

Исследование трансмембранных потенциалов и митохондриальной активности нервных клеток Mpf после их криоконсервации

Г.И. Морозова¹, О.А. Лопатина², Е.Л. Фирсова², Р.Я. Подчерняева²

¹Российский университет дружбы народов, г. Москва

²ФГБУ «НИИ вирусологии им Д. Ивановского» Минздравсоцразвития России, г. Москва

Study of Transmembrane Potentials and Mitochondrial Activity of Mpf Nerve Cells After Their Cryopreservation

G.I. MOROZOVA¹, O.A. LOPATINA², E.L. FIRSOVA², R.YA. PODCHERNYAEVA²

¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

²D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology of the Ministry of Health Care and Social Development, Moscow, Russia

После криоконсервации и в процессе восстановления физиологических условий в клетках могут возникать повреждения различного характера и разной степени выраженности, причинами которых могут быть изменения метаболических процессов, повышение проницаемости мембран, изменение энергетического состояния клетки. Эффективность деконсервации определяется способностью восстановления исходных свойств клеток. Оценка жизнеспособности клеточных культур, в том числе по состоянию мембран митохондрий, является одной из сложных задач.

В данной работе продемонстрированы возможности флуоресцентного зонда-катиона ДСМ для оценки состояния трансмембранных потенциалов (ТМП) и митохондриальной активности (МА) в нервных клетках мозга хорька (Mpf) в процессе размораживания. С целью выбора контрольных клеток в адекватном физиологическом (энергетическом) состоянии клетки исследовали через различные интервалы времени после их размораживания (3–24 ч). Культуры клеток Mpf окрашивали добавлением физиологического раствора с ДСМ к суспензии клеток до оптимальной концентрации 2,5 мкМ ДСМ и инкубировали с зондом при температуре 20 или 37°C в течение 40 или 20 мин соответственно. Препараты живых клеток (на стеклах) исследовали на микрофлуориметре ЛЮАМ И-2 (ЛОМО). Величины уровня ТМП в каждой клетке монослоя оценивали по цвету и интенсивности флуоресценции зонда ДСМ в митохондриях [Добрецов Г.Е., 1985]. Установлено, что интенсивность флуоресценции ДСМ в митохондриях клеток Mpf зависит от времени их культивирования в течение суток после размораживания: в течение 1–3 ч от начала культивирования клеток сохраняется низкий уровень ТМП. Наиболее высокий уровень ТМП, сопряженный, прежде всего, с энергизацией митохондрий, наблюдается только через 12 ч и достигает максимума через 24 ч, при этом энергетический потенциал клетки сохраняется в течение 3–4 пассажей после деконсервации. Эта динамика ТМП в клетках может отражать изменения свойств разных мембран, а именно их вязкости и (или) ионной проницаемости на фоне температурного скачка в среде после размораживания.

After cryopreservation and during the restoration of physiological conditions in cells there can be damages of various character and different degree of manifestation which likely caused by the changes in metabolic processes, increase of permeability of membranes, change of cell energetic conditions. Efficiency of freeze-thawing is determined by ability to recover initial properties of cells. The assessment of viability of cell cultures, including the state of mitochondria membranes is one of difficult tasks.

In this work the possibilities of fluorescent probe cation DSM for an assessment of the state of transmembrane potentials (TMPs) and mitochondrial activity (MA) in brain nerve cells of a ferret (Mpf) during thawing are shown. To select the control cells with an adequate physiological (energetic) state the cells were investigated in different time intervals after their thawing (3–24 hrs). Mpf cell cultures were stained by adding physiological solution with DSM probe to cell suspension up to optimal concentration of 2.5 mM DSM and incubated with a probe at either 20 or 37°C during 40 or 20 min, respectively. Preparations of living cells (on glass) were investigated with microfluorimeter LUMAM I-2 (LOMO). The values of TMPs level in each cell of a monolayer were estimated by color and intensity of fluorescence of DSM probe in mitochondria [Dobretsov G.E., 1985]. Fluorescence intensity of DSM probe in mitochondria of Mpf cells has been established to depend on time of their culturing within 24 hrs after thawing: within 1–3 hrs from the beginning of cell culturing a low TMPs level is kept. The highest level of TMPs which is first of all related to mitochondrial energization, is achieved only in 12 hrs and reaches the maximum in 24 hrs, thus the energy potential of a cell is maintained during 3–4 passages after freeze-thawing. This TMPs dynamics in cells can reflect the changes in properties of different membranes, namely: their viscosity and (or) ionic permeability on the background of temperature leap in the medium after thawing.