

Влияние экзогенного криопротектора на функциональное состояние митохондрий изолированных гепатоцитов и клеток костного мозга крысы при оценке флуоресцентным методом

Е.А. АВЕРЧЕНКО, Н.С. КАВОК, И.А. БОРОВОЙ, Н.Л. ПОГРЕБНЯК
Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Fluorescent Method for Estimation of Exogenous Cryoprotectant Influence on Functional Condition of Mitochondria of Isolated Hepatocytes and Bone Marrow Cells of Rats

E.A. AVERCHENKO, N.S. KAVOK, I.A. BOROVYU, N.L. POGREBNIYAK
Institute for Scintillation Materials of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Митохондриальный флуоресцентный зонд JC-1 применяли для оценки воздействия криопротекторного агента диметилсульфоксида (ДМСО) на функциональное состояние митохондрий одиночных клеток. О величине митохондриального потенциала судили по интенсивности флуоресценции агрегатов красителя. Для оценки адекватности используемого подхода применяли модуляторы митохондриальной функции – протонофор *p*-трифлуорометоксибензилгидразон (FCCP), ротенон, органические и неорганические прооксиданты. Воздействие криопротектора на гепатоциты и культивируемые клетки костного мозга изучали в двух концентрациях: 2 и 8%. Было показано, что более чувствительными к действию ДМСО являются гепатоциты, в которых криопротектор в низких концентрациях вызывал достоверное снижение митохондриального потенциала. В клетках костного мозга достоверное падение потенциала происходило только при действии токсических концентраций ДМСО. Было также обнаружено, что действие низких концентраций криопротектора оказывает влияние на начальные этапы восприятия клетками регуляторного сигнала. Так, на модели гормон-индуцированных изменений митохондриального потенциала исследовали динамику накопления агрегатов зонда в одиночных гепатоцитах. Было установлено, что под влиянием фенилэфрина (10^{-5} М) в гепатоцитах происходит достоверное повышение интенсивности флуоресценции агрегатов зонда к 20-й минуте эксперимента, эффект сохраняется также на 30-й минуте воздействия альфа-агониста. Предынкубация клеток в присутствии 2% ДМСО полностью отменяла стимулирующее действие агента. Таким образом, использованный флуоресцентный метод позволяет выявлять физиологические изменения митохондриального потенциала одиночных клеток в ответ на регуляторное воздействие, так же как и обнаруживать эффекты экзогенных соединений.

Mitochondrial probe JC-1 has been used in fluorescent microscopy method for estimation of dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotective agent influence on functional condition of mitochondria of single cells. The value of mitochondrial potential of dye aggregates has been determined by their fluorescence intensity. Modulators of mitochondrial function, protonophore *p*-trifluoromethoxy phenylhydrazine (FCCP), rotenone, organic and inorganic pro-oxidants has been used for estimation of method adequacy. Influence of cryoprotectants (with two concentrations, 2% and 8%) on hepatocytes and cultured bone marrow cells has been investigated. It was shown that hepatocytes were the most sensitive to DMSO influence, wherein the cryoprotectant caused a confident decline of mitochondrial potential under low concentration. Confident drop of fluorescence intensity in bone marrow cells was caused by toxic effect of DMSO. It has been also observed that low cryoprotectant concentration influenced an initial stage of perception by the cells of regulatory signal. Accumulation dynamics of probe aggregates in single hepatocytes has been investigated with the model of hormone-induced changes of mitochondrial potential. It has been found that in hepatocytes the effect of phenylephrine (10^{-5} M) provoked the confident increase of aggregates fluorescence intensity to the 20th min of experiment and such an effect didn't change to the 30th min of alpha-agonist influence. Pre-incubation of the cells with 2% DMSO completely eliminated an influence of hormone. Thus, this fluorescent method enables the revealing of physiological changes of mitochondrial potential of single cells, in response to regulatory influence, as well as the finding of the effects of exogenous compounds.