

Анализ состояния клеточных культур после криоконсервирования с использованием флуоресцентных зондов

UDC 57.043.085:577.336

E.V. ONISCHENKO^{1*}, E.I. GONCHARUK¹, T.F. PETRENKO¹, I.A. BOROVOY²,
YU.V. MALYUKIN², V.I. GRISCHENKO¹

State Analysis of Cell Culture after Cryopreservation with Fluorescent Probes

Исследовали взаимодействие люминесцентных зондов различной структуры с культивированными клетками до и после процессов криоконсервирования. Отмечено, что оптимальными красителями для мониторинга функционального состояния клеток после криовоздействия являются зонды карбоцианинового ряда.

Ключевые слова: зонды, криоконсервирование, культура клеток, фибробласты человека.

Досліджували взаємодію люмінесцентних зондів різної структури з культивованими клітинами до та після процесів криоконсервування. Відмічено, що оптимальними барвниками для моніторингу функціонального стану клітин після криовпливу є зонди карбоціанінового ряду.

Ключові слова: зонди, криоконсервування, культура клітин, фібробласти людини.

Interaction of fluorescent probes of different structures with cultured cells prior to and after cryopreservation were investigated. It has been noted that optimal dyes for monitoring of functional state of cells after cryo-effect are the probes of carbocyanine series.

Key-words: probes, cryopreservation, cell culture, human fibroblasts.

При криоконсервировании необходимо отслеживать морфологическую и функциональную сохранность криоконсервированного материала [1, 4]. Метод флуоресцентной микроскопии является наиболее наглядным и информативным для изучения состояния внутриклеточных структур под действием различных факторов [3, 7]. Высокочувствительные люминесцентные красители, связываясь с различными органеллами клетки, позволяют визуально наблюдать процессы, происходящие внутри клетки.

Представляло интерес изучить поведение флуоресцентных зондов разной структуры при культивировании их в клетках монослойных культур. Применение зондов обеспечивает возможность мониторинга клетки во время ее функционирования *in vitro* как до, так и после криоконсервирования. Перспективой подобных исследований является также возможность наблюдения за конкретными мечеными клетками *in vivo* и *in vitro*.

Цель работы – исследование возможности оценки эффекта криоконсервирования на состояние культивированных клеток с применением инкорпорированных флуоресцентных зондов.

Материалы и методы

В работе были использованы зонды BQBF, F2N8, PPZ8 (3-(4-(4-(4'-(3-гидрокси-6-октилокси-флавонил) фенил) пиперазино)-1-пиридиниумил)-1-пропансульфонат), ДСМ (4-(N-диметиламино-стирил)-1-метилпиридин N-толуенсульфонат), ФМЕ (3-гидрокси-4'-(N,N-диметиламино)флавонал), С2 (3,3'-диэтилоксакарбоцианин бромид) и С9 (3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин бромид) и JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтил-бензоимидазолилкарбоцианин иодид). Зонды были синтезированы И.А. Боровым в Институте сцинтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов» НАНУ, А.С. Климченко и В.Г. Пивоваренко (Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченко). Диплоидную линию фибробластов человека (ФЧ) и культуру СПЭВ (перевиваемая клеточная линия почки свиньи) культивировали в ростовой среде Eagle MEM (Sigma) с добавлением 10% FCS [5]. После окрашивания флуоресцентными красителями клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

Меченые клетки криоконсервировали в программном замораживателе по двухэтапной прог-

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

²Институт сцинтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-19, 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

²Institute for Scintillation Materials of Institute of Solid Crystals of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

рамме с последующим погружением в жидкий азот. В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО. Состояние нативных и криоконсервированных клеток оценивали с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Olympus IX71 и проточного цитофлуориметра FACS Calibur фирмы (Becton Dickinson, США) с использованием реагентов этой же фирмы.

Результаты и обсуждение

На первом этапе изучали пролиферацию клеток монослойных культур в присутствии зондов различной структуры. Вопрос о длительном нахождении зондов в культивированных клетках имеет несколько аспектов. Одной из точек приложения люминесцентных зондов является возможность непосредственного наблюдения за клеткой в процессе ее функционирования *in vitro*. Наши исследования по культивированию клеток, меченных зондами, проведены в рамках этого направления. Изменение свечения окрашенных клеток в режиме реального времени позволяет отслеживать изменения, происходящие, например, в процессе реабилитации клеток после криоконсервирования. Люминесцентные зонды могут предоставить также возможность мечения и наблюдения за введенными в организм клетками в рамках изучения механизма их действия.

