

Окта-BODIPY краситель для мониторинга параметров живых клеток с помощью микроскопии с визуализацией времени жизни флуоресценции

© А.Ю. Фролова¹, Э.Е. Ким², Ю.Н. Кононевич², В.И. Мартынов¹, С.М. Деев¹, А.А. Пахомов¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

² Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991 Москва, Россия

e-mail: alpah@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

В окончательной редакции 05.03.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Оценен потенциал применимости мультихромофорного соединения, состоящего из восьми хромофоров 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-с-индацен (BODIPY), связанных через алифатический спейсер с силоксановым ядром, для мониторинга параметров мембран в живых эукариотических клетках. Указанное соединение обладает значительным сольватохромизмом за счет внутримолекулярных взаимодействий хромофоров. Обнаружено, что параметры внешней среды существенно влияют на флуоресцентные свойства красителя, в частности, на время жизни флуоресценции. Это позволило использовать его для мониторинга параметров мембранных структур клетки методом микроскопии с визуализацией времени жизни флуоресценции (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM).

Ключевые слова: 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-с-индацен (BODIPY), агрегация, клеточная визуализация, микроскопия с визуализацией времени жизни флуоресценции (FLIM).

DOI: 10.61011/OS.2024.04.58212.26-24

Введение

Флуоресцентные красители в настоящее время широко используются для изучения процессов, протекающих в живых системах [1]. Для визуализации отдельных компартментов клеток и определения локализации отдельных белков в клетке обычно нужны стабильные и яркие флуорофоры, нечувствительные к параметрам внешней среды. Однако соединения, оптические свойства которых зависят от внешних условий, также востребованы в клеточной биологии, так как позволяют следить за отдельными показателями клетки. К примеру, в литературе описано множество сенсоров неорганических ионов, органических низкомолекулярных соединений, ферментов и т.д. [2]. Флуоресценция таких сенсоров меняется при разной концентрации аналита. Получены даже соединения, позволяющие измерять вязкость в отдельных компартментах клетки, а также термочувствительные зонды. Они обычно основаны на соединениях, квантовый выход и время жизни флуоресценции которых меняются в зависимости от подвижности отдельных элементов хромофорной системы друг относительно друга. Ярким примером таких соединений являются стирильные производные [3–5] и гемицианины [6,7], у которых ароматические циклы разделены двойными связями, а также молекулярные роторы на основе 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-с-индацена (BODIPY) [8–10] (рис. 1). При увеличении вязкости среды или уменьшении темпера-

туры квантовый выход флуоресценции этих соединений растет за счет уменьшения колебательной подвижности хромофора. Особую популярность в последнее время приобрели материалы с эмиссией флуоресценции, вызванной агрегацией (AIE, aggregation-induced emission). Обычно агрегация красителей приводит к тушению (ACQ, aggregation-caused quenching), однако в случае соединений с AIE за счет, с одной стороны, стерических ограничений на взаимодействия π -систем хромофоров друг с другом, а с другой стороны, за счет ограничения колебаний в сконденсированном состоянии происходит рост квантового выхода флуоресценции [11,12]. Недавно нами была синтезирована серия соединений, содержащих несколько (от 2 до 8) флуорофоров BODIPY, связанных с силоксановым ядром через алифатический спейсер [13]. Они хорошо растворимы во многих органических растворителях, однако за счет близкого расположения хромофоров происходит их агрегация. Это проявлялось, с одной стороны, в виде эффектов, похожих на ACQ — квантовый выход флуоресценции уменьшался при увеличении числа хромофоров в молекуле. С другой стороны, при этом наблюдалось появление новых полос флуоресценции, связанных, вероятнее всего, с образованием эксимеров — что можно охарактеризовать как AIE. Флуоресцентные свойства этих олигомерных красителей сильно зависели от параметров внешней среды (растворителя), которая определяла баланс эффектов ACQ-AIE в молекуле. Наиболее выраженными эти эффекты были

в красителе с восемью хромофорами BODIPY (octa-BDP, рис. 2, *a*). За счет высокой гидрофобности это соединение должно хорошо накапливаться в мембранных структурах клетки. В настоящей работе мы оценили потенциал применимости octa-BDP для мониторинга параметров мембран в живых клетках.

