

Определение метаболической активности свежесыводенных и криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека с помощью Alamar Blue-теста

Ю.А. ПЕТРЕНКО, Н.А. ГОРОХОВА, Б.П. САНДОМИРСКИЙ, А.Ю. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

The Determination of Metabolic Activity of Freshly Isolated and Cryopreserved Human Fetal Liver Cells Using Alamar Blue Test

YU.A. PETRENKO, N.A. GOROKHOVA, B.P. SANDOMIRSKY, A.YU. PETRENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследована возможность использования индикатора метаболической активности Alamar Blue (AB) для оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток эмбриональной печени человека (КЭП) до и после криоконсервирования. Показано, что AB – интегральный показатель метаболической активности клеток, которая определяется целостностью плазматической мембраны, интенсивностью гликолиза, активностью дыхательной цепи митохондрий и синтетических процессов. Ингибиторный анализ восстановления AB в КЭП человека свидетельствует о существенном вкладе гликолиза в суммарную метаболическую активность клеток эмбрионального происхождения. Доказано, что AB – высокочувствительный тест жизнеспособности КЭП человека, который может использоваться для скрининга эффективности режимов криоконсервирования.

Ключевые слова: Alamar Blue, клетки эмбриональной печени, криоконсервирование, метаболическая активность, флуоресценция.

Досліджена можливість використання індикатора метаболічної активності Alamar Blue (AB) для оцінки життєздатності і проліферативної активності клітин ембріональної печінки людини (КЕП) до і після криоконсервування. Доведено, що AB – інтегральний показник метаболічної активності клітин, яку визначає цілісність плазматичної мембрани, інтенсивність гліколізу, активність дихального ланцюга мітохондрій і синтетичних процесів. Інгібіторний аналіз відновлення AB в КЕП людини свідчить про суттєвий вклад гліколізу до сумарної метаболічної активності клітин ембріонального походження. Доведено, що AB – високочутливий тест життєздатності КЕП людини, який може використовуватися для скринінгу ефективності режимів криоконсервування.

Ключові слова: Alamar Blue, клітини ембріональної печінки, криоконсервування, метаболічна активність, флуоресценція.

The possibility of using the metabolic indicator Alamar Blue (AB) for fetal liver (FL) cells viability and proliferative activity assessment before and after cryopreservation was investigated. It is shown, that AB is the integral indicator of cells metabolic activity, which reflects the plasma membrane integrity as well as glycolysis intensity and respiratory chain activity in mitochondria. The inhibitory analysis of the AB reduction by human FL cells demonstrated that the glycolysis took the significant part in the total metabolic activity of cells of embryonic origin. The results demonstrate that the AB is a highly sensitive viability test for human FL cells and it could be used for the screening of cryopreservation protocol efficiency.

Key-words: Alamar Blue, fetal liver cells, cryopreservation, metabolic activity, fluorescence.

Для оценки эффективности режима криоконсервирования обычно используют методы окрашивания клеток различными витальными красителями, в частности трипановым синим и флуоресцеин диацетатом (в сочетании с бромистым этидием). Однако эти методы, в основном, отражают целостность плазматической мембраны клетки, но не всегда коррелируют с ее жизнеспособностью. В настоящее время широко применяются функциональные тесты жизнеспособности, основывающиеся на изменении флуоресценции или поглощения света некоторых соединений, пропорциональном метаболической активности клетки. Перспективным для решения криобиологических задач является соединение –

To determine the cryopreservation protocol efficacy, several staining techniques, such as trypan blue or fluorescein diacetate staining are usually applied. However, these techniques basically reflect the integrity of plasma membrane and do not always correlate with the actual viability of cells. Nowadays, the functional viability tests based on the ability of some substances to change their fluorescence or absorbance proportionally to metabolic activity of cells, find a great interest worldwide. The most perspective for cryobiological aims is resazurin – which is commercially known as Alamar Blue (AB) [9].

It has several benefits compared to tetrazolium salts such as MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) or XTT (sodium 3²-[1-

Адрес для корреспонденции: Петренко Ю.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Petrenko Yu.A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ресазурин, известное под коммерческим названием Alamar Blue [9]. Он обладает рядом преимуществ по сравнению с солями тетразолиума МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) и ХТТ (sodium 3²-[1-phenyl-amino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acide hydrate), так как не токсичен для клеток, растворим в культуральной среде в окисленной и в восстановленной формах, что позволяет проводить длительный мониторинг клеток в культуре. При длительном культивировании растительных клеток [4], фибробластов [12], остеобластов [6], эпителиальных клеток [10], лимфоцитов [3], трансформированных клеточных линий [5, 7] было показано, что восстановление АВ коррелирует с пролиферативной активностью клеток.

Принцип АВ-теста заключается в том, что накопление восстановленной формы индикатора пропорционально активности окислительно-восстановительных ферментов [9]. Количество окислительно-восстановительных ферментов увеличивается в ходе пролиферации пропорционально числу клеток. В то же время активность окислительно-восстановительных ферментов пропорциональна метаболической активности клеток, поэтому накопление флуоресцентного продукта АВ может быть использовано как тест на жизнеспособность.

