УДК 537.31:57.043

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОВОДИМОСТИ КЛЕТОК ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОСМОТИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СРЕДЫ

В.А. Шигимага
Кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией
Лаборатория репродуктивной биологии
Институт животноводства НААН
ул. 7-й Гвардейской Армии, 3, пгт. Кулиничи, Харьковский р-н, 62404
Контактный тел.: (057) 740-31-83, 050-553-12-57
E-mail: vash105@gmail.com

Ю.Е. Мегель
Доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой
Кафедра кибернетики
Национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко
ул. Артема, 44, г. Харьков, Украина, 61002
Контактный тел.: (057) 716-41-70, 067-572-42-95
E-mail: megel_ye@mail.ru

Визначено провідність 0,1-0,5М маніту, ооцитів та двоклітинних ембріонів під дією імпульсного електричного поля зростаючої напруженості. Отримано логарифмічну залежність напруженості електропробою мембран клітин від осмотичної концентрації маніту

Ключові слова: провідність, осмотична концентрація, ооцит, ембріон, електропробій

Определена проводимость 0,1-0,5М маннита, ооцитов и двухклеточных эмбрионов под действием импульсного электрического поля возрастающей напряженности. Получена логарифмическая зависимость напряженности электропробоя мембран клеток от осмотической концентрации маннита

Ключевые слова: проводимость, осмотическая концентрация, ооцит, эмбрион, электропробой

Conductivity of 0,1-0,5M mannitol, oocytes and two-cell embryos under action the increasing impulse electric field strength are determined. Logarithmic association of electro-breakdown field strength of cell membranes with the osmotic concentration of mannitol is obtained

Keywords: conductivity, osmotic concentration, oocyte, embryo, electric-breakdown

Введение

В современных технологиях клонирования для реконструкции эмбрионов животных применяется метод электрослияния, основанный на эффекте пробоя мембран в импульсном электрическом поле [1,2]. Среда для электрослияния должна иметь диэлектрические свойства, чтобы снизить влияние на электропроводность клетки. Важнейшей характеристикой среды является осмотическая концентрация - суммарная концентрация всех растворённых в воде веществ [3]. Будем применять здесь именно этот термин, чтобы не оставить без внимания факт возникающего осмотического давления изнутри или снаружи мембраны клетки при понижении или повышении концентрации растворенных веществ относительно цитоплазмы клетки. Для создания необходимого осмотического давления без увеличения проводимости в среду добавляют маннит, сахарозу или сорбит [1,2]. Эти вещества не проникают через мембрану и в определенных концентрациях не оказывают токсического эффекта на клетку в целом [2,4]. В состоянии пробоя клеточная мембрана теряет свойства селективного осмотического барьера, что сразу должно отразиться на проводимости клетки.

В предыдущих исследованиях [5,6] установлено, что проводимость клеток связана с параметрами среды и импульсного напряжения, которое прикладывается к мембране во время пробоя. Теперь необходимо исследовать проводимость этих клеток при том же воздействии, но в условиях различной осмотической концентрации среды, что в биотехнологии получения реконструированных эмбрионов животных практически неизвестно, но используется для облегчения электропорации клеток [7,8] и, по нашему мнению, имеет перспективы с точки зрения повышения реальной эффективности электрослияния. Для этой цели удобно использовать ооциты и эмбрионы мыши, как недорогие модельные объекты.

Методика определения проводимости

Определение проводимости клеток и диэлектрической среды, в качестве которой был взят маннит (SIGMA) на деионизованной воде, проведено с помощью аппаратуры и способа, разработанных и подробно описанных ранее [5,6,9]. Объекты исследования располагались в капле на предметном стекле микроскопа между двумя соосными микроэлектродами и подвергались воздействию линейно возрастающего по амплитуде импульсного напряжения. Вначале определена проводимость маннита концентраций 0,1-0,5М в импульсном поле с возрастающей напряженностью 0-3,5кВ/см при комнатной температуре. Затем при тех же условиях и параметрах определены проводимости клеток. В качестве критерия влияния осмотической концентрации среды на проводимость клеток взята напряженность поля в момент электропробоя клеточной мембраны. Значение этой величины вычислено графоаналитическим методом в области резкого роста зависимости проводимости клетки от напряженности [10]. Вычисленные напряженности пробоя мембран клеток нанесены на один график в зависимости от концентрации маннита. Все вычисления и построение графиков выполнены с помощью программного пакета Microsoft Excel 2002. В экспериментах были использованы ооциты и двухклеточные эмбрионы мыши, полученные по стандартной методике [11].

Результаты исследования

Установлено, что проводимость маннита для всех исследованных концентраций практически не зависит от напряженности поля. Обнаружена только концентрационная зависимость его проводимости, рис. 1, которая оказалась качественно подобной известным данным по кондуктометрии неэлектролитов [12].

