

© Г.В. Дудецкая, И.Ф. Коваленко, Т.П. Бондаренко

УДК 612.014.43:547.569.2:577.352.4

Г.В. Дудецкая, И.Ф. Коваленко, Т.П. Бондаренко

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ДЛЯ ВОДЫ И КРИОПРОТЕКТОРА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнена отделами низкотемпературного криоконсервирования (тема: «Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение способов повышения адгезионной способности клеток до и после криоконсервирования путем модификации физико-химических характеристик подложки и поверхности клеточных мембран», № государственной регистрации отдела НТК: 0106U002164) и криобиохимии и фармакологии НГС (тема: «Структурно-функциональные свойства и пролиферативный потенциал эндокринных тканей при культивировании, криоконсервировании и трансплантации», № государственной регистрации отдела НГС: 0106U002163).

Вступление. Трансплантация адrenoкортикальных клеток надпочечников является альтернативой медикаментозному лечению надпочечниковой недостаточности [4]. Также была показана возможность лечения паркинсонизма у экспериментальных животных путем трансплантации хромаффинных клеток мозгового слоя надпочечников [3]. Исходя из этого, необходимо создавать запасы данного биологического материала. Криоконсервирование является единственным способом долгосрочного хранения биообъектов. Одним из этапов при разработке способов низкотемпературного консервирования клеток является изучение проницаемости плазматических мембран для воды и криопротектора.

Целью исследования было определение параметров проницаемости мембран клеток надпочечников для молекул воды и диметилсульфоксида при температурах 4, 22 и 37 °С.

Объект и методы исследования. Исследование проводилось на адrenoкортикальных (АК) и хромаффинных клетках (ХК) надпочечников взрослых крыс, полученных ферментативным способом. В работе использовали 5, 7, 10% растворы диметилсульфоксида (ДМСО) (фармакопейный препарат димексид), приготовленные на среде 199 и содержащие 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток надпочечных желез для молекул криопротектора (К1) и для молекул воды определяли, сопоставляя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени экспозиции $y(t)$ с решениями уравнений теоретической модели для заданных экспериментальных условий [1]. Энергии активации (ЕА) процессов переноса веществ через мембраны клеток рассчитывали из

зависимостей $\ln K_1(1/T)$, наклон которых согласно уравнению Аррениуса равен E_A/R , где R – универсальная газовая постоянная.

Микроскопические исследования проводили на микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с термостатируемым столиком при температурах 4, 22 и 37 °С.

Осмотические реакции клеток изучали, фотографируя их с регистрацией времени контакта с исследуемыми растворами. Для определения геометрических параметров клеток использовали данные морфометрии.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты исследований и их обсуждение.

Согласно проведенным морфометрическим измерениям суспензия АК надпочечников включала клетки диаметром от 9,12 до 16,62 мкм, а размеры ХК варьировали от 7,16 до 13,88 мкм. Осмолярность используемых растворов криопротектора представлена в **табл. 1**.

Таблица 1

Осмолярность растворов ДМСО

Концентрация ДМСО, %	5	7	10
Осмолярность, мОсм	1170	1511	2170

На **рис. 1–6** представлены примеры экспериментального определения коэффициентов проницаемости мембран АК и ХК надпочечников для молекул криопротектора при различных температурах, путем совмещения с экспериментальными данными теоретической зависимости изменения относительного объема клеток во времени.

Существенными факторами, влияющими на процессы переноса веществ при осмотической реакции, являются концентрация криопротектора и температура. Так с увеличением концентрации ДМСО клетки претерпевали значительные объемные изменения. Из **рис. 1–3** видно, что при использовании растворов ДМСО в указанных концентрациях объем АК уменьшался на 10 – 28%. Время восстановления 95% исходного объема при 4 °С составляло приблизительно 4 мин, а при 37 °С – 1 мин. ХК оказались более чувствительными к изменению осмотического давления (**рис. 4–6**). Это проявлялось в уменьшении объема клеток на 13 – 47%. Время восстановления 95% исходного объема при 4 °С составило около 6 мин, а при 37 °С – 2 мин.

