

УДК 591.15.16.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН К ВОДЕ И ЭНЕРГИИ АКТИВАЦИИ ПЕРЕНОСА ВОДЫ ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНУЮ МЕМБРАНУ.

Н.Д.Безуглый, А.Г.Трохименко

Харьковский биотехнологический центр, 312120 Харьков, п/о Кулинчи, E-mail cryo@animal.Kharkov.ua
Поступила в редакцию 14 декабря 1999 года.

В статье описан метод количественного определения проницаемости цитоплазматических мембран к воде. Метод воллометрии позволяет измерять изменения клеточного объема во времени в растворах различного состава и температуры. Использование физико-математической модели мембранного транспорта Кедема-Качальского и аналитической модели осмотической реакции клеток в растворах непроницающих веществ дает возможность определять коэффициенты проницаемости цитоплазматических мембран ооцитов, яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих к воде и энергию активации транспорта воды через клеточную мембрану.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: осмотическая реакция, проницаемость цитоплазматических мембран, клеточный объем, энергия активации.

Перемещение воды через мембрану из одной части системы в другую вызывается двумя основными причинами: повышением гидростатического давления в одной из частей системы и увеличением в другой ее части концентрации растворенного вещества, для которого мембрана менее проницаема, чем для воды. Второй случай известен как осмос. Помещая клетки в растворы различной тоничности или температуры, мы сталкиваемся с осмотическими эффектами, влияние которых необходимо оценить на всех этапах как замораживания, так и оттаивания.

В начале экспозиции клетки будут изменять свой объем в соответствии с законом Вант-Гоффа. Скорость изменения объема клетки при данной температуре зависит от значения коэффициента проницаемости к воде и веществам, проникающим в клетку, и поверхностно-объемного отношения. Скорость транспорта веществ через цитоплазматические мембраны можно изучать с помощью воллометрии [1, 2].

В основу изучения проницаемости мембран к воде и проникающим веществам положен метод измерения изменений клеточного объема при помещении в растворы различного состава и осмолярности. Количественное описание процесса переноса воды через биологические мембраны дает система уравнений модели Кедема-Качальского [3, 4]. Применив данную систему для обоснования методики воллометрии и анализа осмотического поведения клетки в растворах криопротекторов, была разработана аналитическая модель осмотической реакции клеток в растворах различного состава и осмолярности [5].

Рассмотрим поведение одиночной, изолированной клетки при помещении ее в раствор непроницающих веществ неизотонической концентрации. Изменение объема клетки будет происходить, в основном, из-за перераспределения воды между клеткой и окружающей клетку средой. При таких условиях коэффициент проницаемости к проникающему веществу равен нулю, а коэффициент отражения - единице, следовательно, поток растворенного вещества отсутствует и КК- уравнения принимают вид:

$$J_V = L_p (\Delta p - RT \Delta C_i) \quad (1),$$

где: J_V - общий объемный поток клетки, L_p - коэффициент проницаемости к воде, R - универсальная газовая постоянная, T - температура, Δp и ΔC_i - разности гидростатического давления и концентрации непроницающего вещества на клеточной мембране, соответственно.

Учитывая, что потоки через цитоплазматическую мембрану прямо пропорциональны изменениям соответствующих объемов в клетке, получаем уравнение изменения объема внутриклеточной воды:

$$\frac{dV_w}{dt} = L_p S \cdot (\Delta p - RT \Delta C_i) \quad (2),$$

где S - площадь поверхности мембраны

Так как упругостью цитоплазматических мембран для клеток животных можно пренебречь, то есть $\Delta p = 0$, выражение (2) запишется следующим образом:

$$\frac{dV_w}{dt} = -L_p S R T \Delta C_i \quad (3).$$

Переходя от абсолютных к относительным значениям объема внутриклеточной воды $\hat{V}_w = \frac{V_w}{V_w^{iso}}$, и безразмерной концентрации $\hat{C}_i^e = \frac{C_i^e}{C_i^{iso}}$, где C_i^{iso} - изотоническая концентрация непроникающих веществ, а V_w^{iso} - изотонический объем внутриклеточной воды, получим

$$\frac{d\hat{V}_w}{dt} = \left[L_p \left(\frac{S}{V_w} \right)_0 RTC_i^0 \right] \left(\frac{1}{\hat{V}_w} - \hat{C}_i^e \right) \quad (4)$$

