

Применение новых флуоресцентных красителей в криобиологических исследованиях

UDC 57.043.086.164

I.A. BURIK^{1*}, V.D. ZINCHENKO¹, T.S. DYUBKO¹, O.A. SOKOLIK², I.F. KOVALENKO¹

Application of New Fluorescent Dyes in Cryobiological Studies

Особенностями флуоресцентных методов исследований в биологии являются высокая чувствительность и быстрота получения информации. В криобиологии при помощи флуоресцентных методов можно успешно наблюдать за изменением состояния клеток на разных этапах криоконсервирования, выявлять повреждения клеточных мембран и органелл, исследовать энергетическое состояние клеток. В большинстве случаев подобные исследования связаны с применением флуоресцентных красителей, которые могут быть синтезированы для решения конкретных задач в различных биотехнологиях. Ранее мы исследовали новый флуоресцентный краситель К8-3010, синтезированный в ГНУ «Институт монокристаллов» [2, 3]. Указанный краситель относится к классу полиметиновых красителей, имеет молекулярную массу 418,5 и отрицательный заряд в водных растворах. Показано, что К8-3010 может быть использован для наблюдения за целостностью мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Цель работы – изучение возможности применения для криобиологических исследований новых красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ, разработанных и предоставленных ГНУ «Институт монокристаллов».

Красители 2-ДАБ и 3-ДАБ относятся к классу бензантронов, как и известный мембранный зонд МБА, который ранее был разработан и испытан на различных объектах Г.Е. Добрецовым [1], в настоящее время он широко применяется для биологических исследований.

Молекулы МБА, 2-ДАБ и 3-ДАБ отличаются разным положением радикалов либо самими радикалами. Эти соединения нейтральны и не

Fluorescent research methods in biology are characterized with a high sensitivity and rapid information retrieval. In cryobiology by means of fluorescent methods the researchers are able to successfully observe the changes of cell state at various stages of cryopreservation, revealing of damages of cell membranes and organelles, studying of energetic cell state. In the majority of cases similar studies are related with the application of fluorescent dyes, moreover these dyes may be synthesized for solving distinct tasks in various biotechnologies. Previously we have studied new fluorescent dye K8-3010, synthesized at Scientific and Technical Corporation “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine [2, 3]. The mentioned dye is referred to the class of polymethine dyes, its molecular mass is 418.5 and negative charge in aqueous solutions. It has been shown that this dye may be used to detect the integrity of membranes of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by methods of fluorescent microscopy and flow cytometry.

The research aim was to investigate the possibility of use for cryobiological studies of new dyes: 2-DAB and 3-DAB, designed and provided by Scientific and Technical Corporation “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The dyes 2-DAB and 3-DAB are referred to the class of benzantrones as well as the known membrane probe MBA, previously developed by G.E. Dobretsov [1], now widely used for biological studies.

Molecules of MBA, 2-DAB and 3-DAB differ from each other either by the location of radicals or the radicals themselves. These compounds are neutral and are not inclined to dissociation in aqueous media with the formation of ionic pair. They are also sensitive to the polarity of environment. Some parameters of 2-DAB and 3-DAB dyes are presented in the Table.

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²ГНУ НТК “Институт монокристаллов” НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Scientific and Technical Corporation “Institute for Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

склонны к диссоциации в водных средах с образованием ионной пары. Они также чувствительны к полярности окружения. Некоторые параметры красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ представлены в таблице.

Малые размеры, компактность и высокая гидрофобность позволяют данным красителям легко проникать в биологические объекты и нековалентно связываться с биомакромолекулами. В водных средах их квантовые выходы малы, но сильно возрастают при переходе зондов в гидрофобную фазу.

Положительным свойством красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ является относительно высокая фотохимическая стойкость. Растворимость 2-ДАБ и 3-ДАБ в водных буферных средах мала, поэтому для биофизических исследований готовят растворы указанных красителей на спирту, диметилформамиде или диметилсульфоксиде.

Отличия химической структуры новых красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ от структуры МБА позволяют исследовать различные области мембран.