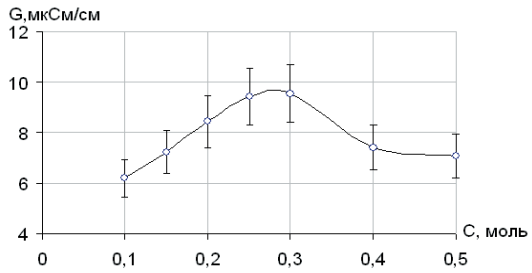

Рис. 1. Проводимость маннита в зависимости от концентрации

Если концентрация растворенного вещества не превышает 0,1М, раствор неэлектролита обычно считают разбавленным. В таких растворах взаимодействие между растворителем преобладает над взаимодействием растворителя и растворенного вещества, поэтому последним можно пренебречь [12]. В случае более концентрированных растворов такое приближение неправомерно и для учета взаимодействия растворителя и растворенного вещества, а также молекул растворенного вещества между собой, вводится эмпирическая величина, заменяющая концентрацию – активность, которая уменьшается с увеличением концентрации [12]. Поэтому максимум на кривой рис. 1 обусловлен тем, что, с одной стороны, с ростом концентрации маннита растет количество диссоциирующих ионных примесей, вносимых с ним, а с другой стороны, уменьшается активность и проводимость падает. Максимум несколько смещен вправо от малых концентраций. Сам по себе этот факт может представлять известный интерес для кондуктометрии диэлектрических жидкостей. Однако, детальный поиск причины такого поведения концентрационной зависимости проводимости маннита выходит за рамки цели статьи, поэтому остается лишь констатировать этот факт и довольствоваться тем, что найденный максимум незначителен и практически не влияет на проводимость клеток, что видно из показанных ниже результатов.

Определены проводимости клеток в зависимости от напряженности поля в средах с осмотической концентрацией маннита 0,1-0,5М. На рис.2 и 3 показаны средние по 3 клеткам зависимости проводимости (за вычетом проводимости маннита [6]). Максимальная ошибка средних для ооцитов и эмбрионов не превышала 10 и 15% соответственно и, чтобы не загромождать графики, не приведена.

На рис. 2 видно, что все ооциты во всех средах претерпели электропробой мембраны с резким ростом проводимости при соответствующей напряженности поля.

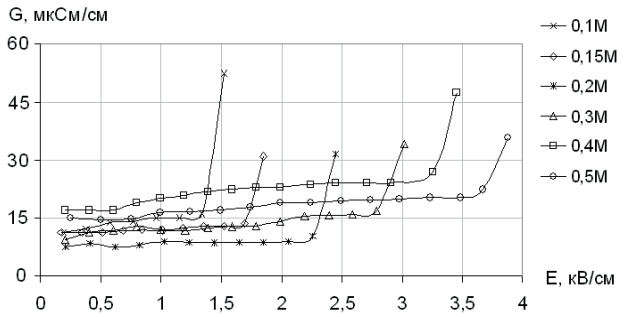

Рис. 2. Семейство концентрационных зависимостей проводимости ооцитов от напряженности поля в манните

Оказалось, что напряженность пробоя ооцитов с ростом концентрации маннита увеличивается. Этот факт можно объяснить тем, что в гипотонической среде (менее 0,3М) объем клетки увеличивается благодаря осмотическому давлению изнутри и, следовательно, механическое напряжение мембраны растет, она становится более чувствительной к повреждениям, которые наносит ей электрический импульс [7,8]. В гипертонической среде (более 0,3М) наоборот, осмотическое давление снаружи растет, клетка сжимается, вызывая эффект “упрочнения” мембраны, что приводит к увеличению электрической прочности на пробой.

Получено аналогичное семейство концентрационных зависимостей проводимости двухклеточных эмбрионов от напряженности поля, рис. 3. На рис. 3 видно, что с уменьшением концентрации маннита, напряженность пробоя мембраны эмбрионов, так же, как и ооцитов, уменьшается. Это объясняется той же причиной, что и для ооцитов, то есть посредством осмотической реакции бластомеров эмбриона на гипотонические или гипертонические свойства среды. Однако, как видно из рис. 2 и 3, характер проводимости эмбрионов и ооцитов в 0,1М среде существенно различный. Качественное объяснение этому факту дано ниже.

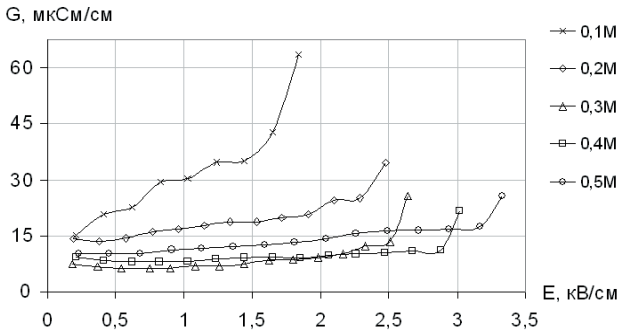

Рис. 3. Семейство концентрационных зависимостей проводимости двухклеточных эмбрионов от напряженности поля в манните

Из семейства концентрационных зависимостей проводимости клеток (рис. 2 и 3) графоаналитическим методом [10] получены значения напряженности пробоя мембран и нанесены на общий график в зависимости от осмотической концентрации маннита, рис. 4. Справа на рис. 4 приведены уравнения логарифмической аппроксимации полученных зависимостей с коэффициентами детерминации. Экстраполяция аппроксимирующих кривых к нулевой напряженности пробоя дает концентрацию 0,044М (для ооцитов) и 0,025М (для эмбрионов). Это означает, что при таких осмотических концентрациях маннита для повреждения (разрыва) мембраны клеток даже не нужно прикладывать внешней силы в виде импульса. Действительно, в эксперименте клетки не выдерживают помещения в среду маннита с концентрацией ниже 0,1М - мембрана быстро и непроизвольно рвется.

