

Осмотическое поведение клеток интерстиция тестисов в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400

UDC 547.42/43:612.111.:577.352

N.A. CHERNOBAY, I.F. KOVALENKO, G.A. BOZHOK, S.YE. KOVALENKO, A.V. PAKHOMOV, L.F. ROZANOV*

Osmotic Behavior of Testes Interstitium Cells in Hypertonic Solutions of NaCl and PEO-400

Суспензия клеток, полученная из интерстиция тестисов крыс, представляет гетерогенную популяцию. Значения минимального и максимального объемов клеток в суспензии отличаются на два порядка, а распределение клеток по размерам может быть описано как бимодальное. Получены данные о степени дегидратации клеток интерстиция тестисов в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400. Экстраполяцией зависимостей объема клеток от осмолярности среды к бесконечному осмотическому давлению определены значения их относительных осмотически неактивных объемов в растворах NaCl (0,3659) и ПЭО-400 (0,3669).

Ключевые слова: размеры клеток интерстиция тестисов, относительный осмотически неактивный объем.

Суспензія клітин, яка одержана з інтерстицію тестисів щурів, являє собою гетерогенну популяцію. Значення мінімального та максимального об'ємів клітин у суспензії відрізняються на два порядки, а розподіл клітин за розмірами може бути описаний як бимодальний. Отримано дані про ступінь дегідратації клітин інтерстицію тестисів у гіпертонічних розчинах NaCl та ПЕО-400. За допомогою екстраполяції залежностей об'єму клітин від осмолярності середовища до нескінченного осмотичного тиску встановлено значення їх відносних осмотично неактивних об'ємів у розчинах NaCl (0,3659) та ПЕО-400 (0,3669).

Ключові слова: розміри клітин інтерстицію тестисів, відносний осмотично неактивний об'єм.

Cell suspension obtained from the rat testes interstitium is a heterogeneous population. The minimal and maximal values of cell volume vary by two orders, and distribution of cells by size can be described as a bimodal one. The data on dehydration of testes interstitium cells in hypertonic solutions of NaCl and PEO-400 were obtained. Values of relative osmotically inactive volume in NaCl (0.3659) and PEO-400 (0.3669) solutions were determined by extrapolation of cell volume dependence on medium osmolarity to perpetual osmotic pressure.

Key words: testes interstitium cell size, relative osmotically inactive volume.

Криоконсервирование фрагментов и клеток тестисов с целью создания запасов материала для трансплантации – необходимое условие при разработке новых схем лечения андроген-дефицитных состояний [2, 3]. В связи с этим необходимо изучение транспортных характеристик мембран клеток тестисов и их морфометрических параметров. Известно, что проницаемость плазматических мембран для молекул воды и криопротекторов является важнейшей криобиологической характеристикой клеток, определяющей их осмотическое поведение в процессе криоконсервирования, а также выживаемость после отогрева и возвращения в изотоническую среду. Один из наиболее адекватных методов оценки проницаемости – метод волюмометрии. В сочетании с физико-математическим моделированием процессов трансмембранного переноса этот метод позволяет определить значения коэффициентов проницаемости мембран инди-

Cryopreservation of testes cells and fragments with the purpose of creating stock of transplantation materials is an indispensable condition for elaboration of novel schemes of androgen-deficient state treatment [2, 3]. In this respect investigation of membrane transport characteristics of testes cells and their morphometric parameters is necessary. It is known that plasmatic membrane permeability for water molecules and cryoprotectants is one of the most important cryobiological characteristics of cells determining their osmotic behavior in the course of cryopreservation as well as survivability after thawing and returning to isotonic medium. Volumetry is among the most adequate methods for permeability assessment. In combination with physico-mathematical modelling of transmembrane transfer processes this method allows determining the membrane permeability coefficients of individual cells for water molecules and cryoprotectants by fitting the experimental dependence of cell volume vs. time with an adequate

