

Влияние различных концентраций ДМСО на динамику гормон-стимулированных изменений трансмембранных потенциалов изолированных гепатоцитов крыс при оценке методом флуоресцентных зондов

UDC 547.569.2:611.36.018.1:577.336

N.S. KAVOK, I.A., BOROVYOY, M.YU. MALYUKINA*

Effect of Different DMSO Concentrations on Dynamics of Hormone-Stimulated Changes in Transmembrane Potentials of Isolated Rat Hepatocytes During Assessment with Fluorescent Probes

Методом флуоресцентной микроскопии оценивали изменения трансмембранного потенциала плазматической и митохондриальной мембран изолированных гепатоцитов крыс при стимуляции катехоламинами на фоне воздействия криопротекторного агента диметилсульфоксида (ДМСО). Величину клеточного потенциала оценивали по интенсивности флуоресценции зонда Н-510 на основе 3, 3-диалкилкарбоцианин бромид (где в качестве алкила использовали этил), изменение митохондриального потенциала – по интенсивности флуоресценции агрегатов митохондриального красителя JC-1. Показано, что динамика флуоресцентных изменений отражает двухфазный характер гиперполяризации клеточной мембраны под влиянием адреналина и альфа-миметика – фенилэфрина. Стимулирующий эффект фенилэфрина в присутствии 2%-го раствора ДМСО сохранялся на первой фазе клеточного ответа и отсутствовал на второй. При действии токсической концентрации криопротектора (8%) влияние альфа-агониста полностью блокировалось. Стимулирующий эффект гормона на митохондриальный потенциал полностью отсутствовал уже при 2%-й концентрации криопротектора. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о влиянии ДМСО на начальные этапы сигнальной трансдукции.

Ключевые слова: флуоресцентные зонды, гепатоциты, трансмембранный клеточный потенциал, трансмембранный митохондриальный потенциал, ДМСО.

Методом флуоресцентної мікроскопії визначали зміну трансмембранного потенціалу плазматичної та митохондриальної мембран ізолюваних гепатоцитів щурів при стимуляції катехоламінами на фоні впливу криопротекторного агента диметилсульфоксиду (ДМСО). Величину плазматичного потенціалу оцінювали за інтенсивністю флуоресценції зонда Н-510 на основі 3,3-діалкілкарбоціанін бромід (де в якості алкілу використовували етил), зміну митохондриального потенціалу – за інтенсивністю флуоресценції агрегатів митохондриального барвника JC-1. Показано, що динаміка флуоресцентних змін відображає двофазний характер гіперполяризації клітинної мембрани під впливом адреналіну та альфа-міметіку – фенілефрину. Стимулюючий ефект фенілефрину у присутності 2%-го розчину ДМСО зберігався на першій фазі клітинної відповіді та був відсутній на другій. При токсичній концентрації криопротектора (8%) дія альфа-агоніста повністю блокувалась. Стимулюючий ефект гормону на митохондриальний потенціал повністю був відсутнім вже при 2%-й концентрації криопротектора. Таким чином, отримані дані свідчать про вплив ДМСО на початкові етапи сигнальної трансдукції.

Ключові слова: флуоресцентні зонди, гепатоцити, трансмембранный клітинний потенціал, трансмембранный митохондриальний потенціал, ДМСО.

Using fluorescent microscopy technique, the changes of transmembrane potential of plasma and mitochondrial membranes of the isolated rat hepatocytes has been estimated under the stimulation by catecholamines against the background influence of dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectant. The fluorescence intensity of probe H-510 based on 3, 3-dialkylcarbocyanine bromide (where alkyl was used as ethyl) was a measure of the plasmatic potential value, whereas the fluorescence intensity of mitochondrial JC-1 dye aggregates was used to estimate a mitochondrial potential value. It was shown that the dynamics of fluorescent changes reflected the diphasic character of hyperpolarization of cellular membrane under influence of adrenaline and alpha-agonist, phenylephrine. Stimulative effect of phenylephrine on cellular potential in 2% DMSO presence is observed in the first phase of cellular response and is absent in the second one. The toxic concentration (8%) of the cryoprotectant totally blocks the alpha-agonist action. Hormone stimulative effect on mitochondrial potential was not observed even at 2% cryoprotectant concentration. Thus, the data obtained reveal the influence of DMSO on the initial stages of signal transduction.

Key words: fluorescent probes, hepatocytes, transmembrane cellular potential, transmembrane mitochondrial potential, DMSO.

Трансмембранный потенциал плазматической мембраны ($\Delta\psi_p$) является одним из высокочувствительных параметров при оценке функциональной активности клеток. Изменения $\Delta\psi_p$ относятся к ранним проявлениям гормональных эффектов на

Transmembrane potential of plasma membrane ($\Delta\psi_p$) is one of highly sensitive parameters when estimating the functional activity of cells. The changes of $\Delta\psi_p$ are related to early manifestations of hormonal effects at the level of plasma membrane. Herewith

Институт сцинтилляционных материалов
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
пр. Ленина, 60, г. Харьков, Украина 61001; тел.: (+38057) 341-01-54, электронная почта: ogrammal@mail.ru.

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

уровне плазматической мембраны. При этом гормональная регуляция трансмембранного потенциала может осуществляться с участием, по крайней мере, двух механизмов: посредством мембранной Na^+/K^+ -АТФазы или вследствие прямого влияния гормона на мембранную ионную проницаемость.

На разных типах клеток с помощью различных методов и подходов было установлено, что независимо от природы действующего агониста типичной особенностью клеточной активации является изменение мембранного потенциала и внутриклеточной концентрации ионов кальция. Фазовый характер изменений мембранного потенциала клеток печени крысы в ответ на стимуляцию адреналином был показан ранее с помощью электрофизиологического метода на целой печени [7]. Отмечена связь индуцированных агонистами флуктуаций потенциала с проявлением метаболического эффекта [16]. Однако данные, полученные на изолированных клетках, достаточно противоречивы [14]. В настоящих исследованиях для оценки потенциала плазматической мембраны был применен предложенный в работе Ehrenberg *et al.* [13] подход, основанный на микрофлуориметрии одиночных клеток. В данном методе оценки наряду с другими потенциал-чувствительными зондами могут применяться также производные карбоцианинов.

