

УДК 57.043:612.014.41

И.П. Горючая¹, Т.С. Дюбка^{1,2}, В.Д. Зинченко^{1*}, И.А. Буряк¹, Л.Д. Паценкер², А.Л. Татарец²**Сквараиновый краситель Square-460 как маркер повреждения мембран при криовоздействиях**

UDC 57.043:612.014.41

I.P. Goryachaya¹, T.S. Dyubko^{1,2}, V.D. Zinchenko^{1*}, I.A. Buryak¹, L.D. Patsenker², A.L. Tatarets²**Squaraine Dye Square-460 as a Marker of Membrane Cryodamage**

Ключевые слова: дрожжи, мембраны, флуоресцентный краситель, Square-460, замораживание-ототев, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

Ключові слова: дріжджі, мембрани, флуоресцентний барвник, Square-460, заморожування-відігрів, проточна цитофлуориметрія, флуоресцентна мікроскопія.

Key words: yeast, membrane, fluorescent dye, Square-460, freeze-thawing, flow cytometry, fluorescent microscopy.

Нарушение целостности клеточной мембраны – универсальный признак повреждения клетки при использовании различных протоколов криоконсервирования [6]. В настоящее время для определения повреждения мембран часто используют флуоресцентные методы, основанные на способности некоторых флуорохромов проникать через поврежденные мембраны клеток, окрашивая внутриклеточные структуры. Выбор флуоресцентных зондов и методик эксперимента зависит от задач исследования и вида изучаемых клеток [2, 5, 8].

Сквараиновый флуоресцентный краситель «Square-460» взаимодействует с биологическими структурами по гидрофобному механизму и окрашивает мембраны клеток [5]. При повреждении цитоплазматических мембран количество гидрофобных мест связывания увеличивается, поскольку для красителя становятся доступными внутриклеточные структуры, что выражается в соответственном увеличении флуоресценции образцов. Это делает его весьма привлекательным для исследования повреждений мембран клеток при криовоздействиях.

Целью настоящей работы было изучение возможности применения флуоресцентного красителя «Square-460» в качестве маркера нарушений целостности клеточных мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных замораживанием-ототевом.

В работе использовали промышленный штамм дрожжей *S. cerevisiae* (раса 608), полученный из Российского НИИ хлебопекарной промышленности (г. Санкт-Петербург). Образцы клеток были любезно предоставлены к.м.н. И.П. Высеканцевым (ИПККиК

Disordered integrity of cell membrane is an universal sign of cell damage caused by different cryopreservation protocols [7]. Nowadays the injury of membranes is often assessed by fluorescent methods, based on the ability of certain fluorochromes selectively penetrate through the damaged cell membranes and stain intracellular structures. Selection of fluorescent probes and methods of the experiment depends on the objectives of the study and on the type of cells [2, 5, 8].

Squaraine fluorescent dye Square-460 interacts with biological structures by hydrophobic mechanisms and stains cell membranes [3]. If the damage of plasmatic membrane occurs the amount of hydrophobic binding sites increases due to the availability of intracellular structures for the dye; this results in subsequent rise of sample's fluorescence. This feature makes this dye prospective for studying the cell membranes damage caused by cryoexposures.

The aim of this work was to investigate the possibility of using fluorescent dye Square-460 as a marker for *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell membrane integrity disorders caused by freeze-thawing.

The experiments were performed in *S. cerevisiae* yeast strain (race 608), derived from the Russian Research Institute of Baking Industry (St. Petersburg). The samples were the courtesy of Dr. I.P. Vysekantsev (IPC&C). Yeast were grown on the wort agar slant for 48 hours at 30°C and washed free of nutrient medium with physiological saline. Impaired structural and functional state of cells was caused by freeze-thawing in 2 ml plastic tubes (Corning, USA) by two regimens: 1) single freezing by immersion in liquid nitrogen (freezing

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) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: vd_zin@mail.ru

Поступила 03.06.2013

Принята в печать 15.12.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 347–350. © 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

²Institute of Single Crystals, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: vd_zin@mail.ru

Received June, 03, 2013

Accepted December, 15, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 347–350. © 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

НАН Украины). Дрожжи выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 ч при 30°C и смывали с питательной среды физиологическим раствором. Для изменения структурно-функционального состояния суспензии клеток замораживали-отогревали в пластиковых пробирках объемом 2 мл («Corning», США) по двум режимам: 1) однократное замораживание погружением в жидкий азот (скорость охлаждения при этом составляла около 200 град/мин) и последующий отогрев на водяной бане при температуре 30°C; 2) двухкратное замораживание-отогрев согласно п. 1.

Жизнеспособность клеток определяли по колониеобразованию чашечным методом Коха [1].