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

видуальных клеток для молекул воды и криопротектора путем сопоставления экспериментальных зависимостей объема клетки от времени с адекватным решением теоретической модели для условий конкретного опыта. В качестве исходных параметров теоретическая модель включает, в частности, поверхностно-объемное отношение клетки и ее относительный осмотически неактивный объем [1]. Осмотически неактивный объем определяет долю внутриклеточных веществ, неспособных покинуть клетку без повреждения мембраны. К ним относятся биологические макромолекулы (нуклеиновые кислоты, белки), мембранные структуры, структурные элементы цитоскелета, связанная вода и др. В отличие от поверхностно-объемного отношения, которое рассчитывается в процессе изучения динамики объемных изменений клеток в растворах проникающих веществ, определение осмотически неактивного объема выделяют как отдельную задачу. Ее решение возможно путем изучения осмотического поведения клеток в растворах непроникающих веществ с известным осмотическим давлением. Такие исследования позволяют определить зависимости объема клеток от осмотичности среды и допустимый уровень дегидратации клеток, рассчитать осмотически неактивный объем, а в некоторых случаях – оценить транспортные характеристики клеточных мембран для воды.

Цель работы – определение относительного осмотически неактивного объема клеток интерстиция тестисов путем оценки степени их дегидратации в растворах NaCl и ПЭО-400 различных концентраций.

Материалы и методы

Суспензию клеток интерстиция в среде 199 получали из тестисов крыс ферментативным методом [4]. Морфометрические исследования показывают, что суспензия содержит клетки с диаметром от 4,56 до 21 мкм (рис. 1). Распределение клеток по размерам может быть оценено как бимодальное.

Исследования, проведенные на лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия), показали, что в свободной капле клетки тестисов сохраняют форму, близкую к сферической, в то время как клетки, придавленные покровным стеклом, деформируются (рис. 2). В связи с этим перед добавлением 0,25, 0,5, 0,75 и 1M растворов NaCl и ПЭО-400 клетки помещали в лунки блока, адаптированного к задачам исследований. Клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE. Максимум кривой возбуждения CFSE $\lambda_{\text{воз}} = 488$ нм, эмиссии $\lambda_{\text{эм}} = 530$ нм.

solution of the theoretical model for the conditions of a certain experiment. The model includes, particularly, cell surface to volume ratio and its relative osmotically inactive volume as initial parameters [1]. Relative osmotically inactive volume determines a moiety of intracellular substances, which are unable to leave the cell without membrane damage. Biological macromolecules (nucleic acids, proteins), membrane structures, cytoskeleton structural elements, bound water *etc.* belong to them. Unlike surface to volume ratio, which is calculated during investigations of cell volume change dynamics in penetrating substance solutions, determination of osmotically inactive volume is distinguished as a separate challenge. This problem solving is possible through investigations of cell osmotic behavior in solutions of non-penetrating substances with acquainted osmotic pressure. Such studies allow determining dependence of cell volume on medium osmotic pressure and permissible level of cell dehydration, calculating relative osmotically inactive volume, and in some cases, evaluating cell membrane transport characteristics for water.

The aim of the work is determining relative osmotically inactive volume of testis interstitium cells by evaluating their dehydration in solutions of NaCl and PEO-400 at various concentrations.

Materials and methods

Interstitial cell suspension in medium 199 was obtained from the rat testes by the enzyme method [4]. Morphometric analysis shows that the suspension comprises cells with the diameter from 4.56 to 21 μm (Fig. 1). Distribution of cells by size can be described as a bimodal one.

The studies performed on a laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) showed that in a free drop testis cells held the shape close to a spherical one, while cells pressed down by cover-glass became deformed (Fig. 2). Thereby before adding 0.25, 0.5, 0.75 and 1 M solutions of NaCl and PEO-400 cells were placed in wells of a block adapted specially for the purpose of the investigation. Cells were stained with the fluorescent dye CFSE. Maximum of CFSE excitation wavelength makes $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, emission wavelength does $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm.

Microscopic analysis was performed on a microscope Obzerver Z1 (Carl Zeiss, Germany).

