

УДК 547.569.2:611.36.018.1:577.336

М.Ю. Малюкина*, Н.С.Кавок, И.А.Боровой, Е.А. Аверченко

Чувствительность трансмембранного потенциала митохондрий гепатоцитов к регуляции фенилэфрином после экспозиции в растворах диметилсульфоксида и 1,2-пропандиола, а также замораживания-отогрева

UDC 547.569.2:611.36.018.1:577.336

M.Yu. Malyukina*, N.S. Kavok, I.A. Borovoy, E.A. Averchenko

Sensitivity of Hepatocyte Mitochondria Transmembrane Potential to Regulation with Phenylephrine after Exposure in Dimethyl Sulfoxide and 1,2-Propanediol Solutions, and Freeze-Thawing

Реферат: Методом микрофлуориметрии одиночных клеток оценивали интенсивность флуоресценции агрегатов зонда JC-1 и агонист-индуцированные изменения трансмембранного потенциала митохондрий гепатоцитов крыс до и после замораживания-отогрева. Показано, что экспозиция клеток в растворах 10% диметилсульфоксида (ДМСО) или 1,2-пропандиола (1,2-ПД) в течение часа и последующая отмывка не приводили к уменьшению флуоресценции агрегатов красителя. После замораживания-отогрева клеток в присутствии данных криопротекторов (2-ступенчатое замораживание до температуры жидкого азота, отогрев и отмывка криопротекторов) отмечено снижение интенсивности флуоресценции агрегатов красителя до $(83 \pm 6)\%$ от контроля в случае использования ДМСО, в случае 1,2-ПД этот показатель составил менее 10%. В отличие от свежеевыделенных клеток, в которых отмечалось повышение интенсивности флуоресценции агрегатов на 30% в ответ на краткосрочную стимуляцию фенилэфрином (10^{-5} М), в гепатоцитах, инкубированных в растворах ДМСО, динамика ответа нарушалась. После замораживания-отогрева клеток отмечено частичное восстановление их чувствительности к действию гормона, однако ответ регистрировался только при повышении концентрации гормона до 10^{-4} М.

Ключевые слова: замораживание-отогрев, гепатоциты, диметилсульфоксид, 1,2-пропандиол, зонд JC-1, митохондрии.

Реферат: Методом мікрофлуориметрії поодиноких клітин оцінювали інтенсивність флуоресценції агрегатів зонда JC-1 та агоніст-індуковані зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій гепатоцитів щурів до та після заморожування-відігрівання. Показано, що експозиція клітин у розчинах 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) або 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) впродовж години і подальше відмивання не призводило до зменшення флуоресценції агрегатів барвника. Після заморожування-відігрівання клітин в присутності цих криопротекторів (2-ступінчасте заморожування до температури рідкого азоту, відігрів і відмивання криопротекторів) встановлено зниження інтенсивності флуоресценції агрегатів барвника до $(83 \pm 6)\%$ від контролю у випадку використання ДМСО, у випадку 1,2-ПД цей показник був менше 10%. На відміну від свіжовиділених клітин, в яких відмічено підвищення інтенсивності флуоресценції агрегатів на 30% у відповідь на короткострокову стимуляцію фенілефріном (10^{-5} М), в гепатоцитах, інкубованих у розчині ДМСО, динаміка відповіді порушувалась. Після заморожування-відігрівання клітин спостерігали часткове відновлення їх чутливості до дії гормону, але відповідь реєстрували лише при підвищенні концентрації гормону до 10^{-4} М.

Ключові слова: заморожування-відігрівання, гепатоцити, диметилсульфоксид, 1,2-пропандіол, зонд JC-1, мітохондрії.

Abstract: Intensity of JC-1 probe aggregates fluorescence and agonist-induced changes in mitochondria transmembrane potential of rat hepatocytes prior to and after freeze-thawing were assessed by single-cell microfluorimetry. It was shown that incubation of the cells in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1,2-propanediol (1,2-PD) solutions within an hour and the following washing decreased the fluorescence of dye aggregates. After freeze-thawing of cells with the cryoprotectants (2-step freezing down to the temperature of liquid nitrogen, thawing and washing-out the cryoprotectants) the intensity of dye aggregates fluorescence decreased down to $83 \pm 6\%$ of control in case of DMSO, and in the case of 1,2-PD the index made less than 10%. Unlike the fresh cell suspension where the rise of aggregates fluorescence intensity by 30% was found in response to short-term stimulation with phenylephrine (10^{-5} M) the hepatocyte suspension incubated in DMSO solution showed no response. After freeze-thawing of cells we revealed a partial recovery of their sensitivity to the hormone effect, but the response was recorded only after increasing the hormone concentration up to 10^{-4} M.

Key words: freeze-thawing, hepatocytes, dimethyl sulfoxide, 1,2-propanediol, JC-1 probe, mitochondria.

Отдел нанокристаллических материалов,
Институт скинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
пр. Ленина, 60, г. Харьков, Украина 61001;
тел.: +38-057-341-01-54,
электронная почта: ogrammal@mail.ru

Поступила 08.11.2011
Принята в печать 23.01.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 143–151.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

* To whom correspondence should be addressed:
60, Lenin avenue, Kharkov, Ukraine 61001;
tel.:+380 57 341 0154,
e-mail: ogrammal@mail.ru

Received November 8, 2011
Accepted January 23, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 2. – P. 143–151.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Для оптимизации условий криоконсервирования необходимы высокочувствительные методы оценки состояния клеток до и после замораживания-отогрева, в частности это методы, позволяющие проводить оценку на уровне одиночных клеток такой гетерогенной популяции, как первичные гепатоциты [6, 17]. Митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) часто используется как маркер митохондриальной активности и жизнеспособности клеток, а также как один из критериев активации апоптоза клетки [2, 20]. Поэтому данный параметр может характеризовать не только митохондриальную функцию клетки, но и ее состояние в целом.