Интенсивность окислительно-восстановительных реакций во многом зависит от природы изучаемых клеток. Работы с АВ выполнялись на дифференцированных клетках или трансформированных перевиваемых клеточных линиях. Однако данные о возможности использования АВ в качестве теста на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток эмбрионального происхождения после криоконсервирования в литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы – исследование возможности использования индикатора метаболической активности Alamar Blue для оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток эмбриональной печени человека до и после криоконсервирования.

Материалы и методы

Суспензию КЭП человека получали модифицированным для малых объемов неферментативным методом [8] из абортусов человека 7-10 недель гестации после искусственного прерывания беременности по социальным показаниям. Клеточную суспензию разводили солевой средой Дюльбекко, разливали по 0,5 мл в пластиковые криоконтейнеры (Costar, Канада), после чего к ней добавляли равные объемы криозащитной среды.

phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acide hydrate), because of its solubility in culture medium in oxidized as well as in reduced form. This ability could be successfully used for long term monitoring of cells during culture. It was shown, that the AB reduction correlates with the metabolic activity of cells during long term culture of plant cells [4], fibroblasts [12], osteoblasts [6], epithelium cells [10], lymphocytes [3] or transformed cell lines [5,7].

The principle of AB test is that the accumulation of its reduced form is proportional to oxidation-reduction activity of enzymes [9]. The number of oxidation-reduction enzymes increase proportionally to cell number during proliferation. At the same time the activity of oxidation-reduction enzymes is proportional to metabolic activity and therefore the accumulation of AB reduced form could be used as a viability test.

The oxidation-reduction reaction intensity is highly dependant on the nature of cells that are under investigation. The majority of studies have been carried out using fully differentiated cells or cell lines. However, data about the possibility of using AB for viability determination of cells of embryonic origin were not reported yet.

The aim of this research was to investigate the possibility of using metabolic indicator Alamar Blue to assess the viability and proliferative activity of human fetal liver (FL) cells before and after cryopreservation.

Materials and methods

The fetal liver cell suspension was obtained using modified for small sample volumes non-enzymatic method [8] from fetuses with 7-10 weeks of gestation. Cell suspension was diluted by Dullbeco's phosphate buffered saline (DPBS) and filled in to cryocontainers by 0,5 ml (Costar, Canada), then the cell suspension was equally mixed with the cryoprotective solution previously prepared in double concentrations. The final concentration of Me₂SO was 5%, fetal calf serum (FCS) – 10%. The program freezing was prepared with the initial cooling rate 1°C/min down to –40°C, then with 10°C/min down to –80°C, then the samples were plunged into liquid nitrogen and stored there for at least 3 months.

After quick thawing on water bath at 40°C, FL cell suspension was washed from the cryoprotective additives by centrifugation at 300 g during 10 min in DPBS supplemented with 10% FCS.

The survival of human FL cells before and after cryopreservation was assessed by trypan blue staining. The cell number was calculated in haemocytometer.

To determine the AB reduction, human FL cells were resuspended in culture medium: DMEM/F12 (Sigma, USA), supplemented by 10% FCS; 50 mg/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. Cell suspensions

Конечная концентрация ДМСО составляла 5%, эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ) – 10%. Программное замораживание производили в три этапа: до -40°C со скоростью $1^{\circ}/\text{мин}$, до -80°C со скоростью $10^{\circ}/\text{мин}$, затем образцы погружали в жидкий азот и хранили не менее трех месяцев.

После быстрого отогрева на водяной бане при $\sim 40^{\circ}\text{C}$ деконсервированную суспензию КЭП человека отмывали от криозащитной среды центрифугированием при 300 g в течение 10 мин в среде Дюльбекко, содержащей 10% ЭСТ.

Сохранность КЭП человека до и после криоконсервирования определяли по окрашиванию клеток трипановым синим. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Для изучения восстановления АВ клетки эмбриональной печени человека суспендировали в культуральной среде: DMEM/F12 (Sigma, США), дополненной 10% ЭСТ; 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Клетки в концентрациях 10^4 , 10^5 и 10^6 клеток/мл культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах (в лунку планшета вносили 200 мкл клеточной суспензии) при 37°C во влажной камере, содержащей 5% CO_2 . Alamar Blue (Serotec Ltd, США) добавляли в среду культивирования в концентрации 10% [10]. Восстановленную форму АВ определяли флуориметрически на спектрофлуориметре Tecan GENios (Tecan Inc, Австралия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Данные обрабатывали с помощью программы XFLUOR4 v.4.50. Результаты представляли как разность между флуоресценцией опытной и холостой проб (без клеток) и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ).

Пролиферативную активность КЭП человека определяли по включению ^3H -тимидина в ДНК [1] и восстановлению АВ. Для этого клетки культивировали 48 ч, затем в лунки планшета вносили АВ или ^3H -тимидин и через 24 ч определяли интенсивность флуоресценции АВ (УЕФ/лунка) или включение ^3H -тимидина в ДНК (имп/мин) на сцинтилляционном β -счетчике (Beckman, США). В качестве контроля использовали клетки, обработанные митомицином С (25 мкг/мл).