Материалы и методы

Синтез octa-BDP описан ранее [13]. Спектры поглощения измеряли с помощью спектрофотометра Cary50 Bio (Varian). Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian). Для определения размера наночастиц octa-BDP в воде использовали наносайзер ZetaSizer Nano ZS (Malvern).

Клетки карциномы шейки матки человека HeLa и карциномы яичников человека SKOV3 выращивали в среде RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific, Inc.) до 10%, L-глутамина до 2 mM (ПанЭко), 100 u/ml пенициллина и 100 µg/ml стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Клетки культивировали во влажной атмосфере при 37°C и 5% CO₂. Среду обновляли каждые 2–3 дня. В экспериментах по анализу апоптоза клеток под действием бензилвиологена и пероксида водорода клетки культивировали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Для микроскопии клеток использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 980. Клетки в 96-луночной планшете визуализировали через объектив Plan-Apochromat 10×/0.3 с использованием дополнительного 4-кратного увеличения за счет сканера микроскопа. Для микроскопии с визуализацией времени жизни флуоресценции использовали расширение PicoQuant с импульсным диодным лазером 485 nm (использовали частоту 20 MHz) и гибридным детектором с временным разрешением < 50 ps. Перед детектором устанавливали светофильтр 520/30 nm для дополнительного отсека света возбуждающего лазера. Анализ кривых затухания флуоресценции проводили в программном обеспечении SymPhoTime 64 (PicoQuant). Для определения времени жизни флуоресценции отдельных клеток выделяли область кадра, занятую клеткой, проводили аппроксимацию кинетики затухания флуоресценции. Несмотря на сложный характер кинетики затухания флуоресценции octa-BDP [13], данные хорошо аппроксимировались моноэкспоненциальной функцией (χ^2 находился в диапазоне 0.9–1.3), так как число детектированных фотонов находилось в районе 100000 (~ 10² в максимуме кинетики). Данные для нескольких клеток в кадре (от 9 до 40) обрабатывались статистически в программе Origin 2021.

Для приготовления наночастиц (НЧ) octa-BDP, небольшое количество красителя сначала растворяли в 20 µl дихлорметана, затем быстро добавляли 50 µl

DMSO, после чего дихлорметан упаривали под вакуумом в течение получаса. Затем брали 5 µl полученного красителя в DMSO и быстро добавляли к нему 95 µl фосфатно-солевого буфера (phosphate buffered saline, PBS), который потом разбавляли до 1 ml либо PBS для экспериментов в кювете, либо питательной средой для экспериментов с клетками. Конечная концентрация красителя составила ~ 5 µM. Быстрое разбавление небольшой аликвоты красителя в органическом растворителе водным буфером (именно в такой последовательности, а не наоборот, как это принято при работе с маленькими объемами) имело критическое значение для получения НЧ, стабильных в течение длительного времени.

Результаты и обсуждение

Детальный анализ сольватохромных свойств octa-BDP в органических растворителях описан в недавней работе [13]. Однако органические растворители не совместимы с живыми клетками, поэтому мы изучили поведение octa-BDP в водном буфере. Для этого octa-BDP растворяли в DMSO, а затем разбавляли фосфатным буферным раствором (PBS). За счет низкой полярности краситель и в DMSO растворялся не очень хорошо, однако после разбавления в PBS агрегировал, о чем свидетельствовало изменение оптических свойств. В спектрах поглощения и флуоресценции появлялось множество новых полос как с батохромным, так и с гипсохромным сдвигами (рис. 2, *c–e*), а также вызванное агрегацией значительное тушение флуоресценции. Поскольку octa-BDP из-за высокой гидрофобности не должен растворяться в воде, можно было бы ожидать его выпадения в осадок при добавлении воды. Несмотря на то, что раствор после добавления воды был достаточно прозрачным и в спектрах поглощения не наблюдалось характерного светорассеивания, octa-BDP действительно выпадал в осадок, но в виде НЧ, о чем свидетельствовали результаты микроскопии (см. ниже) и динамического светорассеяния (dynamic light scattering, DLS, рис. 2, *b*). Средний размер НЧ, согласно данным DLS, равнялся 1080 nm со стандартным отклонением 280 nm.