Выражение, обратное стоящему в квадратных скобках, имеет размерность времени и может быть определено как характерное время осмотической реакции в растворах непроникающих веществ, которое обратно пропорционально коэффициенту проницаемости к воде и поверхностно-объемному отношению:

$$\tau = \frac{1}{L_p RTC_i^0 \left(\frac{S}{V_w} \right)_0} \quad (5)$$

Введя равновесное (конечное) значение относительного объема \hat{V}_w^{eq} , определяющееся из условия равновесия при $t \rightarrow \infty$:

$$\hat{V}_w^{eq} = \frac{1}{\hat{C}_i^e},$$

и, интегрируя методом разделения переменных, получим решение уравнения (4) в пределах от \hat{V}_w^0 до \hat{V}_w , где \hat{V}_w^0 - начальное значение относительного объема. Решение будет иметь вид:

$$t_i = \tau \times \left[\hat{V}_w^{eq} (\hat{V}_w^0 - \hat{V}_w) + \hat{V}_w^{eq2} \left(\ln \frac{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w^0}{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w} \right) \right] \quad (6)$$

Применив метод наименьших квадратов для аппроксимации опытных данных к уравнению (6), получаем:

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^n \left[\hat{V}_w^{eq} (\hat{V}_w^0 - \hat{V}_w) + \hat{V}_w^{eq2} \left(\ln \frac{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w^0}{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w} \right) \right] \times t_i^{exp}}{\sum_{i=1}^n \left[\hat{V}_w^{eq} (\hat{V}_w^0 - \hat{V}_w) + \hat{V}_w^{eq2} \left(\ln \frac{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w^0}{\hat{V}_w^{eq} - \hat{V}_w} \right) \right]^2} \quad (7)$$

где n - количество экспериментальных значений, t_i^{exp} - значение времени, при котором фиксировалось изменение клеточного объема.

Проницаемость к воде изучали в гипертонических растворах NaCl. Так как NaCl в норме является непроникающим через цитоплазматические мембраны веществом при переносе клетки в его гипертонический раствор осмотическое равновесие достигается путем обезвоживания цитоплазмы. Массив экспериментальных данных, характеризующий кинетику выхода воды из клетки, является базовым для определения удельной проницаемости. Через массив экспериментальных точек проводилась расчетная кривая, которая наименьшим образом отклоняется от экспериментальных данных (рис.1). Определялись время осмотической реакции клеток в растворах непроникающих веществ и искомый коэффициент проницаемости к воде, характеризующие данную кривую.

Температурная зависимость коэффициента проницаемости изучалась в диапазоне положительных температур в предположении, что она подчиняется закону Аррениуса:

$$L_p = L_p(T_o) \exp \frac{\Delta E_{act}}{R} \left(\frac{1}{T_o} - \frac{1}{T} \right) \quad (8)$$

где: $L_p(T_0)$ - коэффициент проницаемости при температуре T_0 , ΔE_{act} - энергия активации переноса воды через клеточную мембрану.

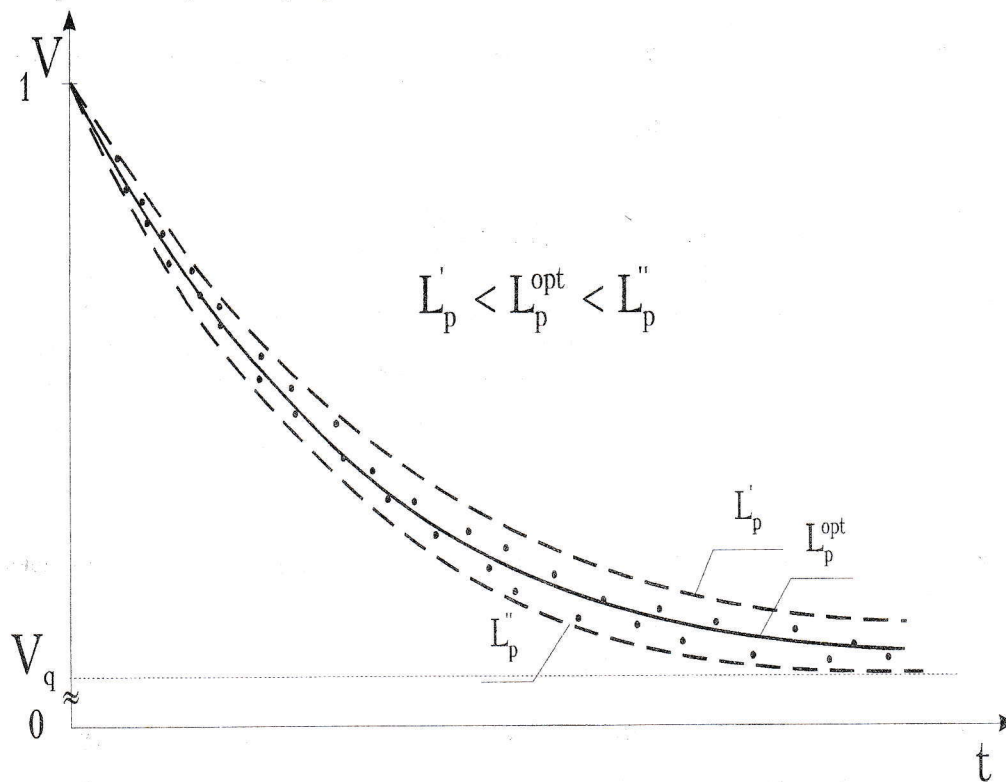


Рис.1. Изменение относительного объема клетки во времени и аппроксимация экспериментальных данных методом вариационного анализа. Точки - экспериментальные данные, линии - расчетные данные. Пунктиром показаны поисковые значения L_p , сплошной линией - оптимальное значение L_p . V_q - равновесное значение клеточного объема.