В данной работе мы исследовали применение красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ для выявления повреждений клеток дрожжей *S. cerevisiae* после криоконсервирования.

Материалы и методы

Дрожжи *S. cerevisiae* (промышленный штамм получен в Санкт-Петербургском отделении Российского НИИ хлебопекарной промышленности) для исследований выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 ч при 30°C и смывали с питательной среды физиологическим раствором. Концентрация клеток в суспензиях составляла $\sim 10^9$ кл/мл. Одну часть образцов медленно замораживали до -20°C в морозильной камере, вторую часть быстро замораживали до -196°C погружением в жидкий азот. Затем образцы оттаивали на водяной бане при 30°C и центрифугировали при 800 g в течение 5 мин, удаляя надосадок. К осадку добавляли по 10 мкл спиртового раствора красителя 2-ДАБ или 3-ДАБ с исходной концентрацией 10^{-3} моль/л. После окрашивания ко всем пробам добавляли по 10 мл физиологического раствора и центрифугировали при указанных выше условиях.

Окрашенные клетки исследовали на микроскопе Axio Observer Z1 в проходящем свете и при возбуждении светом с длиной волны 488 нм.

Также изучали действие красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ различных концентраций на жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae*. Жизнеспособность клеток определяли чашечным методом Коха.

Результаты и обсуждение

Установлено, что красители 2-ДАБ и 3-ДАБ в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} моль/л не проявляют

Small dimensions, compactness and high hydrophobicity enable these dyes to easily penetrate into biological objects and to be non-covalently bound with biomacromolecules. In aqueous media their quantum yields are low, but strongly increased during transition of probes into hydrophobic phase.

Positive feature of dyes 2-DAB and 3-DAB is their relatively high photochemical resistance. Since the solubility of 2-DAB and 3-DAB in aqueous buffer media is small for performance of biophysical studies using these dyes it is recommended to prepare their solutes with alcohol, dimethyl formamide or dimethyl sulfoxide.

The differences of chemical structure of new dyes of 2-DAB and 3-DAB form the one of MBA enable the investigating of different areas of membrane.

In this research we have studied the applicability of the dyes 2-DAB and 3-DAB for revealing the post-thaw damages of cells of *S. cerevisiae* yeasts.

Materials and methods

S. cerevisiae yeasts (industrial strain was obtained at Saint-Petersburg department of Russian R&D of Baking Industry) for the researches were grown on the wort-agar for 48 hrs at 30°C and washed-out from nutritive medium with physiological solution. Cell concentration in suspensions made $\sim 10^9$ cells/ml. One part of the samples was slowly frozen down to -20°C in freezing chamber, the second part was rapidly frozen down to -196°C by plunging into liquid nitrogen. Afterwards the samples were thawed on water bath at 30°C and centrifuged at 800 g for 5 min with removal of supernatant. To the sediment there was added by 10 μl of alcohol solution of the dyes 2-DAB or 3-DAB with initial concentration of 10^{-3} mol/l. After staining all samples were complemented with 10 ml physiological solution and centrifuged under the mentioned above conditions.

The stained cells were studied with Axio Observer Z1 microscope in transmitted light and at the excitation at 488 nm wavelength.

The effect of 2-DAB and 3-DAB dyes of different concentrations on *S. cerevisiae* yeast viability was studied as well. Cell viability was determined with Koch dish method.

Results and discussion

We have established that 2-DAB and 3-DAB dyes in concentrations of about 10^{-4} – 10^{-3} M/l do not manifest a toxic effect on *S. cerevisiae* cells. At the same time the concentration of 10^{-6} – 10^{-5} mol/l is sufficient to perform analysis using fluorescent microscopy and flow cytometry.

Figure demonstrates the images of *S. cerevisiae* yeast after freezing down to -196°C , stained with 2-DAB and 3-DAB dyes, made in transmitted light

токсического действия на клетки *S. cerevisiae*. В то же время для проведения анализа методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии достаточна концентрация красителя 10^{-6} – 10^{-5} моль/л.