Мы проверили, будет ли octa-BDP накапливаться в клетках после их инкубации с полученными НЧ. Мы протестировали это на клетках рака шейки матки человека HeLa, широко применяемых в рутинных клеточных экспериментах. Для этого клетки инкубировали с НЧ в растворе питательной среды в течение 30 min и затем визуализировали с использованием флуоресцентной микроскопии (рис. 3). Видно, что действительно происходит накопление зеленого красителя в клетках, однако наблюдалось также множество флуоресцирующих частиц, находящихся в броуновском движении. Полученные микроскопические изображения клеток HeLa согласуются с накоплением octa-BDP в мембранных структурах клетки. Известно, что липофильные незаряженные красители, в том числе и BODIPY, локализуются внутри клетки в

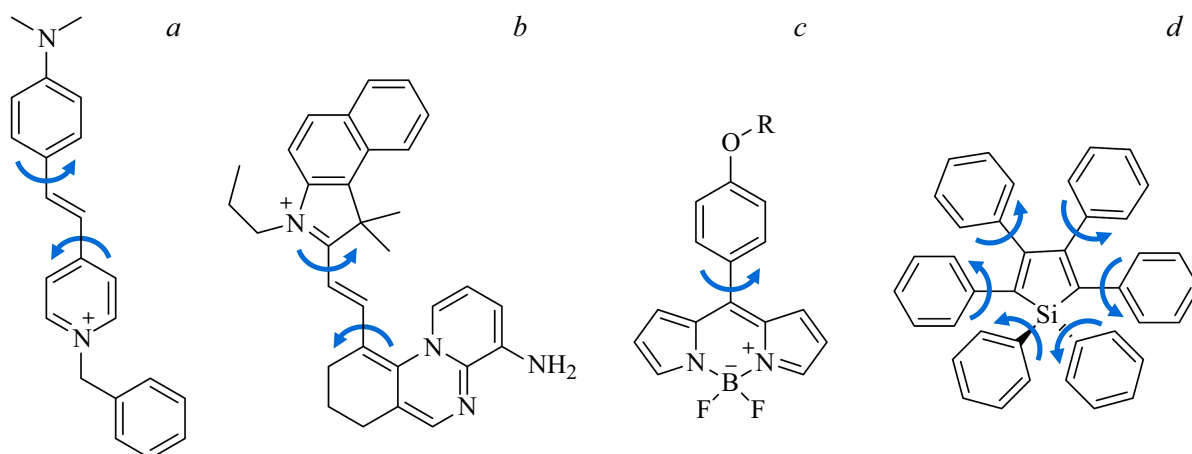


Рис. 1. Примеры чувствительных к вязкости и температуре соединений на основе молекулярных роторов: стирилов [3] (a), гемцианинов [6] (b), BODIPY [8] (c), а также гексафенилсилола, характеризующегося эффектом AIE [12] (d). Стрелкой показаны вращательные степени свободы, отвечающие за безызлучательную релаксацию из возбужденного состояния.

