

Применение карбоцианиновых флуоресцентных зондов для оценки функционального состояния культивированных клеток после криоконсервирования

Е. И. Гончарук, Е. В. Онищенко, В. В. Тимон, Т. Ф. Петренко, И. А. Боровой¹,
Ю. В. Малюкин¹, В. И. Грищенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
Ул. Переяславская, 23, Харьков, 61015, Украина

¹Институт скнтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины
Пр. Ленина, 60, Харьков, 61076, Украина

goncharuk_elena@ukr.net

Исследована возможность применения карбоцианиновых флуоресцентных зондов C2, C9 и JC-1 для характеристики криоконсервированных клеток диплоидной линии фибробластов человека. Показано, что эти зонды могут быть использованы при криоконсервировании клеточных линий для мониторинга их функционального состояния.

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

Введение. Криоконсервирование является оптимальным способом долговременного хранения биологических объектов [1, 2]. Важный аспект данного процесса – это характеристика морфологической и функциональной сохранности криоконсервированного материала. Для получения полной информации о структуре клетки и ее функции целесообразно использовать широкий спектр методов, позволяющих охарактеризовать объект всесторонне. Флуоресцентные красители широко применяют в биологической и медицинской практике, что открывает новые возможности в исследовании строения и функционирования клеток, мембран, липопротеинов как в составе организма, так и в изолированных структурах [3, 4]. Данный метод является

наиболее наглядным и информативным способом изучения состояния внутриклеточных структур под действием различных факторов.

Как известно, на изменения внутриклеточного постоянства одной из первых реагирует система энергетического обмена клетки. Поэтому особое внимание следует уделить исследованию сохранения структурной и функциональной целостности митохондриального комплекса [5] после процесса криоконсервирования. JC-1 является известным красителем, используемым для изучения потенциала митохондриальных мембран ($\Delta\psi$) [6]. Его характерная особенность состоит в том, что он существует в двух формах, флуоресцирующих в различных областях спектра. При окрашивании клеток JC-1 митохондрии функционирующей клетки, имеющие высокий $\Delta\psi$, флуоресцируют в оранжевой области спектра, тогда как неактивные будут иметь зеленое свечение.

Целью данного исследования является оценка состояния культивированных клеток после криоконсервирования с использованием карбоцианиновых флуоресцентных красителей C2/H510 (3,3'-диэтилоксакарбоцианинбромид), C9/H510 (3,3'-диоктадецилоксакарбоцианинбромид) и JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензоимидазолкарбоцианиниодид).

Материалы и методы. Красители синтезированы в Институте сцинтилляционных материалов НАН Украины. JC-1 получен по методике, описанной в работе [7], так же получен аналог красителя DioC2(3) – C2/H510 (далее C2). Кроме того, мы применили другой краситель этого гомологичного ряда – C9/H510 (далее C9) с девятью углеводородными остатками, что делает структуру зонда более гидрофобной, но, предположительно, не меняет его флуоресцентных свойств.

Исходные растворы красителей готовили на основе диметилсульфоксида (ДМСО). Суспензию клеток окрашивали растворами зондов C2, C9 и JC-1. Для установления оптимальных рабочих концентраций зондов при окрашивании клеточной суспензии использовали красители в концентрации от 10^{-4} до 10^{-7} М. К клеточным суспензиям добавляли красители C2, C9 и JC-1 и инкубировали в течение 15 мин при $t = 37$ С. После этого несвязавшийся краситель удаляли центрифугированием в растворе Хенкса [8]. Степень окрашивания клеток оценивали с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа Olympus IX71 («Olympus», США).

Диплоидную линию фибробластов человека культивировали в ростовой среде 199 (ГУП ИПВЭ им. М. П. Чумакова РАМН) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ЭСКРС) производства «Биолот» (РФ) [9]. После окрашивания флуоресцентными красителями клетки инкубировали при температуре 37 С и 5 %-м содержании CO_2 .

Локализацию зондов в клетках культуры определяли методом люминесцентной микроскопии после культивирования в течение 24 ч.

Для подтверждения зависимого от потенциала связывания флуоресцентных зондов с митохондриями использовали протонный транслокатор р-(трифторметокси)-фенилгидразонкарбонилцианид (FCCP) («Sigma», США). К пролиферирующей культуре клеток, окрашенных флуоресцентными зондами C2, C9 и JC-1, добавляли FCCP в концентрации 5 мкМ [10].

Суспензию клеток фибробластов человека (ФЧ) в растворе Хенкса (10^6 /мл) вносили в пластиковые криопробирки «Nunc» (Дания) объемом 1 мл, по каплям добавляли раствор ДМСО до конечной концентрации 10 % и замораживали в программном замораживателе ИПКиК НАН Украины по двухэтапной программе с последующим погружением в жидкий азот. Отогрев производили на водяной бане при температуре 40 С.

