Probl Cryobiol Cryomed 2017; 27(2): 164
https://doi.org/10.15407/cryo27.02.164

Проникність мембран ентероцитів миші для води та кріопротекторів

В.В. Огурцова[2], І.Ф. Коваленко[1]
[1]Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
[2]Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я Усикова НАН України, м. Харків

Mouse Enterocytes' Membrane Permeability to Water and Cryoprotective Agents

V.V. Ogurtsova[2], I.F. Kovalenko[1]
[1]Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
[2]O.Ya. Usikov Kharkiv National Universtiy of Radio Electronics, Kharkiv, Ukraine

Визначення транспортних властивостей мембрани є необхідною ланкою кріобіологічних досліджень і розробки оптимальних умов кріоконсервування конкретних видів клітин. Коефіцієнти проникності для молекул води у значній мірі визначають оптимальні швидкості охолодження під час заморожування, а коефіцієнти проникності речовин, які використовуються як кріопротектори, – часові параметри процедури еквілібрації клітин у середовищі кріоконсервування.

Ентероцити виділяли з тонкого кишечника миші за методом Картера [J.H. Carter, 1982]. Коефіцієнти фільтрації та проникності для кріопротекторів визначали волюмометричним методом. Клітини вміщували у бінарний розчин (0,15 М NaCl – 1 М кріопротектор) та досліджували кінетику зміни розмірів клітин у розчинах трьох кріопротекторів: гліцерину, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилсульфоксиду (ДМСО) при температурі 25 та 12°С за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина). Об'єм клітин апроксимували об'ємом зрізаного конуса. Лінійні розміри клітин визначали за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss»). Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин під час їх контакту з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь [Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкарь, 1994].

Коефіцієнти фільтрації та проникності отримували як величини, які забезпечують найкращу апроксимацію експериментальних кривих. Таким чином, були визначені коефіцієнти проникності мембран ентероцитів миші для кріопротекторів за температур 25°С/12°С ($\times 10^{-7}$ м/с): гліцерин – (0,134 ± 0,05)/(0,056 ± 0,002); 1,2-ПД – (0,672 ± ± 0,11)/(0,269 ± 0,087); ДМСО – (0,53 ± 0,1)/(0,192 ± 0,05) і коефіцієнти фільтрації у присутності кріопротекторів ($\times 10^{-14}$ м^3/н·с): гліцерин – (1,24 ± 0,14)/(0,558 ± 0,092); 1,2-ПД – (1,42 ± 0,17)/(0,705 ± 0,099); ДМСО – (1,3 ± 0,13)/(0,832 ± 0,26). Отримані значення коефіцієнтів за двох значень температури дозволили розрахувати величини енергії активації проникання молекул кріопротектора крізь мембрани ентероцитів миші (кДж/моль): гліцерин – 47,39; 1,2-ПД – 49,76; ДМСО – 55,15 та молекул води у присутності кріопротектора: гліцерин – 44,16; 1,2-ПД – 38,03; ДМСО – 24,37. Отримані значення коефіцієнтів проникності та енергії активації процесу проникання молекул води та кріопротекторів будуть використані для розрахунку оптимальної швидкості заморожування ентероцитів миші.

Estimation of the transport properties of membrane is the mandatory step of cryobiological research as well as the revealing of optimal conditions to cryopreserve the specific types of cells. The coefficients of permeability for water molecules largely determine the optimum cooling rate during freezing and the permeability coefficients of substances, used as the cryoprotective agents (CPAs), affect the temporal parameters of equilibration procedure in a cryopreservation medium

Enterocytes were isolated from mouse small intestine by the method of J.H. Carter (1982). The coefficients of filtration and permeability for CPAs were found by volumetric method. The cells were placed into a binary solution (0.15 M NaCl – 1M CPA) and the kinetics of a change in the cell's dimensions was investigated in the solutions of three cryoprotectants (glycerol, 1,2-PD and DMSO) at 25 and 12°C with a microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). Cell volume was approximated by a truncated cone volume. Linear dimensions of cells were determined using AxioVision Rel. 4.6. The experimentally determined time dependencies of cell volume during their contact with hypertonic solution of the CPAs were approximated with numerical solutions of nonlinear equations [E.A. Gordiyenko, N.S. Pushkar, 1994].

The coefficients of filtration and permeability were obtained as the values providing fitting of experimental and theoretical curves. In such a way we determined the permeability coefficients for murine enterocytes' membranes for the CPAs at 25°C/12°C ($\times 10^{-7}$m/s): (0.134 ± ± 0.05)/(0.056 ± 0.002) for glycerol; (0.672 ± 0.11)/(0.269 ± ± 0.087) for 1,2-PD; (0.53 ± 0.1)/(0.192 ± 0.05) for DMSO and the filtration coefficients in the presence of CPAs ($\times 10^{-14}$ m^3/n·s): (1.24 ± 0.14)/(0.558 ± 0.092) for glycerol; (1.42 ± 0.17)/(0.705 ± 0.099) for 1,2-PD; (1.3 ± 0.13)/(0.832 ± 0.26) for DMSO. The obtained coefficients at the two temperature values enabled the calculation of the activation energy values of cryoprotectant molecule penetration through the membrane of enterocytes (kJ/mol): 47.39 for glycerol; 49.76 for 1,2-PD; 55.15 for DMSO as well as for water molecules in the presence of cryoprotectant: 44.16 for glycerol; 38.03 for 1,2-PD; 24.37 for DMSO. The obtained coefficients of permebility and activation energy of penetration of water and cryoprotective agents molecules will be used to calculate the optimal rate of freezing of mouse enterocytes.