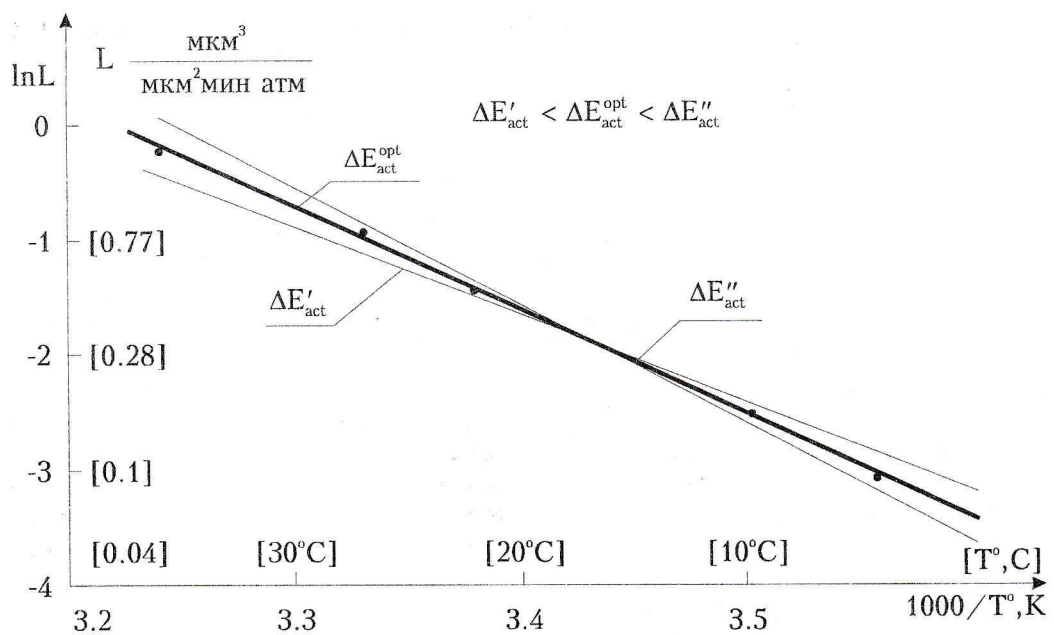


Рис.2. График Аррениуса коэффициента проницаемости к воде, по оси ординат в квадратных скобках указаны значения коэффициента проницаемости.

Искомая энергия активации определялась как коэффициент, характеризующий температурную зависимость в координатах Аррениуса (рис. 2), применяя метод наименьших квадратов к уравнению (8):

$$\Delta E_{act} = R \frac{\sum_{j=1}^k \left(\ln L_{P_j}^{exp} - \ln L_P(T_0) \right) \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_j} \right)}{\sum_{j=1}^k \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_j} \right)^2} \quad (9),$$

где k - количество экспериментальных точек, T_0 и T_j - начальное и текущее значения температуры, соответственно.

Таким образом, вышеописанные методы позволяют рассчитать коэффициенты проницаемости цитоплазматических мембран половых клеток млекопитающих, определить характерные времена осмотической реакции и энергию активации транспорта воды через клеточную мембрану, что дает возможность оценить дегидратацию клеток при снижении температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглий М.Д., Медведовський О.В. Напівавтоматичний метод вивчення осмотичної реакції зародків та яйцеклітин ссавців //Тези доповіді І Республ. конференції "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку". - Львів. - 1990 - с.6.
2. Безуглий Н.Д., Гордиенко Н.А., Медведовский А.В. Волюмометрия яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. I. Физико-математические основы и технические подходы к измерению изменений клеточного объема. - Биофизический вестник. - Выпуск 4 (2), 1999. - с. 72 - 79.
3. Kedem O., Katchalsky A. A thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. //Biochem. et biophys. acta. - 1958. - V. 27. - № 2. - p. 229-246.
4. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficient of membrane permeability. //J. Gen. Physiol. - 1961. - V. 45. - N 1. - p. 143-179.
5. Безуглий Н.Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации. //Автореф. диссертации канд. биол. наук. - Харьков. - 1984.