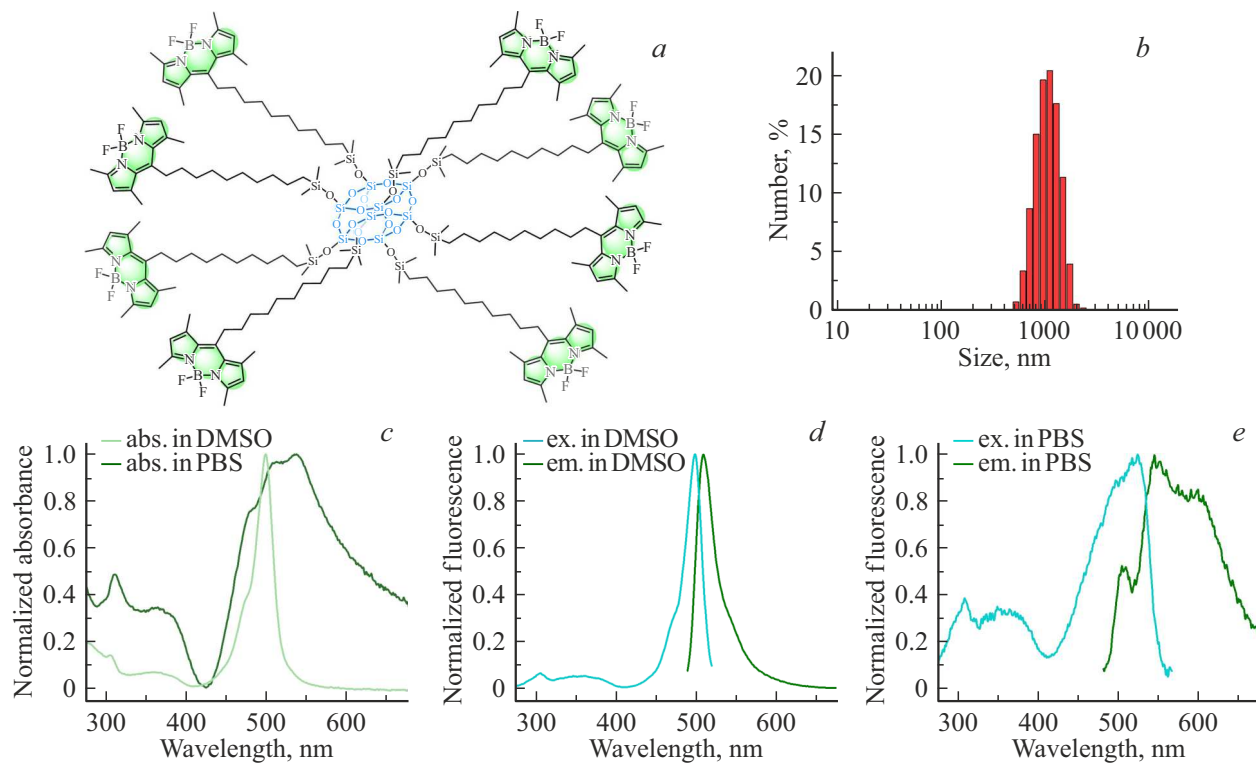


Рис. 2. Структура octa-BDP (a) и его свойства в растворе: размер частиц octa-BDP в водном буфере согласно данным динамического светорассеяния (b), спектры поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции в DMSO и водном фосфатном буфере (c–e).

мембранных структурах, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, липидные капли [2]. Флуоресцентные изображения клеток в целом были аналогичны полученным нами ранее с гомологичными производными BODIPY [14]. При микроскопии с визуализацией времени жизни флуоресценции (FLIM, рис. 3, d) видно, что краситель в клетках и в НЧ имеет разное время флуоресценции (5.1 и 1.6 ns соответственно). Это

согласуется с уменьшением агрегации при растворении красителя в клетках. Об этом же свидетельствуют и спектры эмиссии флуоресценции клеток и НЧ, полученные при помощи детектора микроскопа (рис. 3, e). Видно, что в клетках исчезают полосы агрегатов в области 550–600 nm.

Для оценки потенциала применимости octa-BDP для мониторинга параметров клеток мы взяли клетки HeLa