Для изучения влияния различных ингибиторов на восстановление АВ свежесыведенные КЭП культивировали 48 ч, затем в лунки планшета добавляли дигитонин (100 мкг / 10^6 клеток), разрушающий плазматическую мембрану, или ингибитор цитохромоксидазы – азид натрия (5 ммоль/мл), или ингибитор гликолиза – моноиодацетат (10 ммоль/мл). Alamar Blue вносили одновременно с ингибиторами или через 24 ч после их добавления. Интенсивность флуоресценции в обоих случаях определяли через 24 ч после внесения индикатора.

in densities of 10^4 , 10^5 and 10^6 cells per ml were seeded into flat-bottomed 96-well plate by 200 μl per well. 20 μl of commercial stock solution of AB (Serotec Ltd, USA) were added to each well and cell suspensions were cultured in 5% CO_2 / 95% humidity at 37°C [10]. The reduced form of AB was determined by fluorescence measurements at excitation wavelength 550 nm and emission of 590 nm. Measurements were carried out using Tecan Genios microplate reader (Tecan Inc, Australia). Data analysis was made using software supplied with the Tecan reader. Results were represented as the Relative fluorescent units (RFU), which were calculated as a difference between investigated samples and a background (samples without cells).

The proliferative activities of human FL cells was determined by the ^3H -thymidine incorporation method [1] as well as by the reduction of AB. Cells were cultured during 48 hrs, followed by the addition of AB or ^3H -thymidine into culture medium. After 24 hrs of co-culture the determination of fluorescence intensity (RFU/well) or ^3H -thymidine incorporation (counts per min, cpm) were assessed using scintillating β -counter (Beckman, USA). As a control, cells were treated with mitomycin-C (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

To determine the influence of several inhibitors on AB reduction, the freshly isolated FL cells were cultured during 48 hrs, followed by the addition of digitonin (100 $\text{mg}/10^6$ cell), which destroys the plasma membrane or the cytochrome oxidase inhibitor – sodium azide (5 mmol/ml), or the inhibitor of glycolysis – monoiodoacetate (10 mmol/ml). Alamar Blue was added to each well simultaneously or after 24 hrs of co-culture with inhibitors. The fluorescence intensity was measured after 24 hrs after AB addition.

Statistical handling was carried out using Student's t-test ($p < 0.05$). Analysis was made in Origin v.6.1.

Results and discussion

The dynamics of accumulation of AB reduced form during culture of cells in final densities of 10^4 , 10^5 or 10^6 cell per ml is presented in Fig. 1. During 7 days of human FL cells culture in final density 10^4 cells per ml, there were no significant changes in fluorescence levels compared to background. The fluorescence levels of FL cells in final density 10^5 cells per ml were significantly higher than those with cell concentration 10^4 cells per ml only after 4 days of culture. The maximal fluorescence level for this cell density was obtained on 5th day of culture (8158 ± 546 RFU/well). During investigation of AB reduction by cells in final density 10^6 cells per ml, the quick increase of fluorescence levels was observed during 3 days of culture, then on 5th day the AB reduction rate decreased and almost completely stopped afterwards (Fig. 1).

The reduction of AB fluorescence during culture could be possibly associated with the formation of final

Для оценки достоверности различных групп данных использовали t-критерий Стьюдента (показатель значимости $p < 0,05$). Анализ проводили в программе Origin v. 6.1.

Результаты и обсуждение

Динамика накопления восстановленной формы АВ при культивировании свежевыделенных КЭП человека в концентрации 10^4 , 10^5 или 10^6 клеток/мл представлена на рис. 1. Культивирование КЭП человека в концентрации 10^4 клеток/мл не изменяло уровень флуоресценции АВ в течение семи суток; при концентрации 10^5 клеток/мл достоверное увеличение уровня флуоресценции по сравнению с суспензией в концентрации 10^4 клеток/мл наблюдалось с четвертых суток. Максимальный уровень флуоресценции для данной концентрации клеток достигался на пятые сутки культивирования (8158 ± 546 УЕФ/лунка) и в дальнейшем не изменялся. При исследовании восстановления АВ клетками в концентрации 10^6 клеток/мл быстрый рост флуоресценции наблюдался до третьих суток культивирования, на пятые сутки скорость накопления восстановленной флуоресцентной формы АВ снижалась, а затем уровень флуоресценции выходил на “плато” (см. рис. 1).

Снижение флуоресценции АВ при культивировании может быть связано с образованием конечного продукта восстановления – бесцветного и нефлуоресцирующего гидрорезорупина [10].

По результатам исследований можно сделать вывод о зависимости восстановления АВ от времени культивирования и плотности клеточной суспензии в образце. Отметим, что для концентрации 10^6 клеток/мл на временном отрезке 24–72 ч накопление флуоресцирующей формы АВ приближалось к линейному, а максимальная скорость накопления наблюдалась между 48–72 ч. Поэтому дальнейшие эксперименты проводили с оптимальной концентрацией 10^6 клеток/мл, АВ вносили в культуральную среду после 48 ч культивирования, а интенсивность флуоресценции определяли через 24 ч после внесения АВ.

