

МЕДИЦИНА

УДК 616.65-006.66:612.014.4-076

НЕОДНОРОДНОСТЬ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ПУНКТАТА АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО МЕМБРАННОМУ ПОТЕНЦИАЛУ

© 2012 г. Г.К. Максимов¹, О.В. Тарнопольская², А.И. Шихлярова²,
Е.М. Непомнящая², В.А. Сергань²

Исследованы клетки эпителия пунктата аденокарциномы предстательной железы, прижизненно окрашенные потенциалозависимыми флуоресцентными зондами. Использовали зонд-катион ДСМ и зонд-анион АНС, яркость флуоресценции которых в целой клетке пропорциональна мембранному потенциалу клетки: для катиона прямо пропорциональна, для аниона обратно пропорциональна. Измеряли яркость флуоресценции клетки, площадь клеток, ядер, ядерно-цитоплазматическое отношение. Внутри клетки измеряли области с максимальной и минимальной яркостью, вычисляли их отношение (коэффициент неоднородности), который составил $1,8 \pm 0,5$. Изучали характер распределения митохондрий в клетках. Большая часть клеток у данной группы больных имела митохондрии, собранные в большие скопления, располагающиеся в базальной части клеток. Высказано предположение, что такое расположение скоплений митохондрий формирует электрическую гетерогенность клеточной цитоплазмы. Электрическая неоднородность раковых клеток пунктата предстательной железы больных велика, средний мембранный потенциал составил от 3,7 до 31 отн.ед.

Ключевые слова: пунктат аденокарциномы предстательной железы, клетки эпителия, мембранный потенциал, флуоресцентные зонды АНС и ДСМ.

Прошло 220 лет с момента знаменательного события – в 1791 году вышел в свет “Трактат о силах электричества при мышечном движении” врача, анатома и физиолога Луиджи Гальвани. Он обнаружил и публично продемонстрировал, что живому организму присуща электрическая активность. Немного позднее в своем изобретении вольтова столба Алессандро Вольта (физик) во многом основывался на исследованиях и представлениях Гальвани. Поэтому можно сказать, что науку об электричестве подарил человечеству врач совместно с физиком. Биоэлектрические явления продолжают оставаться актуальной задачей фундаментальной биологии и медицины. Наличие электрической активности означает, что любой живой организм вне зависимости от уровня организации представляет собой источник биоэлектрических потенциалов. Каждая клетка, каждый орган, каждая ткань представляют собой сложные системы гальванических элементов.

Абсолютное первенство исследований в этой области принадлежит изучению специализированных клеток – нейронов, миоцитов и кардиомиоцитов, которые непосредственно участвуют в генерации нервного импульса или электрической активности сердца. В монографии Г.Н. Зацепиной [1] представлены данные о мембранном потенциале эмбриональной клетки как управляющем параметре ее жизнедеятельности. Вегетативно-нервный аппарат и эндокринная система возникают только на определенном этапе развития организма как в филогенезе, так и в онтогенезе. Они возникают под управлением более древней системы регуляции – мембранного потенциала эмбриональной клетки. В работе [2] на модели дифференцировки клеток нейробластомы было продемонстрировано, что дифференцировка сопровождается деполяризацией мембраны, вызываемой работой калиевых и натриевых ионных каналов. На модели заживления раны роговицы также было показано, что колебания мембранного потенциала, создающие в ткани электрические поля, регулируют миграцию клеток [3], их поляризацию и частоту делений [4]. Мембранный потенциал (МП) управляет дифференцировкой мезенхимальных стволовых клеток [5]. По-разному

¹ Институт аридных зон Южного научного центра РАН, 344006, Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41.

² Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, 344037, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63; e-mail: rnoiopatology@yandex.ru; rnoi@list.ru

себя ведет средний МП лимфоцитов в процессе индуцированного канцерогенеза и общей реакции на повреждение [6].

Взаимодействие любого проникающего иона (или заряженной везикулы) с клеткой определяется прежде всего величиной мембранных электрических потенциалов на плазматической, митохондриальной и ядерной мембранах. Изучение электрической неоднородности злокачественных клеток, обусловленной различной величиной их мембранных потенциалов, является не только прикладной, но и фундаментальной научной проблемой [7]. Это поможет понять механизмы взаимодействия этих клеток с цитостатиками, антибиотиками, гормонами, а также механизмы действия на клетки электромагнитных полей различных параметров [8].

