

Влияние гипертонии на объемные изменения и пространственное расположение липидных капель адренокортикоцитов

Т.А. Юрчук¹, Г.А. Божок², И.Ф. Коваленко², Т.П. Бондаренко²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Hypertonia Effect on Volumetric Changes and Spatial Distribution of Lipid Drops in Adrenocorticocytes

T.A. Yurchuk¹, G.A. Bozhok², I.F. Kovalenko², T.P. Bondarenko²

¹V.N. Karazin Kharkov National University

²Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Показано, что при размораживании криоконсервированных фрагментов органотипической культуры надпочечников повышался базальный уровень секреции гормонов адренокортикоцитами (АК). Поскольку в процессе криоконсервирования клетки подвергаются воздействию гиперосмотических растворов солей и криопротекторов, это может спровоцировать изменения формы и объема клеток, а также повлиять на гормоносинтезирующую функцию АК. Мы предположили, что это достигается при сближении предшественника стероидных гормонов холестерина, заключенного в липидных каплях (ЛК), с местом их синтеза в митохондриях за счет объемных изменений АК, вызванных факторами криоконсервирования.

Цель работы – изучение влияния объемных изменений АК, вызванных гипертоническими растворами и последующей регидратацией, на пространственное расположение ЛК в клетках.

АК получали ферментативным способом из коры надпочечников половозрелых крыс. Идентификация ЛК в клетках была выполнена с помощью флуоресцентного красителя нильского красного (НК), имеющего широкий спектр эмиссии 450–800 нм (красный спектр является индикатором липидов, растворенных в цитоплазме и мембранах, а желтый – в ЛК). Прикрепленные на коллагеновой подложке окрашенные НК клетки обрабатывали гипертоническими растворами 1 М NaCl; 0,75 М NaCl; 0,5 М NaCl. Изотонию восстанавливали путем добавления гипертонической среды 199 с пропидиум йодидом для визуализации мертвых клеток. Проводили измерения диаметров клеток в проходящем свете, а распределение ЛК – с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

В подсчет брали клетки диаметром 13–18,5 мкм. Изучение отношения объемов клетки V/V_0 показало, что в растворе 1 М NaCl клетки уменьшались от начального объема до 57%, в 0,75 М NaCl – до 60%, а в 0,5 М NaCl – до 62,3%. При изучении флуоресценции НК установили, что распределение ЛК также уменьшалось в объеме до 62, 65, 67% соответственно. После регидратации в течение 20 мин клетки во всех случаях восстанавливали объем до 85% от исходного. Достоверное различие зафиксировали в распределении ЛК в 1 М NaCl и 0,75 М NaCl, а его отсутствие – в 0,5 М NaCl. Визуально ЛК выглядели уплотненными образованиями в центре клетки.

Таким образом, инкубация в гипертонических растворах и последующая регидратация влияют на объемные изменения АК и пространственное расположения ЛК в них, что, возможно, оказывает стимулирующий эффект на синтез гормонов.

It has been shown that post-thaw basal level of hormone secretion of adrenocorticocytes (ACs) from frozen-thawed fragments of adrenal organotypic cultures increased. Since the cells during cryopreservation are subjected to the effect of hyperosmotic salt solutions and cryoprotective agents this may provoke the changes in the shape and volume of cells, as well as affect hormone-synthesizing function of ACs. We supposed that this is the result of approaching the precursor of steroid hormones, cholesterol, enclosed in lipid drops (LDs) to the site of synthesis on mitochondria due to volumetric changes of ACs caused by cryopreservation factors.

The research aim was to investigate the effect of AC volumetric changes caused by hypertonic solutions and following rehydration on spatial location of LDs in cells.

ACs were derived by enzymatic method from the adrenal cortex of mature rats. LDs were identified in cells by means of Nile red (NR) fluorescent dye possessing a wide emission spectrum of 450–800 nm (red spectrum is indicator of lipids dissolved in cytoplasm and membranes and yellow one for lipids in LDs). Adhered on collagen and NR stained cells were treated with hypertonic solutions of 1 M NaCl, 0.75 M NaCl and 0.5 M NaCl. Isotonia was restored by adding of hypertonic medium 199 with propidium iodide to visualize dead cells. Cell diameters were measured in transmitted light and distribution of LDs was examined by means of fluorescent microscopy using Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss) and the software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

The cells with the diameter of 13–18.5 μm were used for calculations. The study of cell volume ratio V/V_0 has shown that in 1 M NaCl solution the cell volume decreased down to 57% of initial volume, down to 60% in 0.75 M NaCl, and down to 62.3% in 0.5 M NaCl. Analysis of NR fluorescence revealed that distribution of LDs also reduced in the volume down to 62, 65 and 67%, correspondingly. After rehydration in all the cases the cells recovered the volume up to 85% of initial one during 20 min. Statistically significant difference was found in distribution of LDs in 1 M NaCl and 0.75 M NaCl and its absence in 0.5 M NaCl. Visually LDs looked like condensed formations in cell centre.

Thus incubation in hypertonic solutions and following rehydration affect volumetric changes of ACs and spatial location of LDs in them, that probably renders a stimulating effect on hormone synthesis.