Исследования на различных типах клеток свидетельствуют о том, что восстановление АВ пропорционально пролиферативной активности [3, 5, 6, 12]. Для проверки этого утверждения в отношении КЭП человека было изучено действие митомицина С на восстановление АВ клетками и включение ^3H -тимидина в ДНК. Митомицин С – антибиотик, продуцируемый *Streptomyces caespitosus*, специфически ингибирует синтез ДНК за счет перекрестной сшивки ее цепей. Полученные результаты показывают, что обработка митомицином С приводила к угнетению исследуемых

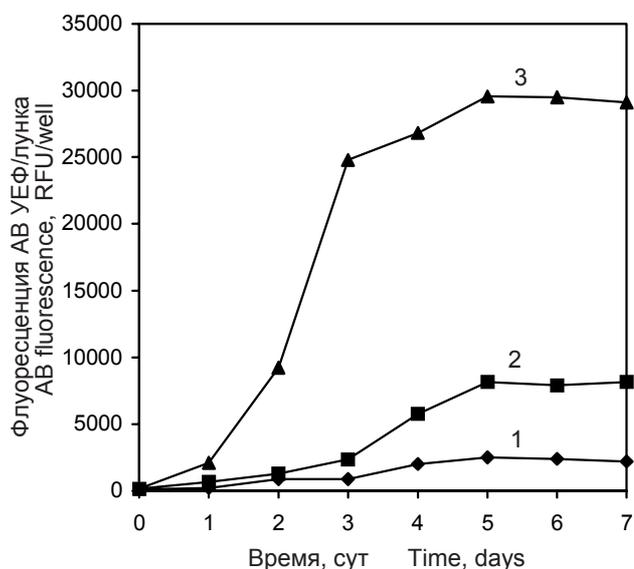


Рис. 1. Изменение флуоресценции АВ при культивировании свежевыделенных КЭП человека в концентрациях: 1 – 10^4 ; 2 – 10^5 ; 3 – 10^6 клеток/мл.

Fig. 1. Change in AB fluorescence when culturing freshly isolated human FL cells in following concentrations: 1 – 10^4 ; 2 – 10^5 ; 3 – 10^6 cells/ml.

product of reaction – colorless and nonfluorescent substance – hydrezoruphin [10].

These results show that the AB reduction depends on culture duration as well as on the cell density in the investigated samples. It should be mentioned that during 24–72 hrs of culture of cells in final density 10^6 cells per ml the increase of AB accumulation was almost linear. Furthermore, the maximal accumulation rate was observed between 48 hrs and 72 hrs of culture. The followed analysis was carried out using optimal cell concentration 10^6 cells per ml; АВ was added into culture medium after 48 hrs of culture and fluorescence intensity was measured after 24 hrs after АВ addition.

Several studies, carried out on different cell types show that the АВ reduction is proportional to proliferative activity of cells investigated [3, 5, 6, 12]. To verify this opinion concerning FL cells, the influence of mitomycin C on АВ reduction and ^3H -thymidine incorporation was investigated. Mitomycin C – antibiotic produced by *Streptomyces caespitosus*, specifically inhibits the DNA synthesis by cross-linking DNA chains. The results obtained show that the mitomycin C treatment resulted in the inhibition of investigated indexes (Fig. 2). The fluorescence intensity of АВ reduced form was 27500 ± 2543 RFU/well (Fig. 2, a). In this case fluorescence level was significantly higher than that of mitomycin C treated samples. Therefore, the АВ reduction correlates with the proliferative activity of FL cells. The level of proliferative activity inhibition depended on the method of investigation have been chosen: in presence of mitomycin C the АВ fluorescence intensity decreased

показателей (рис. 2). Интенсивность флуоресценции восстановленной формы АВ составляла 27500 ± 2543 УЕФ/лунка (рис. 2, а). При этом уровень флуоресценции существенно превышал показатель обработанной митомицином С пробы, что подтверждает высокую чувствительность метода. Следовательно, восстановление АВ коррелирует с пролиферативной активностью КЭП. Степень ингибирования пролиферативной активности зависела от выбранного метода оценки: при добавлении митомицина С интенсивность флуоресценции АВ снижалась в 2,3 раза, а включение ^3H -тимидина – в 6,5 раз (рис. 2, б). Разница в степени угнетения митомицином С исследуемых показателей, очевидно, связана с тем, что включение ^3H -тимидина является прямым тестом пролиферативной активности, а восстановление АВ – косвенным, отражающим увеличение в ходе клеточной пролиферации количества окислительно-восстановительных ферментов, выявляемое по их активности.

До настоящего времени недостаточно изучены вопросы о природе и локализации окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в восстановлении АВ. Авторы работы [11] основными в восстановлении АВ считают митохондрии за счет высокой активности их окислительно-восстановительных ферментов и способности ингибиторов дыхательной цепи угнетать восстановление АВ. Поскольку при эмбриональном развитии митохондриальный путь генерации энергии не превалирует, а основным в биотрансформации химических соединений для энергообеспечения клетки является гликолиз [2], то вопрос о соотношении этих путей катаболизма

in 2,3 times and ^3H -thymidine incorporation decreased – in 6,5 times (Fig. 2, b). Difference in mitomycin C inhibition levels assessed by two different methods might be caused by the difference in principles of these methods. It is known that the ^3H -thymidine incorporation method is a direct test of proliferative activity, whereas АВ – is a method which reflects an increase of oxidation-reduction enzymes during cell proliferation.