Метод флуоресцентных зондов, разработанный Ю.А. Владимировым и Г.Е. Добрецовым и описанный в их монографии 1980 года [9], имеет неоспоримое преимущество, поскольку является неинвазивным, минимально влияющим на исследуемые клетки. Оценка изменения мембранного потенциала клеток с помощью флуоресцентных потенциалозависимых зондов неинвазивна, оставляет клетки живыми при измерении. Цель данного исследования состояла в изучении электрической неоднородности клеток пунктата аденокарциномы предстательной железы (кубический и призматический эпителий) в живой клеточной культуре с использованием потенциалозависимых флуоресцентных зондов – аниона и катиона. На основании ряда исследований было доказано, что яркость флуоресценции катиона ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний), связавшегося с клетками в живой культуре, прямо пропорциональна МП клеток, а яркость флуоресценции аниона АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат) обратно пропорциональна МП клеток [10]. Мы выбрали и применили эти два флуоресцентных зонда – анион и катион – потому что в прежних своих исследованиях МП лимфоцитов эти зонды удачно дополняли друг друга: популяция лимфоцитов гетерогенна по МП, и если исследовать его одним зондом, то часть лимфоцитов остается еле заметной, практически невидимой и в результате не будет учтена. При окраске анионом АНС ярко выделяются клетки с низким МП, а при окраске только катионом ДСМ наиболее яркими выглядят клетки с высоким МП. Зонд-анион АНС не проникает в ядро клетки, является поверхностным, а катион ДСМ проникает в ядро, хорошо выделяя клеточные органеллы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился биопсийный материал (аспирационный пунктат) предстательной железы, который был взят у 12 больных, направленных на лечение в Ростовский научно-исследовательский онкологический институт с мая по июль 2011 г. У девяти больных была гистологически подтверждена умеренно дифференцированная аденокарцинома предстательной железы.

Исследование МП проводили с помощью двух потенциалозависимых флуоресцентных зондов аниона АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат) (Serva) и катиона ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний) (синтезирован НИИ физической и органической химии при Южном федеральном университете). Флуоресценцию АНС возбуждали светом длиной волны 375 нм, а длина волны эмиссии АНС была 480 нм. Для флуорохрома ДСМ значения длин волн составили 450 нм и 520 нм. Конечная концентрация АНС в препарате клеточной суспензии была 40 мкМ, а ДСМ – 20 мкМ [8]. Препараты для микроскопирования готовили на предметных стеклах в капле 100 мкл раствора Хенкса, осторожно выдавливая микрошпателем клетки из аспирационного пунктата опухоли. В клеточную взвесь добавляли разведенный на физрастворе флуорохром АНС или ДСМ, накрывали покровным стеклом, инкубировали каждый препарат со своим зондом до микроскопирования 10 минут при комнатной температуре. Микросъемку производили на максимально возможном увеличении (1000×) цветной цифровой камерой AxioCam HRc люминесцентного микроскопа “Axio Imager.M2” Zeiss. Интерактивные измерения проводили с помощью программного обеспечения AxioVision, rel.4.8., на каждом цифровом фото были одинаковое разрешение и экспозиция. Измеряемые характеристики клеток были следующими:

- 1) площадь клетки,
- 2) площадь ядра,
- 3) ядерно-цитоплазматический индекс ЯЦИ (отношение площади ядра к площади цитоплазмы),
- 4) яркость клетки (по АНС и ДСМ),
- 5) максимальная яркость участка клетки (ЯркMAX),
- 6) минимальная яркость участка клетки (ЯркMIN),
- 7) отношение (ЯркMAX) к (ЯркMIN).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistika 6.0, использовали параметрические показатели (среднее и стандартное отклонение) и непараметрический критерий Манна–Уитни.

На рисунке 1 представлены структурные формулы используемых флуоресцентных зондов.

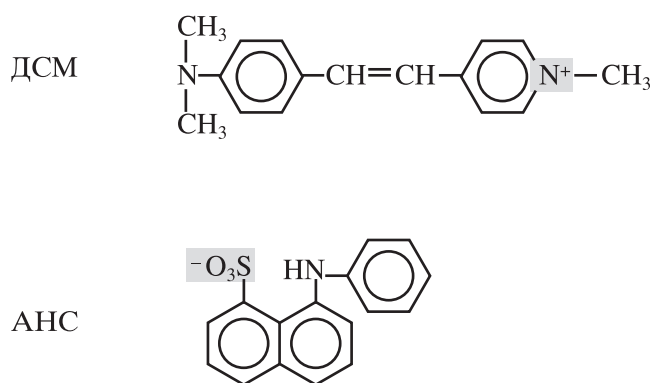


Рис. 1. Структурные формулы потенциалочувствительных флуоресцентных зондов АНС и ДСМ