Распределение клеток по размерам, неоднородности внутренней структуры и интенсивности флуоресценции красителя «Square-460» изучали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) [6]. Распределение клеток по интенсивности флуоресценции анализировали при 530 нм. Флуоресценцию красителя «Square-460» возбуждали светом с длиной волны 488 нм (аргоновый лазер). Клетки окрашивали путём 15-минутной инкубации в среде, содержащей краситель «Square-460» в концентрации 40 мкмоль/л, отмывали свободный краситель с помощью центрифугирования в течение 3 мин при 800 g.

Наблюдение флуоресценции в клеточных суспензиях и микрофотографирование осуществляли на микроскопе «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия). Использовали набор фильтров для флуоресценции 20 («Carl Zeiss»).

Каждый эксперимент повторяли 5 и более раз. Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента-Фишера и программы «Microsoft Excell 2010». Данные представлены в виде $M \pm SE$. Различия между выборками считали значимыми при $p < 0,05$.

Повреждения клеток в данной работе вызывали процедурой замораживания-отогрева. Количество неповрежденных клеток в суспензии можно оценить по их функциональной активности. В случае *S. cerevisiae* таким функциональным тестом обычно является образование колоний в питательной среде [2].

Как видно из таблицы, после однократного цикла замораживания-отогрева количество колониеобразующих единиц (КОЕ) снижалось примерно на два порядка по сравнению с контролем без замораживания, а после двукратного цикла количество КОЕ снижалось на пять порядков по сравнению с контролем. Резкое снижение жизнеспособности, по-видимому, вызвано повреждением структурных компонент клеток, в том числе мембранных структур.

На рис. 1, А приведена микрофотография неповрежденной криовоздействию суспензии *S. cerevisiae* после окрашивания красителем «Square-460». Видно, что данный краситель окрашивает оболочки клеток и почти не проникает в клетки.

rate in this case was about 200 deg/min), followed by warming in a water bath at 30°C, 2) double cycle of freeze-thawing as in 1.

Cell viability was determined by colony forming ability according Koch's plate method [1].

Distribution of the cells by size, nonuniformity of the internal structure and Square-460 dye fluorescence intensity was studied by FACS Calibur flow cytometer (BD, USA) [6]. The cell distribution by fluorescence intensity was studied at 530 nm. The fluorescence of Square-460 dye was excited by light with 488 nm wave length (argon laser). Cells were stained during 15 minute-long incubation in a medium with Square-460 dye with concentration of 40 mmol/l, non-bound dye was washed-out by centrifugation for 3 minutes at 800 g.

Fluorescence was observed in cell suspensions and micrographs made using a Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped by fluorescence filters set 20 (Carl Zeiss).

Each experiment was repeated 5 and more times. Statistical analysis was performed using Student-Fisher's t-test and Microsoft Excell 2010 software. Data are presented as $M \pm SE$. Differences between the samples was considered significant at $p < 0.05$.

The damage of the cells in this study were caused by the freeze-thawing procedure. The amount of non-damaged cells in the suspension could be assessed by their functional activity. In the case of *S. cerevisiae* such a functional test is usually the formation of colonies in a nutrient medium [4].

As seen from the Table, single freeze-thawing cycle resulted in a fall of number of colony forming units (CFUs) of approximately two orders of magnitude in comparison with the non-frozen control, and after two cycles of freeze-thawing the number of CFUs was reduced by five orders of magnitude compared with the control. The sharp decrease in the viability was apparently caused by damage of cell structural components, including membrane structures.

Колониеобразование *S. cerevisiae*
после замораживания-отогрева
Colony forming activity of *S. cerevisiae*
following freeze-thawing

Образец Sample	Число КОЕ в 1 мл среды CFUs per 1 ml
Контроль без замораживания Non-frozen control	$(2,8 \pm 0,5) \times 10^7$
Однократное замораживание-отогрев One cycle of freeze-thawing	$(5,8 \pm 1,7) \times 10^4$
Двукратное замораживание-отогрев Two cycles of freeze-thawing	$(3,7 \pm 1,1) \times 10^2$



