

УДК 577.352.462:57.043

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ КРЫСЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДЫ В НЕИЗОТОНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ ЭЛЕКТРОЛИТА

Л.Г. Кулешова, Е.А. Гордиенко, И.Ф. Коваленко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул. Переяславская, 23
Поступила в редакцию 20 марта 2002 г.

Методом световой микроскопии изучено осмотическое поведение гепатоцитов крысы в неизотонической среде электролита (NaCl). Морфометрически получены кинетические кривые обезвоживания клеток, позволившие аналитически, с помощью уравнений неравновесной термодинамики, рассчитать численные значения коэффициента фильтрации мембран гепатоцитов для молекул воды (L_p), а также объемную долю осмотически неактивных внутриклеточных веществ (α). Установлено, что коэффициент фильтрации L_p зависит от концентрации электролита в среде и снижается от $2,17 \times 10^{-11}$ м³/Нс до $0,50 \times 10^{-11}$ м³/Нс при увеличении внеклеточной осмотичности от 1087 мОсм/л до 6636 мОсм/л, соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гепатоциты, мембрана, проницаемость, осмолярность.

Эмпирический поиск оптимальных условий криоконсервирования биологических объектов во многом может быть облегчен благодаря теоретическим подходам к решению целого ряда криобиологических задач. Определение комплекса биофизических характеристик клеток для этой цели является крайне необходимым. К числу таких характеристик прежде всего следует отнести коэффициент проницаемости (или фильтрации) L_p клеточной мембраны для молекул воды. По определению коэффициентом фильтрации L_p клеточной мембраны называется коэффициент пропорциональности между удельным (через единицу площади клеточной мембраны) объемным потоком и трансмембранным перепадом гидростатического давления Δp при нулевом трансмембранном перепаде осмотического давления $\Delta \pi$:

$$L_p = \left[\frac{1}{S} \left(\frac{dV}{dt} \right) / \Delta p \right]_{\Delta \pi = 0}, \quad (1)$$

где S - площадь клеточной поверхности, V - объем клетки, t - время.

Коэффициент фильтрации L_p может быть рассчитан из экспериментальных данных при изучении кинетики изменения клеточного объема в неизотонических растворах различных непроникающих веществ.

В работе исследовано влияние гипертонических растворов электролита (NaCl) на транспортные характеристики плазматических мембран гепатоцитов крысы при комнатной температуре.

Как известно [1], изменение относительного объема клетки при контакте с гипертоническими растворами непроникающего в клетки вещества описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - \hat{\pi}_1^{\text{out}} \right], \quad (2)$$

где $y = V/V_0$ - относительный объем клетки, t - время, α - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ, $\tau_0 \equiv [\gamma L_p \pi_0]^{-1}$, γ - поверхностно-объемное отношение клетки в начальный момент времени, L_p - коэффициент фильтрации клеточной мембраны, π_0 - осмотическое давление физиологического раствора, π_1^{out} - осмотическое давление внеклеточного раствора, $\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \pi_1^{\text{out}} / \pi_0$ - приведенное осмотическое давление внеклеточного раствора.

В силу закона сохранения массы число молей растворенного вне клетки вещества с течением времени не меняется. Поэтому

$$\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) \frac{1 - g_0}{y - g_0}, \quad (3)$$

где $\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0)$ - начальное значение приведенного осмотического давления внеклеточного раствора, а g_0 - отношение суммарного объема клеток к объему всего образца в начальный момент времени.

Если $\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) > 1$, то в процессе экспозиции клеток в гипертонической среде их относительный объем достигает минимальных значений y_{min} и с теоретической точки зрения должен оставаться в дальнейшем неизменным. Очевидно, что на этой стационарной фазе выполняется равенство

$$\frac{1 - \alpha}{y_{\text{min}} - \alpha} - \hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) \frac{1 - g_0}{y_{\text{min}} - g_0} = 0 \quad (4)$$

откуда

$$\alpha = \frac{\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) y_{\text{min}} (1 - g_0) - y_{\text{min}} + g_0}{\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) (1 - g_0) - y_{\text{min}} + g_0} \quad (5)$$

При бесконечном разведении ($g_0 \rightarrow 0$)

$$\alpha = \frac{y_{\text{min}} [\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) - 1]}{\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) - y_{\text{min}}} \quad (6)$$

Поскольку фигурирующие в правой части равенства (6) величины либо задаются, либо определяются экспериментально, формула (6) позволяет вычислить объемную долю осмотически неактивных внутриклеточных веществ.

