

Влияние криопротекторов ДМСО, 1,2-пропандиола и криовоздействия на чувствительность митохондриального потенциала одиночных гепатоцитов к регуляции фенилэфрином при оценке флуоресцентным методом

М.Ю. МАЛЮКИНА, Н.С. КАВОК, И.А. БОРОВОЙ

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Influence of DMSO, 1,2-Propanediol Cryoprotectants and Cryoexposure on Sensitivity of Single Hepatocyte Mitochondrial Potential to Regulation with Phenylephrine Assessed by Fluorescent Method

M.YU. MALYUKINA, N.S. KAVOK, I.A. BOROVY

Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Методом микрофлуориметрии одиночных клеток по интенсивности флуоресценции агрегатов зонда JC-1 оценивали агонист-индуцированные изменения трансмембранного потенциала митохондрий гепатоцитов крыс до и после криовоздействия. Криоконсервацию клеток осуществляли методом ступенчатого замораживания в жидком азоте в присутствии 10% ДМСО или 10% 1,2-пропандиола. Было показано, что низкомолекулярные криопротекторы в данных концентрациях не оказывают влияния на митохондриальный потенциал при кратковременной инкубации с клетками (1 ч) с последующей их отмывкой. Однако после криовоздействия отмечалось снижение потенциала митохондрий гепатоцитов ($80 \pm 6\%$ от контроля) при использовании ДМСО в качестве криопротектора, в клетках, криоконсервированных с 1,2-пропандиолом, агрегаты красителя не обнаруживались.

Согласно данным литературы и результатам собственных исследований воздействие криозащитных веществ в более низких концентрациях (менее 10%) может приводить к изменениям в механизмах регуляции трансмембранных потенциалов клетки. В настоящем исследовании было установлено, что кратковременная инкубация изолированных гепатоцитов в присутствии 2 и 8% ДМСО с последующим отмыванием криопротектора не влияет на митохондриальный потенциал. Однако, в отличие от контроля, быстрый (к 15 мин эксперимента) стимулирующий эффект фенилэфрина (10^{-5} М) на образование j-агрегатов (гормон-индуцируемое повышение интенсивности флуоресценции агрегатов на 30%) в митохондриях гепатоцитов на фоне воздействия криопротектора не обнаруживался. Тест на чувствительность потенциала к регуляции фенилэфрином был также использован для оценки восстановления митохондриальной функции в гепатоцитах после криовоздействия. Ответ на краткосрочное гормональное воздействие также не регистрировался. Полученные данные указывают, что, по-видимому, после воздействия криопротектора и криоконсервации для полного восстановления клеточных функций и чувствительности к регуляторным воздействиям необходим определенный лаг-период.

Agonist-induced changes of rat hepatocyte transmembrane mitochondrial potential prior to and after the cryoexposure were evaluated by fluorescence intensiveness of JC-1 probe aggregates obtained with single cell microfluorimetry method. The cells were cryopreserved by stepwise freezing in liquid nitrogen with either 10% DMSO or 10% 1,2-propane diol. It was shown that low-molecular cryoprotectants in these concentrations did not affect the mitochondrial potential after short-term incubation with cells (1 hour) and their following washing. However, after cryoexposure we observed the decrease of hepatocyte mitochondrial potential ($80 \pm 6\%$ of the control) if using DMSO as cryoprotectant, and in the cells cryopreserved with 1,2-propane diol no dye aggregates were found.

According to the literature data and the results of our own investigations the effect of cryoprotective substances in lower concentrations (below 10%) may lead to the changes in regulation mechanisms of transmembrane cell potentials. This investigation allowed to establish that a short-term incubation of isolated hepatocytes with 2 and 8% DMSO with the following removing of cryoprotectant did not affect the mitochondrial potential. However, in contrast to the control, a rapid (to the 15th minute of experiment) stimulating effect of phenylephrine (10^{-5} M) on the formation of j-aggregates (hormone-induced increase of aggregate fluorescence intensiveness by 30%) in hepatocyte mitochondria on the background of cryoprotectant exposure was not found. Test for sensitivity of potential to the regulation by phenylephrine was also used for assessment of mitochondrial function restoration in hepatocytes after cryoexposure. The response to a short-term hormonal effect was not observed too. The obtained data point that the occurrence of certain lag period after influence of cryoprotectant and cryopreservation is obviously necessary for a complete restoration of cell functions and their sensitivity to the regulatory effects.