Рост культуры контролировали с помощью инвертированного микроскопа Биолам П2-1 («ЛОМО», РФ).

Состояние митохондрий, окрашенных флуоресцентными красителями, в клетках культуры ФЧ анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus IX71, соединенного с цифровой камерой Olympus C-5060.

Связывание зондов с клетками оценивали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur фирмы «Becton-Dickinson» (США) с применением реагентов этой же фирмы. Суспензию клеток инкубировали с зондами в рабочих концентрациях в течение 20 мин. После отмывания клетки переводили в среду Хенкса без антибиотиков и анализировали.

Результаты и обсуждение. Рабочие концентрации флуоресцентных зондов для окрашивания клеток ФЧ составляют 10^{-6} М для C2, 10^{-5} М для C9 и JC-1.

При культивировании клеток, меченных флуоресцентными зондами, наблюдали свечение внутриклеточных структур. На рис. 1, а, б (см. вклейку) представлены клетки культуры ФЧ, окрашенные зондами C2 и C9 соответственно. В обеих пробах отмечено зеленое свечение. Окрашенные структуры являют собой нитчатые разветвленные образования размером 60 нм и более, равномерно распределенные в клетке, по своему виду напоминающие классическую картину хондриома (совокупности митохондрий клетки) фибробластов. Таким образом, данные зонды связываются с митохондриями.

На рис. 1, в (см. вклейку) приведена культура клеток, окрашенная зондом JC-1. В клетках про-

смазываются зеленого цвета структуры, схожие со структурой хондриома, и расположенные на них скопления ярких оранжевых участков, связанных с J-агрегатами. Их появление, как известно, определяется высокой функциональной активностью митохондрий [11].

Данные фотографии свидетельствуют о митохондриальном характере связывания зондов JC-1 и C2. Мы наблюдали сходный с окрашиванием C2 характер свечения клеток, окрашенных зондом C9, что дает основание также отнести его к митохондриальным зондам.

Для подтверждения потенциал-зависимого связывания зондов с мембранами митохондрий использовали деполяризующий агент FCCP, действие которого основано на подавлении процесса митохондриального дыхания, в результате чего происходит изменение . Добавление протонного транслокатора в культуру клеток, окрашенную зондом JC-1, приводит к замене оранжевого свечения хондриома на зеленый. При воздействии FCCP на клетки культуры ФЧ, окрашенной зондом C2, происходит тушение свечения митохондрий. Контуры митохондрий становятся тусклыми, прерывистыми, теряют четкость свечения, наблюдается выход красителя в цитоплазму клетки и в околоклеточное пространство. По истечении некоторого времени контуры хондриома невозможно различить. По нашему мнению, такое поведение зонда C2 свидетельствует о его потенциал-зависимом характере связывания с мембранами митохондрий.

Поведение зонда C9 после добавления FCCP является аналогичным, но выход зонда в цитоплазму клетки и в околоклеточное пространство происходит менее интенсивно, а остаточные контуры свечения структур митохондрий более четкие по сравнению с красителем C2. Это может указывать на более прочный характер связи зонда C9 с мембранами митохондрий.

Таким образом, данные исследования подтверждают митохондриальную локализацию зондов C2 и C9 в клетке, что дает возможность использовать их для исследования состояния митохондрий.

В присутствии зонда C2 отмечен интересный феномен. При просмотре образцов, окрашенных этим зондом, в флуоресцентном микроскопе под

действием УФ света происходит быстрый (за 20–30 с) выход красителя в окружающую среду, что затрудняет оценку состояния митохондрий в клетках (рис. 2, а, см. вклейку). Следует отметить, что в клетках культуры, не подвергшихся криоконсервированию и окрашенных этим же зондом (рис. 1, а), подобного поведения красителя не выявлено. Механизм такой миграции может быть объяснен, во-первых, неполным восстановлением функциональных свойств митохондрий после криоконсервирования, проявляющемся в изменении параметров связывания с красителем, и, во-вторых, наличием собственной криочувствительности у зонда C2, что может приводить к изменению характеристик его связывания с мембраной митохондрий.

Для проверки данной гипотезы зонд C2 в рабочей концентрации замораживали по той же программе, что и окрашенные клетки. После отогрева образца клетки ФЧ окрашивали и далее культивировали в стандартных условиях. По истечении 24 ч стекло с окрашенными клетками просматривали в флуоресцентном микроскопе со средним световым фильтром. Установлено, что «выгорание» зонда происходит с той же интенсивностью, что и в контрольном неконсервированном образце. Анализ спектров флуоресценции при длительном (до 1 ч) облучении в УФ области также показал высокую фотостабильность зонда, в том числе и после его замораживания–оттаивания. Таким образом, зонд C2 не меняет своих флуоресцентных свойств под действием низких температур и не является криочувствительным.