Численное решение уравнения (2) с учетом уравнения (3) позволяет, варьируя параметры τ_0 и α , подобрать такие их значения, при которых теоретическая кривая изменения относительного объема клеток совпадает с экспериментально определяемой зависимостью $y(t)$, и тем самым определить эти параметры. Коэффициент фильтрации клеточной мембраны L_p рассчитывается из $\tau_0 \equiv [\gamma L_p \pi_0]^{-1}$, так как значение π_0 известно, а поверхностно-объемное отношение γ определяется экспериментально.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией осмотического ответа гепатоцитов крысы на гипертоническое воздействие. Гепатоциты выделяли из печени крыс по методу [2]. Гипертонические растворы хлористого натрия в концентрации 2%, 5%, 20% вес. готовили на среде суспендирования клеток следующего состава: 250мМ сахара, 5мМ KCl, 0,4мМ KH_2PO_4 , 0,4мМ NaHPO_4 , 0,8мМ MgSO_4 , 1,2мМ CaCl_2 , 10мМ трис, 1% альбумин.

Осмотическое давление растворов контролировали на осмометре ОМКА ИЦ-01. Данные приведены в таблице 1. рН растворов составлял 7,4.

Таблица 1. Осмотическое давление гипертонических сред

Реагенты	Среда суспендирования	2% NaCl	5% NaCl	20% NaCl
Осмотическое давление, мОсм/л	417	1087	2246	6636
Приведенное осмотическое давление, $\hat{\pi}_1^{\text{out}}$	1,16	3,44	7,11	21,00

Свежевыделенные гепатоциты помещали в специально сконструированную камеру, позволяющую визуально изучать кинетику клеточной реакции. Жизнеспособность гепатоцитов оценивали по окрашиванию витальным красителем 0,2% трипановым синим, вводимым непосредственно в исследуемый препарат до введения соответствующего реагента. Жизнеспособность клеток в среднем составляла 80%.

Кинетические кривые изменения относительной площади клеток в гипертонических растворах NaCl получены методом морфометрии. Статистическую обработку результатов проводили, используя традиционный метод определения стандартного отклонения [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспериментальных кривых (рис.1) показал, что реакция гепатоцитов крысы на внеклеточную гипертоничность состоит из трех фаз: быстрой фазы обезвоживания, фазы стабилизации обезвоженного состояния (так называемой Lag-фазы) и фазы разрушения клеток. Длительность Lag-фазы определяется как

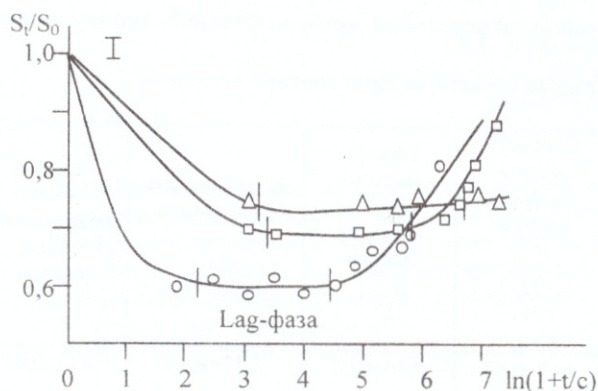


Рис.1. Изменение относительной площади изображения гепатоцитов крысы со временем при различной гипертоничности внеклеточного раствора:

Δ - 2% NaCl; \square - 5% NaCl; \circ - 20% NaCl

фрагментацией цитоматрикса и четким контрастированием ядер (рис.2.5, рис.3.4). Впоследствии отмечается отслоение мембраны от цитоматрикса, о чем свидетельствует формирование многочисленных локальных бляшек (пузырей), развивающихся и коалесцирующих во времени (рис.2.7, рис.2.9).

различной осмотической устойчивостью клеток, так и величиной осмотического градиента. При внеклеточной осмотичности раствора 1070 мОсм/л длительность Lag-фазы в среднем составляет около 240 с. При возрастании внеклеточной гипертоничности длительность Lag-фазы закономерно уменьшается и при внеклеточной осмотичности 2246 и 6636 мОсм/л составляет 150 с и 90 с соответственно. По-видимому, на стадии стабилизации обезвоженного состояния за счет прямого химического действия высоких концентраций электролита транспортные характеристики мембран клеток нарушаются, в результате чего в норме не проникающий в клетку хлористый натрий начинает входить в клетку. Объем клеток увеличивается и в дальнейшем наблюдается их разрушение. Морфологически повреждение гепатоцитов характеризуется разрыхлением, грануляцией,

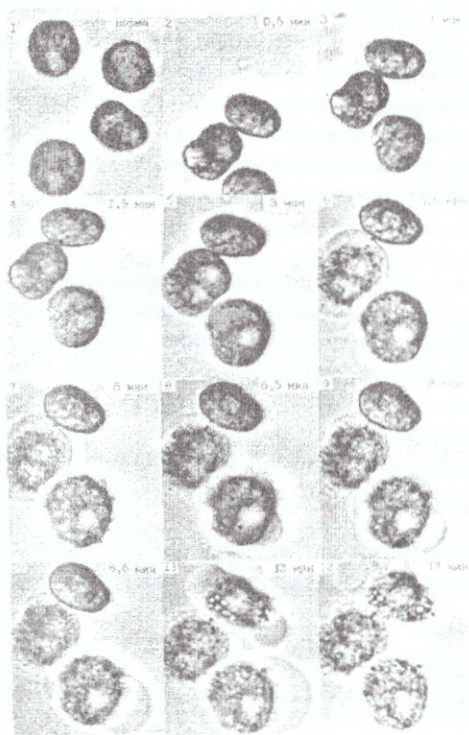


Рис.2. Кинетика морфологической реакции гепатоцитов крысы на введение 5%-го раствора NaCl увеличение при съемке $\times 200$.