На рисунке представлены фотографии дрожжей *S. cerevisiae*, окрашенных красителями 2-ДАБ и 3-ДАБ после замораживания до -196°C , снятые в проходящем свете (с фильтром Conversions filter 32), и флуоресцентные изображения при возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 488 нм.

Интенсивность флуоресценции различных клеток неодинакова (рисунок). При сопоставлении флуоресцентных снимков и фотографий в проходящем свете можно видеть, что в клетках, которые не флуоресцируют, не различается ультраструктура. Отсюда следует, что такие клетки погибли.

Отсутствие флуоресценции таких клеток объясняется тем, что красители 2-ДАБ и 3-ДАБ гидрофобны и при попадании в разрушенную клетку их флуоресценция тушится водой.

На рисунке, б и г в поле зрения, кроме нефлуоресцирующих клеток, также находятся слабо и интенсивно флуоресцирующие клетки. В проходящем свете в слабо флуоресцирующих клетках хорошо различается ультраструктура. Следовательно, такие клетки менее других повреждены при замораживании. В клетках с наибольшей интенсивностью флуоресценции просматривается меньше элементов ультраструктуры, а интенсивное свечение локализуется на этих элементах. Это свидетельствует о проникновении большого количества красителя в клетки через нарушенные участки мембран и его адсорбции на гидрофобных местах связывания внутри клеток. Тушение флуоресценции не наблюдается, поэтому водный баланс внутри клетки, по-видимому, существенно не нарушен, что и приводит к значительному возрастанию интенсивности флуоресценции. Следовательно, повреждение мембран в интенсивно флуоресцирующих клетках было частичным.

При микроскопическом исследовании дрожжей, замороженных до -20°C и окрашенных красителями 2-ДАБ и 3-ДАБ, клетки распределяются по интенсивности флуоресценции так же, как было описано выше для клеток, замороженных до -196°C . Однако количество интенсивно флуоресцирующих клеток при замораживании до -20°C меньше, чем при замораживании до -196°C .

Некоторые параметры флуоресценции красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ
Some fluorescence parameters of 2-DAB and 3-DAB dyes

Краситель Dye	Молекулярная масса Molecular mass	$\epsilon, \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ $\epsilon, \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{abs}}, \text{нм}$ $\lambda_{\text{abs}}, \text{nm}$	$\lambda_{\text{fl}}, \text{нм}$ $\lambda_{\text{fl}}, \text{nm}$	Квантовый выход Quantum yield
2-ДАБ 2-DAB	273,33	2900	480	670	0,011
3-ДАБ 3-DAB	273,33	10250	470	666	0,11

Примечания: λ_{abs} – положение максимума спектра поглощения; λ_{fl} – положение максимума спектра флуоресценции; ϵ – молярный коэффициент экстинкции; QY – квантовый выход флуоресценции в этаноле

Notes: λ_{abs} – location of absorption spectrum maximum; λ_{fl} – location of fluorescence spectrum maximum; ϵ – molar coefficient of extinction; QY – quantum yield of fluorescence in ethanol

(with Conversionfilter 32) and at fluorescence excitation by light with 488 nm wavelength.

The fluorescence intensity in different cells is unequal. By comparing fluorescent images and those in transmitted light we may see that in non-fluorescing cells the ultrastructure is not distinguished (Figure). It means that these cells are dead.

No fluorescence of these cells is explained by the fact that 2-DAB and 3-DAB dyes are hydrophobic and when getting into a destroyed cell their fluorescence is water-quenched.