Ранее было показано [1], что суспендирование митохондрий с некоторыми криопротекторами нарушало функционирование органелл вследствие ингибирования НАД-Н – дегидрогеназного участка дыхательной цепи [7]. При этом снижалась активность переносчиков электронов и протонов внутренней мембраны митохондрий и окислительно-восстановительных процессов дыхательной цепи. На одиночных гепатоцитах было установлено, что клетки с высоким митохондриальным потенциалом менее устойчивы к замораживанию-отогреву по сравнению с клетками с умеренно сниженным митохондриальным потенциалом [17]. Механизм обнаруженного эффекта не был описан, однако была выявлена взаимосвязь между гетерогенностью биоэнергетического фенотипа клеток в популяции и результатами замораживания-отогрева.

Микроскопия с использованием флуоресцентных зондов позволяет изучать митохондриальную функцию на уровне одиночных клеток, что важно при исследовании механизмов, которые определяют индивидуальные особенности клеточной реакции на регуляторные воздействия. Наиболее распространенным зондом в исследованиях митохондриальных функций является катионный карбоцианиновый краситель JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианина йодид). С увеличением мембранного потенциала краситель JC-1 накапливается в митохондриях и формирует концентрационно зависимые J-агрегаты, что сопровождается сдвигом эмиссии флуоресценции (возбуждение при 488 нм) с зеленого цвета, характерного для мономеров красителя (527 нм), к красному (595 нм), свойственному J-агрегатам [12].

Оценка влияния некоторых гормонов на митохондрии в составе клетки методом микрофлуориметрии позволяет судить не только о состоянии митохондриальной функции, но и о целостности механизмов внутриклеточной передачи сигналов [18]. Данный метод позволяет визуализировать и количественно оценить накопление J-агрегатов в митохондриях, а также выявить достаточно быстрые

Optimization of cryopreservation conditions requires high-sensitive methods for assessment of cell state before and after freeze-thawing, in particular the methods enabling the evaluation at the level of single cells, e.g. such heterogenic population as primary hepatocytes [6, 17]. Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) is often used as a marker of mitochondrial activity and cell viability as well as one of the criteria of cell apoptosis activation [2, 20]. Therefore this parameter may characterize both mitochondrial function of a cell and its general state.

Previously it was reported [1] that introduction of some cryoprotectants to mitochondria suspension disordered the function of organelles due to inhibition of NAD-H dehydrogenase area of respiratory chain [7]. The activity of electron and proton carriers of mitochondria inner membrane and redox processes in respiratory chain were decreased thereat. The studies in single hepatocytes allowed to establish that the cells with a high mitochondrial potential were less resistant to freeze-thawing if compared with the cells with moderately decreased mitochondrial potential [17]. The mechanism of the discovered effect has not been described, however, the correlation between heterogeneity of bioenergetic cell phenotype in the population and the results of freeze-thawing was revealed.

Microscopy with fluorescent probes enables to study mitochondrial function in single cells that is important during investigation of mechanisms determining individual peculiarities of cell response to regulatory impacts. The most often used probe in the studies on mitochondrial functions is the cationic carbocyanine dye JC-1 (5,5',6,6'-tetrachlore-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazole-carbocyanine-iodide). Increasing of membrane potential results in accumulation of JC-1 dye in mitochondria and formation of concentration-dependent J-aggregates that is accompanied by the shift of fluorescence emission (excitation at 488 nm) from green color peculiar to dye monomers (527 nm) to the red one (595 nm) characteristic for J-aggregates [12].

Assessing the effect of some hormones on mitochondria within a cell by microfluorimetry enables to estimate both state of mitochondrial function and integrity of mechanisms of intracellular signaling [18]. This method allows to visualize and estimate quantitatively the accumulation of J-aggregates in mitochondria as well as to reveal quite rapid changes in aggregates fluorescence under effect of regulatory signal. Mitochondria are the indirect targets of adrenergic agonists [9, 13, 14]. Mechanisms of mitochondrial processes activation by these hormones has been properly studied [15]. Physiological effect of adrenergic agonists at the level of mitochondria consists in the acceleration of reactions of tricarboxylic acid cycle (TAC)



изменения флуоресценции агрегатов под действием регуляторного сигнала. Митохондрии являются опосредованной мишенью адреноагонистов [9, 13, 14]. Механизм активации митохондриальных процессов этими гормонами хорошо изучен [15]. Физиологическое действие адреноагонистов на уровне митохондрий заключается в ускорении реакций цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) [21], усилении интенсивности дыхания [16] и образовании АТФ [22]. В связи с этим оценка ответа на регуляцию агонистами после экспозиции в растворах криопротекторов, а также после замораживания-отогрева в присутствии криопротекторов с последующим удалением криопротектора позволит установить функциональную сохранность митохондрий.

Ранее было установлено, что при использовании потенциал-чувствительных флуоресцентных зондов H-510 и JC-1 кратковременная инкубация изолированных гепатоцитов в течение часа в среде с 10% диметилсульфоксида (ДМСО) приводила к снижению клеточного и митохондриального потенциалов [3]. Также было показано, что под влиянием ДМСО (начиная с 2%-й концентрации в суспензии) чувствительность потенциалов изолированных гепатоцитов к регуляторным воздействиям изменялась.

Целью данного исследования было оценить изменения $\Delta\psi_m$ (по интенсивности флуоресценции J-агрегатов) на различных этапах криоконсервирования гепатоцитов в присутствии криопротекторов ДМСО и 1,2-пропандиола (1,2-ПД), а также чувствительность клеток к гормональной регуляции альфа-адреноагонистом фенилэфрином.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В работе использовали изолированные гепатоциты белых беспородных крыс-самцов 3-месячного возраста. Клетки выделяли неферментативным методом [5] с применением перфузионной среды, содержащей 2 мМ ЭДТА, жизнеспособность клеток оценивали по окраске трипановым синим; для гепатоцитов после выделения она составляла около 90%.

