

Оценка мембранного потенциала митохондрий в изолированных гепатоцитах после гипотермического хранения

А.Ю. Сомов¹, А.Ю. Петренко¹, А.С. Лебединский¹, В.С. Холодный¹,
О.В. Кукло¹, Ю.В. Малюкин², И.А. Боровой²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Институт сцинтилляционных материалов, НТК «Институт монокристаллов НАН Украины», г. Харьков

Evaluation of Mitochondrial Membrane Potential in Isolated Hepatocytes after Hypothermic Storage

A.YU. SOMOV¹, A.YU. PETRENKO¹, A.S. LEBEDINSKY¹, V.S. KHOLODNYI¹,
O.V. KUKLO¹, YU.V. MALYUKIN², I.A. BOROVY²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute for Scintillation Materials, Institute for Single Crystals
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Регистрация изменений потенциала митохондрий с помощью флуоресцентных зондов является быстрым и удобным методом неинвазивного контроля состояния органелл в составе клеток. Рассеивание мембранного потенциала митохондрий – ранний признак нарушения энергетической функции митохондрий при воздействии низких температур.

В данной работе была проведена оценка мембранного потенциала митохондрий гепатоцитов после гипотермического хранения (ГХ) с помощью флуоресцентных зондов JC-1 и родамина 123.

В экспериментах использовали изолированные гепатоциты крыс, которые хранили 24 ч в сахарозо-содержащей среде, разработанной в ИПКиК НАН Украины. Насыщение клеток красителями проводили в ходе нормотермической инкубации. Интенсивность флуоресценции клеток определяли после 1 и 24 ч с помощью конфокального микроскопа «LSM 510 META» («Carl Zeiss», Германия) и планшетного флуоресцентного анализатора «Tecan GENios» (Австрия). Изучали также влияние митохондриальных агентов: разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования, ингибитора дыхательной цепи и АТФ-синтазы на интенсивность флуоресценции клеток при ГХ.

Выполненная работа позволила определить оптимальные условия насыщения клеток флуоресцентными красителями, провести сравнительный анализ значений потенциала митохондрий, полученных с помощью JC-1 и родамина 123. Показано, что JC-1 является наиболее информативным флуорохромом. В результате воздействия протонифора, ингибиторов дыхательной цепи на мембранный потенциал митохондрий наблюдалось изменение эмиссии JC-1, в то время как родамин 123 не позволял выявить смещения мембранного потенциала.

Применение флуоресцентных красителей, специфических к митохондриям, является перспективным направлением не только для изучения мембранного потенциала митохондрий, но и для усовершенствования уже имеющихся экспресс-методов контроля метаболического состояния клеток при гипотермии.

Recording of mitochondrial potential changes with fluorescent probe is a quick and convenient method for non-invasive control of organelles' state as components of cells. Scattering of mitochondrial membrane potential is an early sign of mitochondria energetic function disorder during low temperature exposure.

Evaluation of mitochondrial membrane potential of hepatocytes after hypothermic storage (HS) with fluorescent probes JC-1 and rhodamine 123 has been performed in this work.

Isolated rat hepatocytes, stored for 24 hrs in sucrose-containing medium developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, were used in the experiments.

Cells were saturated with dyes during normothermic incubation. Cell fluorescence intensity was determined after 1 and 24 hrs with confocal microscope Carl Zeiss LSM 510 META (Germany) and plate fluorescence analyzer Tecan GENios (Austria). We studied the effect of mitochondrial agents: decouplers of respiration and oxidative phosphorylation, inhibitor of respiratory chain and ATP synthase on the intensity of cell fluorescence during HS.

The performed research allowed determining the optimal conditions of cell saturation with fluorescent dyes and performing a comparative analysis of mitochondrial potential indices obtained with JC-1 and rhodamine 123. It has been shown that JC-1 is the most informative fluorochrome. Under exposure of protonophore inhibitors of respiratory chain on mitochondrial membrane potential the change of JC-1 emission was observed while rhodamine 123 did not allow revealing the shift of membrane potential.

Application of fluorescent dyes specific to mitochondria is a prospective trend for studying mitochondrial membrane potential and improvement of already existing express-methods for control of cell metabolic state during hypothermia.