Не менее важной и еще более сложной задачей является оценка митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$). Он может быть характеристикой не только митохондриальной функции, но и состояния клетки в целом. Потенциал рассеивается в процессе синтеза АТФ, Ca^{2+} -транспорта или работы иных митохондриальных белков-переносчиков. Однако с помощью флуоресцентных потенциал-чувствительных красителей удалось зарегистрировать высокоамплитудные спонтанные кратковременные изменения мембранного потенциала одиночных митохондрий как в клетках, так и в изолированных органеллах [9, 15]. С помощью митохондриального зонда JC-1 на одиночных гепатоцитах нами было показано, что нарушение окислительного баланса клеток под влиянием индукторов оксидативного стресса сопровождается адекватными изменениями флуоресценции агрегатов молекул зонда в клетках [1]. Таким образом, данный подход позволяет изучать механизмы клеточной адаптации к действию разнообразных факторов на уровне одиночных клеток.

Повреждение клеток при замораживании клеточных суспензий и тканей зачастую заключается в нарушениях структуры мембран и ингибировании мембранно-связанных ферментов, что, в свою очередь, влияет на изменение потенциала клетки. При использовании криопротекторов для возможной защиты биообъектов от эффектов заморажи-

hormonal regulation of transmembrane potential may be implemented with the involvement at least of two mechanisms of membrane Na^+/K^+ -ATPase and direct effect of hormone on membrane ion permeability.

In various cell types using different techniques and approaches there has been established that independently on the nature of acting agonist the feature of cell activation is the change of membrane potential and intracellular concentration of calcium ions. Phase character of the changes in membrane potential of rat liver cells in response to stimulation of adrenalin has been demonstrated previously in solid liver by means of electrophysiological method [7]. There has been found the relationship between induced agonists of potential fluctuations and the manifestation of metabolic effect [16]. However the data obtained in isolated cells are quite controversial [14]. In our research for the estimation of plasma membrane potential we applied the proposed by Ehrenberg *et al.* [13] approach, based on microfluorimetry of single cells. In this method the derivatives of carbocyanines could be used along with other potential sensitive probes.

Not less important, but also more complicated task is the assessment of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). It may be the characteristic of not only mitochondrial function, but in a whole of cell state. Potential diffuses during ATP synthesis, Ca^{2+} -transport or the activity of other mitochondrial carrier proteins. However by means of fluorescent potential-sensitive dyes it was possible to record high amplitude spontaneous short-term changes of membrane potential of single mitochondria both in cells and in isolated organelles [9, 15]. Using mitochondrial probe JC-1 in single hepatocytes we have shown that the disorder of oxidative balance of cells under the effect of inducers of oxidative stress is accompanied with adequate changes in fluorescence of probe molecules' aggregates in cells [1]. Thus this approach enables to study the mechanisms of cell adaptation to the effect of different factors at the level of single cells.

Damage of cells during freezing of cell suspensions and tissues frequently consists in the impairment of membrane structure and inhibition of membrane-bound enzymes, that is in its turn affects the change of a cell potential. When using the cryoprotectants for potential protection of bioobjects from the effects of freezing the data on the influence of cryoprotectants on cell functions and subcellular structures are needed. It is known that the presence of cryoprotectants depending on temperature, concentration and exposure time may lead to the strengthening of heterogeneity of lipid bilayer of membranes, disorder of their barrier properties, inhibition of the activity of cytoplasm and membrane enzyme complexes [6]. It has been established that the effect of cryoprotective agent DMSO under different concentrations on transmembrane potential of plasma membrane may be mediated both by the

вания важны данные о влиянии криопротекторов на функции клеток и субклеточных структур. Известно, что присутствие криопротекторов в различной концентрации и в зависимости от температуры и времени экспозиции может приводить к увеличению гетерогенности липидного бислоя мембран, нарушению их барьерных свойств, ингибированию активности цитоплазматических и мембранных ферментных комплексов [6]. Установлено, что влияние криопротектора ДМСО в разных концентрациях на трансмембранный потенциал плазматической мембраны может быть выражено как в нарушении функции Na^+/K^+ -АТФазы, так и изменениях в работе ион-транспортных систем мембраны [8, 9]. Добавление в суспензию митохондрий ДМСО нарушает деятельность дыхательной цепи органелл, что проявляется в уменьшении активности работы переносчиков электронов и протонов, окислительно-восстановительных реакций цепи [2, 6].

Цель работы – изучение воздействия ДМСО в разных концентрациях на $\Delta\Psi_p$ и $\Delta\Psi_m$ изолированных гепатоцитов и особенностей раннего гормонального эффекта на потенциал клеток в присутствии криопротектора.

Материалы и методы

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

Эксперименты проводили с использованием зондов H-510, D-307 и JC-1, синтезированных в лаборатории нанодисперсных материалов ИСМА НАН Украины (г. Харьков). H-510 (3,3'-диэтилоксакарбоцианин бромид) характеризуется максимумом флуоресценции 515 нм [5]; D-307 (1,1'-диэтил-3,3,3',3'-тетраметиллиндокарбоцианин бромид) – 670 нм [3]; JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол-карбоцианин иодид) характеризуется двухполосной флуоресценцией с максимумами 510 и 585 нм. Исходный (1 мМ) раствор исследуемого зонда в ДМСО разводили непосредственно перед экспериментом до необходимой концентрации.

В работе использовали изолированные гепатоциты печени белых крыс-самцов популяции Вистар 3-месячного возраста. Клетки выделяли неферментативным методом [8] с использованием перфузионной среды, содержащей 2 мМ ЭДТА, жизнеспособность клеток оценивали по окраске с трипановым синим. Жизнеспособность гепатоцитов после выделения составляла около 90%. Клетки (5×10^5 кл/мл) инкубировали с зондами H-510, D-307 и JC-1 в конечной концентрации 10^{-6} М. Инкубацию клеток с зондами H-510 и D-307 проводили в буфере HBSS (pH 7.4) при 22°C в течение 20 мин

impaired function of Na^+/K^+ -ATPase and the changed activity of ion-transport systems of membrane [8, 9]. The adding of DMSO into the mitochondria suspension impairs the respiratory chain of organelles, manifesting in the lessening the activity of electron and proton carriers, redox chain reactions [2, 6].