В работе использовали инкубационные растворы и среды производства ФУПП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН, сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота (ООО «Биолот», Россия).

[21], reinforcement of respiration intensity [16] and formation of ATP [22]. Thus, the assessment of response to agonists regulation after incubation in cryoprotectant solutions as well as after freeze-thawing in the presence of cryoprotectants with the following removal of cryoprotectant would allow to determine the functional integrity of mitochondria.

Previously it has been established using potential-sensitive fluorescent probes H-510 and JC-1 that short-term incubation of isolated hepatocytes during an hour in the medium with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) induced the decrease in cell and mitochondrial potentials [3]. Also it has been shown that under DMSO effect (starting from 2% concentration in suspension) the sensitivity of potentials in isolated hepatocytes to the regulation was changed.

The research aim was to evaluate the changes of $\Delta\psi_m$ (by intensity of J-aggregates fluorescence) at various stages of hepatocytes cryopreservation in presence of DMSO and 1,2-propanediol (1,2-PD) as well as sensitivity of cells to hormonal regulation by alpha-adrenoagonist phenylephrine.

Materials and methods

The experiments were conducted according to the regulations of the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The investigations were conducted in isolated hepatocytes of 3 month-old white breedless male rats. The cells were isolated by non-enzymatic method [5] using perfusion medium containing 2mM EDTA. Cell viability was assessed by trypan blue staining, for hepatocytes after isolation it made about 90%.

In the research we used incubation solutions and media produced by the Enterprise for the Production of Bacterial and Viral agents of the Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of the Russian Academy of Medical Sciences), fetal bovine serum (Biolot Ltd, Russia).

JC-1 probe was synthesized at the Laboratory of nanodisperse materials of the Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkov). Stock solution (1mM) of the studied probe in DMSO was diluted to the required concentration just before the experiment.

The cells (5×10^5 cells/ml) were stained with JC-1 probe (10^{-6} M) at 22°C for an hour in Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum .

Observation for luminescent objects and their photorecording were performed with luminescent microscope Olympus IX71 (Japan) and digital camera Olympus C-5060 (Japan). The images were analyzed using softwares DP-soft 5.0 (Olympus, Japan) and Photoshop (Adobe, USA). Cell images were processed



Зонд JC-1 синтезировали в лаборатории нанодисперсных материалов ИСМА НАН Украины (г. Харьков). Исходный раствор (1 мМ) исследуемого зонда в ДМСО разводили до необходимой концентрации непосредственно перед экспериментом.

Клетки (5×10^5 кл/мл) окрашивали зондом JC-1 (10^{-6} М) в среде «Игла» с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки теленка при 22°C в течение часа.

Наблюдение за люминесцирующими объектами и их фотографирование осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа «Olympus IX71» (Япония) и цифровой камеры «Olympus C-5060» (Япония). Для анализа изображений применяли программы «DP-soft 5.0» («Olympus», Япония) и «Photoshop» («Adobe», США). Изображения клеток гистограммировали и измеряли уровни серого (*gray level*) пикселей, затем относили значения уровней серого для клеток после каких-либо воздействий (F_{exp}) к уровням для контрольных клеток (F_c). Все данные по флуоресценции приведены в процентах по отношению к контролю [3]. Данные обрабатывали при помощи программы «Origin 6.1» («Origin Lab Corporation», США), учитывая фоновый шум. При расчетах использовали данные в среднем от 10 клеток из каждого образца.

Интенсивность флуоресценции агрегатов (митохондриальный потенциал) оценивали после различных воздействий на клетки.

1. Влияние экспозиции в течение часа в среде диспергирования (280 мМ сахарозы; 5 мМ KCl; 0,8 мМ KH_2PO_4 ; 0,8 мМ MgSO_4 ; 1,2 мМ CaCl_2 ; 20 мМ Hepes-NaOH; pH 7,4) с 20% эмбриональной сыворотки теленка и 10% ДМСО или 1,2-ПД, а также в среде «Игла» с 10% эмбриональной сыворотки теленка и 2 или 8% ДМСО.

2. Влияние экспозиции и удаления криопротекторов.

3. Влияние замораживания-отогрева гепатоцитов: 1 ч экспозиции в среде диспергирования с 10% ДМСО или 1,2-ПД, замораживание в два этапа до -196°C [4]; отогрев на водяной бане при 38°C , последующая отмывка от криопротектора.

4. Стимуляция фенилэфрином (10^{-4} М и 10^{-5} М). Гормон вносили в образцы после окрашивания JC-1. Интенсивность флуоресценции оценивали в течение 30 мин после внесения гормона (контролем служили клетки без гормона). На основании ранее полученных данных для некоторых экспериментов была выбрана контрольная точка – 20 мин, когда ответ свежeweделенных клеток на стимуляцию был максимальным.

Для удаления криопротектора во всех случаях к суспензии добавляли 5-кратный объем среды диспергирования, содержащей дополнительно 0,5 М сахарозы, центрифугировали и осадок ресу-

and gray levels of pixels were measured, then the gray level values of cells after any exposures (F_{exp}) were normalized by the values of control cells (F_c). All the data on fluorescence are presented in percentage of the control [3]. The data were processed by Origin 6.1 software (Origin Lab Corporation, USA) considering background noise. For calculations we used in average the data of 10 cells from each sample.

Intensity of aggregates fluorescence (mitochondrial potential) was assessed after different effects onto cells.

1. Effect of incubation within an hour in dispersion medium (280 mM sucrose; 5 mM KCl; 0.8 mM KH_2PO_4 ; 0.8 mM MgSO_4 ; 1.2 mM CaCl_2 ; 20 mM Hepes-NaOH; pH 7.4) with 20% fetal bovine serum and 10% DMSO or 1,2-PD as well as in Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 2 or 8% DMSO.