Рис.3. Кинетика морфологической реакции гепатоцитов крысы на введение 20%-го раствора NaCl увеличение при съемке $\times 200$.

В таблице 2 приведены экспериментально полученные данные (S_0 , S_{min} , $Y_{min} = \frac{\Delta S}{\Delta t} \cdot \frac{S_{min}}{S_0}$), а также аналитически рассчитанные численные значения клеточных параметров (L_p , α) при заданных условиях (π_1^{out}). Объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ при возрастании внеклеточной гипертоничности падает, что свидетельствует об увеличении эффективной внутриклеточной концентрации

Таблица 2. Экспериментальные и аналитически рассчитанные характеристики клеток

Осмотическое давление внеклеточного раствора π_1^{out} , (мОсм/л)	Среднее значение исходной площади клетки S_0 , 10^{-3} мм^2	Среднее значение минимальной площади клетки S_{min} , 10^{-3} мм^2	Относительный минимальный объем клетки Y_{min}	Скорость обезвоживания клетки $\frac{\Delta S}{\Delta t}$, $10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$	Максимальное обезвоживание клетки $\frac{S_{min}}{S_0}$	Коэффициент фильтрации L_p , $10^{-12} \text{ м}^3/\text{с} \cdot \text{Па}$	Осмотически неактивный объем клетки α
1087	$0,291 \pm 0,038$ n=8	$0,221 \pm 0,027$	$0,625 \pm 0,033$	$4,47 \pm 0,83$	$0,76 \pm 0,02$	$2,17 \pm 0,43$	$0,471 \pm 0,023$
2246	$0,282 \pm 0,060$ n=12	$0,193 \pm 0,038$	$0,509 \pm 0,046$	$7,06 \pm 2,09$	$0,68 \pm 0,04$	$1,09 \pm 0,25$	$0,428 \pm 0,031$
6636	$0,274 \pm 0,049$ n=9	$0,170 \pm 0,040$	$0,421 \pm 0,043$	$8,62 \pm 1,34$	$0,62 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,09$	$0,392 \pm 0,027$

осмотически активных веществ. Вероятно, при экстремальных воздействиях на цитометрикс возможна фрагментация белковых молекул протеолитическими ферментами, которые высвобождаются из разрушенного липосом. Кроме того, в раствор переходят вещества ранее связанные с мембранами или сосредоточенные в изолированных компартаментах клеток. Это предположение вполне согласуется со стрессовой морфологией гепатоцитов (рис.2, рис.3). Следствием увеличения эффективной внутриклеточной концентрации осмотически активных веществ является поступление воды в клетки и их набухание. Снижение коэффициента фильтрации скорее всего может быть обусловлено блокированием водных каналов при изменении геометрии клеточной мембраны в результате сжатия клеток. Увеличение же скорости обезвоживания при возрастании осмотического фактора может явиться одной из причин повреждения клеточной мембраны за счет развиваемых на ней осмотических градиентов.

ВЫВОДЫ

Таким образом, коэффициент фильтрации L_p для молекул воды плазматических мембран гепатоцитов крысы не имеет постоянного значения и уменьшается при увеличении гипертоничности внеклеточной среды.

При замораживании клеточных суспензий согласно фазовой диаграмме состояния, независимо от исходной концентрации компонентов криоконсерванта, в зоне эвтектических температур клетки оказываются в среде с максимальной гипертоничностью.

Поскольку выход воды из клеток лимитируется коэффициентом фильтрации L_p , скорость нарастания гиперосмотического фактора в каналах должна быть такой, чтобы одновременно исключить вероятность образования внутриклеточных кристаллов и нарушение полупроницаемых свойств плазматической мембраны.

Полученные в данной работе численные значения коэффициента фильтрации L_p позволяют аналитически рассчитать оптимальную скорость охлаждения гепатоцитов крысы, при которой возможно выполнение вышеуказанных условий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. К.:Наукова думка,1994.-144с.
2. Кравченко Л.П., Андриенко А.Н., Семенченко О.А., Петренко А.Ю., Сукач А.Н. Способ получения изолированных клеток печени. А.с.№1463757. С12N5/00, з.№4221432/28-13 от 02.04.87. опубл. 07.03.89. БИ №8.
3. Л. Закс. Статистическое оценивание.-М.:Статистика.1976.-598с.