Известно, что изменения клеточного объема при осмотической реакции зависят не только от

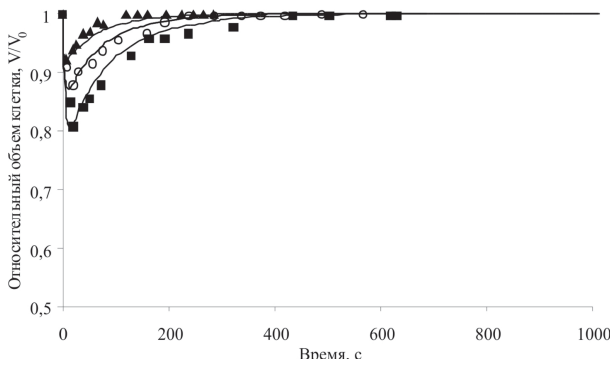


Рис 1. Экспериментальные (■, ○, ▲) и теоретические (сплошная линия) кривые зависимости изменения относительного объема АК надпочечников от времени экспозиции в растворе, содержащем 5% ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

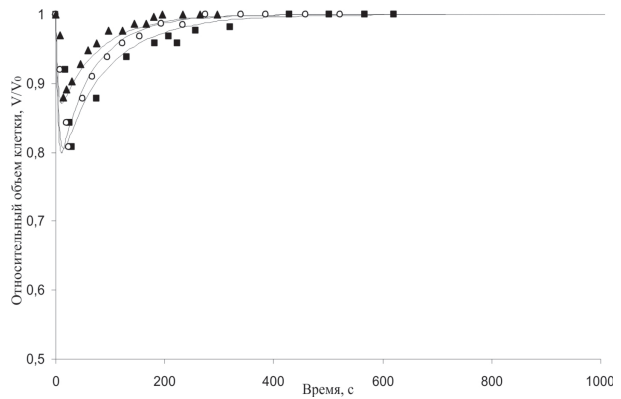


Рис 4. Экспериментальные (■, ○, ▲) и теоретические (сплошная линия) кривые зависимости изменения относительного объема ХК надпочечников от времени экспозиции в растворе, содержащем 5% ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

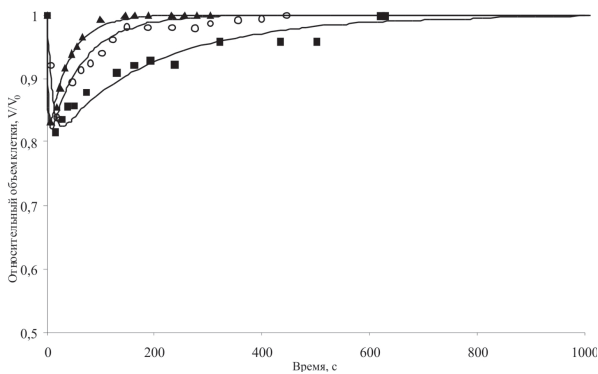


Рис 2. Экспериментальные (■, ○, ▲) и теоретические (сплошная линия) кривые зависимости изменения относительного объема АК надпочечников от времени экспозиции в растворе, содержащем 7% ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

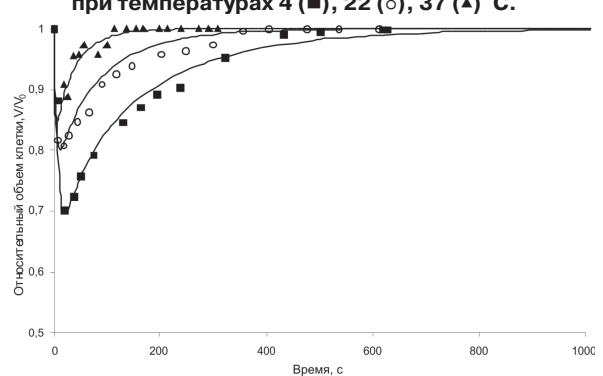


Рис 5. Экспериментальные (■, ○, ▲) и теоретические (сплошная линия) кривые зависимости изменения относительного объема ХК надпочечников от времени экспозиции в растворе, содержащем 7% ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

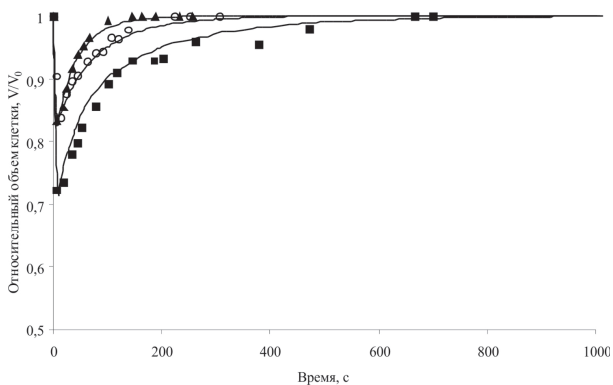


Рис 3. Экспериментальные (■, ○, ▲) и теоретические (сплошная линия) кривые зависимости изменения относительного объема АК надпочечников от времени экспозиции в растворе, содержащем 10% ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