Одной из задач было исследование токсичности зондов для культивированных клеточных линий. При исследовании клеточных суспензий и культивированных клеток в течение 72 ч было установлено, что карбоцианиновые зонды С2, С9 и JC-1 не влияют на рост клеток, что доказывает отсутствие их токсического эффекта.

При культивировании клеток, окрашенных зондами BQBF, F2N8, PPZ8 и ФМЕ, в течение 48 ч существенно снижается способность клеток к адгезии и пролиферации. Следовательно, зонды группы флавонолов проявляют токсичность и не могут быть использованы при длительном культивировании. Зонд ДСМ слаботоксичен и не снижает способности клеток к адгезии, частично замедляя пролиферацию клеток. Морфология клеток в этих линиях была изменена, клетки имели сферическую форму и наблюдалась вакуолизация цитоплазмы. Динамика роста клеток культуры фибробластов человека в присутствии исследованных зондов показала, что зонды флавоновой группы проявляют токсичность и не могут быть использованы в интегрированном в клетки состоянии *in vitro*. Однако уникальные спектральные свойства этих зондов могут быть использованы для характеристики клеток при кратковременном контакте (рис. 1).

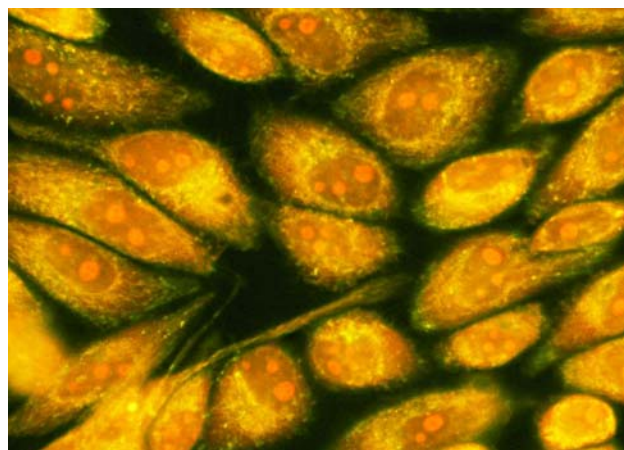
Следует отметить, что люминесценция клеток, окрашенных карбоцианиновыми зондами, была

более интенсивной по сравнению с люминесценцией клеток, окрашенных зондами другого ряда во всех случаях наблюдения.

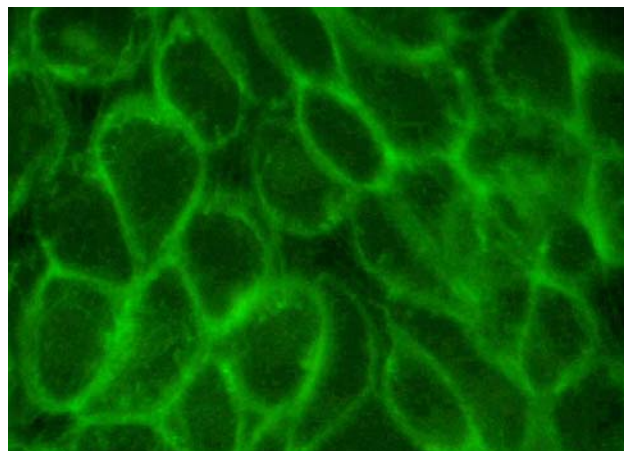
Таким образом, сравнение влияния карбоцианиновых, флавоновых и стироловых производных на линии клеточных культур показало, что карбоцианиновые зонды наиболее пригодны для длительного культивирования и мониторинга состояния клеток при нормальных условиях и под действием физических факторов *in vitro*.

Следующим этапом было изучение возможности оценки эффекта криоконсервирования на состояние культивированных клеток с применением инкорпорированных флуоресцентных зондов. При культивировании клеток, меченных флуоресцентными карбоцианиновыми зондами, наблюдали свечение внутриклеточных органелл (рис. 2).

При окрашивании клеток зондом JC-1 в клетках видны структуры митохондрий, окрашенные в зелёный цвет, и скопления ярких оранжевых участков, соответствующих образованному красителем J-агрегатам. Их наличие определяется высокой функциональной активностью митохондрий [2].

