

Оценка энергетического состояния клеток после криоконсервации

О. А. ЛОПАТИНА¹, Г. И. МОРОЗОВА², Г. А. ДАНЛЫБАЕВА¹, Е. Л. ФИРСОВА¹, Р. Я. ПОДЧЕРНЯЕВА¹

¹ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва

²Российский университет дружбы народов, г. Москва

Estimation of Cell Energetic State After Cryopreservation

O.A. LOPATINA¹, G.I. MOROZOVA², G.A. DANLYBAYEVA¹, E.L. FIRSOVA¹, P.YA. PODCHERNYAYEVA¹

¹D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Методом долгосрочного хранения клеточных линий является их криоконсервация и хранение суспензий клеток в жидком азоте.

Эффективность применения клеточных линий после деконсервации во многом зависит от степени восстановления их исходных свойств. Показано, что клетки с более высоким уровнем энергетического обмена способны сохранять достаточно высокий уровень функциональной активности [Тошчаков В.Ю. и соавт., 1989].

Цель работы – изучение состояния трансмембранных потенциалов (ТМП) и митохондриальной активности (МА) в нервных клетках мозга хорька (Mpf) в процессе размораживания. Для изучения процессов, происходящих в клетках, использовали флюоресценцию потенциал-чувствительного зонда – катиона 4-(*n*-диметиламино-стирил)-1-метилпиридиния (ДСМ), синтезированного в Институте органического синтеза АН Латвии [Морозова Г.И. и соавт., 1981]. С целью выбора контрольных клеток в адекватном физиологическом (энергетическом) состоянии клетки исследовали через различные временные интервалы после их размораживания (3–24 ч).

Культуры клеток Mpf окрашивали флуоресцентным зондом ДСМ при добавлении физиологического раствора с ДСМ к суспензии клеток. В первой серии экспериментов определяли оптимальный режим инкубации клеток с различными концентрациями зонда (от 1 до 50 мкМ в конечной концентрации). Клетки инкубировали с зондом при 20 и 37°C в течение 15–60 мин. Все препараты исследовали в люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ И-2 (ЛОМО). Интенсивность флюоресценции (F) в каждой клетке (в области митохондрий) регистрировали с помощью фотометрической насадки ФМЭЛ через оптический зонд. Для каждого образца измеряли по 50–100 клеток в опыте и контроле. Установлено, что концентрации 2 и 5 мкМ ДСМ в среде и время инкубации 40 или 20 мин с зондом при 20 и 37°C соответственно являются оптимальными. В дальнейшем эксперименты проводили в этих условиях.

Установлено, что F ДСМ в митохондриях клеток зависит от времени их культивирования в течение суток после размораживания. Экспериментальные оценки показали, что в течение 1–3 ч с момента начала культивирования таких клеток сохраняется низкий уровень ТМП, а наиболее высокий их уровень, сопряженный, прежде всего, с энергизацией митохондрий, достигается только через 12 ч. Такая 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), изменение протонного потенциала на мембранах митохондрий в процессе метаболической активации и пролиферации [Добрецов Г.Е., 1989; Веренинов А.А., 1986; Скулачев В.П., 1987].

При сопоставлении экспериментальных данных установлено, что биофизический параметр F может быть использован как оценка физиологического (прежде всего энергетического) состояния клеток.

The method providing a long-term storage for cell lines is their cryopreservation and cell suspension storage in a liquid nitrogen.

The efficiency of applying the cell lines after freeze-thawing mostly depends on the recovery degree of their initial properties. The cells with higher level of energetic metabolism were shown to preserve quite a high level of functional activity [Toshchakov et al., 1989].

The research was targeted to study the state of transmembrane potentials (TMP) and mitochondrial activity in nerve cells of ferret brain (Mpf) during freeze-thawing. To investigate the processes, occurring in cells, we have used the fluorescence of potential-sensitive probe: cation 4-(*n*-dimethylaminostiril)-1-methylpyridinium (DSM), synthesized at the Latvian Institute of Organic Synthesis [Morozova et al.s, 1981]. In order to select the control cells in adequate physiological (energetic) state the cells were studied in different time intervals after their thawing (3–24 hrs).

The Mpf cell cultures were stained with DSM fluorescent probe when adding physiological solution with DSM into cell suspension. In the first experimental series we have determined the optimal regimen for cell incubation with different probe concentrations (from 1 to 50 mM final concentration). Cells were incubated with probe at 20 and 37°C for 15–60 min. All preparations were studied under LUMAM I-2 luminescent microscope (LOMO). The intensity of fluorescence (F) in each cell (in mitochondrial area) was recorded with PMEL photometrical attachment via optical probe. For each sample we measured 50–100 cells in the experiment and the control. The concentration of 2 and 5 mM DSM in medium and 40 or 20 min incubation time with probe at 20 and 37°C, correspondingly, were established as optimal. Further experiments were performed under these conditions.

There was established that F of DSM in cell mitochondria depended on time of their culturing within a day after thawing. The experimental assessments have demonstrated that during 1–3 hrs from these cells' culturing beginning there is preserved a low level of TMP, and the highest one, primarily conjugated with mitochondrial energization, is only achieved in 12 hrs. This TMP dynamics in cells may reflect the changes in properties of different membranes, namely their viscosity and/or ion permeability (at the background of temperature jump in the medium after thawing), change in proton potential on mitochondrial membrane during metabolic activation and proliferation [Dobretsov, 1989; Vereninov, 1986; Skulachev, 1987].

When comparing experimental data the biophysical parameter F was established as possible to be applied in estimating physiological (primarily energetic) cell state.