs with the 0.75 M sodium chloride, and the distance between the probes was 60 E, which corresponds to twice width of the mitochondrium phospholipid bilayer.

In the future we plan to evaluate the interaction between lipid droplets and mitochondria during the incubation with cryoprotective media of different composition and under the influence of steroidogenesis stimulators using FRET microscopy.

Keywords: mitochondria, lipid droplets, FRET efficiency, steroidogenesis, cryopreservation.

Рецензент – проф. Бабійчук Г. А.

Стаття надійшла 22. 12. 2014 р.