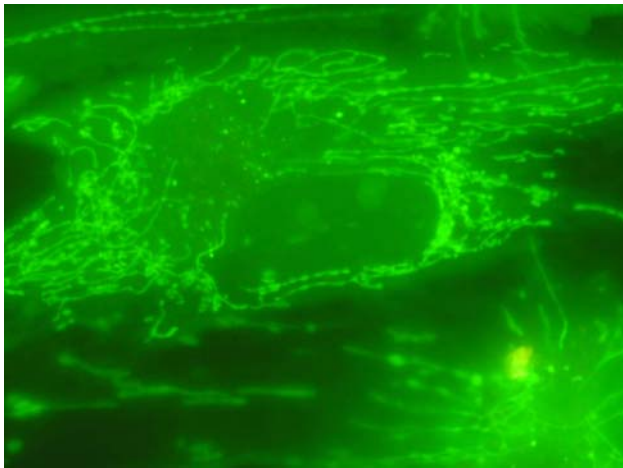


а

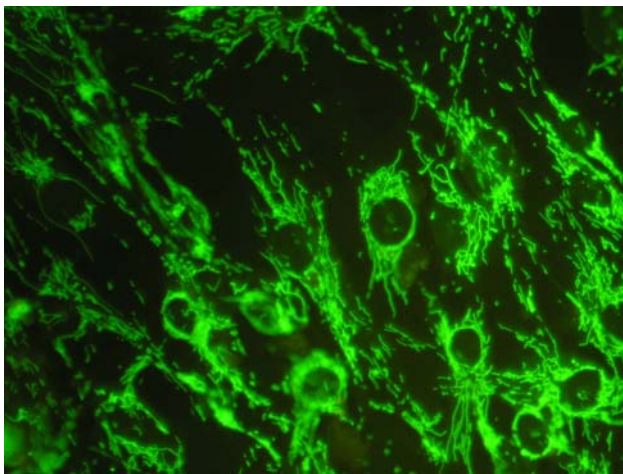


б

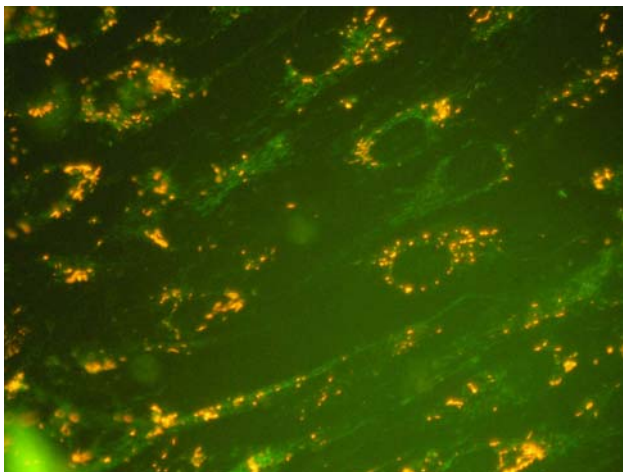
Рис. 1. Нативная культура клеток СПЭВ, окрашенная флуоресцентными зондами: а – зонд ДСМ (×600); б – зонд PPZ8 (×600).



а



б



в

Рис. 2. Клетки культуры фибробластов, меченные флуоресцентными зондами: а – С2 (×900); б – С9 (×600); в – JC-1 (×600).

Изменения в характере свечения и локализации зондов С2, С9 и JC-1 приведены в таблице.

Для клеток, окрашенных зондом JC-1, после замораживания-отогрева выявлен частичный переход J-агрегатов (оранжевое свечение) в мономерную форму (зеленое свечение), что связано со

снижением функциональной активности митохондрий. Для зонда С9 различий в клетках до и после криоконсервирования при анализе методом люминесцентной микроскопии не наблюдали, но по данным проточной цитофлуориметрии происходит усиление рассеянного свечения. При процессах адгезии и пролиферации клеток после деконсервирования локализация зонда не изменилась по сравнению с таковой в нативной культуре.

Проведенные исследования показали, что зонд С2 в растворе не меняет флуоресцентные свойства под действием замораживания и последующего отогрева и не является криочувствительным. Следует отметить, что наблюдаемое в клетках фибробластов после деконсервирования изменение свечения красителя, который в нативных клетках связан с митохондриями, на его диффузное свечение в цитоплазме, вероятно, происходит вследствие неспецифического окрашивания органелл зондом С2 при изменении трансмембранного потенциала митохондрий.

