

## Перспективный для криобиологии зонд с длинноволновой эмиссией для обнаружения апоптоза

К.А. ПЫРШЕВ, М.М. ГУЗЫК, К.Ю. МАНОЙЛОВ

Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины, г. Киев

## Red-Shifted Probe for Apoptosis Detection Prospective for Cryobiology

K.A. PYRSHEV, M.M. GUZYK, K.YU. MANOILOV

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Последние данные литературы демонстрируют противоречивые результаты о влиянии низких температур на различные типы клеток, акцентируя при этом внимание на роли апоптоза. Поэтому изучение апоптоза очень важно для криобиотехнологии. Наиболее популярные методы, применяемые для обнаружения апоптоза клеток, используют те же механизмы, что и макрофаги, распознающие изменения на поверхности апоптотической клетки. Нарушение липидной асимметрии с последующей экспозицией фосфатидилсерина (ФС) на внешний слой плазматической мембраны является основным критерием раннего выявления апоптоза и обычно изучается с помощью аннексина V. В связи с автофлуоресценцией, вызванной клеточными пигментами, представленной в коротковолновой области, многие исследователи интересуются зондами с излучением в красной области. Таким свойством обладает зонд на основе нильского красного (NR12S) [Kucherak *et al.*, 2010]. NR12S является радиометрическим зондом, спектры возбуждения которого находятся в сине-зеленой области с эмиссионными сдвигами длины волны в желтую и красную области. Еще одним преимуществом такого подхода является возможность его комбинированного использования в спектрофлуориметрии, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, что позволяет детально характеризовать исследуемые системы.

Мы протестировали NR12S в исследованиях клеток. Использовали культуру моноцитов человека U937 в среде RPMI 1640/HEPES («Sigma-Aldrich») с эмбриональной бычьей сывороткой. Уровень некроза изучали по окрашиванию пропидием йодидом (PI) («Sigma-Aldrich»). Были обнаружены некоторые особенности применения NR12S, что может быть важно для других исследователей, использующих этот метод.

Данные спектрофлуориметрии показали, что NR12S и PI, внесенные вместе во внеклеточный раствор, взаимодействуют и дают один пик излучения с эмиссией с увеличенным квантовым выходом и смещенным пиком ближе к 620 нм. Такая проблема может быть решена с помощью зонда для выявления некроза со спектром излучения в зеленой области или применением дополнительных контрольных образцов для обнаружения уровня некроза. Другая характеристика имеет отношение к наличию в растворе RPMI 1640 красителя фенолового красного с возбуждением при 520 нм и эмиссией при более 580 нм. Из-за наложения с эмиссией NR12S наиболее часто изучаемые клетки в растворе RPMI 1640 дают эмиссию, смещенную в более длинноволновую область, что искусственно увеличивает процент апоптотических и некротических клеток в тестах с проточной цитометрией. Применение NR12S зонда в исследованиях на клетках для обнаружения апоптоза находится только на начальной стадии, и определение оптимальных условий его применения имеет важное значение.

Авторы выражают благодарность Н. В. Короткевич и А.Ю. Лабынцеву за предоставленные культуры клеток и техническую консультацию.

Recent literature data search shows controversial results dealing with influence of low temperatures on different cell types with important focus on apoptosis. The most popular methods applying for apoptotic cells detection use the same mechanism as the macrophages recognizing the change on apoptotic cell surface. Lipid asymmetry disturbance followed by phosphatidylserine (PS) exposure on plasma membrane extracellular layer is the main parameter for early detection of apoptosis been commonly studied by annexin V assays. In view of autofluorescence caused by the cellular pigments presented in a short-wavelength region a lot of researchers interest in probes with the emission in red region. Such characteristic is proper for probe based on Nile Red (NR12S) [Kucherak, Oncul *et al.*, 2010]. NR12S is a ratiometric probe that can be excited in the blue-green region with response by wavelength shifts in yellow and red emission. Another advantage of this approach is the possibility of its combine using in spectrofluorimetry, flow cytometry and confocal microscopy permitting to characterize the studied system in detail.

We tested the application of NR12S for cellular studies. Human monocytes culture U937 was used in RPMI 1640/HEPES (Sigma-Aldrich) with fetal bovine serum (FBS). The level of necrosis was detected by propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich). Some peculiarities in NR12S application have been found that can be important for other researchers using this method.

Spectrofluorimetry data has shown that NR12S and PI added together to extracellular solution are interacting and giving one peak of emission with enhanced quantum yield and shifted peak closer to 620 nm. Such problem can be solved by using the probe for necrosis with emission spectra in green region or applying additional control specimen for necrosis level detection. Another characteristic deals with existing in RPMI 1640 solution of the dye phenol red excited in 520 nm and giving response over 580 nm. Due to overlap with NR12S emission the commonly studied cells in RPMI 1640 solution respond in emission shifted to longer-wavelength region artificially increasing percent of apoptotic and necrotic cells detected by flow cytometry. It has to be noted that FBS contains different types of proteins and flow cytometer has shown their conjugating with NR12S probe.

NR12S probe application in a cell research as the assay for apoptosis is just on its beginning and the determination of its optimal application conditions is of importance. Some results of NR12S application will be presented at the conference.

The authors would like to thank N.V. Korotkevich and A.J. Labyntsev for providing cell culture and technical advice.