Nowadays, questions about the nature and localization of oxidation-reduction enzymes that take part in АВ reduction are not well investigated yet. Authors [11] consider mitochondria to play the main role in АВ reduction. Their opinion based on the high mitochondria oxidation-reduction enzymes activity and on the ability of respiratory chain inhibitors to depress the АВ reduction. Taking into account that during embryonic development, mitochondrial pathways of energy generation are not predominated and the main role in biotransformation of chemical substances directed on energy provision plays glycolysis, question about the interrelation of these two metabolic pathways in cells of embryonic origin is very important for both developmental biology and cryobiology. For this purpose, the inhibitory analysis of АВ reduction was carried out. To inhibit the mitochondrial function or glycolysis the sodium azide or monoiodoacetate (MIA) were used.

An influence of glycolysis or mitochondrial oxidation inhibitors during FL cells culture is presented in Fig. 3. In the absence of inhibitors the fluorescence level after 24 hrs of co-culture with АВ was 27638 ± 2500 RFU/well. After treatment of cells with sodium azide the level of fluorescence decreased in more than two times (16521 ± 2750 RFU/well). After addition of glycolysis

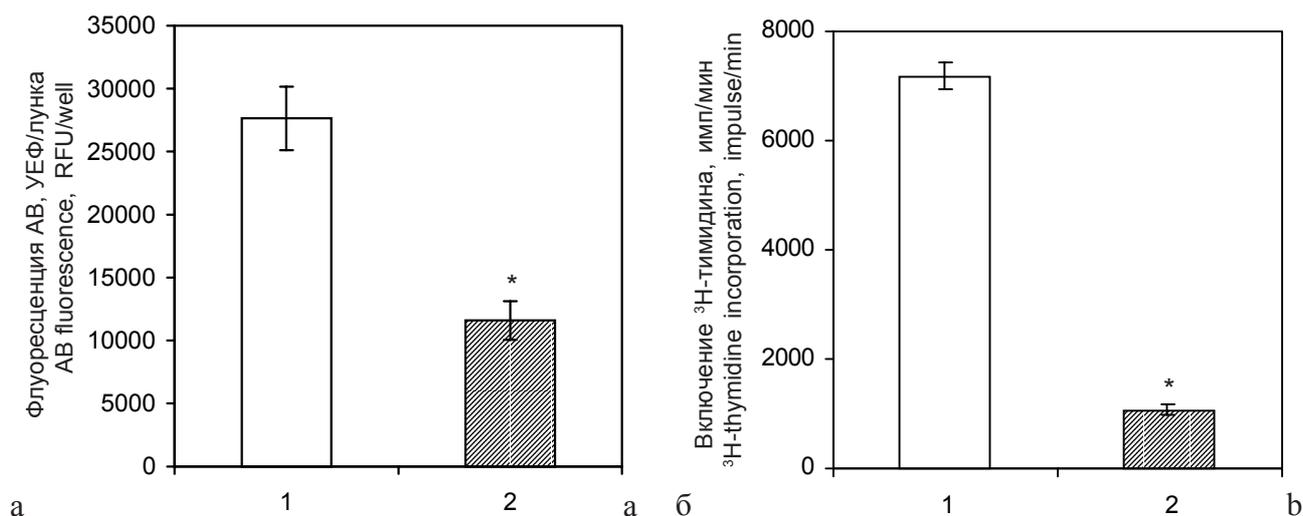


Рис. 2. Пролиферативная активность КЭП человека, определенная с помощью АВ теста (а) и по включению ^3H -тимидина (б) при отсутствии (1) или наличии (2) митомицина С. * – различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к необработанным образцам.

Fig. 2. Proliferative activity of human FL cells, determined with АВ test (a) and by ^3H -thymidine incorporation at mitomycin C absence (1) or presence (2). * – differences are statistically significant ($p < 0.05$) when comparing with data on non-treated samples.

веществ в клетках эмбрионального происхождения представляет интерес как для биологии развития, так и криобиологии, из-за различной криочувствительности этих путей. В связи с этим был проведен ингибиторный анализ восстановления АВ. В качестве ингибитора митохондриальной функции использовали азид натрия, а гликолиз подавляли моноацетатом (МИА).