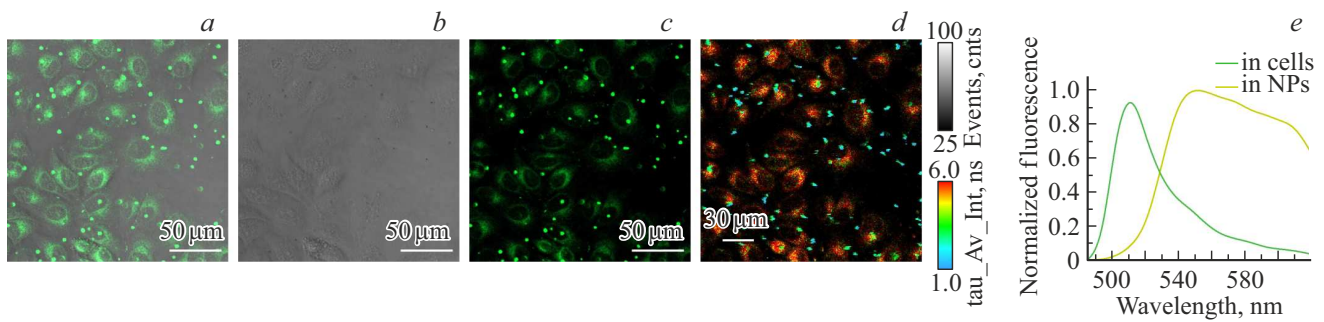
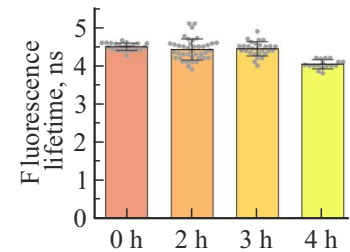
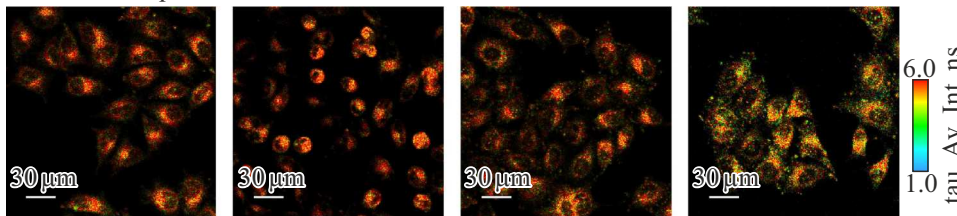


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa, инкубированных с НЧ octa-BDP: *a* — наложение зеленого канала и проходящего света, *b* — изображения клеток в проходящем свете, *c* — клетки в зеленом канале детекции (возбуждение лазером 488 nm, детекция эмиссии в диапазоне 490–675 nm), *d* — FLIM с возбуждением лазером 485 nm и детекцией в диапазоне 505–545 nm; *e* — спектры эмиссии флуоресценции красителя в клетках и НЧ, полученные с помощью детектора QUASAR микроскопа Zeiss LSM 980 в диапазоне 490–620 nm при возбуждении лазером 488 nm.

a HeLa + Etoposide



b SCOV3 + Etoposide

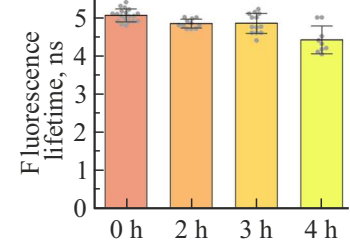
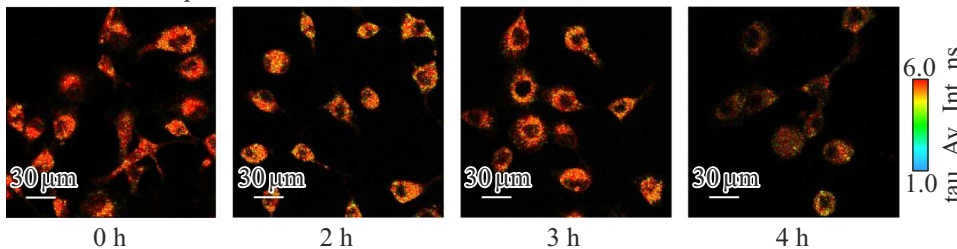


Рис. 4. Изменение времени жизни флуоресценции octa-BDP в клетках HeLa (*a*) и SCOV3 (*b*) через 0, 2, 3, 4 h после добавления к ним этопозида. Справа приведены гистограммы времени жизни флуоресценции клеток при разном времени инкубации. Показаны средние времена жизни флуоресценции клеточных популяций и стандартные отклонения, точками показаны данные для отдельных клеток.