Cell diameters (d) were measured using AxioVision 4.7 software (Carl Zeiss, Germany). If the cell is shaped like sphere, cell volume (V), cell membrane surface area (S) and surface-volume ratio (γ) can be determined from diameter data:

$$V = \frac{\pi d^3}{6}; S = \pi d^2; \gamma = \frac{6}{d}.$$

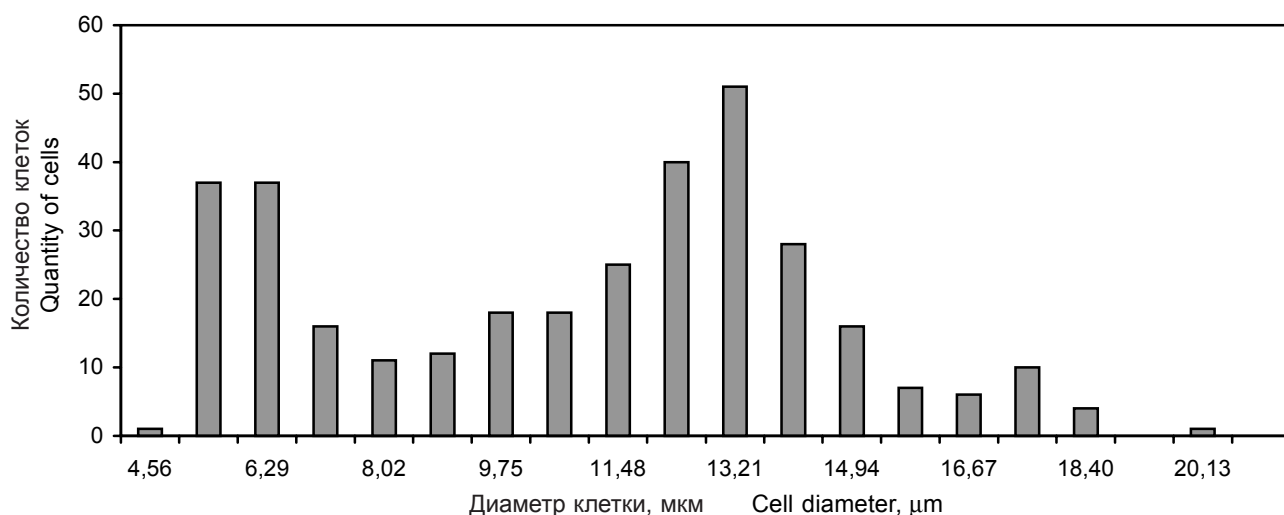


Рис. 1. Распределение клеток интерстиция тестисов в суспензии по размерам.

Fig. 1. Distribution of testis interstitium cells in suspension by size.

Микроскопические исследования проводили на микроскопе Obzerver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

С помощью программы AxioVision 4.7 измеряли диаметры (d) клеток. В приближении сферы по этим данным можно определить объем клетки (V), площадь поверхности клеточной мембраны (S) и поверхностно-объемное отношение (γ):

$$V = \frac{\pi d^3}{6}; S = \pi d^2; \gamma = \frac{6}{d}.$$

Очевидно, что экспериментальные данные об изменении клеточного объема следует представлять не в абсолютных, а в относительных величинах. Так, относительный объем клетки (y) можно найти из соотношения:

$$y = \left(\frac{d}{d_0}\right)^3,$$

Apparently experimental data on cell volume changes should be presented not in absolute units, but in relative ones. Thus, cell relative volume (y) can be calculated from the formula:

$$y = \left(\frac{d}{d_0}\right)^3,$$

where d is cell diameter after impact; d_0 is initial volume of the cell.

Cell relative osmotically inactive volume was determined by extrapolation of relative volume dependence vs. concentrations of the non-penetrating extracellular component PEO-400 and NaCl, which were presented in Van't Hoff coordinates, to perpetual osmotic pressure.

The results were statistically processed by the Student-Fisher test.