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресцентный зонд-анион АНС вследствие отрицательно заряженной внутренней стороны плазматической мембраны клетки почти не проникает в цитоплазму и совсем не проникает в ядро клетки, оставляя его темным. Клетки, связавшие зонд АНС, имеют голубой цвет по области цитоплазмы и темное ядро. Зонд-катион ДСМ легко проникает в клетку и в ядро клетки по той же причине – отрицательно заряженной внутренней стороны мембраны и липофильной части самой молекулы ДСМ. Гидрофобная часть молекулы погружается в липидный бислой плазматической мембраны клетки, а отрицательно заряженная внутренняя область клеточной мембраны ускоряет его проникновение в клетку.

На рисунке 2 показаны клетки пунктата предстательной железы (кубический и призматический эпителий), связавшие флуоресцентный зонд ДСМ.

Флуоресценция ДСМ в клетке полихроматична: цитоплазма зеленая, ядро оранжевое или бурое, ядрышки желтые или светло-оранжевые, митохондрии желтые. При действии ингибитора фосфорилирования динитрофенола яркость митохондрий падает, а цвет меняется от желтого до зеленого, невидимого на фоне зеленой цитоплазмы. Клетки опухоли предстательной железы в нашем опыте имели различный характер распределения митохондрий. В некоторых клетках (примерно третья часть) митохондрии были хаотично распределены по клетке, желтые зерна митохондрий выделялись на фоне зеленой цитоплазмы. Большая часть клеток имела четкие области скоплений митохондрий и некоторые отдельные зернышки по цитоплазме. Чаще всего скопления митохондрий приходилось на область вокруг ядра. Достаточно часто наблюдались скопления митохондрий в базальной части эпителиальных клеток железы, как показано на рисунке 3.

Анализируя результаты измерения яркости целых клеток аденокарциномы предстательной железы, можно сделать вывод, что клетки каждого больного (каждой пробы пунктата) неоднородны по яркости (т.е. по МП) как по ДСМ, так и по АНС. Об этом свидетельствует большая величина стандартного отклонения к средней яркости флуоресценции (таблица 1). Отношение стандартного отклонения к средней величине яркости клеток в каждой пробе изменялось по ДСМ от 20 до 70% (среднее 33%),

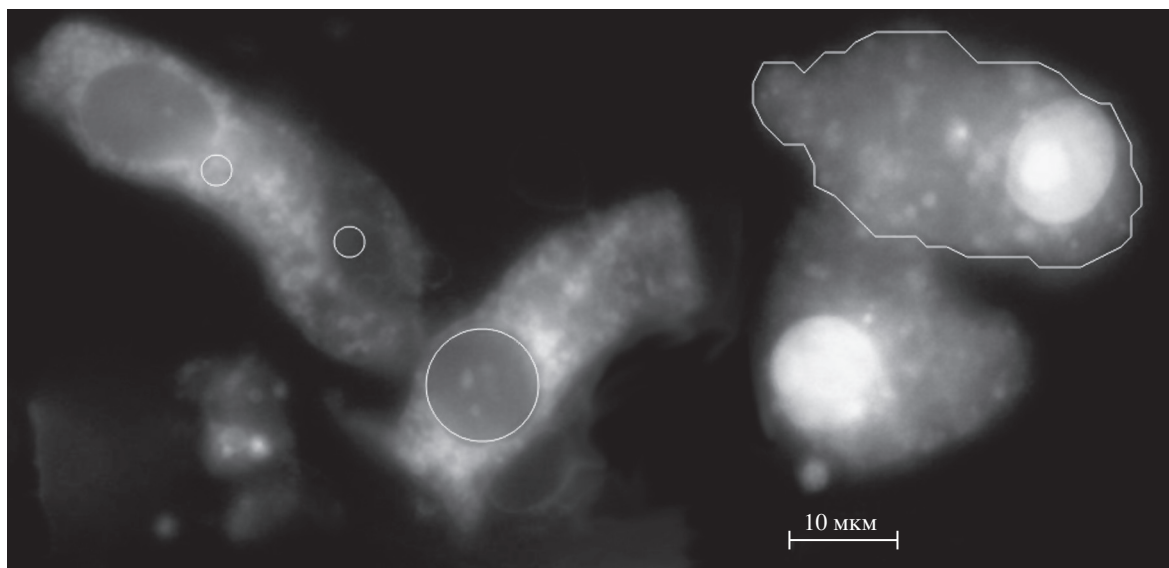


Рис. 2. Клетки пунктата аденокарциномы предстательной железы, окрашенные флуоресцентным красителем катионом ДСМ. Линией обведены контуры для измерения площади клеток и ядер, малыми окружностями отмечены самые яркие и темные области в каждой клетке