The research aim is to study the effect of DMSO under different concentrations on $\Delta\Psi_p$ and $\Delta\Psi_m$ of isolated hepatocytes and peculiarities of early hormonal effect on cell potential in cryoprotectant presence.

Materials and methods

The experiments were carried-out in the accordance with the statements of "European Convention on Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasburg, 1986).

Experiments were performed using the probes H-510, D-307 and JC-1, synthesized in the Laboratory of Nanodisperse Materials of the Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkov). H-510 (3,3'-diethyloxycarbocyanine bromide) has a fluorescence maximum at 515 nm [5]; D-307 (1,1'-diethyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine bromide) does at 670 nm [3]; JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide) has a two band fluorescence with maxima at 510 and 585 nm. Initial solution (1 mM) of the studied probe in DMSO was diluted directly prior to the experiment up to the concentration required.

Isolated liver hepatocytes of 3 month old white male Wistar population rats were used in the work. The cells were isolated by non-enzyme method [8] using the perfusion medium, containing 2 mM EDTA, the cell viability was assessed on the staining with trypan blue. Viability of freshly isolated hepatocytes made about 90%. The cells (5×10^5 cells/ml) were incubated with the probes H-510, D-307 and JC-1 under 10^{-6} M final concentration. The cell incubation with H-510 and D-307 probes was performed in HBSS buffer pH 7.4 at 22°C during 20 min (incubation media produced by Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences). Incubation of hepatocytes with JC-1 probe was done in Eagle's medium with 10% fetal calf serum (Biolot, Russia). Depending on the experimental design the incubation was performed also in high-potassium buffer (143 mM K^+), in some cases incubation medium contained either valinomycin (500 nM), and FCCP (250 nM^{-5} M). The effects of adrenaline (10^{-6} M) and phenylephrine (10^{-5} M) were assessed on the background of DMSO presence (2 or 8% concentration) (all reagents produced by Sigma Aldrich). The cells were incubated with DMSO for an hour.

Luminescent objects were examined and the images were made by means of luminescent microscope Olympus IX71 and digital camera Olympus C-5060 (Japan). Fluorescence intensity (F) was obtained after building the histograms of cell images and measuring

(инкубационные растворы и среды производства ФУПП "Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова" РАМН). Инкубацию гепатоцитов с зондом JC-1 проводили в среде Игла с 10% сывороткой крови эмбрионов крупного рогатого скота (ООО "БиолоТ", Россия). В зависимости от постановки инкубацию также проводили в высококалийевой среде (143 мМ К⁺), в отдельных случаях инкубационная среда содержала валиномицин (500 нМ), FCCP (0,25–5 мкМ). Эффекты адреналина (10⁻⁶ М) и фенилэфрина (10⁻⁵ М) оценивали на фоне влияния ДМСО (2 и 8%) (все реактивы производства Sigma Aldrich, США), для чего клетки инкубировали с ДМСО в течение часа.

Наблюдение и фотографирование люминесцирующих объектов осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX71 и цифровой камеры Olympus C-5060 (Япония). Интенсивность флуоресценции (*F*) получали путем гистограммирования изображений клеток и измерения уровня серого (gray level) пикселей, выделенных по соответствующему каналу. Значения клеточного потенциала и его относительные изменения рассчитывали по формуле Нернста, адаптированной в отношении потенциал-чувствительных катионных красителей как описано ранее [3, 13]. Для оценки митохондриального потенциала одиночных клеток использовали *log*-соотношения $F_{on}/F_{control}$ с учетом автофлуоресценции [1, 12].

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программ "Statistika v 5.0" ("Statsoft", США) и "Origin 6.1" ("Origin Lab", США) с использованием критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе экспериментов на одиночных клетках оценили чувствительность производных карбоцианиновых зондов к изменениям клеточного трансмембранного потенциала $\Delta\Psi_p$. Были протестированы зонды H-510 и D-307 с различной длиной алкильных цепей (H-510/C2, H-510/C18, D-307/C2, D-307/C18).

На основании полученных результатов мы пришли к выводу, что наиболее чувствительным зондом, адекватно отражающим значения трансмембранного потенциала, является короткоцепочечный зонд H-510 (H-510/C2) (рис. 1). При дальнейших исследованиях использовали зонд H-510/C2.

Трансмембранный потенциал рассчитывали из данных о флуоресценции связанного с клетками зонда. Известно, что оценить с помощью оптических индикаторов мембранный потенциал целых клеток в отличие от изолированных оргanelл гораз-

the gray level of pixels in appropriate channel. The values of cell potential and its relative changes were counted on Nernst equation, adapted in respect of potential-sensitive cation dyes [4, 13]. To assess mitochondrial potential of single cells there was used *log* of F_{exp}/F_{con} ratio taking into account the autofluorescence [1, 12].

The results were statistically processed by means of the software Statistika v. 5.0 (StatSoft, USA) and Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, USA) using the Student's t-criterion. The results differed statistically and significantly at $p < 0.05$.

Results and discussion

At the first stage of the experiments the sensitivity of the derivatives of carbocyanine probes to the change of cell transmembrane potential $\Delta\Psi_p$ in single cells was assessed. There were tested the probes H-510 and D-307 with different length of alkyl chains (H-510/C2, H-510/C18, D-307/C2, D-307/C18).

On the base of the findings we concluded that the most sensitive probe, adequately reflecting the values of transmembrane potential, is short-chain probe H-510 (H-510/C2) (Fig. 1), and this was used in further experiments.