2. Effect of incubation with cryoprotectants and their removal.

3. Effect of hepatocytes freeze-thawing: 1 hour exposure in dispersion medium with 10% DMSO or 1,2-PD, freezing by 2 stages down to -196°C [4]; thawing in water bath at 38°C , and the following washing-out the cryoprotectant.

4. Stimulation by phenylephrine (10^{-4} and 10^{-5} М), which was introduced into the samples after staining with JC-1. Fluorescence intensity was assessed during 30 min after introduction of hormone (control was the cell suspension without hormone). Due to the previous data for some experiments we selected 20 min as a control point when response of fresh cell suspension to stimulation was maximal.

In all the cases to remove cryoprotectant the suspension was diluted 5-fold by dispersion medium containing additionally 0.5 M sucrose, centrifuged and the sediment was resuspended in dispersion medium with 20% serum.

The controls were the cell suspensions in corresponding media without DMSO, 1,2-PD and not subjected to freeze-thawing.

The data were statistically processed using Statistica v 5.0 software (StatSoft, USA) using Student's t-criterion. The differences were considered as significant ones at $p < 0.05$.

Results and discussion

According to the reported data [10, 11] as well as the findings of our research [3] the ion-transport functions of plasma membrane are disordered after the incubation of cells in the solutions with 2 and 8% DMSO. It was not revealed whether disordered functions were recovered after the cryoprotectant removal. Our experiments have shown that cell incubation in 2 and 8% DMSO solutions during an hour resulted in decrease of JC-1 dye J-aggregates fluorescence, and



пендировали в среде диспергирования с добавлением 20% сыворотки.

Контролем служили клетки, находившиеся в соответствующих средах без ДМСО, 1,2-ПД и не подвергавшиеся замораживанию-отогреву.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы «Statistica v 5.0» («StatSoft», США) и t-критерия Стьюдента. Достоверно различавшимися считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно данным литературы [10, 11], а также результатам наших собственных исследований [3] ион-транспортные функции плазматической мембраны нарушаются после пребывания клеток в растворах с концентрациями ДМСО 2 или 8%. Не было показано, восстанавливаются ли нарушенные функции после удаления криопротектора. Наши эксперименты показали, что инкубация клеток в растворах с 2 или 8% ДМСО в течение часа действительно приводила к снижению уровня флуоресценции J-агрегатов красителя JC-1, а значит – митохондриального потенциала по сравнению с интактными клетками [3]. Однако удаление криопротектора из клеток после инкубации гепатоцитов в присутствии ДМСО приводило к восстановлению уровня флуоресценции J-агрегатов до $(93,48 \pm 7,00)$ и $(93,79 \pm 6,52)\%$ относительно контроля для 2 и 8% растворов ДМСО соответственно.

Убедившись в том, что митохондриальная функция после экспозиции в растворе с низкой концентрацией ДМСО и его удаления восстанавливается, мы взяли растворы ДМСО и 1,2-ПД в более высоких концентрациях (10%), которые используются для криоконсервирования, и среду такого состава, который используется при замораживании. Экспозиция в данной среде с 10% ДМСО или 1,2-ПД (рис. 1, столбцы 1, 2) не привела к падению флуоресценции агрегатов по сравнению с контролем, как и последующая отмывка от криопротекторов (рис. 1, столбцы 3, 4). Замораживание-отогрев суспензии гепатоцитов в присутствии 10% ДМСО с последующей отмывкой вызывало некоторое снижение интенсивности флуоресценции J-агрегатов по сравнению с контролем до $(83 \pm 6)\%$ (рис. 1, столбец 5). Флуоресценция агрегатов после замораживания-отогрева клеток в присутствии 1,2-ПД с последующей отмывкой составила менее 10% (рис. 1, столбец 6). Таким образом, ДМСО оказался более эффективным криопротектором в данных условиях по сравнению с 1,2-ПД. В дальнейших экспериментах 1,2-ПД не использовали.

Оценка митохондриальной активности по накоплению агрегатов JC-1 не исключает наличия латентных повреждений в механизмах регуляции на уров-

thus mitochondrial potential if compared to intact cells [3]. However, removal of cryoprotectant out of cells after incubation of hepatocytes with DMSO led to the recovery of J-aggregates fluorescence level upto 93.48 ± 7.00 and $(93.79 \pm 6.52)\%$ regarding the control for 2 and 8% DMSO solutions, respectively.

Afterwards we have ascertained that mitochondrial function is recovered after exposure in solution with low DMSO concentration and its removal we used DMSO and 1,2-PD solutions of higher concentrations (10%) which are applied for cryopreservation and medium of the composition used for freezing. Exposure in this medium with 10% DMSO or 1,2-PD (Fig. 1, column 1 and 2) did not cause the decrease in aggregates fluorescence comparing with the control as well as the following washing-out the cryoprotectants (Fig. 1, column 3 and 4). Freeze-thawing of hepatocyte suspension in the presence of 10% DMSO with the following washing induced insignificant reduction in intensity of J-aggregates fluorescence if compared to

