

УДК: 612.451.014:547.422

Осмотическое поведение клеток надпочечников в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400**Н.А.Чернобай, Т.А.Юрчук, Г.А.Божок, И.Ф.Коваленко, С.Е.Коваленко, Л.Ф.Розанов***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)*

Суспензия клеток, полученная из надпочечников мышей, представляет собой гетерогенную популяцию. Значения минимального и максимального объемов клеток в суспензии различаются на два порядка, а распределение клеток по размерам может быть описано как бимодальное. Получены данные о степени дегидратации клеток надпочечников в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400. Экстраполяцией зависимостей объема клеток от осмолярности среды к бесконечному осмотическому давлению найдены значения их относительных осмотически неактивных объемов в растворах NaCl (0,4027) и ПЭО-400 (0,3704).

Ключевые слова: *размеры клеток надпочечников, относительный осмотически неактивный объем.*

Осмотична поведінка клітин надниркових залоз у гіпертонічних розчинах NaCl та ПЕО-400**Н.А.Чернобай, Т.О.Юрчук, Г.А.Божок, І.Ф.Коваленко, С.Є.Коваленко, Л.Ф.Розанов**

Суспензія клітин, отримана з надниркових залоз мишей, є гетерогенною популяцією. Значення мінімального та максимального об'ємів клітин у суспензії відрізняються на два порядки, а розподіл клітин за розміром може бути описано як бімодальний. Отримані дані про ступень дегідратації клітин надниркових залоз в гіпертонічних розчинах NaCl та ПЕО-400. Екстраполяцією залежностей об'єму клітин від осмолярності середовища до нескінченного осмотичного тиску знайдені значення їх відносних осмотично неактивних об'ємів у розчинах NaCl (0,4027) та ПЕО-400 (0,3704).

Ключові слова: *розміри клітин надниркових залоз, відносний осмотично неактивний об'єм.*

Osmotic behavior of adrenal cells in hypertonic solutions of NaCl and PEO-400**N.A.Chernobay, T.A.Yurchuk, G.A.Bozhok, I.F.Kovalenko, S.Ye.Kovalenko, L.F.Rozanov**

Mice adrenal cell suspension is a heterogeneous population. The minimum and maximum values of cell volume in suspension differ by two orders, and distribution of cells by size can be described as bimodal. The values of dehydration rate of adrenal cells in hypertonic solutions of NaCl and PEO-400 have been calculated. Values of relative osmotically inactive volume in NaCl (0.4027) and PEO-400 (0.3704) solutions have been determined by extrapolation of dependence of cell volume on medium osmolarity to infinite osmotic pressure.

Key words: *size of adrenal cells, relative osmotically inactive volume.*

Введение

Криоконсервирование фрагментов и клеток надпочечников с целью создания запасов материала, пригодного для трансплантации, в настоящее время рассматривают как необходимое условие в разработке новых подходов к проблеме лечения гипокортицизма (Yan, 1990; Егоров, 1994; Бондаренко та ін., 2003). В связи с этим особое значение приобретает изучение транспортных характеристик мембран клеток надпочечников и их морфометрических параметров. Известно, что проницаемость плазматических мембран для молекул воды и криопротекторов является важнейшей криобиологической характеристикой клеток, определяющей их осмотическое поведение в процессе криоконсервирования и выживаемость после отогрева и возвращения в изотоническую среду. Один из наиболее адекватных методов оценки проницаемости – метод волюмометрии. В сочетании с физико-математическим моделированием процессов трансмембранного переноса этот метод позволяет определить значения коэффициентов проницаемости мембран индивидуальных клеток для молекул воды и криопротектора путем сопоставления экспериментальных зависимостей объема клетки от времени с адекватным решением теоретической модели для условий конкретного опыта. В качестве исходных параметров теоретическая модель включает, в частности, поверхностно-объемное отношение клетки и ее относительный осмотически неактивный объем (Гордиенко, Пушкар, 1994). Осмотически неактивный объем определяет долю внутриклеточных веществ, не способных покинуть клетку без повреждения мембраны. К ним относятся биологические

макромолекулы (нуклеиновые кислоты, белки), мембранные структуры, структурные элементы цитоскелета, связанная вода и др. В отличие от поверхностно-объемного отношения, определяемого в процессе изучения динамики объемных изменений клеток в растворах проникающих веществ, определение осмотически неактивного объема становится отдельной задачей. Ее решение возможно путем изучения осмотического поведения клеток в растворах непроникающих веществ с известным осмотическим давлением. Такие исследования позволяют определить зависимости объема клеток от осмотичности среды и допустимый уровень дегидратации клеток, провести расчёт осмотически неактивного объема, а в некоторых случаях – оценить транспортные характеристики клеточных мембран для воды.

Целью данной работы было определение относительного осмотически неактивного объема клеток надпочечников путем оценки степени их дегидратации в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400 различных концентраций.

