

Оценка состояния митохондрий в клетках после криоконсервирования

В.В. ТИМОН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Estimation of Mitochondria's State After Cryopreservation

V. V. TIMON

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

Процесс криоконсервирования связан с образованием внутри- и внеклеточных кристаллов льда, которые при росте могут повреждать мембранные компоненты клетки.

Цель работы – изучить состояние митохондриального аппарата клеток культуры эмбриональных фибробластов человека (ЭФЧ) после криоконсервирования.

Клетки культуры ЭФЧ окрашивали флуоресцентными красителями C2, C9 и JC-1 (предоставлены ГНУ НТК “Институт монокристаллов”) в выбранных концентрациях и криоконсервировали под защитой 10%-го ДМСО по двухэтапной программе с последующим хранением в жидком азоте. Образцы отогревали при температуре 41°C в течение 3 мин, после чего клетки высевали в культуральные флаконы и через 24 ч культивирования оценивали состояние митохондрий под флуоресцентным микроскопом при $\mu = 520$ нм.

Контролем служили клетки нативной культуры ЭФЧ, при окрашивании которых зондами C2 и C9 под люминесцентным микроскопом наблюдали зеленое свечение, а при использовании JC-1 – зеленое и оранжевое. Митохондрии клеток культуры ЭФЧ имел характерное нитчатое строение и разветвлялся по всей клетке. По характеру распределения на поверхности митохондрий C2, C9 и JC-1 не отличались, хотя для JC-1 характерно скопление красителя с образованием так называемых J-агрегатов, что выражалось в появлении зон оранжевого свечения.

Установлено, что свечение флуоресцентных красителей после криоконсервирования сохранялось в митохондриоми пролиферирующей культуры ЭФЧ. Степень свечения зондов C9 и JC-1 в криоконсервированных образцах не отличалась от контрольных, зонд C2 при свете флуоресцентной лампы быстро терял локализацию свечения в митохондриях и выходил в цитоплазму.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранности структурной и функциональной организации митохондрий пролиферирующих клеток после криоконсервирования и возможности использования флуоресцентных зондов C9 и JC-1 для данных целей.

Cryopreservation process is related to the formation of intra- and extracellular ice crystals, which may damage membrane cell components at growth stage.

Research aim is to study the state of mitochondria apparatus of human fibroblast cell embryonic culture (HEF) after cryopreservation.

HEF culture cells were stained with C2, C9 and JC-1 fluorescent dyes (provided by SNU STC “Institute of single crystals”) under chosen concentrations and were cryopreserved under 10% DMSO protection according to two-stage program with following storage in liquid nitrogen. Samples were thawed on water bath at 41°C for 3 min, afterwards the cells were seeded in cultural flasks and in 20-24 hrs of culturing the state of mitochondria was estimated with fluorescent microscope at 520 nm wavelength.

Cells of HEF native culture served as the control, when staining them with C2 and C9 probes with luminescent microscope, there was observed a green luminescence and when using JC-1 this was orange one. HEF cell culture mitochondria was of a typical filamentous structure and branched along the whole cell. On the distribution character on the surface of mitochondria C2, C9 and JC-1 do not differ, but for JC-1 there was characteristic accumulation of dye with the formation of J-aggregates, that was expressed in appearance of zones of orange luminescence.

There was established that luminescence of fluorescent dye after cryopreservation was kept in mitochondria of HEF proliferating culture. The degree of C9 and JC-1 probe luminescence in cryopreserved sample did not differ from the control. C2 probe when being in the light of fluorescent lamp rapidly lost the localization of luminescence in mitochondria and released into the cytoplasm.

The obtained results indicate about the integrity of structural and functional organization of mitochondria of proliferating cells after cryopreservation and possibility of using C9 and JC-1 fluorescent probes for these aims.