

Проницающая способность и криозащитная эффективность ряда криопротекторов

Н.А. ЧЕРНОБАЙ, Т.М. ГУРИНА, А.В. ПАХОМОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Permeability and Cryoprotective Efficiency of Several Cryoprotectants

N.A. CHERNOBAI, T.M. GURINA, A.V. PAKHOMOV

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

С использованием метода волюмометрии и модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского [Гордиенко Е.А., 1994] определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток интерстиция тестисов (КИТ) и надпочечников для молекул глицерина, ДМСО, ЭГ и ДМФА при температурах 35, 20 и 5°C. Рассчитаны значения энергий активации (E_A) процессов переноса веществ через мембраны КИТ и клеток надпочечников для молекул изученных криопротекторов.

Показано, что при 5°C проницаемость плазматических мембран клеток надпочечников для глицерина, ДМСО и ЭГ достоверно не отличается (K_1 изменяется от $0,45 \times 10^{-7}$ до $0,49 \times 10^{-7}$ м/с). При 35°C наибольшей проницаемостью в ряду этих криопротекторов через мембраны клеток надпочечников характеризуется ЭГ ($K_1 = 24,37 \times 10^{-7}$ м/с), наименьшей – глицерин ($K_1 = 2,52 \times 10^{-7}$ м/с). Значение коэффициента проницаемости мембран клеток надпочечников для молекул ДМФА при 5°C составляет $233,0 \times 10^{-7}$ м/с, при более высокой температуре его проницаемость сравнима с проницаемостью молекул воды.

Значения коэффициентов проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для глицерина, ДМСО и ЭГ в интервале температур от 35 до 5°C отличаются незначительно и лежат в диапазонах $0,38 \pm 1,05 \times 10^{-7}$, $1,99 \pm 2,67 \times 10^{-7}$ и $6,75 \pm 9,32 \times 10^{-7}$ м/с при 5, 20 и 35°C соответственно. Исключение составляет ДМФА, значение коэффициента проницаемости которого при 20°C составляет $24,45 \times 10^{-7}$ м/с, при 5°C – $4,41 \times 10^{-7}$ м/с.

Установлено, что наименьшим значением энергии активации процессов переноса веществ через мембраны клеток надпочечников характеризуется глицерин ($E_A = 40,80$ кДж/моль), наибольшим – ЭГ ($E_A = 93,74$ кДж/моль); через мембраны клеток интерстиция тестисов наименьшим значением энергии активации обладает глицерин ($E_A = 46,92$ кДж/моль), наибольшим – ДМФА ($E_A = 62,99$ кДж/моль).

Оценена сохранность КИТ после криоконсервирования с растворами глицерина (7%), ДМСО (10%), ЭГ (7%) и ДМФА (5%) с использованием скоростей охлаждения 1, 5 и 10 град./мин до -40°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Применение глицерина в качестве криопротектора обеспечило 75%-ю сохранность клеток при всех указанных режимах замораживания. При использовании других криопротекторов сохранность клеток повышалась (с 56 до 83%) при увеличении скорости охлаждения от 1 до 10 град./мин. Более низкую сохранность КИТ в присутствии ДМФА при низких скоростях можно объяснить поступлением криопротектора в клетки в процессе замораживания, обусловленным его высокой проницающей способностью.

Using the method of volumetry and the modified physical-mathematical model of Kedem-Katchalsky [Gordiyenko E.A., 1994] the permeability coefficients for testes interstitium and adrenal cortex cell plasmatic membranes for glycerol, Me₂SO, EG, and Me₂FA at 35, 20 and 5°C were determined. The values of activation energy (E_A) of the processes of substance transfer through testes and adrenal cortex cell membranes for molecules of the investigated cryoprotectants were calculated.

It was noted that at 5°C the permeability of adrenal cortex cell membranes for glycerol, Me₂SO and EG did not significantly differ (K_1 varied from 0.45×10^{-7} to 0.49×10^{-7} m/s). The highest permeability at 35°C for these cryoprotectants through adrenal cortex cell membranes was characteristic for EG ($K_1 = 24.37 \times 10^{-7}$ m/s), the lowest one was for glycerol ($K_1 = 2.52 \times 10^{-7}$ m/s). The permeability coefficient of adrenal cortex cell membranes for Me₂FA molecules at 5°C was 233.0×10^{-7} m/s, at higher temperature its permeability was comparable with the one for water molecules.

The permeability coefficients of testes interstitium cell membranes for molecules of glycerol, Me₂SO and EG within the temperature range from 35 down to 5°C differed slightly and were within $0.38 \pm 1.05 \times 10^{-7}$, $1.99 \pm 2.67 \times 10^{-7}$ and $6.75 \pm 9.32 \times 10^{-7}$ m/s at 5, 20 and 35°C, respectively. Me₂FA was an exception, its permeability coefficient at 20°C was 24.45×10^{-7} m/s, and at 5°C was 4.41×10^{-7} m/s.

The obtained results showed that the lowest value of activation energy of the processes of substance transfer through the adrenal cortex cell membranes was characteristic for glycerol ($E_A = 40.80$ kJ/mol), the highest for EG ($E_A = 93.74$ kJ/mol); through the testes interstitium cell membranes the lowest value of activation energy was characteristic for glycerol ($E_A = 46.92$ kJ/mol), the highest for Me₂FA ($E_A = 62.99$ kJ/mol).

The survival of testes interstitium cells after cryopreservation with glycerol (7%), Me₂SO (10%), EG (7%) and Me₂FA (5%) solutions using the cooling rates of 1, 5 and 10 deg/min down to -40°C with the following plunging into a liquid nitrogen has been estimated. Application of glycerol as a cryoprotectant provided 75% cell survival in all studied freezing conditions. Cell survival increased (from 56 up to 83%) with a rise in cooling rate from 1 up to 10 deg/min when using other cryoprotectants. Lower testes cell survival in the case of Me₂FA and low cooling rates could be caused by an extra flux of cryoprotectant into cells during freezing due to extremely higher permeability of Me₂FA.