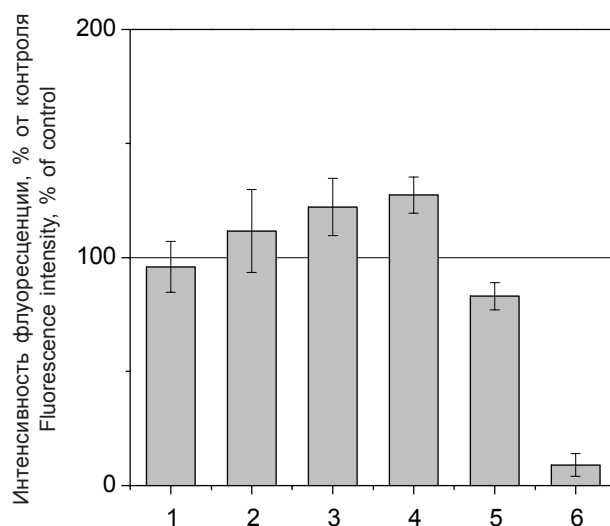


Рис. 1. Флуоресценция J-агрегатов зонда в митохондриях гепатоцитов после: 1 – экспозиции в среде с 10% ДМСО; 2 – экспозиции в среде с 10% 1,2-ПД; 3 – экспозиции в среде с 10% ДМСО и последующей отмывки; 4 – экспозиции в среде с 10% 1,2-ПД и последующей отмывки; 5 – замораживания-отогрева в присутствии 10% ДМСО; 6 – замораживания-отогрева в присутствии 10% 1,2-ПД; контроль – находившиеся в соответствующих средах без ДМСО, 1,2-ПД и не подвергавшиеся замораживанию-отогреву – принят за 100%.

Fig. 1. Fluorescence of J-aggregates of probe in mitochondria of hepatocytes after: 1 – exposure in medium with 10% DMSO; 2 – exposure in the medium with 10% 1,2-PD; 3 – exposure in the medium with 10% DMSO and the following washing; 4 – exposure in the medium with 10% 1,2-PD and the following washing; 5 – freeze-thawing with 10% DMSO; 6 – freeze-thawing with 10% 1,2-PD; control – cells, being in appropriate media without DMSO, 1,2-PD and not exposed to freeze-thawing (assumed as 100%).

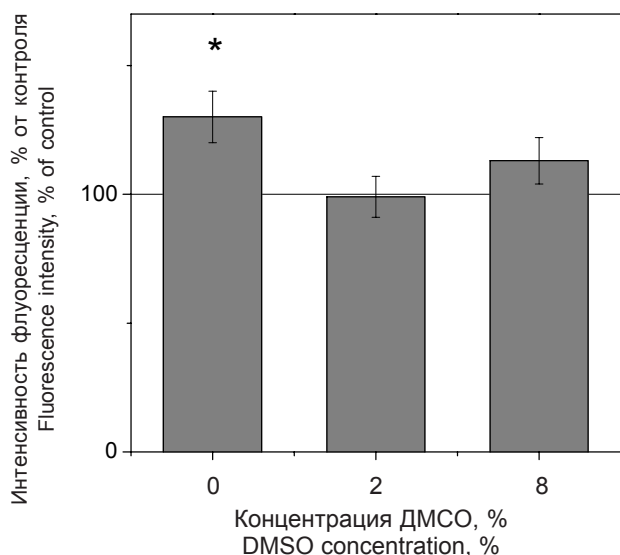


Рис. 2. Флуоресценция J-агрегатов зонда в митохондриях через 20 мин после внесения фенилэфрина (10^{-5} М) в суспензию гепатоцитов, подвергнутых часовой инкубации в растворах криопротектора ДМСО и последующей отмывке; контроль – клетки без инкубации в ДМСО и без внесения фенилэфрина – принят за 100%; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Fig. 2. Fluorescence of J-aggregates of probe in mitochondria 20 min later introduction of phenylephrine (10^{-5} M) into hepatocyte suspension subjected to one hour incubation in solutions of DMSO cryoprotectant and the following washing; control – the cells without incubation with DMSO and without introduction of phenylephrine (assumed as 100%); * – $p < 0.05$ relative to the control.

не восприятия регуляторного сигнала или формирования клеточного ответа. Более полно судить о восстановлении функции митохондрий после воздействия криопротекторов и низких температур позволяет оценка чувствительности митохондриального звена к регуляции при воздействии агониста на клетки.

Ранее было установлено, что 30-минутная инкубация гепатоцитов в среде с 2% ДМСО приводит к снижению способности митохондрий к фенилэфрин-стимулированному накоплению агрегатов [3]. Как отмечено выше, после удаления ДМСО из клеток способность формировать агрегаты в митохондриях сохранялась, а уровень флуоресценции достоверно не отличался от контроля. Однако ответ на стимуляцию фенилэфрином (10^{-5} М) после инкубации в растворах 2 и 8% ДМСО и последующей отмывки не наблюдался в отличие от образца без ДМСО ($p < 0,05$) (рис. 2), что может свидетельствовать о нарушениях в механизмах передачи сигнала в митохондрии и регуляции потенциальных процессов – мишеней адреноагонистов: функционировании ЦТК [21], дыхания [16] или образования АТФ [22].

the control down to (83 ± 6)% (Fig. 1, column 5). Fluorescence of aggregates after freeze-thawing of cells in the presence of 1,2-PD with the following washing made less than 10% (Fig. 1, column 6). Thus DMSO appeared to be more effective cryoprotectant in these conditions unlike 1,2-PD. In further experiments 1,2-PD was not used.

Assessment of mitochondrial activity by accumulation of JC-1 aggregates does not exclude the presence of latent damages in trigger mechanisms at the level of perception of regulatory signal or formation of cell response. The evaluation of mitochondrial link sensitivity to the regulation implemented by agonist effect on the cells allow to estimate more profoundly the recovery of mitochondrial functions after cryoprotectant and low temperature effects.

It was found recently that 30-min incubation of hepatocytes in the medium with 2% DMSO caused the decrease in mitochondrial potential to phenylephrine-stimulated accumulation of aggregates [3]. As it was mentioned above, after removal of DMSO from cells the ability to form aggregates in mitochondria was preserved and the fluorescence level did not significantly differ from the control. However, no response to stimulation with phenylephrine (10^{-5} M) after incubation in 2 and 8% DMSO solutions and the following washing was observed unlike the samples without DMSO ($p < 0.05$) (Fig. 2) attesting the disorders in the mechanisms of signal transfer into mitochondria and regulation of potential processes, target of adrenoagonists: TAC [21], respiration [16] or ATP formation [22].