Transmembrane potential was calculated from the fluorescence data of the probe bound with the cells. It is known that to assess by means of optical indicators the membrane potential of the whole cells if comparing to isolated organelles is much more complicated, whereas the cells contain many subcellular compartments and it is necessary to distinguish the changes of

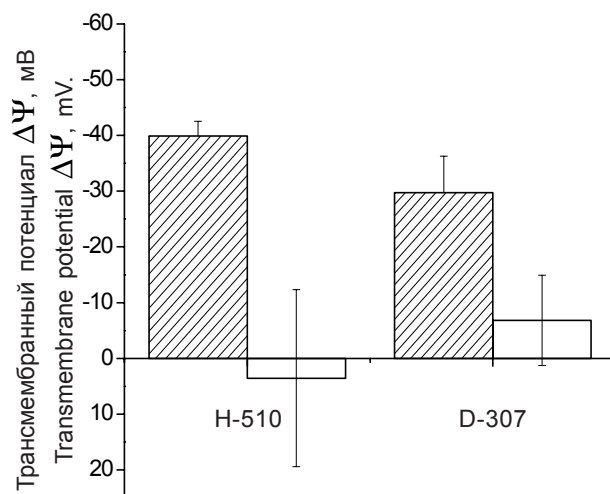


Рис. 1. Трансмембранный потенциал гепатоцитов крыс при оценке с помощью производных C2 (▨) и C18 (□) зондов H-510 и D-307.

Fig. 1. Estimation of transmembrane potential of rat's hepatocytes by means of derivatives C2 (▨) and C18 (□) of the probes H-510 and D-307.

до сложнее, поскольку клетки содержат множество субклеточных компартментов и необходимо дифференцировать изменения оптических свойств, связанных с состоянием плазматической мембраны и любой другой мембранной структуры. Интенсивное окрашивание митохондрий цианиновыми красителями, проникающими через мембрану катионами, может искажать результаты измерений потенциала плазматической мембраны. Для исключения влияния данного фактора применяли протонифор FCCP, рассеивающий трансмембранный потенциал внутренней митохондриальной мембраны и инкубацию в калиевой среде, которая приводит к снижению трансмембранного потенциала плазматической мембраны. Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о чувствительности изученных показателей к воздействию высококалиевой среды. Это дает основания утверждать, что полученные значения отражают величину трансмембранного потенциала плазматической мембраны клеток.

В данной модельной системе оценили характер изменений потенциала одиночных клеток в ответ на действие адреналина (10^{-6} М) (рис. 3, а) и альфа-агониста фенилэфрина (10^{-5} М) (рис. 3, б). Показано, что повышение потенциала является двухфазным. Известно, что первая фаза ответа может быть опосредована активацией Na^+/K^+ -АТФазы [18], а вторая – связана с функцией калиевых каналов [17].

Для оценки влияния криопротектора на потенциал ДМСО использовали в двух концентрациях 2

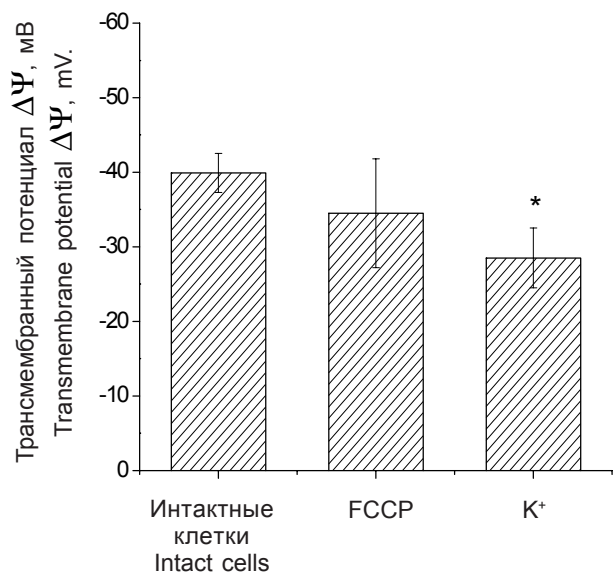
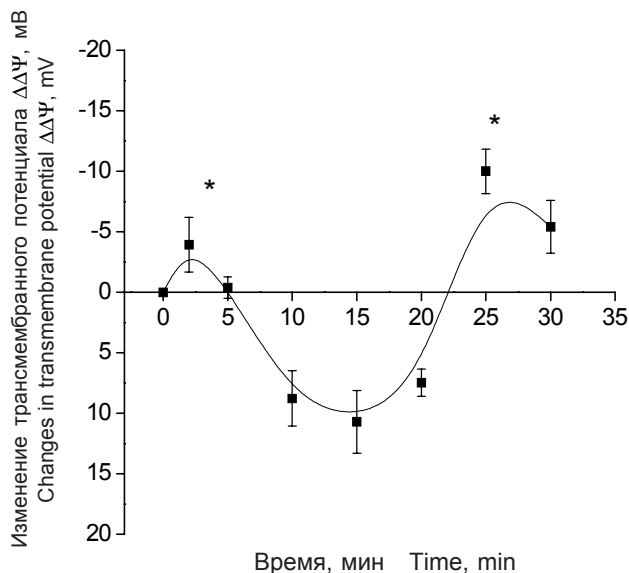


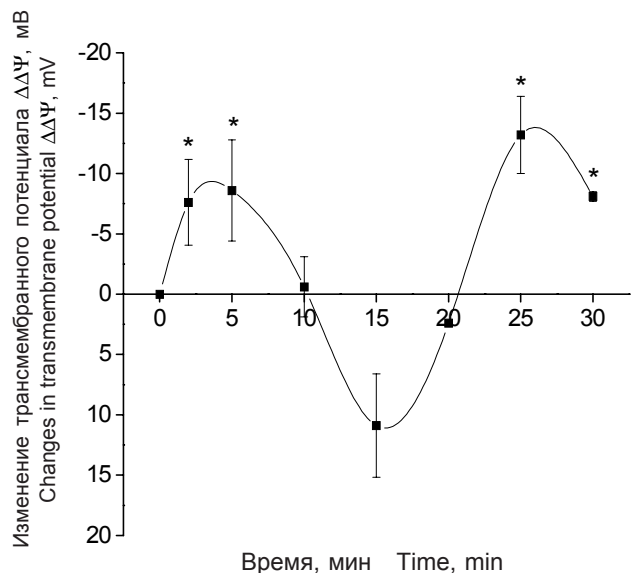
Рис. 2. Оценка трансмембранного потенциала гепатоцитов крыс на фоне действия модуляторов потенциала с использованием зондов H-510 (C2); * – $p < 0,05$ по отношению к интактным клеткам.