Влияние ингибиторов гликолиза и митохондриального окисления на восстановление АВ при культивировании КЭП человека показано на рис. 3. В контроле (при отсутствии ингибиторов) уровень флуоресценции через 24 ч сокультивирования с АВ составлял 27638 ± 2500 УЕФ/лунка. При обработке клеток азидом натрия наблюдали почти двукратное снижение уровня флуоресценции (16521 ± 2750 УЕФ/лунка). После добавления в культуру ингибитора гликолиза МИА накопление восстановленного АВ снижалось в 7 раз, а при сочетанном добавлении МИА и азид натрия практически прекращалось. Интенсивность флуоресценции необработанных ингибиторами КЭП через 48 ч культивирования (контроль) сохранялась на уровне 24 ч. Наблюдалось значительное падение уровня флуоресценции для клеток, обработанных азидом натрия, по сравнению с 24 ч воздействия (6699 ± 1790 УЕФ/лунка). Восстановление АВ полностью подавлялось как при отдельном использовании МИА, так и при сочетанном с азидом натрия. Более слабое ингибирование восстановления АВ азидом натрия, по сравнению с МИА, может быть связано с медленной проницаемостью азид натрия через плазматическую мембрану клеток, а также с малым вкладом в восстановление АВ митохондриальных окислительно-восстановительных ферментов по сравнению с гликолитическими.

Отметим, что действие используемых ингибиторов не обусловлено гибелью клеток, сохранность которых после 48 ч культивирования в присутствии ингибиторов составляла $65 \pm 5\%$. При внесении в среду культивирования дигитонина, разрушающего плазматическую мембрану клеток, наблюдалось прокрашивание всех клеток трипановым синим и полное подавление восстановления АВ (см. рис.3).

Исследования на свежеевыделенных КЭП человека подтверждают целесообразность использования АВ в качестве теста на жизнеспособность клеток, отражающего как целостность их мембран, так и активность ряда метаболических путей. Специфическое ингибирование одного из метаболических путей (гликолиза, окислительного фосфорилирования или синтеза ДНК) приводит к резкому, а иногда и практически полному угнетению восстановления АВ, свидетельствует о высокой чувствительности данного теста к многофакторным повреждениям клеток, одним из которых является криоповреждение.

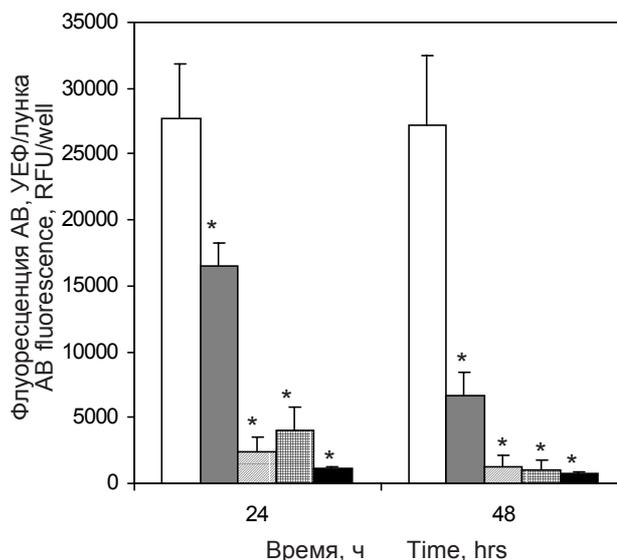


Рис. 3. Влияние ингибиторов на флуоресценцию АВ после 24 и 48 ч культивирования с ингибиторами: □ – отсутствие ингибиторов; ■ – азид натрия; ▨ – совместная добавка азид и МИА; ▤ – МИА; ■ – дигитонин; * – различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к необработанным образцам.

Fig. 3. Inhibition effect on AB fluorescence following 24 and 48 hrs on culturing with inhibitors: □ – no inhibitor; ■ – sodium azide; ▨ – combined addition of azide and MIA; ▤ – MIA; ■ – digitonine; * – differences are statistically significant ($p < 0.05$) in respect of un-treated samples.

inhibitor – MIA, the accumulation of AB reduced form decreased in 7 times. At the same time the simultaneous addition of MIA and sodium azide resulted in almost complete inhibition of AB reduction. The fluorescence intensity of untreated samples did not change after culture for up to 48 hrs. The significant decrease in fluorescence level of FL cells, treated with sodium azide was observed at this time point compared to 24 hrs (6699 ± 1790 RFU/well). Complete inhibition of AB reduction was observed using both MIA alone or supplemented with sodium azide. Less active inhibition of AB reduction using sodium azide compared to MIA might be caused by slow permeation of sodium azide through the plasma membrane as well as by the small involvement of mitochondrial oxidation-reduction enzymes in AB reduction compared to glycolytic.

It should be mentioned, that the action of these inhibitors was not associated with the cell death. Cell survival in presence of inhibitors was $65 \pm 5\%$. After addition of digitonin, which destroys the plasma membrane integrity, cells were all stained with the trypan blue and the AB reduction was completely stopped as well (Fig. 3).