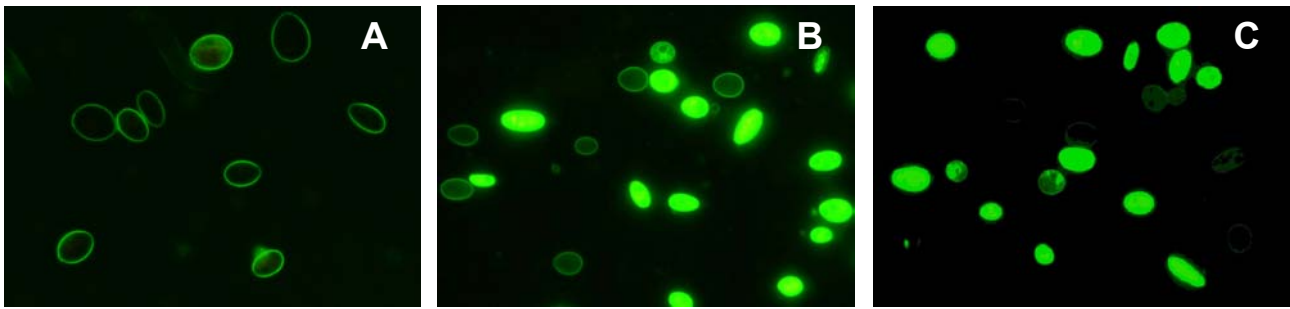


Рис. 1. Флуоресценция клеток дрожжей *S. cerevisiae*, окрашенных красителем «Square-460»: **A** – контроль без криовоздействия; **B** – однократное замораживание-отогрев; **C** – двукратное замораживание-отогрев.

Fig. 1. Fluorescence of *S. cerevisiae* yeast cells stained with Square-460 dye: **A** – non-frozen-thawed control; **B** – post one-fold freeze-thawing; **C** – post two cycles of freeze-thawing.

Однократное замораживание до -196°C и последующий отогрев вызывают увеличение проницаемости мембраны *S. cerevisiae* для красителя «Square-460»: наблюдается окрашивание цитоплазмы в среднем у 60,5% клеток (рис. 1, B). Визуальная оценка в проходящем свете показала нарушения структуры данных клеток.

После двукратного замораживания большая часть клеток (около 80%) была ярко окрашена (рис. 1, C).

Точечные диаграммы FSC/SSC клеток *S. cerevisiae*, окрашенных красителем «Square-460» до и после низкотемпературного воздействия, приведены на рис. 2.

Сопоставление полученных точечных диаграмм с флуоресцентными микрофотографиями окрашенных красителем «Square-460» клеток *S. cerevisiae* (рис. 1 и 2) показывает, что область значений FL1-H 10^2 – 10^4 соответствует клеткам с поврежденными мембранами, обладающим интенсивной флуоресценцией. В контрольном образце количество клеток с флуоресценцией в области FL1-H 10^2 – 10^4 составляет $5 \pm 2\%$. У подвергшихся однократному замораживанию-отогреву клеток количество регистрируемых в правой части диаграмм событий увеличивается и достигает $65 \pm 6\%$, а после двукратного – $85 \pm 7\%$.

Fig. 1A shows a fluorescence image of non-frozen-thawed *S. cerevisiae* suspension stained with Square-460. It is seen, that this dye stained only the cell plasma membranes, and virtually did not penetrate into the cells.

Single freezing down to to -196°C and subsequent thawing up to 30°C caused an increase in *S. cerevisiae* cell membrane permeability for Square-460 dye, as evidenced by staining of the cytoplasm in 60.5% of the cells (Fig. 1B). Observations by transmitted light microscopy showed that these cells had various disruptions of their structure.

After a two-fold freezing the most cells (about 80%) had bright fluorescence (Fig. 1, C).

Dot plots FSC/SSC of *S. cerevisiae* yeast cells, stained by Square-460 dye, both prior to and post low temperature effect are shown in Figure 2.

Comparing the obtained graphs and fluorescent images of the *S. cerevisiae* cells stained with Square-460 (Figs. 1 and 2) showed that the range of FL1-H 10^2 – 10^4 obviously corresponds to cells with damaged membranes, characterized by increased fluorescence. In the control sample, the number of cells with fluorescence in the FL1-H 10^2 – 10^4 was $5 \pm 2\%$. In the cell suspension subjected to single freeze-thawing a quantity of events detected in the right side of the plots was