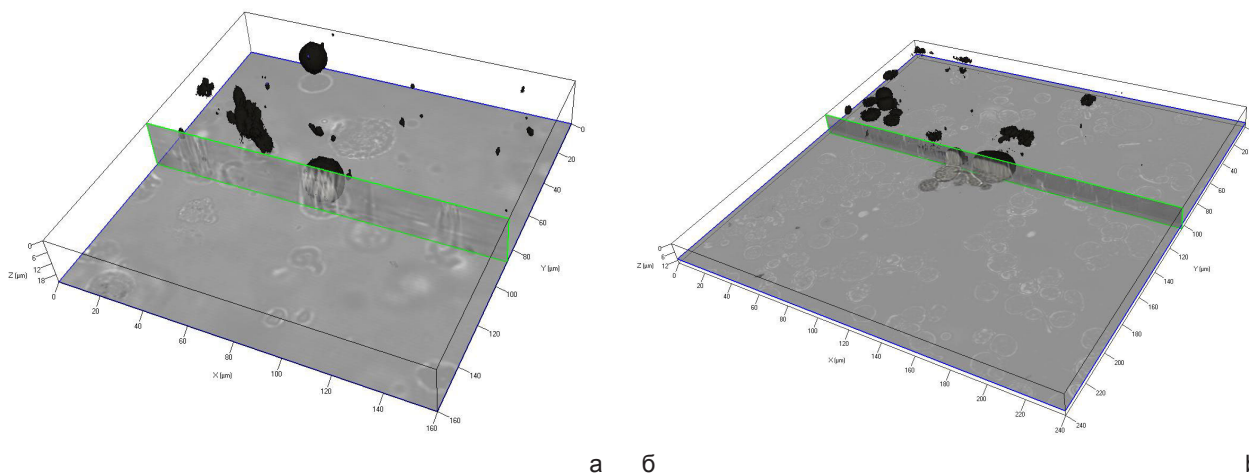


Рис. 2. Реконструированные изображения клеток интерстиция тестисов, находящиеся в свободной капле (а) и под покровным стеклом (б).

Fig. 2. Reconstructed images of testis interstitium cells in a free drop (a) and under cover-glass (b).

где d – диаметр клетки после воздействия; d_0 – исходный диаметр клетки.

Относительный осмотически неактивный объем клеток определяли экстраполяцией зависимостей относительного объема от концентрации непроникающего внеклеточного компонента ПЭО-400 и NaCl, представленных в координатах Вант-Гоффа, к бесконечному осмотическому давлению.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Данные морфометрии (см. рис. 1) позволяют оценить пределы варьирования объема и поверхностно-объемного отношения клеток в суспензии. Объем клеток варьирует в пределах $4,96 \times 10^1$ – $4,84 \times 10^3$ мкм³, т. е. в пределах двух порядков. Поверхностно-объемное отношение изменяется не более, чем в 5 раз ($0,29$ – $1,32$ мкм⁻¹).

Для оценки степени обезвоживания клеток тестисов в растворах ПЭО-400 и NaCl и определения осмотически неактивного объема этих клеток (параметра, используемого при расчете коэффициентов проницаемости) были получены зависимости относительного клеточного объема от концентрации осмотически активных частиц в растворе (рис. 3).

Из приведенных данных видно, что кривые зависимости относительного объема клеток тестисов от концентрации осмотически активных частиц различны для растворов NaCl и ПЭО-400. В растворах ПЭО-400 дегидратация при равных концентрациях осмотически активных частиц выше, чем в растворах NaCl. Переход от концентраций к осмотическим давлениям растворов и представление данных в координатах Вант-Гоффа (рис. 4, а, б) показали, тем не менее, хорошее соответствие результатов, полученных при использовании NaCl и ПЭО-400. Найденные из графиков значения относительных осмотически неактивных объемов клеток практически не отличаются.

Выводы

Суспензия клеток интерстиция тестисов крыс включает клетки с объемом от $4,96 \times 10^1$ до $4,84 \times 10^3$ мкм³ и поверхностно-объемным отношением от $0,286$ до $1,316$ мкм⁻¹. Распределение клеток по размерам может быть оценено как бимодальное.