Согласно методу проточной цитофлуориметрии клетки фибробластов, меченные зондом JC-1 (рис. 3), люминесцируют в оранжевой области спектра ($\lambda = 585 \pm 20$ нм) и распределены двумя группами. После замораживания-отогрева клеточной суспензии, меченной JC-1, в $66,53 \pm 3\%$ клеток зонд находится в мономерной форме (зеленая область спектра), что может служить показателем снижения функциональной активности митохондрий исследуемых клеток.

Флуоресценция клеток культуры ФЧ, окрашенной С2 до и после криоконсервирования, находится в зелёной области ($\lambda = 530$ нм), как и для клеток культуры, меченной зондом С9.

Показатели свечения зондов в культуре ФЧ до и после замораживания-отогрева

Название зонда	Окрашивание	Локализация зонда	Степень яркости свечения
С2	Зеленое	Хондриом	Средняя
С2 после замораживания-отогрева	Зеленое	Диффузное свечение цитоплазмы	Усиление яркости
С9	Зеленое	Хондриом	Средняя
С9 после замораживания-отогрева	Зеленое	Хондриом	Усиление яркости
JC-1	Оранжевое свечение J-агрегатов	Хондриом	Средняя
JC-1 после замораживания-отогрева	Оранжевое и зеленое свечение J-агрегатов и мономеров	Хондриом	Тушение

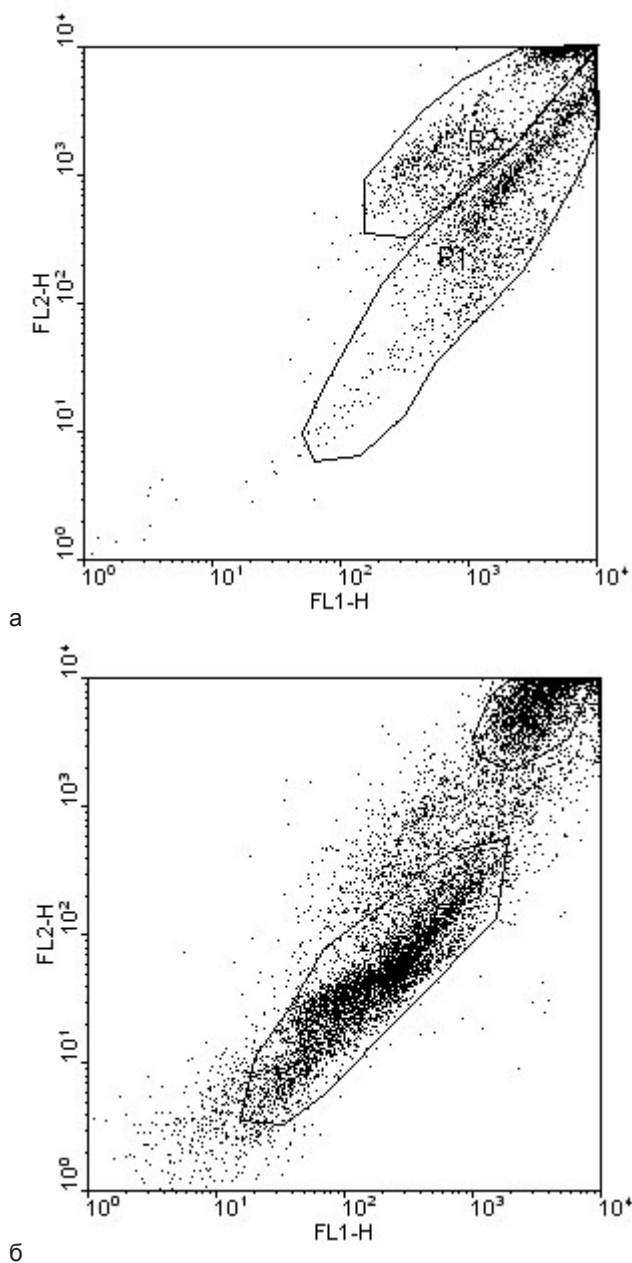


Рис. 3. Цитофлуориметрический анализ клеток, окрашенных флуоресцентным зондом JC-1: (а) до (FL1 (X-axis) и FL2 (Y-axis) R1 = 19,03% R2 = 79,72%) и (б) после криоконсервирования (FL1 (X-axis) и FL2 (Y-axis) R1 = 66,53% R2 = 20,49%).