и SCOV3 и обработали их этопозидом. Данный препарат является индуктором апоптоза и вызывает рост вязкости мембранных структур клеток, поэтому он часто используется для тестирования вискозиметров на основе флуоресцентных красителей [3]. После инкубации клеток с этопозидом в течение 1, 2 и 3 h добавляли раствор НЧ octa-BDP (концентрация красителя $\sim 5 \mu\text{M}$) и инкубировали еще час, затем после отмывки несвязавшегося красителя получали микроскопические изображения клеток (рис. 4). Время жизни флуоресценции красителя в клетках HeLa и SCOV3 в начале эксперимента отличалось и составило 4.50 и 5.50 ns соответственно. Это может свидетельствовать о разном липидном составе этих клеток и согласуется с другими экспериментами, демонстрирующими, что состав и вязкость липидного бислоя в различных культурах клеток может отличаться [15,16]. Более того, время жизни флуоресценции octa-

BDP в клетках HeLa в этом эксперименте отличалось от такового в эксперименте, описанном выше (рис. 3), что свидетельствует о разном составе липидного бислоя клеток в этих экспериментах. Добавление этопозида ($250 \mu\text{M}$) к клеткам HeLa и SCOV3 приводило к уменьшению за 4 h времени жизни флуоресценции красителя до 4.0 и 4.4 ns соответственно (рис. 4).

Мы индуцировали апоптоз также и другими реагентами: бензилвиологеном ($5 \mu\text{M}$) и более традиционным — пероксидом водорода ($400 \mu\text{M}$). Эксперименты проводили на клетках HeLa, которые культивировались в среде DMEM вместо RPMI как ранее. До индукции апоптоза время жизни флуоресценции octa-BDP в клетках равнялось 5.4–5.5 ns (рис. 5). Эти значения отличаются от полученных в предыдущих экспериментах, что лишний раз подтверждает, что липидный состав клеток зависит от условий культивирования. На клетках

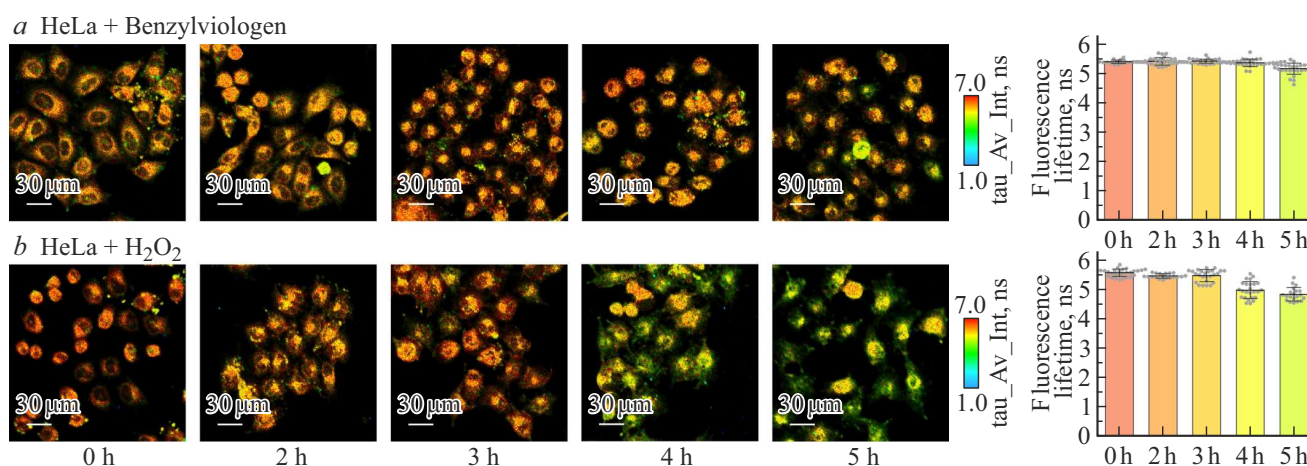


Рис. 5. Изменение времени жизни флуоресценции octa-BDP в клетках HeLa в ходе апоптоза, вызванного бензилвиологеном (а) и пероксидом водорода (b) через 0, 2, 3, 4, 5 h после добавления реагента. На гистограммах показаны средние времена жизни флуоресценции клеточных популяций и стандартные отклонения, точками показаны данные для отдельных клеток.