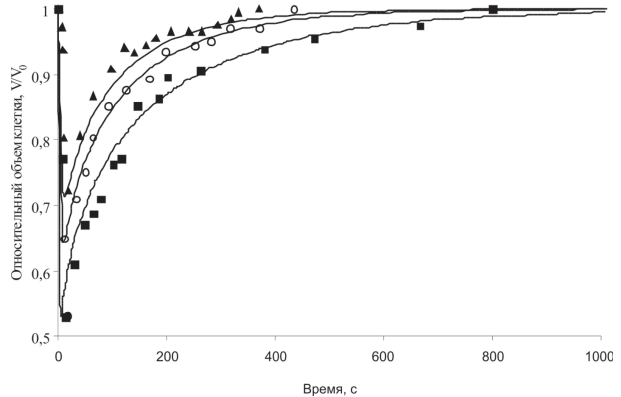


Рис 6. Экспериментальные (■, ○, ▲) и теоретические (сплошная линия) кривые зависимости изменения относительного объема ХК надпочечников от времени экспозиции в растворе, содержащем 10% ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

концентрации веществ вне клетки, но и от температуры. Из представленных данных видно, что с понижением температуры увеличивалось время регидратации клеток после фазы обезвоживания. При добавлении 5% раствора ДМСО к АК и 5, 7 и 10% растворов ДМСО к ХК при температуре 37 °С наблюдалось наименьшее изменение клеточного объема. Таким образом, установлено, что температура оказывала влияние не только на длительность

уравновешивания, но и на величину изменений клеточного объема.

В табл. 2 приведены рассчитанные коэффициенты проницаемости плазматических мембран АК и ХК надпочечников для растворов, содержащих 5, 7, и 10% ДМСО.

Из данных представленных в табл. 2 следует, что значения коэффициентов проницаемости для молекул ДМСО увеличиваются с повышением

Коефіцієнти проникності плазматических мембран АК и ХК надпочечников для молекул ДМСО при температурах 4, 22 и 37 °С

Концентрация ДМСО, %	Коефициент проникности $K_1 \times 10^7$ м/с					
	АК			ХК		
	4 °С	22 °С	37 °С	4 °С	22 °С	37 °С
5	0,6±0,11	1,43±0,62	4,17±0,19	0,62±0,21	0,93±0,13	2,47±0,28
7	1,05±0,03	2,72±1,01	11,55±0,2	1,31±0,05	1,36±0,52	4,67±0,01
10	1,47±0,28	3,7±0,35	14,3±0,33	1,5±0,22	1,94±0,78	4,88±0,12

Примечание: разница между коэффициентами проникности при температурах 4, 22 и 37 оС для всех концентраций ДМСО достоверна при $p < 0,05$.

температуры и концентрации криопротектора в растворе. Установлено, что проникность плазматической мембраны АК при температуре 22 и 37 °С выше, чем у ХК, причем при 37 °С этот показатель значительно возрастает.

Коефициент фильтрации мембран АК для воды при температуре 4 °С составил $2,35 \pm 0,83 \times 10^{14}$ м³/Н х с, при 22 °С – $2,71 \pm 0,31 \times 10^{14}$ м³/Н х с, при 37 °С – $4,28 \pm 1,91 \times 10^{14}$ м³/Н х с. Для ХК

коэффициенты составили $2,51 \pm 0,83 \times 10^{14}$ м³/Н х с – при 4 °С, $2,82 \pm 0,95 \times 10^{14}$ м³/Н х с – при 22 °С, $2,85 \pm 1,03 \times 10^{14}$ м³/Н х с – при 37 °С.

В табл. 3 представлены результаты расчета энергии активации транспорта молекул через плазматические мембраны АК и ХК надпочечников в различные температурные интервалы.

Наименьшая энергия активации установлена в температурном интервале 4 – 22 °С для обоих видов

Таблица 3

Энергии активации транспорта молекул через плазматические мембраны АК и ХК надпочечников

Концентрация ДМСО, %	Энергия активации E_a , кДж/моль					
	АК			ХК		
	4 – 22 °С	4 – 37 °С	22 – 37 °С	4 – 22 °С	4 – 37 °С	22 – 37 °С
5	33,35	42,15	52,53	15,57	30,05	47,94
7	31,87	55,00	83,43	20,43	27,63	36,28
10	35,66	50,06	67,42	21,34	25,62	30,57

клеток. Более высокие значения энергии активации наблюдаются в диапазоне температур 22 – 37 °С.

Ранее было показано, что ДМСО является дифильным веществом. С одной стороны он проявляет выраженные гидрофильные свойства (∞ растворимость, высокая энергия Н-связи с молекулами воды). С другой стороны наличие в молекуле 2-х метильных групп обеспечивает его способность активно взаимодействовать с липидными компонентами мембран, о чем свидетельствует значение коэффициента распределения ДМСО в системе «н-октанол - вода» ($K_p = 0,243$). Таким образом, ДМСО способен проникать внутрь клеток, как по белковым водным каналам, так и непосредственно через липидный матрикс [2].

Следовательно, можно предположить, что проникновение молекул ДМСО через плазматическую мембрану АК происходит через липидный бислой и белковые каналы, а у ХК проникновение молекул

ДМСО происходит преимущественно через липидный бислой.