Клетки интерстиция тестисов обезвоживаются в растворах ПЭО-400 в большей степени, чем в растворах NaCl с той же концентрацией осмотически активных частиц.

Значения относительных осмотически неактивных объемов клеток интерстиция тестисов, опре-

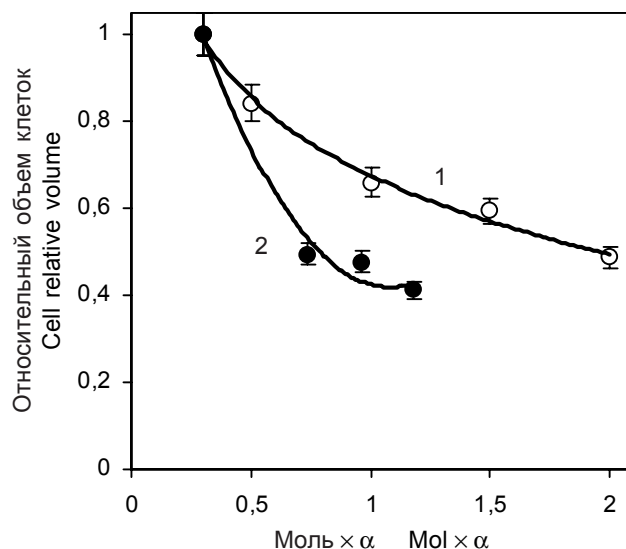


Рис. 3. Зависимость относительного объема клеток интерстиция тестисов от молярности растворов NaCl (1) и ПЭО-400 (2); α – константа диссоциации.

Fig. 3. Dependence of relative volume of testis interstitium cells on molarity of NaCl (1) and PEO-400 (2) solutions. α – dissociation constant.

Results and discussion

The morphometric data (see Fig. 1) allow estimating limits of the cell volume and surface-volume ratio variations in suspension. The cell volume varies within the range of 4.96×10^1 – 4.84×10^3 μm^3 , i.e. within the range of two orders. The cell surface to volume ratio changes not more than by 5 times (0.29 – 1.32 μm^{-1}).

Dependence of cell relative volume on concentrations of osmotically active particles in solution was obtained for the estimation of testis cell dehydration in PEO-400 and NaCl solutions and determination of the osmotically inactive volume of these cells (an index used for calculation of permeability coefficients) (Fig. 3).

From the data presented one can see that the curves of dependence of testis cell relative volume on concentrations of osmotically active particles are different for NaCl and PEO-400 solutions. In PEO-400 solutions dehydration is higher than that in NaCl solutions at equal concentrations of osmotically active particles.

Transition from concentrations to solution osmotic pressures and presentation of the data in Van't Hoff coordinates (Fig. 4, a, b), however, showed a good accordance of the results obtained with NaCl and PEO-400. Found from the graphs values of relative osmotically inactive volumes of cells are practically the same.

Conclusions

The rat testes interstitium cell suspension comprises cells of volume from 4.96×10^1 to 4.84×10^3 μm^3 and