Fig. 2. Estimation of transmembrane potential of rat's hepatocytes on the background of the effect of potential modulators using the probes H-510 (C2); * – $p < 0.05$ in respect of the data of intact cells.

optical properties related to the state of plasma membrane and any other membrane structure. Intensive staining of mitochondria with cyanine dyes, penetrating *via* membrane as cations, may distort the results of measurements of plasma membrane potential. To exclude the effect of this factor there was applied the



а



а б

б

Рис. 3. Фазовый характер изменений потенциала при действии α -адреноагонистов на изолированные гепатоциты крыс: а – адреналин; б – фенилэфрин; * – $p < 0,05$ по отношению к интактным клеткам.

Fig. 3. Phase character of the changes in potential under the effect of α -adrenoagontists on isolated rat's hepatocytes: а – adrenaline; б – phenylephrine; * – $p < 0.05$ in respect of the data on intact cells.

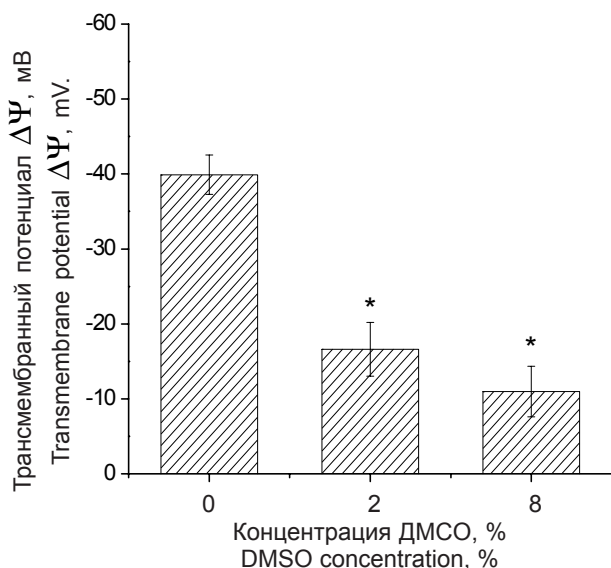


Рис. 4. Трансмембранный потенциал гепатоцитов крыс на фоне воздействия криопротектора. * – $p < 0,05$ по отношению к клеткам без ДМСО.

Fig. 4. Transmembrane potential of rat's hepatocytes on the background of cryoprotectant effect. * – $p < 0.05$ in respect of the cells without DMSO.

и 8%. Установлено, что значения потенциала снижаются под воздействием криопротектора в обеих концентрациях (рис. 4).

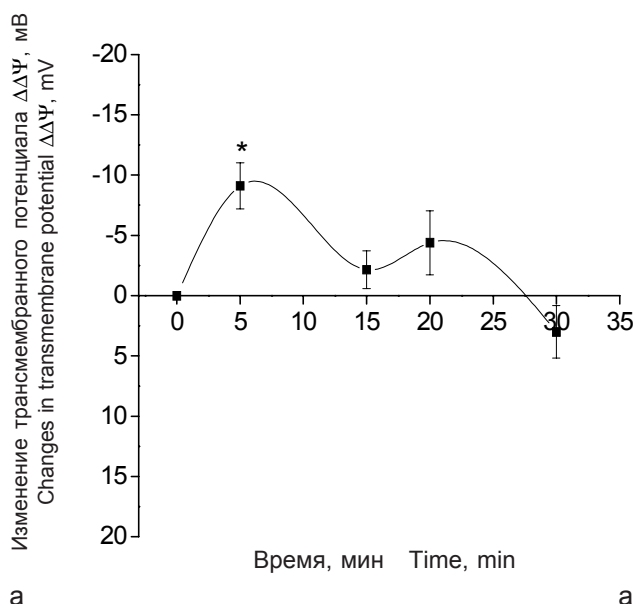
Для изучения механизма влияния криопротектора на начальные этапы трансмембранной передачи сигнала действие фенилэфрина исследовали в динамике на фоне 2% ДМСО (рис. 5, б). Установлено, что первая фаза ответа сохраняется,

protonophore FCCP, dissipating the transmembrane potential of inner mitochondrial membrane and incubation in potassium medium, resulting in a reduction of transmembrane potential of plasma membrane. The data presented in Fig. 2 testify to sensitivity of the studied indices to the effect of high-potassium medium. This allows to confirm that the obtained values reflect the value of transmembrane potential of cell plasma membrane.

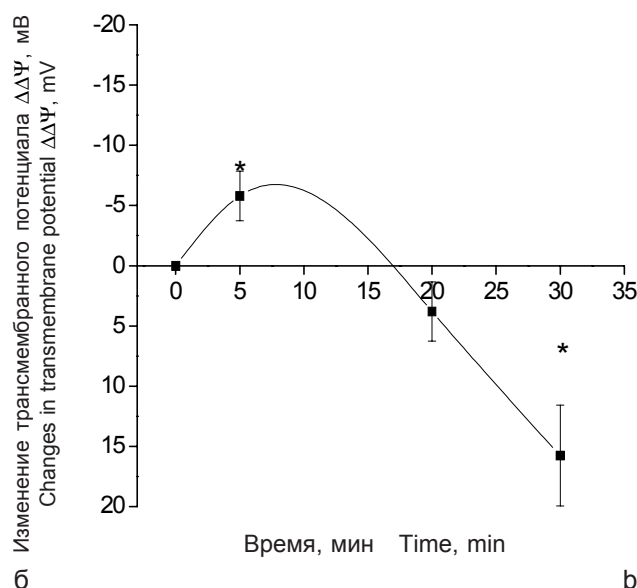
In this model system there was estimated the character of changes in the potential of single cells in response to adrenaline effect (10^{-6} M) (Fig. 3a) and alpha-agonist phenylephrine (10^{-5} M) (Fig. 3b). It has been shown that the rise in potential is two-phase process. It is known that the first phase of response may be mediated by the activation of Na^+/K^+ -ATPase [16] and the second one is related to the function of potassium channels [17].

To estimate the effect of cryoprotectant on the potential there was used DMSO at two concentrations: 2 and 8%. The potential values have been established to reduce under the effect of cryoprotectants at both concentrations (Fig. 4).