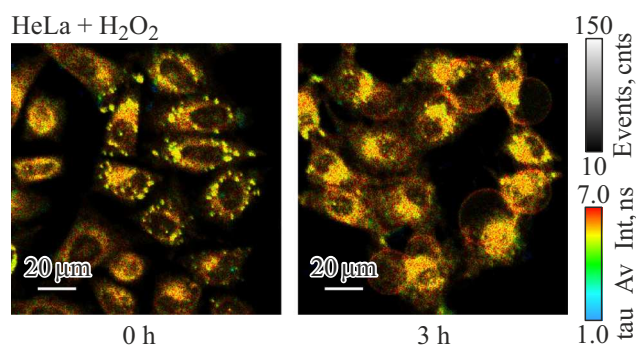


Рис. 6. FLIM клеток HeLa, меченых octa-BDP, до и после инкубации с пероксидом водорода в течение 3 ч. Перед визуализацией клетки не промывали PBS.

HeLa, меченных octa-BDP, при увеличении 60× можно было различить отдельные компартменты с различным временем жизни флуоресценции: около 5.1 ns в точечных структурах и 5.6 ns в основной части клетки (рис. 6). Также наблюдалось увеличение времени жизни флуоресценции красителя до 6.0 ns в характерных для апоптоза выпуклостях плазматической мембраны (блебах). Как и в случае с этопозидом, под действием бензилвиологена и пероксида водорода время жизни флуоресценции в клетках падало (за 5 h, до 5.2 и 4.8 ns соответственно, рис. 5).

Такое поведение octa-BDP кардинально отличает его от молекулярных роторов, для которых индуцированное этопозидом и другими цитотоксинами увеличение вязкости мембран приводит к росту квантового выхода и времени жизни флуоресценции за счет ограничения колебательных степеней свободы [3,17,18]. Соединение octa-BDP работает на других принципах, его время жизни флуоресценции определяется межхромофорной агрегацией, зависящей от параметров среды, в которой

он находится [13]. Причем в значительной степени образование внутримолекулярных агрегатов хромофоров в octa-BDP определялось не вязкостью, а полярностью. Падение времени жизни флуоресценции octa-BDP свидетельствует об увеличении количества межхромофорных агрегатов в результате ухудшения их растворимости в среде. Это может быть связано с изменением состава в мембранных структурах клетки, и в частности, количества полярных/неполярных компонентов в ней в большей степени, нежели количества остатков насыщенных/ненасыщенных жирных кислот, определяющих их вязкость. Значительно большее падение времени жизни флуоресценции octa-BDP в экспериментах с пероксидом водорода по сравнению с бензилвиологеном согласуется с этим утверждением. Бензилвиологен вызывает апоптоз через окислительный стресс и не взаимодействует напрямую с липидами, тогда как пероксид водорода помимо индукции окислительного стресса в клетке может участвовать в перекисном окислении липидов, в результате чего их полярность значительно возрастает, что и приводит к усилению агрегации BODIPY и уменьшению времени жизни флуоресценции octa-BDP.

В заключение стоит также отметить, что недавно было показано, что время жизни флуоресценции некоторых молекулярных роторов может зависеть не только от вязкости, но и от полярности среды [19].

Заключение

Таким образом, в настоящей работе продемонстрировано, что octa-BDP действительно можно использовать для слежения за параметрами мембранных структур в живых клетках. В отличие от широко используемых для этого флуоресцентных красителей на основе роторов время жизни флуоресценции octa-BDP определяется агрегацией хромофоров и вызываемой ею эффектами