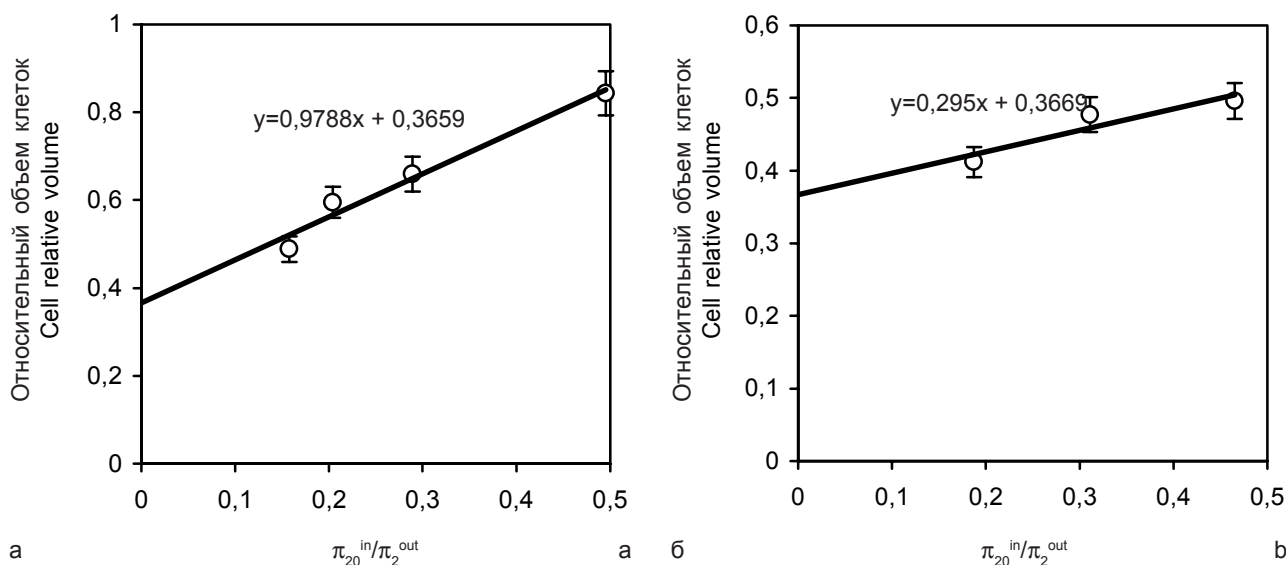


Рис. 4. Зависимость относительного объема клеток интерстиция тестисов от приведенного осмотического давления растворов NaCl (а) и ПЭО-400 (б).

Fig. 4. Dependence of relative volume of testis interstitium cells on reduced osmotic pressure for NaCl (a) and PEO-400 (b) solutions.

деленные из зависимостей относительного объема от приведенного осмотического давления для растворов NaCl и ПЭО-400, составляют 0,3659 и 0,3669 соответственно.

surface to volume ratio from 0.29 to 1.32 m^{-1} . Distribution of cells by size can be described as a bimodal one.

Testes interstitium cells are dehydrated in PEO solutions more than in NaCl solutions at equal concentrations of osmotically active particles.

The values of relative osmotically inactive volumes of testes interstitium cells determined from relative volume dependence on reduced osmotic pressure for NaCl and PEO-400 solutions are 0.3659 and 0.3669, respectively.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 142 с.
2. Калиниченко С.Ю., Вадов В.В., Ворсклов Л.В. Возрастной дефицит андрогенов (синдром Padam) у мужчин; диагностика и лечение // Врач. – 2003. – №6. – С. 21–24.
3. Кирпатовский И.Д. Нейроэндокринная трансплантация как новое направление в современной трансплантации. Успехи сочетанных аллотрансплантаций органов гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы // Вестник трансплантации и искусственных органов. – 2005. – №3. – С. 14–15.
4. Пахомов А.В., Божок Г.А., Боровой И.А. и др. Использование флуоресцентной диагностики для характеристики клеток стероидогенных тканей // Проблемы эндокринной патологии. – 2007. – №4. – С. 78–83.

Поступила 09.02.2010
Рецензент Т.П. Линник

References

1. Gordiyenko Ye.A., Pushkar N.S. Physical bases of low temperature preservation of cell suspensions. – Kiev: Nauk. Dumka, 1994. – 142 p.
2. Kalinichenko S.Yu., Vadov V.V., Vorsklov L.V. Androgen age deficiency (Padam syndrome) in males; dyagnostics and treatment // Vrach. – 2003. – N6. – P. 21–24.
3. Kirpatovskiy I.D. Neuroendocrinal transplantation as a new direction in modern transplantology. Successes of combined allotransplantations of organs of pituitary-hypothalamogonadial system // Vestnik Transplantatsii i Iskusstvennykh Organov. – 2005. – N3. – P. 14–15.
4. Pakhomov A.V., Bozhok G.A., Borovoy I.A. et al. Usage of fluorescent dyagnostics for characterization of steroid tissue cells // Problemy Endokrynnoi Patologii. – 2007. – N4. – P. 78–83.

Accepted in 09.02.2010