

Использование β -дикетонов Eu как метчика в клетках при криоконсервировании

Е.И. Гончарук¹, Е.В. Онищенко¹, П.Н. Жмури², Н.А. Волкова¹

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

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

Usage of Eu β -diketones as Marker in Cells Under Cryopreservation

E.I. GONCHARUK¹, E.V. ONISCHENKO¹, P.N. ZHMURIN², N.A. VOLKOVA¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute for Scintillation Materials of State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

После деконсервирования клеток важно подтвердить их сохранность и аутентичность. Ионы европия, характеризующиеся узкополосной люминесценцией, могут быть использованы для мечения и тестирования клеточных культур. Цель работы – исследование взаимодействия β -дикетонов Eu (ацетотиенилтрифторацетон европия) с диплоидной культурой клеток фибробластов человека до и после криоконсервирования.

Культивирование проводили в стандартных условиях до достижения клетками 70% конfluence, после чего клетки окрашивали растворами β -дикетонов Eu, синтезированных в ИСМА НТК "Институт монокристаллов". Спектры поглощения и испускания клеток, меченных данным красителем, регистрировали на спектрофлуориметре FluoroMax-4 (Horiba, США). Криоконсервирование меченых клеток проводили по 3-этапной программе с использованием 7% ДМСО. Распределение красителя в клетках оценивали с помощью сканирующего конфокального микроскопа (Zeiss) при возбуждении 488 нм. Количественную оценку окрашивания проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD). Контролем служили некриоконсервированные культуры клеток.

Спектр флуоресценции при возбуждении на 350 нм культуры клеток, меченных β -дикетонами европия, характеризовался узким пиком с максимумом при $\lambda = 616$ нм, значительно превышающим по интенсивности собственную флуоресценцию клеток. Исследование распределения β -дикетонов европия в пролиферирующей культуре клеток показало связывание красителя с органеллами цитоплазмы клеток, свечение наблюдалось в красной области. При долгосрочном культивировании меченых клеток отмечено достоверное снижение их адгезивной способности и скорости роста. Конфокальная микроскопия показала выход красителя во внеклеточное пространство, что может свидетельствовать о непрочном связывании красителя с органеллами. Этот факт подтверждается данными цитофлуориметрии: количество окрашенных клеток после криоконсервирования снижается в 2,5 раза. Термограммы замораживания нативных и меченых клеток не отличались, т.е. интеграция данного хелатного соединения не оказывала влияния на криоконсервирование.

Полученные результаты свидетельствуют, что β -дикетоны Eu могут использоваться для исследования и идентификации культур клеток. Такая особенность данного метчика как узкополосная люминесценция является уникальным штрих-кодом для подтверждения аутентичности длительно сохраняемых или транспортируемых образцов.

Работа выполнена при поддержке гранта УНТЦ 4358.

After cells' freeze-thawing of importance is to confirm their integrity and authenticity. The europium ions, characterized by a narrow-band luminescence, may be used for cell culture labeling and testing. The research was targeted to study the interaction of Eu β -diketones (europium acetylacetonyltrifluoroacetone) with human fibroblast cell diploid culture prior to and after cryopreservation.

The culturing was carried-out under the standard conditions up to cell achieving 70% confluent, afterwards cells were stained with Eu β -diketone solutions, synthesized at the Institute for Scintillation Materials of State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of NAS of Ukraine. The absorption and emission spectra of cells, labeled with this dye, were recorded with FluoroMax-4 spectrofluorimeter (Horiba). Labeled cells were cryopreserved by the 3-step program with 7% DMSO. Dye distribution in cells was assessed using the scanning confocal microscope (Zeiss) at 488 nm excitation. Staining was quantitatively estimated using the cytofluorimetry method (FACS Calibur, BD). Non-cryopreserved cell cultures served as the control.

Fluorescence spectrum at 350 nm excitation of cell culture, stained with Eu β -diketones, was characterized by a narrow peak with the maximum at $\lambda=616$ nm, significantly exceeding the own cell fluorescence by the intensity. Studying the Eu β -diketone distribution in proliferating cell culture has demonstrated the dye binding with cell cytoplasm organelles, the luminescence was noted in red range. Statistically significant decrease in adhesive ability and growth rate was noted under long-term culturing of labeled cells. Confocal microscopy has shown the dye release into an extracellular space, that may testify to the unstable dye binding with organelles. This fact is confirmed by cytofluorimetric data: a number of stained cells after cryopreservation decreased in 2.5 times. The thermograms of frozen native and labeled cells did not differ, i.e. the integration of this chelative compound did not affect the cryopreservation.

The results obtained testify to the fact that the Eu β -diketones may be used for cell culture study and identification. Such capability of this marker as a narrow-band luminescence is the unique bar-code to confirm the authenticity of long-term stored and transported samples.

The research was carried-out under STCU grant 4358 support.