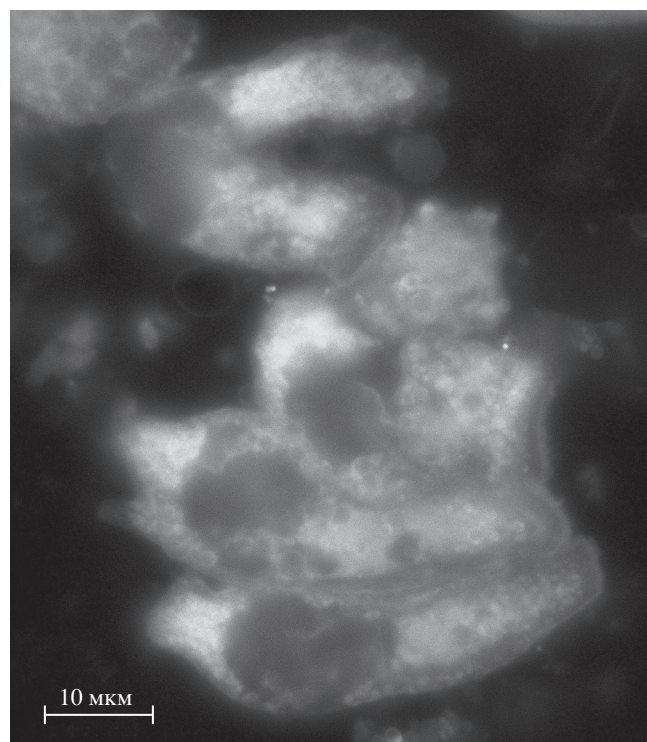


Рис. 3. Клетки призматического эпителия предстательной железы, окрашенные флуоресцентным зондом ДСМ

а по АНС – от 7 до 67% (среднее 44%). Измерения яркости клеток у всех девяти больных при строго стандартных условиях показали различные значения средней яркости. Так, средняя яркость по ДСМ изменялась от 3,7 до 31 отн. ед., а по яркости АНС – от 1,8 отн. ед. до 24,5. Таковую резкую неоднородность клеток по мембранному потенциалу у больных можно объяснить тем, что изучаемая величина отображает более тонкие процессы, которые

в данном исследовании нами пока не прослежены. А именно: прием больными различных лекарственных препаратов, в том числе гормонов для максимальной андрогенной блокады. В таблице 1 представлены результаты флуориметрического и цитометрического исследования клеток аденокарциномы предстательной железы у девяти больных. Средняя площадь клеток по девяти больным была 220 ± 75 мкр куб. Ядерно-цитоплазматический индекс составил $0,38 \pm 0,10$.

Следует отметить относительное постоянство коэффициента внутриклеточной неоднородности – неоднородности цитоплазмы каждой клетки (данные 6-го столбца таблицы 1 с отношением максимальной ЯркМАХ и минимальной ЯркМІН яркостей). Среднее отношение максимальной яркости области клетки к минимальной для ДСМ составляет $1,87 \pm 0,50$; для АНС $1,74 \pm 0,72$, статистически значимого различия нет. Самая яркая область клетки совпадала с областью активных митохондрий с высоким отрицательным потенциалом.

В процессе флуориметрии клеточной суспензии часто встречали клеточные скопления эпителиальных клеток, частично сохранивших структуру эпителиального пласта протоков железы: они были плотно сцеплены между собой. Эти клетки в прижизненной окраске ДСМ отличались интересным признаком – митохондрии концентрировались в базальной области клетки, создавая таким образом четкую полярность. Такие клетки представлены на рисунке 3. Очевидно, проникая в клетку, катион ДСМ связывается с отрицательно заряженными внутриклеточными структурами. Чем выше отрицательный заряд области связывания, тем ярче эта область флуоресцирует. Здесь отчетливо проявляется полярность апикальной и базальной области опухолевых клеток по яркости. На этом

Таблица 1. Показатели цитометрии и флуориметрии клеток аденокарциномы предстательной железы