Материалы и методы

Суспензию клеток получали из надпочечников мышей в среде 199 ферментативным методом (Пахомов и др., 2007). Морфометрические исследования, результат которых приведен на рис. 1, показывают, что суспензия содержит клетки с диаметром от 4,21 до 21 мкм. Распределение клеток по размерам может быть оценено как бимодальное.

Перед добавлением 0,25 М, 0,5 М, 0,75 М и 1 М растворов NaCl и ПЭО-400 клетки помещали в лунки блока, адаптированного к задачам исследований.

Микроскопические исследования проводили на микроскопе Obzerver.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Пользуясь программой AxioVision 4.7, измеряли диаметры (d) клеток. В приближении сферы из этих данных могут быть получены объем клетки (V), площадь поверхности клеточной мембраны (S) и поверхностно-объемное отношение (γ):

$$V = \frac{\pi d^3}{6}; \quad S = \pi d^2; \quad \gamma = \frac{6}{d}$$

Очевидно, что экспериментальные данные об изменении клеточного объема уместно представлять не в абсолютных, а в относительных величинах. Так, относительный объем клетки (y) может быть найден из соотношения:

$$y = \left(\frac{d}{d_0}\right)^3,$$

где d_0 – исходный диаметр клетки, а d – диаметр клетки после воздействия.

Относительный осмотически неактивный объем клеток определяли экстраполяцией зависимостей относительного объема от концентрации непроникающего внеклеточного компонента NaCl и ПЭО-400, представленных в координатах Вант-Гоффа, к бесконечному осмотическому давлению.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Представленные на рис. 1 данные морфометрии позволяют оценить пределы варьирования объема и поверхностно-объемного отношения клеток в суспензии. Объем клеток варьирует в пределах $3,91 \cdot 10^1 - 4,84 \cdot 10^3$ мкм³, то есть в пределах двух порядков. Поверхностно-объемное отношение варьирует, в свою очередь, в пределах $0,29 - 1,43$ мкм⁻¹, изменяясь не более, чем в 5 раз.

Для оценки степени обезвоживания клеток надпочечников в растворах NaCl и ПЭО-400 и определения «осмотически неактивного объема» этих клеток (параметра, используемого при расчете коэффициентов проницаемости) были получены зависимости относительного клеточного объема от концентрации осмотически активных частиц в растворе, представленные на рис. 2.

Из приведенных данных видно, что кривые зависимости относительного объема клеток надпочечников от концентрации осмотически активных частиц различны для растворов NaCl и ПЭО-400. В растворах ПЭО-400 дегидратация при равных концентрациях осмотически активных частиц выше, чем в растворах NaCl. Переход от концентраций к осмотическим давлениям растворов

и представление данных в координатах Вант-Гоффа (рис. 3 а, б) показало, тем не менее, хорошую сопоставимость результатов, полученных при использовании NaCl (0,4027) и ПЭО-400 (0,3704). Найденные из графиков значения относительных осмотически неактивных объемов клеток имеют незначительные различия.

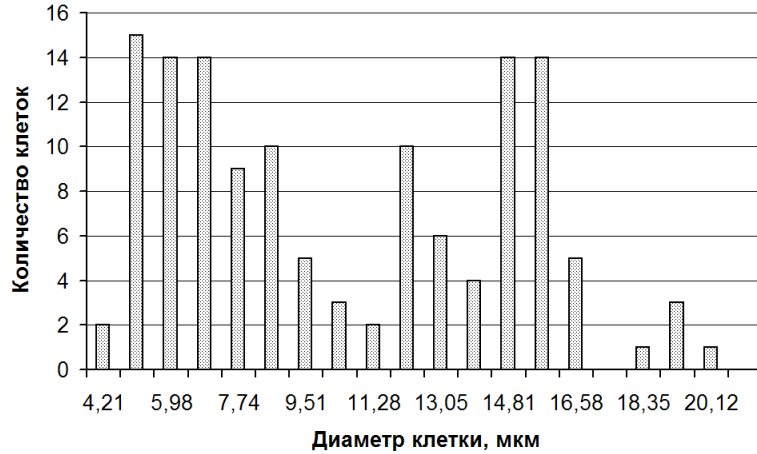


Рис. 1. Распределение клеток надпочечников в суспензии по размерам

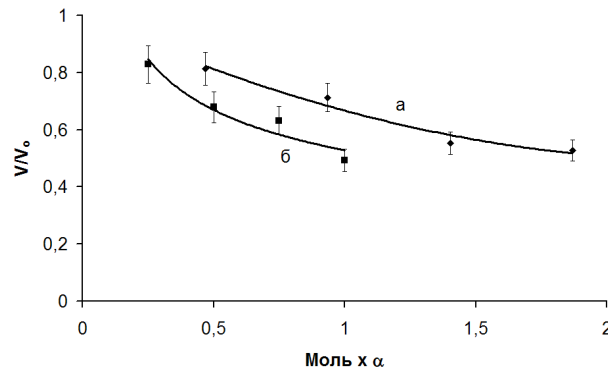


Рис. 2. Зависимость относительного объема клеток надпочечников от молярности растворов NaCl (а) и ПЭО-400 (б). α – константа диссоциации