After freeze-thawing of cell suspension with 10% DMSO and washing we have noted no increase in fluorescence intensity as a response to introduction of 10^{-5} M phenylephrine (Fig. 3). After introduction of hormone into fresh hepatocyte suspension the fluorescence intensity increased, reached its maximum values to the 20th minute and later smoothly decreased to the end of observation period (30 min). The increase of adrenoagonist concentration up to 10^{-4} M in the suspension of frozen-thawed cells induced a short-term effect: maximum fluorescence intensity was observed in 15 min after introduction of phenylephrine, and to the 20th min it sharply decreased. Presumably freeze-thawing in the specified conditions led to the lowering of sensitivity in hepatocyte adrenoreceptors manifesting in the absence of response to the introduction of 10^{-5} M phenylephrine. The response to increase of hormone concentration (10^{-4} M) probably testified that the disorders were not total. Most likely the receptor sensitivity in the cells was preserved, and increased regulator concentration provided functional response. Apparently, functional activity of all structures in mitochondria can be recovered after cryoprotectant expo-



После замораживания-отогрева клеточной суспензии в присутствии 10% ДМСО и отмывки также отсутствовал прирост интенсивности флуоресценции в ответ на внесение 10^{-5} М фенилэфрина (рис. 3). После внесения гормона в свежeweделенную суспензию гепатоцитов интенсивность флуоресценции повышалась, достигала максимума к 20-й минуте и затем плавно снижалась к концу срока наблюдения (30 мин). Увеличение концентрации адреноагониста до 10^{-4} М в суспензии замороженных-отогретых клеток вызывало кратковременный эффект: максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали через 15 мин после внесения фенилэфрина, а к 20-й минуте она резко снижалась. Вероятно, процесс замораживания-отогрева в выбранных условиях приводил к снижению чувствительности адренорецепторов гепатоцитов, что проявлялось в отсутствии ответа на внесение 10^{-5} М фенилэфрина. Ответ на увеличенную концентрацию гормона (10^{-4} М), вероятно, свидетельствовал о том, что эти нарушения не носили тотального характера. Скорее всего, в клетках сохранялась восприимчивость рецепторов, и увеличенная концентрация регулятора позволяла обеспечить функциональную реакцию. Возможно, функциональная активность всех структур митохондрий может восстановиться после воздействия криопротектора и замораживания-отогрева через некоторое время, однако для оценки данного предположения необходимо провести дополнительные исследования.

Одной из причин снижения метаболической активности и гибели гепатоцитов является окислительный стресс, которому подвергаются клетки как на этапе выделения, так и во время гипотермического хранения [8]. Не исключено, что этот фактор отвечает за возможные нарушения структур митохондрий, о которых упоминалось выше, и соответствующее снижение чувствительности митохондрий к регуляторным воздействиям фенилэфрина после инкубации в растворах ДМСО и замораживания-отогрева. Для повышения устойчивости клеток к стрессорным воздействиям при криоконсервировании на этапе, предшествующем замораживанию, в суспензию клеток вводят антиоксиданты. Stephenne X. и соавт. [19] использовали 2-часовую инкубацию суспензий гепатоцитов с антиоксидантами и, кроме того, введение антиоксидантов в среду замораживания на этапе криоконсервирования для повышения устойчивости клеток к стрессорным воздействиям. Авторы отметили улучшение митохондриальной функции в ходе криоконсервирования. В наших дальнейших исследованиях мы рассмотрим возможность использования антиоксидантных соединений для

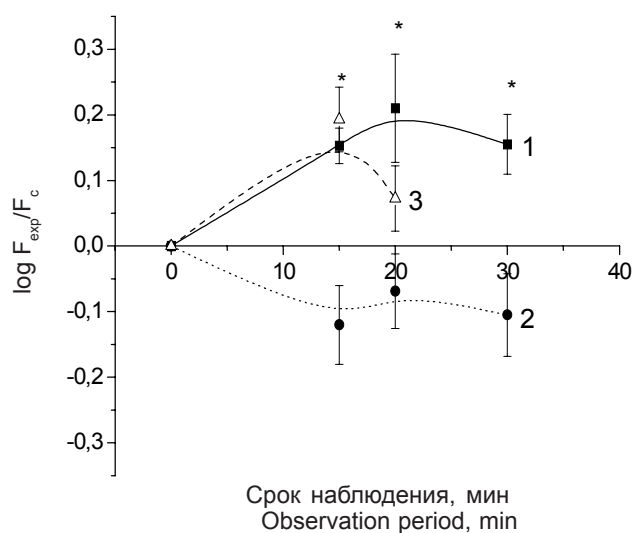


Рис.3. Флуоресценция J-агрегатов зонда в митохондриях после: 1 – внесения фенилэфрина (10^{-5} М) в суспензию, не подвергавшуюся инкубации в ДМСО и замораживанию-отогреву; 2 – внесения фенилэфрина (10^{-5} М) в суспензию, замороженную-отогретую в присутствии 10% ДМСО и отмывую; 3 – внесения фенилэфрина (10^{-4} М) в суспензию, замороженную-отогретую в присутствии 10% ДМСО и отмывую; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Fig. 3. Fluorescence of J-aggregates of probe in mitochondria after: 1 – introduction of phenylephrine (10^{-5} M) into suspension, not incubated with DMSO and not frozen-thawed; 2 – introduction of phenylephrine (10^{-5} M) into suspension, frozen-thawed with 10% DMSO and washed; 3 – after introduction of phenylephrine (10^{-4} M) into suspension, frozen-thawed with 10% DMSO and washed; * – $p < 0.05$ relative to the control.

sure and freeze-thawing after some time, but to check this suggestion the additional investigations are to be done.