№ пробы пунктата	Число клеток	Средняя яр- кость клеток ± станд. откл. (отн.ед.)	$\frac{\text{ЯркMAX}}{\text{ЯркMIN}}$	Средняя яр- кость клеток ± станд. откл. (отн.ед.)	$\frac{\text{ЯркMAX}}{\text{ЯркMIN}}$ ± станд. откл.	Ядерно-цитоплазматическое отношение ± станд. откл.
		ДСМ		АНС		
		1	2	3	4	
1	26	7,4±5,2	1,5±0,2	3,6±2,0	1,7±0,6	0,28±0,11
2	23	31±14	2,9±1,2	17,4±11,6	3,4±1,3	0,26±0,10
3	28	18,5±4,3	2,5±0,7	1,9±0,6	1,1±0,1	0,42±0,3
4	17	17,7±3,6	1,8±0,4	15,4±1,1	1,1±0,1	0,54±0,31
5	36	6,3±2,1	1,9±0,5	1,8±1,1	1,7±0,2	0,34±0,30
6	40	7,1±1,6	1,7±0,4	9,4±4,0	1,6±0,7	0,33±0,13
7	49	10,6±2,1	1,5±0,4	24,5±12,9	1,7±0,6	0,40±0,24
8	97	5,1±1,3	1,5±0,3	1,8±0,51	1,6±0,3	0,36±0,12
9	48	3,7±1,3	1,5±0,25	3,8±1,9	1,7±0,5	0,53±0,24

фото видно только малую часть эпителиального пласта клеток, на основании которого можно представить целостную картину первичной тонкой организации клеток эпителия протоков железы, где полярность апикальной и базальной области клеток сохранилась. Именно скопление высоко отрицательно заряженных митохондрий в базальной части клеток эпителия создает полярность каждой клетки и пласта в целом. В таких биофизических условиях протекает жизнедеятельность клеток органа в целом и выполняется основная функция – синтез и выброс секрета.

Таким образом, выполненное исследование показало, что популяция клеток эпителия пунктата аденокарциномы гетерогенна по мембранному потенциалу, а также подтвердило предположение об электрической полярности эпителиальных клеток. Данные витальной флуориметрии клеток пунктата аденокарциномы предстательной железы свидетельствуют об электрической неоднородности не только клеточной взвеси, но и каждой опухолевой клетки, определяемой разной яркостью флуоресценции потенциалозависимых красителей по областям цитоплазмы. Для клеток аденокарциномы предстательной железы, в отличие от лимфоцитов, можно использовать только один потенциалозависимый зонд для оценки МП, поскольку неокрашенных клеток в клеточной взвеси не было ни в окраске АНС, ни в окраске ДСМ. Прижизненное окрашивание клеток потенциалозависимым зондом ДСМ имеет преимущество в том, что флуоресценция ДСМ полихроматична и клетки легко морфологически идентифицировать, хорошо визуализируются клеточные органеллы. Среднее отношение максимальной яркости области внутри клетки к минимальной составило $1,8 \pm 0,5$.

Использование потенциалозависимых зондов позволяет дать количественную характеристику электрической гетерогенности клеток пунктата аденокарциномы предстательной железы и выявить в клеточной культуре уровень жизнеспособности опухолевых клеток как важный критерий, определяющий дальнейшую диагностику и тактику лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зацепина Г.Н. Электрическая система регуляции процессов жизнедеятельности. М.: Изд-во МГУ, 1992. 160 с.
2. Arcangeli A., Rosati B., Crociani O. et al. Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: Potentiating effects of BDNF // Journal of Neurobiology. 1999. Vol. 40. P. 214–225.
3. Zhao M., Song B., Pu J. et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase and PTEN // Nature. 2006. Vol. 442. P. 457–460.
4. Song B., Zhao M., Forrester J.V., McCaig C.D. Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo // PNAS. 2002. Vol. 99. P. 13577–13582.
5. Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.L. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. PLoS ONE 2008; Vol. 3 (11). URL: www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0003737
6. Зацепина Г.Н., Егудина С.В., Тарнопольская О.В. Изменение адаптационной способности и кинетики адаптации Т-лимфоцитов в гипотонии в патологических состояниях организма млекопитающих // Биофизика. 1992. Т. 37. № 1. С. 142–149.
7. Сидоренко Ю.С., Шихлярова А.И., Протасова Т.П., Барсукова Л.П., Марьяновская Г.Я., Коробейникова Е.П. Некоторые электрофизиологические корреляты общих неспецифических адаптационных реакций организма больных раком легкого // Вестник Южного научного центра РАН. 2009. Т. 5. № 2. С. 112–119.
8. Сидоренко Ю.С., Шихлярова А.И., Максимов Г.К. Оптимизация противоопухолевого эффекта при сочетании воздействий магнитных полей на мозг и аутокровь, инкубированную с химиопрепаратом // Вестник Южного научного центра РАН. 2007. Т. 3. № 3. С. 105–112.
9. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды для исследования биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
10. Морозова Г.А., Добрецов Г.Е., Дубур Г.Я., Дубуре Р.Р., Голицын В.М., Баренбойм, Владимиров Ю.А. Флуоресценция 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке // Цитология. 1981. Т. 23. № 8. С. 916–923.