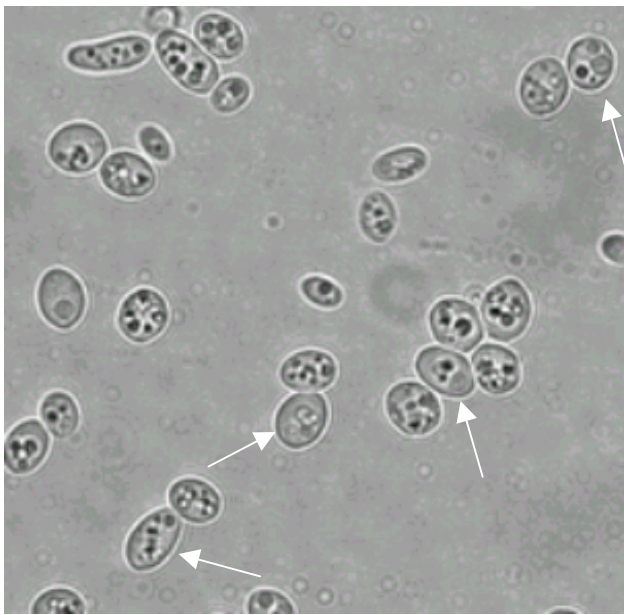
In Fig. b and d the cells with slight and intensive fluorescence are also in visual field. The ultra-structure is well distinguished under transmitted light in slightly fluorescent cells. So, these cells are less impaired during freezing. In cells with highest fluorescent intensity the luminescence is localised on cell organelles. This testifies to the fact that the dye penetrated in great number into cells and was adsorbed on hydrophobic parts of organelles. Consequently, the membrane damaging in these cells was only partial, that resulted in fluorescence intensity increase.

Under microscopy the yeast, slowly frozen down to -20°C and stained with 2-DAB and 3-DAB are distributed by fluorescence intensity as described above. However the number of intensively fluorescing cells during freezing down to -20°C is lower than under freezing down to -196°C .

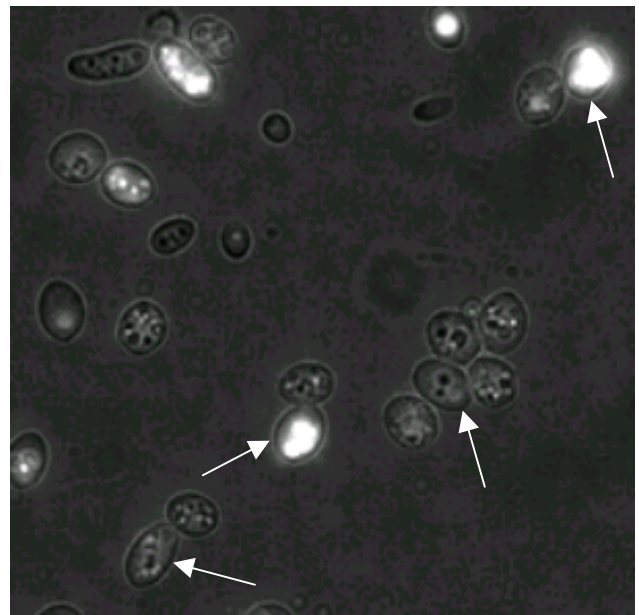
Conclusions

The experiments in *S. cerevisiae* yeast have demonstrated that 2-DAB and 3-DAB dyes enable not only to distinguish damaged and undamaged cells, but estimate the damage extent in membranes under cryogenic effects as well.

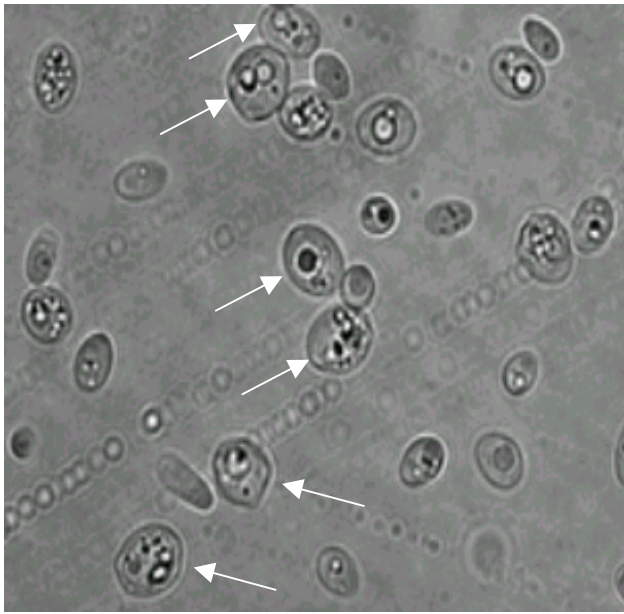
The performed research of new dyes 2-DAB and 3-DAB in *S. cerevisiae* as example has demonstrated the possibility of their application for express-estimating the effect of cryopreservation factors on cells.