For the investigation of the mechanism of cryoprotectant effect on early stages of transmembrane signal transduction the effect of phenylephrine was studied in dynamics on the background of 2% DMSO (Fig. 5b). It has been found that the first response phase is kept, while the second one is absent. It has been shown also that the effect of adrenoagonist on cells during incubation in high-potassium medium on the dynamics of changes in the potential has similar cha-



а



а б

б

Рис. 5. Динамика изменений потенциала гепатоцитов в ответ на действие фенилэфрина на фоне инкубации в высококалийной среде (а) и воздействия 2% ДМСО (б); * – $p < 0,05$ по отношению к клеткам без фенилэфрина.

Fig. 5. Dynamics of the changes in potential of hepatocytes in response to the effect of phenylephrine on the background of incubation in high-potassium medium (a) and the effect of 2% DMSO (b); * – $p < 0.05$ in respect of cell without phenylephrine

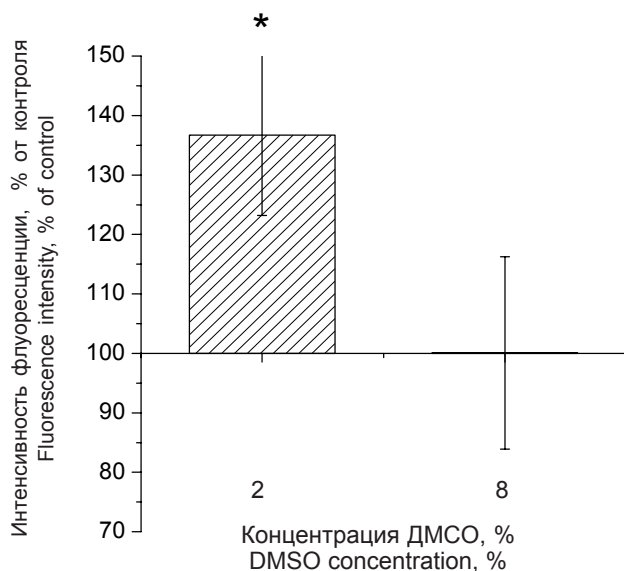


Рис. 6. Краткосрочный эффект фенилэфрина (5 мин) на интенсивность флуоресценции зонда H-510 в клетках печени на фоне воздействия разных концентраций криопротектора; контроль – клетки без фенилэфрина; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Fig. 6. Short-term effect of phenylephrine (5 min) on fluorescence intensity of the probe H-510 in liver cells on the background of the effect of different concentrations of cryoprotectant; the control are the cells without phenylephrine; * – $p < 0.05$ in respect of the control.

тогда как вторая фаза отсутствует. Показано также, что действие адrenoагониста на клетки при инкубации в высококальциевой среде на динамику изменений потенциала имеет сходный характер (рис. 5, а). Известно, что инкубация клеток в высококальциевой среде приводит к нарушению работы ионных транспортных систем, что и обусловило отсутствие второй фазы ответа, поэтому можно сделать вывод, что 2%-й ДМСО также влияет на работу ионных каналов. Тогда как исследование влияния более высоких концентраций криопротектора (8%) показало полное отсутствие ответа на фенилэфрин (рис. 6). На основании этого можно сделать вывод, что более высокие концентрации криопротектора влияют не только на работу ионных транспортных систем, но и на работу АТФазы [6].

Известно, что добавление в суспензию митохондрий криопротекторов нарушает дыхательную цепь органелл, они ингибируют НАД-Н–дегидрогеназное звено процесса аэробного дыхания [2], поэтому в данной модельной системе представляло интерес выяснить влияние ДМСО на потенциал митохондрий. Как отмечено выше, используемый нами подход позволяет оценивать влияние на митохондриальную функцию разнообразных регуляторных факторов [1]. Для оценки воздействия криопротекторов на митохондриальном уровне были использованы две концентрации 2 и 8%. Показано, что обе концентрации ДМСО вызывают

раक्टर (Fig. 5a). Cell incubation in high-potassium medium is known to result in the impairment of the activity of ion-transport systems, which caused the absence of the second phase of response, therefore we may conclude that 2% DMSO affects the activity of ion channels too. Meanwhile when studying the effect of higher concentrations of cryoprotectant (8%) a complete absence of the response to phenylephrine has been shown (Fig. 6). On this base we can conclude that higher concentrations of cryoprotectant affect not only the activity of ion transport systems but also the one of ATPase [6].

It is known that the addition of cryoprotectants into the suspension of mitochondria impairs the respiratory chain of organelles, they inhibit NAD-H-dehydrogenase link of aerobic respiration process [2], therefore in this model system there was of interest to examine the DMSO effect on the mitochondria potential. As it has been mentioned above the used by us approach enables to estimate the effect of various regulatory factors on mitochondrial function [1]. To assess the effect of cryoprotectants at mitochondrial level 2 and 8% concentrations were used. It has been shown that both concentrations of DMSO cause the reduction of fluorescence of dye aggregates in hepatocytes (Fig. 7).

Mitochondria participate in the reaction of catecholamines in cells, therefore as well there was of interest to find-out the effect of phenylephrine on mitochondria potential as well as the one of cryoprotectant on

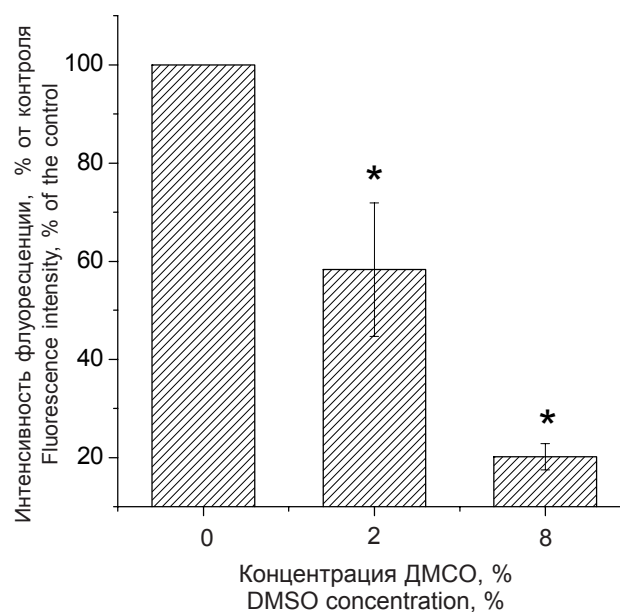


Рис. 7. Влияние криопротектора на интенсивность флуоресценции агрегатов зонда JC-1 в гепатоцитах крыс; контроль – клетки без ДМСО; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Fig. 7. Effect of cryoprotectants on fluorescence intensity of the aggregates of JC-1 probe in rat's hepatocytes; the control are the cells without DMSO; * – $p < 0.05$ in respect of the control.