One of the reasons of decrease in metabolic activity and hepatocytes death is an oxidative stress to which the cells are subjected both at the isolation stage and during hypothermic storage [8]. It is possible that this factor induces probable disorders of mitochondria structures which were mentioned above and corresponding decrease of mitochondria sensitivity to regulatory effects of phenylephrine after incubation in DMSO solutions and freeze-thawing. To raise the cell resistance to stress impacts during cryopreservation at the stages prior to freezing one use the antioxidants introduction into the suspension. Stephenne X. *et al.* [19] applied 2-hour incubation of suspension of hepatocytes with antioxidants, and, moreover, added the antioxidants into freezing medium at cryopreservation stage aiming to increase cell resistance to stress effects. The authors have noted the improvement of mitochondrial function post cryopreservation. In our future studies

коррекции обнаруженных изменений в регуляции митохондриальной активности.

Выводы

Таким образом, микрофлуориметрия одиночных гепатоцитов с использованием митохондриального зонда JC-1 показала, что экспозиция клеток в растворах 10% диметилсульфоксида или 1,2-пропандиола в течение часа и последующая отмывка не приводили к уменьшению флуоресценции агрегатов красителя. После замораживания-отогрева клеток в присутствии данных криопротекторов (2-ступенчатое замораживание до температуры жидкого азота, отогрев и отмывка криопротекторов) отмечалось снижение интенсивности флуоресценции агрегатов красителя до $(83 \pm 6)\%$ от контроля в случае ДМСО и менее чем 10% – 1,2-ПД. Инкубация в растворах ДМСО вызывала выраженное снижение ответа на стимуляцию фенилэфрином (10^{-5} М), в отличие от клеток без воздействия криопротектора, в которых повышалась интенсивность флуоресценции агрегатов на 30%. Изменения флуоресценции при стимуляции 10^{-5} М фенилэфрина отсутствовали и в клетках после замораживания-отогрева, однако повышение концентрации гормона до 10^{-4} М позволило их зарегистрировать.

Литература

1. Білоус А.М., Мойсєєв В.О., Бондаренко В.А., Нардїд О.А. Про механїзм дії поліетиленоксидів на біологічні системи // Вісник АН УРСР. – 1978. – №3. – С. 25–36.
2. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.6. – №9. – С. 2–9.
3. Кавок Н.С., Боровой И.А., Малюкина М.Ю. Влияние различных концентраций ДМСО на динамику гормон-стимулированных изменений трансмембранных потенциалов изолированных гепатоцитов крыс при оценке методом флуоресцентных зондов // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т.20, №4. – С. 407–415.
4. Мазур С.П., Белоус А.М., Петренко А.Ю. Изучение причин угнетения активности системы биотрансформации р-нитроанизола в изолированных гепатоцитах крыс после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 1991. – №4. – С. 3–5.
5. Петренко А.Ю., Макогон Н.В. Мембранный потенциал как показатель гормонального эффекта у животных разного возраста // Вестник Харьков. ун-та. – 1982. – №226. – С. 9–11.
6. Afrimzon E., Zurgil N., Shafran Y. et al. The individual-cell-based cryo-chip for the cryopreservation, manipulation and observation of spatially identifiable cells. II: functional activity of cryopreserved cells // BMC Cell Biol. – 2010. – Vol. 11: 83.
7. Aon A., Cortassa S., Maack C., O'Rourke B. Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutation redox thiol status // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, №30. – P. 21889–21900.
8. Arthur P.G., Niy X., Rigby P. et al. Oxidative stress causes a decline in lysosomal integrity during hypothermic incubation of

we will consider the possibility of using the antioxidant compounds to correct the revealed by us changes in regulation of mitochondrial activity.

Conclusions

Thus, the microfluorimetry of single hepatocytes using mitochondrial probe showed that incubation of cells in 10% dimethyl sulfoxide and 1,2-propane diol solutions for an hour and the following washing did not lead to the decrease of dye aggregates fluorescence. Freeze-thawing of cells in the presence of mentioned cryoprotectants (2-step freezing down to temperature of liquid nitrogen, thawing and washing-out the cryoprotectants) resulted in the decreased intensity of dye aggregates fluorescence down to $(83 \pm 6)\%$ of the control in the case with DMSO, and down to 10% with 1,2-PD. Incubation in DMSO solutions caused a significant decrease of response to phenylephrine (10^{-5} M) stimulation unlike to cells without cryoprotectant effect wherein we noted the rise in fluorescence intensity of aggregates by 30%. There were no changes of fluorescence after stimulation with 10^{-5} M phenylephrine in cells after freeze-thawing, however the rise of hormone concentration up to 10^{-4} M allowed to discover them.

References

1. Belous A.M., Moiseev V.O., Bondarenko V.A., Nardid O.A. About effect mechanism of polyethylene oxides on biological systems // Visnyk of Academy of Sciences of UkrSSR. – 1978. – N3. – P. 25–36.
2. Vladimirov Yu.A. Biological membranes and non-programmed death of cell // Sorosovskyi Obrazovatelnyy Zhurnal. – 2000. – Vol. 6, N9. – P. 2–9.
3. Kavok N.S., Borovoy I.A., Malyukina M.Yu. Effect of different DMSO concentrations on dynamics of hormone-stimulated changes in transmembrane potentials of isolated rat hepatocytes during assessment with fluorescent probes // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N4. – P. 407–415.
4. Mazur S.P., Belous A.M., Petrenko A.Yu. Study of inhibition reasons of biotransformation system activity of p-nitroanisole in isolated rat hepatocytes after cryopreservation // Problems of Cryobiology. – 1991. – N4. – P. 3–5.
5. Petrenko A.Yu., Makogon N.V. Membrane potential as an index of hormonal effect in animals of different age // Vestnyk of Kharkov National University. – 1982. – N226. – P. 9–11.
6. Afrimzon E., Zurgil N., Shafran Y. et al. The individual-cell-based cryo-chip for the cryopreservation, manipulation and observation of spatially identifiable cells. II: functional activity of cryopreserved cells // BMC Cell Biol. – 2010. – Vol. 11: 83.
7. Aon A., Cortassa S., Maack C., O'Rourke B. Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutation redox thiol status // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, N30. – P. 21889–21900.
8. Arthur P.G., Niy X., Rigby P. et al. Oxidative stress causes a decline in lysosomal integrity during hypothermic incubation of