Для клеток, меченных зондами С2 и С9, после криоконсервирования наблюдается интенсивное внутриклеточное свечение красителей, что может свидетельствовать об их неспецифическом связывании с органеллами клетки. После реабилитации путем инкубирования клеточной суспензии в ростовой среде при 37°C интенсивное свечение красителей исчезает.

Полученные нами результаты позволяют наблюдать за репаративными процессами в клетке, связанными с системами ее энергообеспечения, в процессе длительного культивирования, которые

могут быть проведены с использованием описанной системы ФЧ-потенциал-зависимый зонд. Может быть обеспечена неинвазивная быстрая оценка состояния энергетической системы клеток после криоконсервирования.

Как известно, мембранные структуры являются уязвимыми при криоконсервировании клеток. Возникает вопрос, что происходит с потенциалом митохондриальных и плазматической мембран при криоконсервировании. В исследовании [2] показаны электронно-микроскопически ультраструктурные изменения митохондрий при криоконсервировании нейрона моллюска. Однако после реабилитации в виде длительной инкубации в физиологическом растворе ультраструктурные различия митохондрий, вызванные охлаждением, ДМСО или криоконсервированием, сглаживались, и через 8 ч ультраструктурная организация крист митохондрий всех клеток (независимо от воздействия) не различалась. Относительно клеток млекопитающих еще в конце 90-х годов было установлено [6], что как процесс замораживания-оттаивания, так и криопротекторы сами по себе влияют на электрические свойства мембраны, сильно уменьшая проводимость клеточной мембраны для ионов. Однако параметры мембраны восстанавливались через два часа после культивирования размороженных клеток в среде, содержащей клеточные метаболиты. Таким образом, можно говорить о завершении репаративных процессов и восстановлении гомеостаза мембраны клетки через указанный срок.

Почему важно знать состояние митохондриальных мембран и плазматической мембраны клетки в случае использования карбоцианиновых зондов? JC-1 является классическим красителем, который отражает состояние митохондриального аппарата. Его поведение в клетке зависит от потенциала внутренней мембраны митохондрий. Он устойчив к воздействию агентов, деполаризующих плазматическую мембрану, чего нельзя однозначно сказать о карбоцианиновых зондах С2 и С9. Известно, что гомолог этого ряда DIOC6(3) реагирует на изменение как $\Delta\Psi$, так и потенциала плазматической мембраны [8] снижением уровня своей флуоресценции. Таким образом, DIOC6(3) и, возможно, его гомологи обладают широким спектром отражения состояния как митохондриальных, так и плазматической мембраны клетки. Можно предполагать, что восстановление флуоресценции интегрированных в клетку зондов до исходных значений будет свидетельствовать о восстановлении функционального состояния мембран клетки.

Выводы

Таким образом, изменение свечения зондов С9 и JC-1 отражает функциональное состояние клетки

и является показательным тестом для выявления ее криоповреждений. Поведение зонда С2 может свидетельствовать о его высокой чувствительности к изменению состояния митохондрий клеток после замораживания-отогрева; зонды С2, С9 и JC-1 могут быть использованы для мониторинга функционального состояния клеточных линий при криоконсервировании.

Авторы выражают благодарность сотруднику отдела криобиофизики Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины Дюбко Т.С. за плодотворное сотрудничество в обсуждении результатов.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
2. Дмитриева Е.В., Мошков Д.А., Гахова Э.Н. Ультраструктурные изменения нейрона МПЗ моллюска *Lymnaea stagnalis* после криоконсервации изолированного мозга // Цитология.– Т. 48, №6.– С. 480–485.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
5. Культура животных клеток. Методы. / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
6. Чекурова Н.Р., Кислов А. Н., Венринцев Б.Н. Действие криопротекторов на электрические характеристики клеточной мембраны эмбрионов мыши // Криобиология.– 1990.– №1.– С. 25–29.
7. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy.– New York: Kluwer Academic/Plenum, 1999.– 698 p.
8. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis // FEBS Letters.– 1997.– Vol. 411, N1.– P. 77–82.

Поступила 7.07.2008