снижение флуоресценции агрегатов красителя в гепатоцитах (рис. 7).

Митохондрии участвуют в реакции катехоламинов в клетках, поэтому также представляло интерес выяснить влияние фенилэфрина на потенциал митохондрий и проследить влияние криопротектора на тонкие регуляторные механизмы. Исследовалось действие более низкой концентрации ДМСО. Полученные данные свидетельствуют о нарушении динамики ответа гепатоцитов на действие гормонального сигнала в этих условиях (рис. 8).

Выводы

Таким образом, на экспериментальной модели была продемонстрирована возможность измерений трансмембранного потенциала плазматической и митохондриальной мембран одиночных клеток с помощью флуоресцентного зонда Н-510 (для плазматической мембраны) и JC-1 (для митохондриальной мембраны). Показано, что динамика изменений флуоресценции адекватно отражает как амплитуду, так и направленность процесса поляризации мембраны, что можно использовать при оценке клеточной реакции на воздействие разнообразных регуляторных факторов и для выяснения тонких механизмов этого влияния. Обнаружено, что под действием криопротектора (для обеих исследованных концентраций) снижается как клеточный, так и митохондриальный потенциал клеток, и наблюдаются изменения начальных этапов клеточного ответа на гормональное воздействие. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм влияния криопротектора на динамику клеточного ответа может быть связан с изменениями функции ион-транспортных систем. Использованный флуоресцентный метод позволяет выявлять тонкие физиологические изменения митохондриального потенциала одиночных клеток в ответ на регуляторное воздействие и обнаруживать эффекты экзогенных соединений.

Литература

1. Аверченко Е.А., Кавок Н.С., Степаненко А.М. и др. Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса // *Біофіз. вісник.* – 2009. – Вип. 22 (1). – С. 49–56.
2. Білоус А.М., Мойсєєв В.О., Бондаренко В.А., Нардід О.А. Про механізм дії поліетиленоксидів на біологічні системи // *Вісник АН УРСР.* – 1978. – №3. – С. 25–36.
3. Ефимова С.Л., Малюкин Ю.В., Кемниц К. Спектрально-люминесцентные свойства 1,1-диоктадецил-3,3,3'-тетраметилиндодикарбоцианинперхлората в бинарных растворах // *Журнал прикладной спектроскопии.* – 2001. – Т. 68, №5. – С. 569-572.
4. Кавок Н.С., Степаненко А.М., Боровой И.А., Малюкина М.Ю. Метод флуоресцентных зондов в оценке трансмембранного потенциала одиночных гепатоцитов крысы при воз-

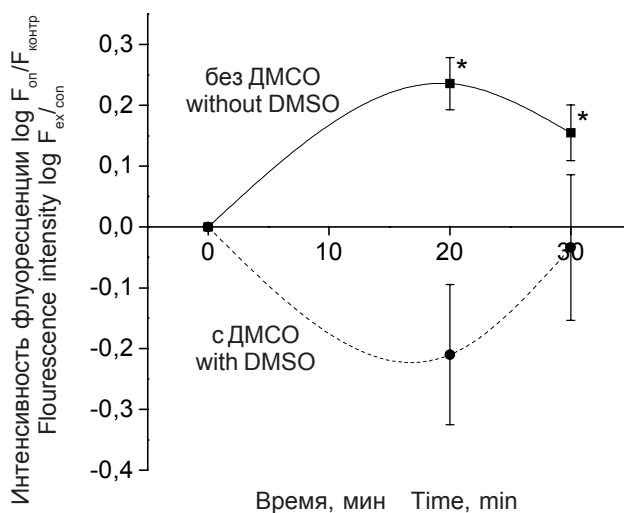


Рис. 8. Динамика изменений флуоресценции J-агрегатов зонда JC-1 в митохондриях гепатоцитов крыс под влиянием фенилэфрина (10^{-5} M); контроль – клетки без фенилэфрина; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Fig. 8. Dynamics of fluorescence changes of J-aggregates of the probe JC-1 in mitochondria of rat's hepatocytes under the effect of phenylephrine (10^{-5} M); the control are the cells without phenylephrine; * – $p < 0.05$ in respect of the control.

intrinsic regulatory mechanisms. There was studied the effect of lower DMSO concentration. The findings testify to the impairment of the response dynamics of hepatocytes on the effect of hormonal signal under these conditions (Fig. 8).

Conclusions

Thus in the experimental model there has been demonstrated the possibility of measuring the transmembrane potential of plasma and mitochondrial membrane of single cells using fluorescent probes H-510 (for plasma membrane) and JC-1 (for mitochondrial membrane). It has been shown that the dynamics of fluorescence changes adequately reflects both amplitude and orientation of the process of membrane polarization, which can be used for assessment of cell response to the effect of various regulatory factors and for elucidation of intrinsic mechanisms of this action. It was revealed that under cryoprotectant effect (for both studied concentrations) both cell and mitochondrial potentials decreased and the changes of initial stages of cell response to hormonal effect were observed. The findings testify to the fact that the mechanism of cryoprotectant effect on dynamics of cell response may be related to the alterations in the function of ion-transport systems. The used fluorescent method enables the revealing of fine physiological changes of mitochondrial potential of single cells in response to regulatory effect, as well as the finding those for of exogenous compounds.

действии адреналина // *Биофиз. вісник.*– 2008.– Вип. 21 (2).– С. 95–100.