- rat hepatocytes // *Free Rad. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 44. – P. 24–33.
9. Binet A., Claret M. Alpha-adrenergic stimulation of respiration in isolated rat hepatocytes // *Biochem J.* – 1983. – Vol. 210, №3. – P. 867–873.
 10. Blake D.A., Whitehart D.R., Yu H. et al. Common cryopreservation media deplete corneal endothelial cell plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase activity // *Curr. Eye Res.* – 1996. – Vol. 15, №3. – P. 263–271.
 11. Chiou S., Vesely D.L. Dimethyl sulfoxide inhibits renal Na⁺, K⁺-ATPase at site different from ouabain and atrial peptides // *Life Sci.* – 1995. – Vol. 57, №10. – P. 945–955.
 12. Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the j-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 197, №1. – P. 40–45.
 13. Crompton M., Goldstone T.P. The involvement of calcium in the stimulation of respiration in isolated rat hepatocytes by adrenergic agonists and glucagon // *FEBS Lett.* – 1986. – Vol. 204, №2. – P. 198–202.
 14. Garrison J.C., Borland M.K. Regulation of mitochondrial pyruvate carboxylation and gluconeogenesis in rat hepatocytes via an alpha-adrenergic, adenosine 3':5'-monophosphate-independent mechanism // *J. Biol. Chem.* – 1979. – Vol. 254, №4. – P. 1129–1133.
 15. Halestrap A.P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in the vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism // *Biochim Biophys Acta.* – 1989. – Vol. 973, №3. – P. 355–382.
 16. Quinlan P.T., Halestrap A.P. The mechanism of the hormonal activation of respiration in isolated hepatocytes and its importance in the regulation of gluconeogenesis // *Biochem J.* – 1989. – Vol. 236, №3. – P. 789–800.
 17. Roach K.L., King K.R., Uygun K. et al. High-throughput single cell arrays as a novel tool in biopreservation // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 58, №3. – P. 315–321.
 18. Robb-Gaspers L.D., Burnett P., Rutter G.A. et al. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses // *The EMBO Journal.* – 1998. – Vol. 17, №17. – P. 4987–5000.
 19. Stephenne X., Najimi M., Sokal E.M. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, №1. – P. 1–14.
 20. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target // *Pharm. Rev.* – 2002. – Vol. 54, №1. – P. 101–127.
 21. Taylor W.M., van de Pol E., Bygrave F.L. The stimulation of tricarboxylic acid-cycle flux by alpha-adrenergic agonists in perfused rat liver // *Biochem J.* – 1989. – Vol. 233, №2. – P. 321–324.
 22. Titheradge M.A., Stringer J.L., Haynes R.C. Jr. The stimulation of the mitochondrial uncoupler-dependent ATPase in isolated hepatocytes by catecholamines and glucagon and its relationship to gluconeogenesis // *Eur. J. Biochem.* – 1979. – Vol. 102, №1. – P. 117–124.
 10. Blake D.A., Whitehart D.R., Yu H. et al. Common cryopreservation media deplete corneal endothelial cell plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase activity // *Curr. Eye Res.* – 1996. – Vol. 15, №3. – P. 263–271.
 11. Chiou S., Vesely D.L. Dimethyl sulfoxide inhibits renal Na⁺, K⁺-ATPase at site different from ouabain and atrial peptides // *Life Sci.* – 1995. – Vol. 57, №10. – P. 945–955.
 12. Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the j-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 197, №1. – P. 40–45.
 13. Crompton M., Goldstone T.P. The involvement of calcium in the stimulation of respiration in isolated rat hepatocytes by adrenergic agonists and glucagon // *FEBS Lett.* – 1986. – Vol. 204, №2. – P. 198–202.
 14. Garrison J.C., Borland M.K. Regulation of mitochondrial pyruvate carboxylation and gluconeogenesis in rat hepatocytes via an alpha-adrenergic, adenosine 3':5'-monophosphate-independent mechanism // *J. Biol. Chem.* – 1979. – Vol. 254, №4. – P. 1129–1133.
 15. Halestrap A.P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in the vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism // *Biochim Biophys Acta.* – 1989. – Vol. 973, №3. – P. 355–382.
 16. Quinlan P.T., Halestrap A.P. The mechanism of the hormonal activation of respiration in isolated hepatocytes and its importance in the regulation of gluconeogenesis // *Biochem J.* – 1989. – Vol. 236, №3. – P. 789–800.
 17. Roach K.L., King K.R., Uygun K. et al. High-throughput single cell arrays as a novel tool in biopreservation // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 58, №3. – P. 315–321.
 18. Robb-Gaspers L.D., Burnett P., Rutter G.A. et al. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses // *The EMBO Journal.* – 1998. – Vol. 17, №17. – P. 4987–5000.
 19. Stephenne X., Najimi M., Sokal E.M. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, №1. – P. 1–14.
 20. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target // *Pharm. Rev.* – 2002. – Vol. 54, №1. – P. 101–127.
 21. Taylor W.M., van de Pol E., Bygrave F.L. The stimulation of tricarboxylic acid-cycle flux by alpha-adrenergic agonists in perfused rat liver // *Biochem J.* – 1989. – Vol. 233, №2. – P. 321–324.
 22. Titheradge M.A., Stringer J.L., Haynes R.C. Jr. The stimulation of the mitochondrial uncoupler-dependent ATPase in isolated hepatocytes by catecholamines and glucagon and its relationship to gluconeogenesis // *Eur. J. Biochem.* – 1979. – Vol. 102, №1. – P. 117–124.