

Коефіцієнти проникності мембран еритроцитів миші для води та кріопротекторів

В.В. Огурцова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Permeability Coefficients of Murine Enterocyte Membranes for Water and Cryoprotectants

V.V. Ogurtsova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Заморожування-відтавання залишається основним методом консервування клітин. Вивчення осмотичної реакції клітин і транспортних властивостей їх мембран є необхідним етапом кріобіологічних досліджень і розробки оптимальних умов кріоконсервування конкретних видів клітин [Dumont F. *et al.*, 2003].

Мета роботи – визначення коефіцієнтів проникності еритроцитів миші для води та кріопротекторів, які часто використовуються під час кріоконсервування клітинних суспензій. Для експериментів було вибрано наступні кріопротекторні речовини: етиленгліколь (ЕГ), гліцерин, 1,2-пропандіол (1,2-ПД) та диметилсульфоксид (ДМСО).

Досліджувався вплив кріопротекторів на еритроцити кишечника мишей. Клітини виділяли за методикою Carter J.H. та співавт. (1986). Коефіцієнти фільтрації та проникності мембран еритроцитів для кріопротекторів визначали волонометричним методом. Клітини вміщували у бінарний розчин (0,15 М NaCl – 1 М кріопротектора), об'єм якого значно перевищував початковий об'єм клітинної суспензії. Досліджували кінетику зміни розмірів клітин у розчинах чотирьох кріопротекторів при температурі 25°C за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» (масляно-імерсійний об'єктив $\times 63$). Об'єм клітин апроксимували об'ємом зрізаного конуса. Лінійні розміри клітин (висоту, малий і великий діаметри зрізаного конуса) визначали за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.6». Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин під час їхнього контакту з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь, які описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів [Gordiyenko E.A. *et al.*, 1994].

Отримані коефіцієнти фільтрації вірогідно не відрізняються між собою в розчинах кріопротекторів 1,2-ПД, ДМСО та гліцерину ((1,42 \pm 0,17), (1,3 \pm 0,13) та (1,24 \pm 0,14) $\times 10^{14}$ м³/Н·с відповідно), у той же час коефіцієнт фільтрації еритроцитів миші у розчині ЕГ майже у 2 рази більший, ніж у розчинах названих кріопротекторів ((2,4 \pm 0,32) $\times 10^{14}$ м³/Н·с). Найбільший коефіцієнт проникності мембран еритроцитів миші спостерігали у ЕГ ((4,79 \pm 0,99) $\times 10^7$ м/с), проникність для 1,2-ПД та ДМСО становить (0,672 \pm 0,11) та (0,530 \pm 0,1) $\times 10^7$ м/с відповідно, а найменший коефіцієнт проникності мають мембрани еритроцитів для гліцерину ((0,134 \pm 0,05) $\times 10^7$ м/с). За тривалістю виживання клітин у розчинах кріопротектори можна розташувати як 1,2-ПД > ДМСО > гліцерин > ЕГ. Показано, що ЕГ негативно впливає на мембрани еритроцитів, порушуючи їх проникні властивості. Отримані дані можуть бути використані для підбору оптимального режиму кріоконсервування цих клітин.

Freeze-thawing has remained the main method of preserving the cells. Study of osmotic response of cells and transport properties of their membranes is a mandatory step of cryobiological researches and development of optimal conditions for cryopreservation of specific cell types [Dumont F. *et al.*, 2003].

The research aim was to determine the permeability coefficients for murine enterocytes for water and cryoprotectants, usually applied for the cryopreservation of cell suspensions. The experiments were done with the following cryoprotective agents: ethylene glycol (EG), glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO).

The cells were isolated by the method reported by J.H. Carter (1986). The coefficients of enterocyte membrane filtration and permeability for cryoprotectants was determined with volumetric method. The cells were placed into a binary solution (0.15 M NaCl – 1 M cryoprotectant) with the volume significantly exceeding the one of the cell suspension. The kinetics of the cell size changes was studied with Axio Observer Z1 microscope (oil-immersion, $\times 63$). The volume of cells was approximated with a truncated cone. Linear dimensions of cells (height, small and large diameters of a truncated cone) was found using AxioVision Rel. 4.6. Experimentally determined time dependencies of cell volume during their contact with solutions of 0.15 M NaCl and 1 M cryoprotectant were approximated with numerical solutions of the nonlinear equations system describing the dependence in terms of linear thermodynamics of irreversible processes [Gordiyenko E.A. *et al.*, 1994].

The obtained filtration coefficients did not significantly differ between the solutions of cryoprotectants 1,2-PD, DMSO and glycerol ((1.42 \pm 0.17); (1.3 \pm 0.13) and (1.24 \pm 0.14) $\times 10^{14}$ m³/N·s, respectively), meanwhile the filtration coefficient of mouse enterocytes in EG solution was almost 2 times higher than in the solutions of other cryoprotectants ((2.4 \pm 0.32) $\times 10^{14}$ m³/N·s). The highest permeability coefficient of murine enterocyte membranes was observed for EG ((4.79 \pm 0.99) $\times 10^7$ m/s), the coefficients for 1,2-PD and DMSO were (0.672 \pm 0.11) and (0.530 \pm 0.1) $\times 10^7$ m/s, respectively, and the lowest permeability coefficient of enterocyte membranes was found for glycerol ((0.134 \pm 0.05) $\times 10^7$ m/s). The duration of cell survival in the solution the cryoprotectants can be arranged as 1,2-PD > DMSO > glycerol > ethylene glycol. It has been shown that EG negatively affects the membranes of enterocytes, breaking their penetrating properties. The data can be used for further selection of the most optimal method of cryopreservation of these cells.