Следует отметить, что наблюдаемая в клетках культуры ФЧ после деконсервации замена свечения красителя, связанного с митохондриями, на диффузное свечение цитоплазмы, вероятно, происходит вследствие неспецифического окрашивания органелл зондом C2 при изменении трансмембранного потенциала митохондрий (рис. 2, а).

Для JC-1 выявлен частичный переход J-агрегатов зонда (оранжевое свечение) в мономерную форму (зеленое свечение), что, возможно, связано со снижением функциональной активности митохондрий (рис. 2, в, см. вклейку). В случае исследования зонда C9 методом люминесцентной микроскопии различий в клетках до и после консерви-

Показатели свечения зондов в культуре фибробластов человека до и после замораживания–оттаивания

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

рования не регистрировали, однако данные проточной цитофлуориметрии указывают на то, что наблюдалось усиление рассеянного свечения зонда и его связывание с внутриклеточными мембранами. При адгезии и пролиферации клеток структура митохондрий была аналогична нативной культуре.

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

Данные о криоконсервировании клеток, окрашенных митохондриальными флуоресцентными зондами, и об их судьбе после деконсервации в литературе не найдены. Полученные нами результаты открывают возможность проследить за репаративными процессами в клетке, касающимися системы ее энергообеспечения, в процессе культивирования при достаточно длительном сроке наблюдения с использованием описанной системы ФЧ–потенциал-зависимый зонд.

По результатам цитофлуориметрического анализа, флуоресценция клеток культуры ФЧ, окрашенных зондами С2 и С9, находится в области зеленой флуоресценции ($\lambda = 530$ нм). После криоконсервирования клеток, меченных данными зондами, наблюдается смещение свечения клеток в желтую область (7 ± 2 % для С2 и 34 ± 3 % для С9) и усиление гетерогенности внутриклеточной среды.

При цитофлуориметрическом анализе клеток культуры ФЧ, окрашенных зондом JC-1, показано, что для них свойственна флуоресценция, находя-

щаяся в оранжевой области спектра ($\lambda = 585 \pm 20$ нм), причем клетки распределены двумя группами. После замораживания–оттаивания данный краситель в 70 ± 3 % клеток переходит в мономерную форму, что может служить показателем снижения функциональной активности митохондрий исследуемых клеток.

Согласно данным, полученным методом проточной цитофлуориметрии после криоконсервирования клеток, меченных зондами С2 и С9, наблюдается интенсивное свечение красителей внутри клетки, что может свидетельствовать об их неспецифическом связывании с органеллами клетки. Эти изменения частично исчезают после реабилитации (инкубирование клеточной суспензии в ростовой среде при $t = 37$ С).

Следует обсудить ряд особенностей, касающихся применения флуоресцентных красителей для наблюдения за клетками, если в исследовании присутствует такой специфический процесс, как криоконсервирование. В нашей работе использовали, в частности, краситель JC-1, о котором известно, что он устойчив к воздействию агентов, депляризирующих плазматическую мембрану, и однозначно отражает состояние митохондриального аппарата. Что касается карбоцианиновых зондов С2 и С9, то имеется сообщение, в котором обсуждаются вопросы о надежности применения гомолога из этого ряда – DIOC6(3) для измерения в процессах, где затрагивается целостность плазма-

тической мембраны клетки. Установлено [11], что при длительном (в течение нескольких часов) воздействии таких деполяризаторов плазматической мембраны, как KCl или овабаин, существенно снижается уровень флуоресценции, связанной с DIOC6(3). Исходя из необходимости поддержания адекватной концентрации красителя во внутриклеточном пространстве изменения плазматической мембраны должны влиять на способность митохондрий к связыванию красителя и могут имитировать изменения в . Кроме того, в этой же публикации указывается, что флуоресценция, связанная с применением DIOC6(3), не изменяется в случае валиномицина, являющегося деполяризатором мембран митохондрий, а использование другого деполяризатора FCCP снижает флуоресценцию, но не настолько, как если бы флуоресценция DIOC6(3) была связана исключительно с поляризованными мембранами митохондрий. Таким образом, DIOC6(3) и, возможно, его гомологи имеют ограничения для применения в качестве красителя, отражающего состояние митохондриальных мембран, и, в первую очередь, в случае изменений в плазматической мембране.