Studies carried out on freshly isolated FL cells prove the ability of using AB as a viability test, which reflects both the plasma membrane integrity and the activity of metabolic pathways. The fact, that the specific inhibition of different metabolic pathways (glycolysis, oxidative phosphorylation or DNA synthesis) leads to

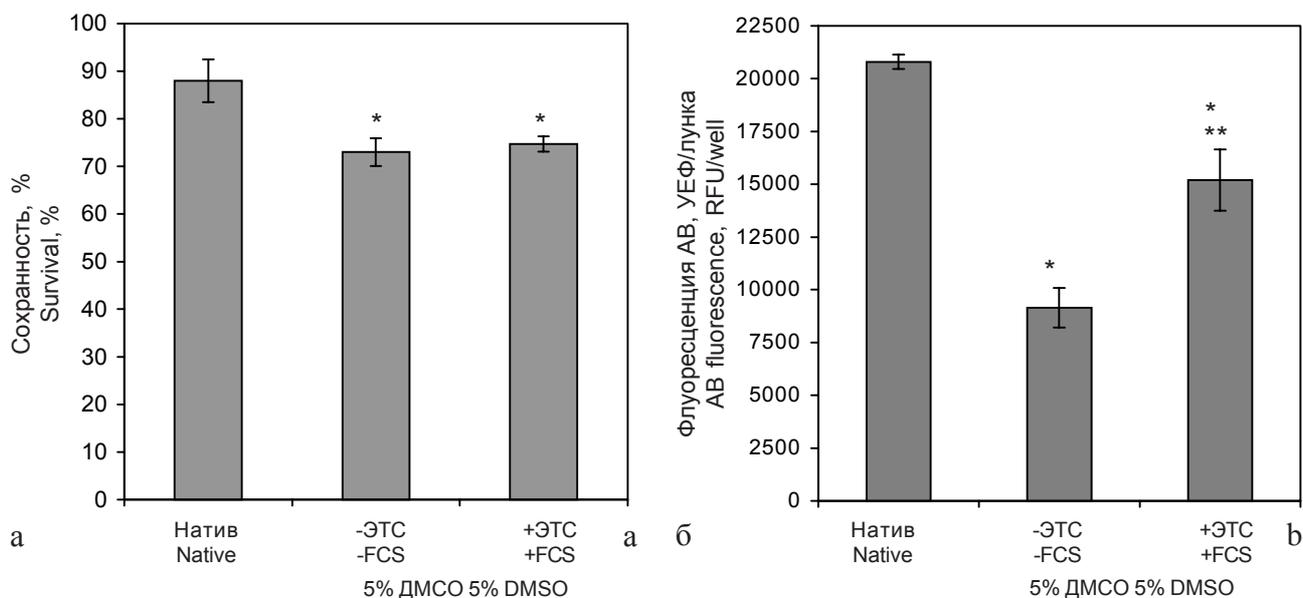


Рис. 4. Влияние добавки ЭТС в криозащитную среду, содержащую 5% ДМСО, на сохранность КЭП человека по трипановому синему (а) и флуоресценцию АВ (б). * – различия достоверны по отношению к нативу ($p < 0,05$); ** – различия достоверны по отношению к значениям после криоконсервирования без добавки ЭТС ($p < 0,05$).

Fig. 4. Effect of FCS addition into cryoprotective medium, containing 5% DMSO on human FL cells survival assessed by trypan blue staining (a) and AB fluorescence (b). * – differences are statistically significant in respect to native samples ($p < 0.05$); ** – differences are statistically significant in respect to the values after cryopreservation without FCS addition ($p < 0.05$).

Данное предположение подтверждается результатами исследований о влиянии добавления ЭТС в криозащитную среду с 5% ДМСО на сохранность КЭП человека по трипановому синему (рис. 4,а) и флуоресценцию АВ (рис. 4,б). Сохранность свежесывленной суспензии КЭП ($88 \pm 5\%$) после криоконсервирования и отмывки криопротектора снижалась примерно на 15%. Наличие ЭТС существенно не влияло на сохранность клеток, оцененную по окрашиванию трипановым синим. Флуоресценция АВ при культивировании криоконсервированных КЭП снижалась в 2,5 раза по сравнению со свежесывленными КЭП. При наличии в среде криоконсервирования ЭТС накопление флуоресцентного продукта АВ увеличивалось на 40%. Приведенные данные доказывают, что АВ является чувствительным тестом жизнеспособности клеток, подвергнутых действию факторов низкотемпературного консервирования. Высокая чувствительность АВ-теста, очевидно, обусловлена тем, что он суммарно отражает повреждение плазматической мембраны и активность различных метаболических путей.

Выводы

Alamar Blue-тест является интегральным показателем метаболической активности клеток, которая определяется целостностью плазматической мембраны, а также интенсивностью протекания энергетических и синтетических процессов.

hard or even complete depression of AB reduction, proves the high sensitivity of AB-test to multifactor cells injuries, in particular to cryoinjuries.

This assumption was confirmed by the results obtained after investigation of the influence of FCS as an additive to cryoprotective media, contained 5% Me₂SO, on FL cells survival, assessed by trypan blue staining (Fig. 4, a) and AB fluorescence (Fig. 4, b). Survival of freshly isolated FL cells ($88 \pm 5\%$) after cryopreservation decreased on 15%. The presence of FCS did not significantly affect the cell survival, assessed by trypan blue staining. During culture of cryopreserved FL cells the AB fluorescence decreased in 2,5 times compared to freshly isolated cells. In the presence of FCS in cryoprotective medium the accumulation of AB fluorescent product increased on 40%. The data presented proves that the AB is a sensitive viability test for cells exposed to low temperature preservation factors. High sensitivity of AB test might be caused by summarizing ability of this test to reflect the plasma membrane injuries as well as to show the activity of different metabolic pathways.