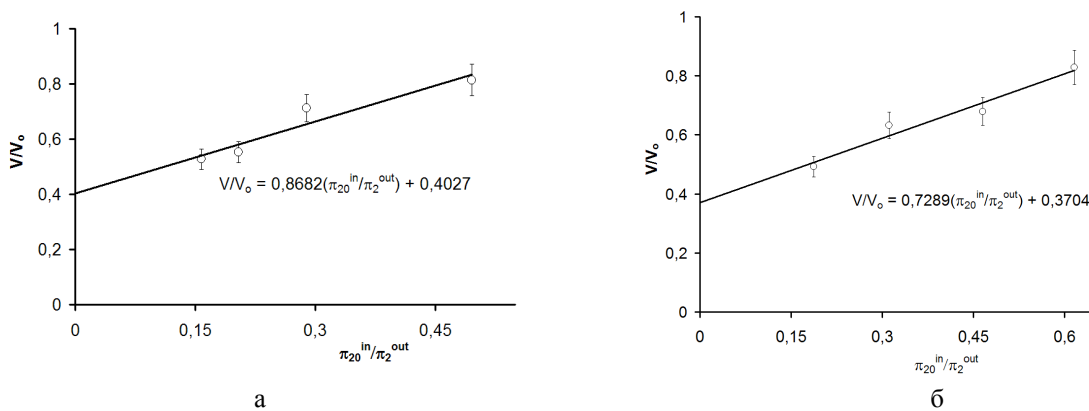


Рис. 3. Зависимость относительного объема клеток надпочечников от приведенного осмотического давления растворов NaCl (а) и ПЭО-400 (б)

Таким образом, изолированные клетки надпочечников в результате дегидратации могут терять до 60% своего объема. Степень дегидратации в растворах ПЭО-400 более выражена, чем можно было бы ожидать, учитывая только количество молекул в растворе и не принимая во внимание способность этих молекул связывать воду.

Выводы

Объем клеток надпочечников мышей варьирует от $3,91 \cdot 10^1$ до $4,84 \cdot 10^3$ мкм³, а поверхностно-объемное отношение от 0,286 до 1,425 мкм⁻¹. Распределение клеток по размерам может быть оценено как бимодальное.

Клетки надпочечников обезвоживаются в растворах ПЭО-400 в большей степени, чем в растворах NaCl с той же концентрацией осмотически активных частиц в растворе.

Значения относительных осмотически неактивных объемов клеток надпочечников, определенные из зависимостей относительного объема от приведенного осмотического давления для растворов NaCl и ПЭО-400, составляют 0,4027 и 0,3704 соответственно.

Список литературы

Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Алабедакарим Н.М., Легач Є.І. та ін. Ксенотрансплантація кріоконсервованного ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №5. – С. 60–63. /Bondarenko T.P., Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Legach Ye.I. ta in. Ksenotransplantatsiya kriokonservovannogo endokrynnoho materialu yak metod korektsii gipofunksii zaloz v eksperymentі // Transplantologiya. – 2003. – Т.4, №5. – С. 60–63./

Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наукова думка, 1994. – 142с. /Gordiyenko Ye.A., Pushkar' N.S. Fizicheskiye osnovy nizkotemperaturnogo konservirovaniya kletochnykh suspenziy. – K.: Naukova dumka, 1994. – 142s./

Егоров Е.И. Лечение болезней надпочечных желез, используя трансплантацию культуры адренокортикальной ткани новорожденных поросят // Бюл. эксп. биол. і мед. – 1994. – Т.117, №4. – С. 389–391. /Yegorov Ye.I. Lecheniye bolezney nadpochechnykh zhelez ispol'zuya transplantatsiyu kul'tury adrenokortikal'noy tkani novorozhdyonnykh porosyat // Byul. eksp. biol. i med. – 1994. – Т.117, №4. – С. 389–391./

Пахомов А.В., Божок Г.А., Боровой И.А. и др. Использование флюоресцентной диагностики для характеристики клеток стероидогенных тканей // Проблемы эндокринной патологии. – 2007. – №4. – С. 78–83. /Pakhomov A.V., Bozhok G.A., Borovoy I.A. i dr. Ispol'zovaniye flyuoresstentnoy diagnostiki dlya kharakteristiki kletok steroidogennykh tkaney // Problemy endokrinnoi patologii. – 2007. – №4. – С. 78–83./

Yan Z.B. A study of cadaveric fetal adrenal used for adrenal transplantation to treat Addison's disease: thirteen cases reported // Transplant. Proc. – 1990. – Vol.22, №1. – P. 280–282.

Представлено: Л.І.Білостоцька / Presented by: L.I.Bilostots'ka

Рецензент: Є.Є.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 14.09.2010.