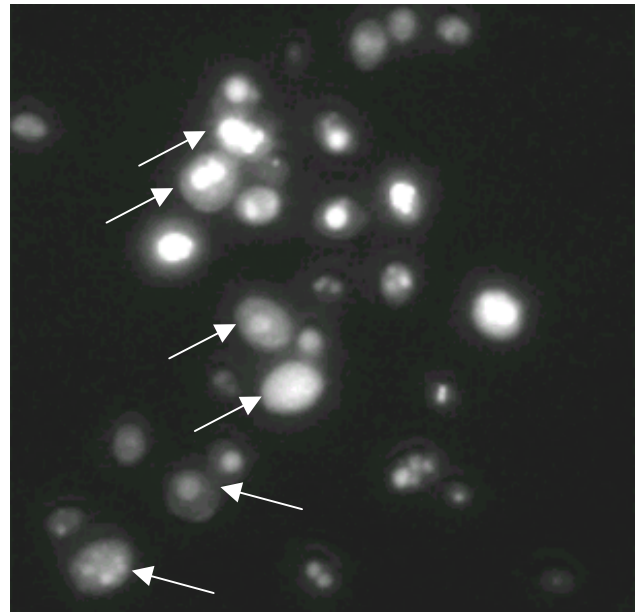
a



б



в



г

Дрожжи *S. cerevisiae* после замораживания до -196°C , окрашенные красителем: а, б – 3-ДАБ; в, г – 2-ДАБ; а, в – изображение в проходящем свете с использованием фильтра Conversion filter 32; б, г – флуоресценция, длина волны возбуждения 488 нм. Стрелками указаны соответствующие клетки на photographs в проходящем свете и на флуоресцентных снимках.

S. cerevisiae yeast after freezing down to -196°C , stained with a dye: а, б – 2-DAB, с, d – 3-DAB; а, с – image in transmitted light with using Conversion filter 32; б, d – fluorescence, excitation wavelength is 488 nm. The arrows point to corresponding cells in the images in transmitted light and in fluorescent images.

Выводы

В экспериментах на дрожжах *S. cerevisiae* показано, что красители 2-ДАБ и 3-ДАБ позволяют не только различать поврежденные и неповрежденные клетки, но и оценивать степень повреждения мембран при криогенных воздействиях. Проведенные исследования новых красителей 2-ДАБ и 3-ДАБ на примере дрожжей *S. cerevisiae* показали возможность их применения для экспресс-оценки действия факторов криоконсервирования на

Nowadays these dyes are available for scientific research and are provided by Setabiomedicals Company (USA).

References

1. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in studies of cells, membranes and lipoproteins.– Moscow: Meditsina, 1989.– 277 p.
2. Zinchenko V.D., Buryak I.A., Dyubko T.S. Application of biological effects of ozone low doses in cryobiology: Coll. of

клетки. В настоящее время данные красители доступны для научных исследований и предоставляются фирмой Setabiomedicals (США).

Литература

1. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
2. Зинченко В.Д., Буряк И.А., Дюбко Т.С. Применение биологических эффектов малых доз озона в криобиологии: Сб. материалов 29-го Всероссийского семинара «Озон и другие экологически чистые окислители. Наука и технологии».– Москва, 2007.– С. 141–149.
3. Buriak I.A., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F. Revealing of latent membrane damages after freeze-thawing// Cryobiology.– 2007.– Vol. 55, N3.– P. 333–334.

Papers of the 29th All-Russian seminar “Ozone and other ecologically safe oxidizers. Science and technologies”.– Moscow, 2007.– P. 141–149.

3. Buriak I.A., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F. Revealing of latent membrane damages after freeze-thawing // Cryobiology.– 2007.– Vol. 55, N3.– P. 333–334.

Accepted in 13.05.2008

Поступила 13.05.2008