Conclusions

Alamar Blue test is an integral indicator of metabolic activity of cells, which reflects the plasma membrane integrity as well as the intensity of energetic and synthetic processes in cells.

The inhibitory analysis of AB reduction by FL cells proves the significant role of glycolysis in summary metabolic activity of cells of embryonic origin.

Ингибиторный анализ восстановления АВ в КЭП человека свидетельствует о существенном вкладе гликолиза в суммарную метаболическую активность клеток эмбрионального происхождения.

Alamar Blue-тест – высокочувствительный метод оценки жизнеспособности КЭП человека и может использоваться для скрининга эффективности режимов криоконсервирования.

Литература

1. Петренко Ю.А., Тарасов А.И., Грищенко В.И., Петренко А.Ю. Влияние криоконсервирования на иммунологическую активность и фенотипический состав лимфоидных клеток эмбриональной печени человека // Пробл. криобиологии.– 2002.– №4.– С. 76-79.
2. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология.– М.: БЭБиМ, 1998.– 200 с.
3. Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. A new rapid and non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay // J. Immunol. Meth.– 1994.– Vol. 170, N2.– P. 211-224.
4. Byth H.A., Mccunu B.I., Dubery I.A. Assesment of a simple, non-toxic Alamar blue cell survival assay to monitor tomato cell viability // Phytochem. Anal.– 2001.– Vol. 12, N5.– P. 340-346.
5. Gloeckner H., Jonuleit T., Lemke H.D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue // J. Immunol. Methods.– 2001.– Vol.252, N1.– P. 131-138.
6. Jonson K.B., Frost A. A new fluorometric assay for determination of osteoblastic proliferation: effects of glucocorticoids and insulin-like growth factor I // Calcif. Tissue Int.– 1997.– Vol. 60, N1.– P. 30-36.
7. Kannan K., Holcombe R.F., Jain S.K. et al. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line // Mol. Cell Biochem.– 2000.– Vol.205, N1-2.– P. 53-66.
8. Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Fuller B. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes // Cell Biology International – 2002. – Vol. 26, N11.– P. 1003-1006.
9. Lancaster M.V., Fields R.D. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. U.S. Patent No. 5.501.959.– 1996.
10. O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity// Eur. J. Biochem.– 2000.– Vol. 267. N17.– P. 5421-5426.
11. Springer J.E., Azbill R.D., Carlson S.L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue // Brain Res. Prot.– 1998.– Vol. 2, N4.– P. 259-263.
12. Voytik-Harbin S.L., Brightman A.O., Waisner B. et al. Application and evaluation of the Alamar Blue assay for cell growth and survival of fibroblasts // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.– 1988.– Vol. 34, N3.– P. 239-246.

Поступила 01.03.2005

Alamar Blue test is a highly sensitive method for the FL cells viability determination and it could be used for the screening of the cryopreservation protocol efficacy.

References

1. Petrenko Yu.A., Tarasov A.I., Grischenko V.I., Petrenko A.Yu. Cryopreservation effect on immunologic activity and phenotypic composition of human embryonic liver lymphoid cells // Problems of Cryobiology.– 2002.– N4.– P. 76-79.
2. Repin V.S., Sukhikh G.T. Medical Cell Biology.– Moscow, 1998.– 200 p.
3. Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. A new rapid and non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay // J. Immunol. Meth.– 1994.– Vol. 170, N2.– P. 211-224.
4. Byth H.A., Mccunu B.I., Dubery I.A. Assesment of a simple, non-toxic Alamar blue cell survival assay to monitor tomato cell viability // Phytochem. Anal.– 2001.– Vol. 12, N5.– P. 340-346.
5. Gloeckner H., Jonuleit T., Lemke H.D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue // J. Immunol. Methods.– 2001.– Vol.252, N1.– P. 131-138.
6. Jonson K.B., Frost A. A new fluorometric assay for determination of osteoblastic proliferation: effects of glucocorticoids and insulin-like growth factor I // Calcif. Tissue Int.– 1997.– Vol. 60, N1.– P. 30-36.
7. Kannan K., Holcombe R.F., Jain S.K. et al. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line // Mol. Cell Biochem.– 2000.– Vol. 205, N1-2.– P. 53-66.
8. Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Fuller B. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes // Cell Biology International – 2002. – Vol. 26, N11.– P. 1003-1006.
9. Lancaster M.V., Fields R.D. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. U.S. Patent No. 5.501.959.– 1996.
10. O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity// Eur. J. Biochem.– 2000.– Vol. 267. N17.– P. 5421-5426.
11. Springer J.E., Azbill R.D., Carlson S.L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue // Brain Res. Prot.– 1998.– Vol. 2, N4.– P. 259-263.
12. Voytik-Harbin S.L., Brightman A.O., Waisner B. et al. Application and evaluation of the Alamar Blue assay for cell growth and survival of fibroblasts // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.– 1988.– Vol. 34, N3.– P. 239-246.

Accepted in 01.03.2005