HETEROGENEITY OF EPITHELIAL CELLS OF PROSTATE ADENOCARCINOMA PUNCTATE BY MEMBRANE POTENTIAL

**G.K. Maximov, O.V. Tarnopol'skaya, A.I. Shikhlyarova,
E.M. Nepomnyashchaya, and V.A. Sergan'**

Epithelial cells of prostatic adenocarcinoma punctate vitally stained with potential-dependent fluorescent probes were studied. Cation DCM and anion ANS probes were used, their fluorescent brightness in the entire cell was proportional to membrane cell potential: directly proportional for cation and inversely proportional for anion. Brightness of cell fluorescence, area of cells and nuclei, nuclear-cytoplasmic ratio were measured. Areas with maximal and minimal brightness were measured inside a cell, and their ratio equal to 1.8 ± 0.5 was calculated (heterogeneity coefficient). Character of mitochondria distribution inside cells was studied. Most of the cells of this group had mitochondria coupled in large clusters. These clusters are located in the basal part of cells. Such distribution of mitochondria clusters is supposed to form electric heterogeneity of cellular cytoplasm. Electric heterogeneity of cancer cells of prostatic gland punctate is high: average membrane potential ranged from 3.7 to 31 relative units.

Key words: prostatic adenocarcinoma punctate, epithelial cells, membrane potential, fluorescent probes ANS and DSM.

REFERENCES

1. Zatsepina G.N. 1992. *Elektricheskaya sistema regulyacii processov zhiznedejatel'nosti*. [The electrical system of regulation vital processes]. M., Moskow State University Publishers: 160 p. (In Russian).
2. Arcangeli A., Rosati B., Crociani O. et al. 1999. Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: Potentiating effects of BDNF. *Journal of Neurobiology*. 40: 214–225. (In English).
3. Zhao M., Song B., Pu J. et al. 2006. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase and PTEN. *Nature*. 442: 457–460. (In English).
4. Song B., Zhao M., Forrester J.V., McCaig C.D. 2002. Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo. *PNAS*. 99: 13577–13582. (In English).
5. Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.L. 2008. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 3(11). URL: www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0003737. (In English).
6. Zatsepina G.N., Yegudina S.V., Tarnopol'skaya O.V. 1992. [Change adaptive capacity and kinetics Key adaptation of T-lymphocytes in hypotension in pathology logical states of mammals]. *Biofizika*. 37(1): 142–149. (In Russian).
7. Sidorenko Yu.S., Shikhlyarova A.I., Protasova T.P., Barsukova L.P., Maryanovskaya G.Ya., Korobeynikova E.P. 2009. [Some electrophysiological correlates of general non-specific adaptational reactions of organism of patients with lung cancer]. *Vestnik Yuzhnogo Nauchnogo Tsentra*. 5(2): 112–119. (In Russian).
8. Sidorenko Yu.S., Shikhliarova A.I., Maksimov G.K. 2007. [Optimization of antitumor effect under combination of exposures of brain and autoblood incubated with the chemical preparation to magnetic fields]. *Vestnik Yuzhnogo Nauchnogo Tsentra*. 3(3): 105–112. (In Russian).
9. Vladimirov Yu.A., Dobrecov G.Ye. 1980. *Fluorescentnye zondy dlya issledovaniya biologicheskikh membran*. [Fluorescent probes for the study of biological membranes]. M., “Nauka”: 320 p. (In Russian).
10. Morozova G.A., Dobrecov G.Ye., Dubur G.Ya., Dubure R.R., Golitsyn V.M., Barenboym, Vladimirov Yu.A. 1981. [Fluorescence 4-(n-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium in living cells]. *Citologiya*. 23(8): 916–923. (In Russian).