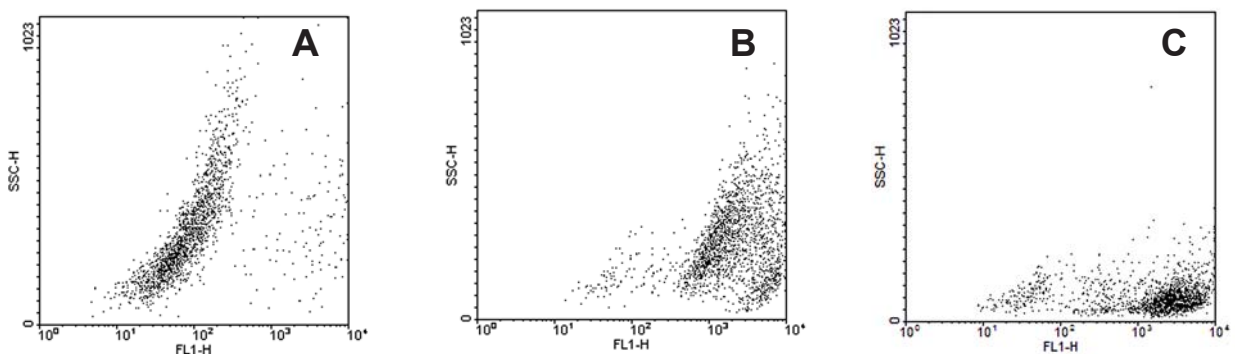


Рис. 2. Точечные диаграммы SSC/FL1-H клеток дрожжей *S. cerevisiae*, окрашенных красителем «Square-460»: **A** – контроль без криовоздействия; **B** – однократное замораживание-отогрев; **C** – двукратное замораживание-отогрев.

Fig. 2. Dot plots SSC/FL1-H of *S. cerevisiae* yeast cells stained with Square-460 dye: **A** – non-frozen-thawed control; **B** – post one-fold freeze-thawing; **C** – post two cycles of freeze-thawing.

Наблюдаемые изменения в диаграммах мы связываем с нарушением целостности мембран клеток вследствие низкотемпературного воздействия.

Таким образом, флуоресцентный сквараиновый краситель «Square-460» не проникает через неповрежденные клеточные мембраны. При нарушении целостности плазматической мембраны он проходит внутрь клеток и окрашивает цитоплазматические структуры. Это делает возможным использование красителя «Square-460» в проточно-цитофлуориметрическом анализе и флуоресцентной микроскопии как маркера нарушения целостности клеточных мембран после криовоздействий.

increased and reached $65 \pm 6\%$ and after two cycles of freeze-thawing it was $85 \pm 7\%$.

The observed changes in plots we associate with disrupted membrane integrity, caused by low temperature exposures.

Thus, fluorescent squaraine dye Square-460 do not penetrate through intact cell membranes. Once the integrity of the cell membranes is interrupted, the dye enters the cells and stains cytoplasmic structures. This makes possible the application of Square-460 dye in flow-cytometric analysis and fluorescence microscopy as a marker of cell membrane integrity impairments appeared post cryoexposure.

Литература

1. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пущино, 1990. – 186 с.
2. Durand J.L., Van Broock M., Frati D.L. et al. Adaptive response to ionising radiation on *Saccharomyces cerevisiae* // *Radio-biologia*. – 2002. – Vol. 2, №1. – P. 18–22
3. Glander H.-J., Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage // *Mol. Human Reprod.* – 1999. – Vol. 5, №2. – P. 109–115.
4. Guide to flow cytometry / Ed. by S.W. Dako. – Carpinteria, California, 2006. – 119 p.
5. K8-3010. Square-460 [Электронный документ] // [веб-сайт] <http://www.setabiomedicals.com/pdf/K8-3010.pdf> (15.08.2010).
6. McGann L.E., Yang H., Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing // *Cryobiology*. – 1988. – Vol. 25, №1. – P. 178–185
7. Walsh S., Lappin-Scott H.M., Stockdale H., Herbert B.N. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes // *J. Microbiol. Methods*. – 1995. – Vol. 24. – P. 1–9.
8. Wlodkowic D., Sommer J., Darzynkiewicz Z. Cytometry in cell necrobiology revisited. Recent advances and new vistas // *Cytometry Part A*. – 2010. – Vol. 77, №7. – P. 591–606.

References

1. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods for assessment of microorganisms viability. – Puschino, 1990. – 186 p.
2. Durand J.L., Van Broock M., Frati D.L. et al. Adaptive response to ionising radiation on *Saccharomyces cerevisiae* // *Radio-biologia*. – 2002. – Vol. 2, N1. – P. 18–22
3. Glander H.-J., Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage // *Mol. Human Reprod.* – 1999. – Vol. 5, N2. – P. 109–115.
4. Guide to flow cytometry / Ed. by S.W. Dako. – Carpinteria, California, 2006. – 119 p.
5. K8-3010. Square-460 [Electronic document] // [web-site] <http://www.setabiomedicals.com/pdf/K8-3010.pdf> (15.08.2010).
6. McGann L.E., Yang H., Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing // *Cryobiology*. – 1988. – Vol. 25, N1. – P. 178–185
7. Walsh S., Lappin-Scott H.M., Stockdale H., Herbert B.N. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes // *J. Microbiol. Methods*. – 1995. – Vol. 24. – P. 1–9.
8. Wlodkowic D., Sommer J., Darzynkiewicz Z. Cytometry in cell necrobiology revisited. Recent advances and new vistas // *Cytometry Part A*. – 2010. – Vol. 77, N7. – P. 591–606.