ACQ-AIE внутри молекулы. Поскольку эти эффекты зависят в большей степени от полярности среды, оста-BDP можно использовать как дополнение к существующим вискозиметрам на основе молекулярных роторов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30016).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] E.A. Specht, E. Braselmann, A.E. Palmer. *Annu. Rev. Physiol.*, **79** (1), 93 (2017). DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034055
- [2] V.I. Martynov, A.A. Pakhomov. *Russ. Chem. Rev.*, **90** (10), 1213 (2021). DOI: 10.1070/RCR4985
- [3] L. Yuan, D. Wang, S. Shan, J. Chen, W. Huang, G. Han, X. Tian, R. Zhang, Z. Zhang, Z. Liu. *Anal. Methods*, **13** (28), 3181 (2021). DOI: 10.1039/D1AY00366F
- [4] M.A. Ustimova, P.A. Chernikova, N.E. Shepel, Y.V. Fedorov, O.A. Fedorova. *Mendeleev Commun.*, **30** (2), 217 (2020). DOI: 10.1016/j.mencom.2020.03.029
- [5] H. Xiao, P. Li, B. Tang. *Chem. — Eur. J.*, **27** (23), 6880 (2021). DOI: 10.1002/chem.202004888
- [6] X.-Z. Yang, B. Xu, L. Shen, R. Sun, Y.-J. Xu, Y.-L. Song, J.-F. Ge. *Anal. Chem.*, **92** (5), 3517 (2020). DOI: 10.1021/acs.analchem.0c00054
- [7] P. Luo, M. Wang, W. Liu, L. Liu, P. Xu. *Molecules*, **27** (22), 7750 (2022). DOI: 10.3390/molecules27227750
- [8] I. López-Duarte, T.T. Vu, M.A. Izquierdo, J.A. Bull, M.K. Kuimova. *Chem. Commun.*, **50** (40), 5282 (2014). DOI: 10.1039/C3CC47530A
- [9] M. Kubánková, P.A. Summers, I. López-Duarte, D. Kiryushko, M.K. Kuimova. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11** (40), 36307 (2019). DOI: 10.1021/acsami.9b10426
- [10] S. Toliautas, J. Dodonova, A. Žvirblis, I. Čiplys, A. Polita, A. Devišis, S. Tumkevičius, J. Šulskus, A. Vyvsniauskas. *Chem. — Eur. J.*, **25** (44), 10342 (2019). DOI: 10.1002/chem.201901315
- [11] J. Mei, Y. Hong, J.W.Y. Lam, A. Qin, Y. Tang, B.Z. Tang. *Adv. Mater.*, **26** (31), 5429 (2014). DOI: 10.1002/adma.201401356
- [12] Z. Zhao, B. He, B.Z. Tang. *Chem. Sci.*, **6** (10), 5347 (2015). DOI: 10.1039/C5SC01946J
- [13] A.A. Pakhomov, E.E. Kim, Y.N. Kononevich, D.S. Ionov, M.A. Maksimova, V.B. Khalchenia, E.G. Maksimov, A.A. Anisimov, O.I. Shchegolikhina, V.I. Martynov, A.M. Muzafarov. *Dyes Pigments*, **203**, 110371 (2022). DOI: 10.1016/j.dyepig.2022.110371
- [14] A.A. Pakhomov, I.E. Deyev, N.M. Ratnikova, S.P. Chumakov, V.B. Mironiuk, Y.N. Kononevich, A.M. Muzafarov, V.I. Martynov. *BioTechniques*, **63** (2), 77 (2017). DOI: 10.2144/000114577
- [15] Y.M. Efremov, L. Shimolina, A. Gulin, N. Ignatova, M. Gubina, M.K. Kuimova, P.S. Timashev, M.V. Shirmanova. *Cells*, **12** (21), 2583 (2023). DOI: 10.3390/cells12212583
- [16] M. Paez-Perez, M.K. Kuimova. *Angew. Chem. Int. Ed.*, e202311233 (2023). DOI: 10.1002/anie.202311233
- [17] Y. Tang, J. Peng, Q. Zhang, S. Song, W. Lin. *Talanta*, **249**, 123647 (2022). DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123647
- [18] J. Yin, M. Peng, W. Lin. *Anal. Chem.*, **91** (13), 8415 (2019). DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01293
- [19] A. Vyšniauskas, I. López-Duarte, N. Duchemin, T.-T. Vu, Y. Wu, E.M. Budynina, Y.A. Volkova, E. Peñna Cabrera, D.E. Ramírez-Ornelas, M.K. Kuimova. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19** (37), 25252 (2017). DOI: 10.1039/C7CP03571C