5. *Малюкин Ю.В., Боровой И.А., Кавок Н.С. и др.* Накопление оксакарбоданинов с различной длиной алкильных цепей в клетках костного мозга и гепатоцитах // *Биофизика.*– 2007.– Т. 52, №4.– С. 667–673.
6. *Нардид О.А.* Исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий методом ЭПР спинового зонда // *Проблемы криобиологии.*– 2009.– Т. 19, №2.– С. 177–185.
7. *Новикова А.И., Макогон Н.В.* Мембранный потенциал как показатель гормонального эффекта у животных разного возраста // *Вестн. Харьк. ун-та.*– 1982.– №226.– С. 9–11.
8. *Петренко А.Ю., Гришук В.П., Сукач А.Н. и др.* Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации // *Биохимия.*– 1989.– Т. 54, №12.– С. 1952–1955.
9. *Aon A., Cortassa S., Maack C., O'Rourke B.* Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status // *J. Biol. Chem.*– 2007.– Vol. 282, N30.– P. 21889–21900.
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, N3.– 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, N10.– P. 945–955.
12. *Diaz G, Falchi AM, Gremo F. et al.* Homogenous longitudinal profiles and synchronous fluctuations of mitochondrial transmembrane potential // *FEBS Lett.*– 2000.– Vol. 475.– P. 218–224
13. *Ehrenberg B., Montana V., Wei M.D. et al.* Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes // *Biophys. J.*– 1988.– Vol. 53, N5.– P. 785–794.
14. *Graf J., Gautam A., Boyer J.L.* Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function // *Proc. Natl. Acad. Sci.*– 1984.– Vol. 81, N20.– P. 6516–6520.
15. *Hattori T., Watanabe K., Uechi Y. et al.* Repetitive transient depolarizations of inner mitochondrial membrane induced by proton pumping // *Biophys. J.*– 2005.– Vol. 88, N3.– P. 2340–2349.
16. *Hill C.E., Ajikobi D.O.* Inhibition of alpha-adrenergic responses in the rat liver by lipophilic K⁺ channel blockers or depolarizing Cl⁻ gradients. Evidence for a potential-sensitive step in the signal transduction path // *Biochem. Cell Biol.*– 1993.– Vol. 71, N5-6.– P. 229–235.
17. *Lan W.-Z., Wang P.Y.T., Hill C.E.* Modulation of hepatocellular swelling-activated K⁺ current by phosphoinositide pathway-dependent protein kinase C // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*– 2006.– Vol. 291.– P. C93–C103.
18. *Lynch C., Wilson P., Blackmore P., Exton J.* The hormone-sensitive hepatic Na⁺-pump // *J. Biol. Chem.*– 1986.– Vol. 261, N31.– P. 14551–14556.

Поступила 02.07.2010
Рецензент А.Ю. Сомов

References

1. *Averchenko E. A., Kavok N.S., Stepanenko A.M. et al.* Mitochondrial potential estimation of isolated hepatocytes during oxidative status changing // *Biophysical Bulletin.*– 2009.– Issue 22 (1).– P. 49–56.
2. *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.
3. *S. L. Efimova, Yu. V. Malyukin, K. Kemnitz* Spectral luminescent properties of 1,1-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindodicarbocyanineperchlorate in binary solutions // *J. Appl. Spectrosc.*– 2001.– Vol. 68, N5.– P. 743–747
4. *Kavok N.S., Stepanenko A.M., Borovoy I.A., Malyukina M. Yu.* Method of fluorescent probes in transmembrane potential estimation of rats' single hepatocytes under influence of adrenalin // *Biophysical Bulletin.*– 2008.– Issue 21 (2).– P. 95–100.
5. *Malyukin Yu.V., Borovoi I.A., Kavok N.S. et al.* Accumulation of oxacarbocyanine dyes with different alkyl chain length in bone marrow cells and hepatocytes // *Biophysics.*– 2007.– Vol. 52, N4.– P. 406–411.
6. *Nardid O.A.* Study of low-molecular effect of cryoprotectants on mitochondria respiratory chain by spin probe EPR // *Problems of Cryobiology.*– 2009.– Vol.19, N2.– P. 177–185.
7. *Novikova A.I., Makogon N.V.* Membranous potential as a hormonal effect index of differently aged animals // *Vestnik of Kharkov University.*– 1982.– N226.– P. 9–11.
8. *Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Sukach A.N. et al.* Energetic state of well-fed rat's hepatocytes isolated with EDTA and vibration // *Biokhimiya.*– 1989.– Vol. 54, N12.– P. 1952–1955.
9. *Aon A., Cortassa S., Maack C., O'Rourke B.* Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status // *J. Biol. Chem.*– 2007.– Vol. 282, N30.– P. 21889–21900.
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, N3.– 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, N10.– P. 945–955.
12. *Diaz G, Falchi AM, Gremo F. et al.* Homogenous longitudinal profiles and synchronous fluctuations of mitochondrial transmembrane potential // *FEBS Lett.*– 2000.– Vol. 475.– P. 218–224
13. *Ehrenberg B., Montana V., Wei M.D. et al.* Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes // *Biophys. J.*– 1988.– Vol. 53, N5.– P. 785–794.
14. *Graf J., Gautam A., Boyer J.L.* Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function // *Proc. Natl. Acad. Sci.*– 1984.– Vol. 81, N20.– P. 6516–6520.
15. *Hattori T., Watanabe K., Uechi Y. et al.* Repetitive transient depolarizations of inner mitochondrial membrane induced by proton pumping // *Biophys. J.*– 2005.– Vol. 88, N3.– P. 2340–2349.
16. *Hill C.E., Ajikobi D.O.* Inhibition of alpha-adrenergic responses in the rat liver by lipophilic K⁺ channel blockers or depolarizing Cl⁻ gradients. Evidence for a potential-sensitive step in the signal transduction path // *Biochem. Cell Biol.*– 1993.– Vol. 71, N5-6.– P. 229–235.
17. *Lan W.-Z., Wang P.Y.T., Hill C.E.* Modulation of hepatocellular swelling-activated K⁺ current by phosphoinositide pathway-dependent protein kinase C // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*– 2006.– Vol. 291.– P. C93–C103.
18. *Lynch C., Wilson P., Blackmore P., Exton J.* The hormone-sensitive hepatic Na⁺-pump // *J. Biol. Chem.*– 1986.– Vol. 261, N31.– P. 14551–14556.

Accepted in 02.07.2010