Выводы.

1. Определены коэффициенты проникности мембран АК и ХК для молекул ДМСО.

2. Энергия активации процесса переноса молекул ДМСО через мембраны АК в диапазоне температур 4 – 37 °С составляет 42,15 - 55 кДж/моль, для растворов содержащих ДМСО от 5 до 10%.

3. Энергия активации процесса переноса молекул ДМСО через мембраны ХК в диапазоне температур 4 – 37 °С составляет 25,62 - 30,05 кДж/моль, для растворов содержащих ДМСО от 5 до 10%.

Перспективы дальнейшего исследования. В дальнейшем планируется использование полученных данных для разработки методов криоконсервирования адренокортикальных и хромоаффинных клеток надпочечников.

Список литературы

1. Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наук. Думка, 1994. – 160 с.
2. Коваленко Г.В. Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика / Г.В. Коваленко, И.Ф. Коваленко, Т.П. Линник // Вісник Харків. нац. універ. ім. В.Н. Каразіна. - 2009. - № 878, Сер. біологія, Вип.10. – С. 109–106.

3. Drucker-Colin R. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status / R. Drucker-Colin, L. Verdugo-Diaz // Cellular Molecular Neurobiology. – 2004. – Vol. 24, №3. – P. 301-316.
4. Dunn J.C. Adrenal cortical cell transplantation / J.C. Dunn, Y. Chu, M.M. Lam [et al.] // J. Pediatr. Surg. – 2004. – Vol. 39, № 12. – P. 1856-1858.

УДК 612.014.43:547.569.2:577.352.4

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ДЛЯ ВОДЫ И КРИОПРОТЕКТОРА

Дудецкая Г.В., Коваленко И.Ф., Бондаренко Т.П.

Резюме. Изучено осмотическое поведение адренокортикальных и хромаффинных клеток надпочечников крыс в растворах ДМСО различных концентраций. С использованием метода волюмометрии и модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран адренокортикальных и хромаффинных клеток надпочечников для молекул ДМСО при температурах 4, 22 и 37 °С. Установлено, что снижение проницаемости мембран адренокортикальных клеток для молекул ДМСО в диапазоне температур 4 – 37 °С составляет 42,15 - 55 кДж/моль, а для хромаффинных клеток этот показатель составляет 25,62 - 30,05 кДж/моль.

Ключевые слова: адренокортикальные клетки, хромаффинные клетки, коэффициенты проницаемости, энергии активации, ДМСО.

УДК 612.014.43:547.569.2:577.352.4

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ І РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ПРОНИКНІСТЬ МЕМБРАН КЛІТИН НАДНИРНИКІВ ДЛЯ ВОДИ І КРИОПРОТЕКТОРА

Дудецька Г.В., Коваленко І.Ф., Бондаренко Т.П.

Резюме. Вивчена осмотична поведінка адренокортикальних і хромаффінних клітин наднирників щурів в розчинах ДМСО різних концентрацій. Із застосуванням метода волюмометрії і модифікованої фізико-математичної моделі Кедем-Качальського визначені коефіцієнти проникливості плазматичних мембран адренокортикальних і хромаффінних клітин наднирників для молекул ДМСО при температурах 4, 22 і 37 °С. Встановлено, що зниження проникливості мембран адренокортикальних клітин для молекул ДМСО у діапазоні температур 4 – 37 °С становить 42,15 - 55 кДж/моль, а для хромаффінних клітин цей показник становить 25,62 - 30,05 кДж/моль.

Ключові слова: адренокортикальні клітини, хромаффінні клітини, коефіцієнти проникливості, енергії активації, ДМСО.

UDC 612.014.43:547.569.2:577.352.4

Effect Of Temperature And Various Concentrations Of Dimethylsulfoxide On The Permeability Of Adrenal Cell Membranes To Water And Cryoprotectant

Dudetskaya G.V., Kovalenko I.F., Bondarenko T.P.

Summary. The osmotic behavior of adrenocortical and chromaffin cells of adrenal glands of rats in solutions of different concentrations of DMSO. Using the method volumometry and modified physical-mathematical model of Kedem-Katchalsky determined the permeability coefficients of plasma membranes of adrenocortical and chromaffin cells of adrenal gland to molecules of DMSO at temperatures of 4, 22 and 37 °C. It is established that the decrease in permeability of membranes of adrenocortical cells to DMSO molecules in the temperature range 4 - 37 °C is 42,15 - 55 kJ/mol, and for chromaffin cells, the figure is 25,62 – 30,05 kJ/mol.

Key words: adrenocortical cells, chromaffin cells, the permeability coefficients, activation energies, DMSO.

Стаття надійшла 28.10.2011 р.