Что же происходит с плазматической мембраной при консервировании? Именно мембранные структуры, как известно, являются слабым звеном при криоконсервировании клеток. Еще в конце 90-х годов прошлого столетия установлено [12], 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 восстанавливаются через 2 ч после культивирования размороженных клеток в среде, содержащей клеточные метаболиты. Сообщается также, что криоконсервирование без криопротекторов сильно изменяет мембранный потенциал плазматической мембраны *Escherichia coli*, но в присутствии ДМСО такое изменение не является особенно драматическим и значение мембранного потенциала сохраняется в пределах 70 % от исходного значения [13]. В работе [14] методом электронной микроскопии выявлены ультраструктурные изменения митохондрий при криоконсервировании нейрона МПЗ моллюска *Lymnaea stagnalis*.

Однако после реабилитации в виде длительной инкубации в физиологическом растворе ультраструктурные различия митохондрий, вызванные охлаждением, действием ДМСО или криоконсервированием, сглаживались и через 8 ч ультраструктурная организация крист митохондрий всех клеток (независимо от воздействия) не различалась.

На основании вышеизложенного можно констатировать, что изменение свечения зондов C9 и JC-1 отражает функциональное состояние митохондрий и является показательным тестом для выявления криоповреждений клетки; поведение зонда C2 может свидетельствовать о его высокой чувствительности к изменению трансмембранного потенциала митохондрий клеток после деконсервации; зонды C2, C9 и JC-1 могут быть использованы для мониторинга функционального состояния клеточных линий при криоконсервировании после реабилитации.

Работа выполнена при поддержке УНТЦ, проект 5-4358/07-УНТЦ.

Авторы благодарят Т. С. Дюбко за консультативную помощь и плодотворное обсуждение.

E. I. Goncharuk, E. V. Onischenko, V. V. Timon, T. F. Petrenko, I. A. Borovoy, Yu. V. Maliukin, V. I. Grishchenko

Application of carbocyanine fluorescent probes for evaluation of the functional state of cell cultures after cryoconservation

Summary

Application of C2, C9 and JC-1 dyes for characterizing human fibroblast diploid cell line after cryoconservation was studied. It was shown that these probes might be used to monitor the functional state of cryoconserved cells.

Keywords: fluorescence, probes, human fibroblasts, cell culture, cryoconservation.

O. I. Гончарук, О. В. Онищенко, В. В. Тимон, Т. П. Петренко, І. А. Боровий, Ю. В. Малюкін, В. І. Грищенко

Застосування карбоціанінових флуоресцентних зондів для оцінки функціонального стану культивованих клітин після криоконсервування

Резюме

Досліджено можливість застосування карбоціанінових флуоресцентних зондів C2, C9 і JC-1 для характеристики криоконсервованих клітин диплоїдної лінії фібробластів людини. Показано, що ці флуоресцентні зонди можуть бути використані при криоконсервуванні клітинних ліній для моніторингу їхнього функціонального стану.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология.– К.: Наук. думка, 1994.–430 с.
2. Цуцаева А. А., Аграненко В. А., Федорова Л. И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А. А. Цуцаевой.–К.: Наук. думка, 1983.–240 с.
3. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.–М.: Наука, 1989.–277 с.
4. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy.– New York etc.: Kluwer Acad./Plenum Publ., 1999.–698 p.
5. Ченцов Ю. С. Хондриом – совокупность митохондрий клетки // Соросовс. образоват. журн.–1997.–№ 12.–С.10–16.
6. Mashimo K., Ohno Y. Ethanol hyperpolarizes mitochondrial membrane potential and increases mitochondrial fraction in cultured mouse myocardial cells // Arch. Toxicol.–2006.–80.–P. 421–428.
7. De Rossi U., Moll J., Spieles M., Bach G., Dahne S., Kriwanek J., Lisk M. Control of the J-aggregation by variation of the N-alkyl-substituents // J. Prakt. Chem.–1995.–337.–P.203–208.
8. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.–М.: Мир, 1983.–264 с.
9. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
10. Smiley S. T., Reerst M., Mottola-Hartshorn C., Mei Lin, Chen A., Smith T. W., Glenn S. D., Chen L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 // Cell Biol.–1991.–88.–P. 3671–3675.
11. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis // FEBS Lett.–1997.–411.–P. 77–82.
12. Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Венрицев Б. Н. Действие криопротекторов на электрические характеристики клеточной мембраны эмбрионов мыши // Криобиология.–1990.–№ 1.–С. 25–29.
13. Маркарян Ш. А., Баграмян К.А., Аракелян В.Б. Мембранный потенциал до и после глубокого замораживания *Escherichia coli* в присутствии диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида // Биофизика.–2002.–47, № 2.–С. 315–316.
14. Дмитриева Е. В., Мошков Д. А., Гахова Э. Н. Ультраструктурные изменения нейрона МПЗ моллюска *Lymnaea stagnalis* после криоконсервации изолированного мозга // Цитология.–2006.–48, № 6.–С. 480–485.

УДК 57.043.085:577.336

Надійшла до редакції 24.07.07