Теперь, имея эти данные, можно предложить объяснение различного характера проводимости эмбрионов и ооцитов в 0,1М среде маннита.

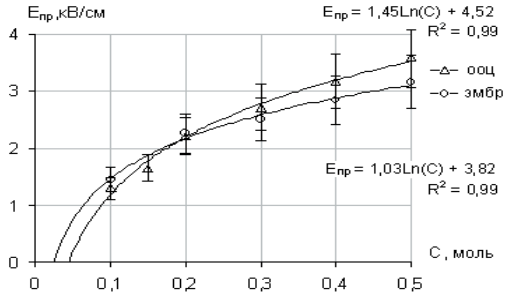

Рис. 4. Зависимость напряженности пробоя мембраны ооцитов и эмбрионов от концентрации маннита

По видеоизображению клеток установлено, что объем перивителлинового пространства эмбриона в изотонической среде (0,3М) превышает аналогичный объем ооцита в 2-3 раза в предположении сферичности клеток в зоне и самой зоны пеллюцида. Поэтому понятно, что эмбрионы могут терпеть большую гипотонию, чем ооциты, поскольку их бластомерам еще есть куда расширяться, в то время, как ооцит достигает предела в виде зоны, которая удерживает мембрану от разрыва и лишь небольшое усилие способно ее пробить. Это подтверждает почти двойная разница значений экстраполированных концентраций, рис. 4 (0,025М против 0,044М), а также меньшая напряженность пробоя ооцитов в 0,1М манните. Поэтому кривая проводимости эмбрионов в 0,1М манните, рис. 3, лежит значительно выше остальных, т.к. ее рост сопровождается и объясняется множественной электропорацией с выходом ионов цитоплазмы в диэлектрическую среду маннита перед необратимым пробоем.

Выводы

1. Проводимость маннита нелинейно зависит от концентрации в интервале 0,1-0,5М, имея максимум при 0,3М, и не зависит от напряженности поля в диапазоне 0-3,5 кВ/см.

2. Напряженность пробоя ооцитов и эмбрионов мыши при изменении осмотической концентрации маннита в интервале 0,1-0,5М изменяется по логарифмическому закону.

Литература

1. Chang D.C. Guide to Electroporation and Electrofusion/ D.C.Chang, B.M.Chassy, J.A.Saunders, A.E.Sowers -San Diego.-Academic Press, 1992.-581p.
2. Zimmermann U. Electromanipulation of cells / U.Zimmermann, G.A.Neil.–N.Y.:CRC Press, -1996.-375p.
3. Коллигативные свойства / Режим доступа : \www/URL: http://dic.academic.ru/ dic.nsf/brokgauz_efron/53835/.
4. Smith LC,Wilmut I. Factors affecting the viability of nuclear transplanted embryos//Theriogen.-1990.-v.33.-N1.-p.153-164.
5. Шигимага В.А. Определение проводимости эмбриональных клеток животных /В.А. Шигимага //Проблемы бионики.- Харьков.-2003.-вып.59.-с.60-64.
6. Шигимага В.А. Кондуктометрия клеток животных в средах с произвольной проводимостью/ Вестник НТУ «ХПИ»//Сб. трудов «Новые решения в современных технологиях».-Харьков:НТУ (ХПИ), 2010.-№57.-С.100-104.
7. Barrau C. Osmotically induced membrane tension facilitates the triggering of living cell electropermeabilization/C.Barrau, J.Teissie, B.Gabriel //Bioelectrochem.-2004.-V.63.-№1-2.-P.327-332.
8. Abidor G. Studies of Cell Pellets: II. Osmotic Properties, Electroporation, and Related Phenomena: Membrane Interactions / G. Abidor, L.-H. Li, S. W. Hui //Biophys. J. -1994.-V.67.-P.427-435.
9. Шигимага В.О. Апаратура для електрозлиття та вивчення провідності клітин/ В.О. Шигимага //Вісник ХДТУСГ. -Харків.-2001.-Вип.6.-с.386-389.
10. Шигимага В.А. Графоаналитические методы определения параметров необратимого импульсного пробоя мембраны клетки (ч.1) / В.А. Шигимага //Бионика интеллекта.–2007.– Вып.2 (67). – С. 84 – 87.
11. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы /Пер. с англ. под ред. М. Манк.- М.: Мир.-1990.- 406с.
12. Левченков С. И. Физическая и коллоидная химия. ч.3. Термодинамика растворов / С. И. Левченков.-Ростов-на-Дону.-2004.-33с.