

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

на правах рукопису

СМОЛЬЯНИНОВА ЄВГЕНІЯ ІВАНІВНА

ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ОСМОТИЧНОЇ РЕАКЦІЇ  
ЯЙЦЕСАЇТИН ТА ЕМБРІОНІВ МІШІ В ГІПЕРТОНІЧНИХ  
РОЗЧИНАХ ЕЛЕКТРОЛІТА ТА КРІОПРОТЕКТОРІВ

СЗ.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

Харків - 1994



00778789 (3)

Робота виконана в Інституті ~~проблем кріобіології та кріомедицини~~  
 Національної Академії наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук

Є. О. Гордієнко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

В. А. Моїсєєв

доктор медичних наук, професор

Є. Я. Панков

Провідна установа: Харківський Державний університет

Захист відбудеться 30 вересня 1994 р. в 15<sup>20</sup>  
 годин на засіданні спеціальної ради Д 016. 60.01 при Інституті  
 проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (ЗІООІБ, м. Харків,  
 вул. Переяславська, 23).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту проблем  
 кріобіології та кріомедицини.

Автореферат розіслано " 18 " серпня 1994 р.

Вчений секретар

спеціалізованої ради

доктор медичних наук,

професор

ЛНБ ім. В. Стефаніка

А. Н. Гольцов

### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Дослідження таких біофізичних характеристик клітин, як проникність їх мембран для молекул води та кріопротекторів, є важливим з точки зору кріобіології, оскільки, відповідно до сучасних уявлень, ці характеристики (поряд з геометричними параметрами клітин) визначають оптимальні значення ряду режимних параметрів кріоконсервування клітинних суспензій (наприклад, тривалість та температуру експозиції клітин у кріозахищному розчині, необхідні для насичення клітин кріопротектором (Schneider U., Maurer P., 1984; Гордієнко Є.О., Коваленко І.Ф., 1974, 1989), швидкість охолодження клітинної суспензії на етапі кристалізації (Mazur P., 1963-1980), режим виведення кріопротектора з замороженої-відтаєної суспензії (Базулький Н.Д., 1984, Levin R.L., 1986). Зазначені транспортні характеристики зумовлюють осмотичну реакцію клітин на контакт з гіпо- або гіпертонічними розчинами солей та кріопротекторів (котрий має місце на різних етапах циклу низькотемпературного консервування) до того часу, поки не настає пошкодження клітини.

Кількісний опис осмотичної поведінки непошкоджених клітин, як правило, здійснюється за допомогою рівнянь термодинаміки необоротних процесів переривних систем (Kedem O., Katchalsky A., 1958, 1962). Відхилення осмотичної реакції клітин при їх експозиції в неізотонічних розчинах від передбаченої цими рівняннями може розглядатися як свідчення часткового або повного пошкодження клітин. Тому вивчення умов, при яких з'являється або зникає такі відхилення, може бути одним з найефективніших підходів щодо дослідження закономірностей кріопошкодження та кріозахисту клітинних суспензій.

У зв'язку з цим актуальним та багатообіцяючим щодо вивчення важливих з кріобіологічної точки зору характеристик клітин та ефектів є підхід, заснований на синтезі експериментального методу рестрації осмотичної поведінки клітин (згод вольтметрії) (Leibo S.P., 1977) та чисельного моделювання реакції клітин в деалогічних умовах.

Метод дослідження було вивчення закономірностей та аналіз особливостей реакції ліцеклітин та ембріонів миші на контакт з неізосмотичними розчинами хлориду натрію (NaCl), сахарози та кріопротекторів методами вольтметрії та моделювання на ДОМ.

Задачи дослідження. Згідно з поставленою метою роботи передбачали вирішати такі задачі:

1) Експериментально вивчити кінетику змінення об'єму яйцеклітин та ембріонів миші в гіпо- та гіпертонічних водних розчинах диметилсульфоксиду (ДМСО), 1,2-пропандіола (1,2-ПД), хлориду натрія (NaCl) та сахарози.

2) Методом чисельного рішення на ЕОМ рівнянь термодинаміки необоротних процесів переїзних систем вивчити динаміку змінення об'єму клітин, а також концентрації криопротектора та електроліта всередині клітини під час контакту яйцеклітин та ембріонів миші з гіпо- та гіпертонічними водними розчинами (ДМСО), (1,2-ПД), NaCl та сахарози.

3) Шляхом зіставлення теоретичних та експериментальних даних, здобутих при виконанні пунктів 1) і 2), визначити коефіцієнти проникності мембран яйцеклітин та ембріонів миші для молекул води та криопротекторів та об'єму частку осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин залежно від вмісту криопротектора, солі, значення рН та температури у зовнішньому середовищі, а також в ряду "яйцеклітина-зігота - двоклітинний ембріон-чотирьохклітинний ембріон".

4) Виявити відхилення реальної реакції досліджуваних об'єктів на контакт з гіпо- та гіпертонічними розчинами криопротекторів та солей від теоретичної залежності та, якщо можливо, з'ясувати, чому ці відхилення з'являються.

5) На основі аналізу одержаних результатів сформулювати рекомендації по удосконаленню процедури криоконсервування репродуктивних клітин ссавців.

Наукова новизна. Одержано нові дані про значення коефіцієнтів фільтрації та проникності плазматичних мембран яйцеклітин та ембріонів миші для молекул ДМСО та 1,2-ПД залежно від концентрації солі та криопротектора у зовнішньому середовищі, а також від його рН та температури. Вперше встановлено факт залежності клітинного об'єму, після досягнення якого починається формування мембранних пухирів на поверхні ембріонів миші, від ступеня та тривалості збезводнення, яке передувє їх набухання. Сформульовано гіпотезу про наявність додаткового структурованого внутрішньоклітинної фази під впливом на клітини гіпертонічних розчинів, яка дозволяє з'ясувати деякі закономірності явища формування мембранних пухирів на по-

верхні клітин.

Практичне та теоретичне значення роботи. В ході дослідження розроблено підходи, які дозволяють обґрунтовано підбирати такі значення режимних параметрів кріоконсервування ембріонів ссавців, як оптимальна щодо кріоконсервування стадія дроблення ембріона, оптимальна тривалість експозиції ембріона в кріозахищеному розчині (до охолодження), яка необхідна для насичення клітин кріопротектором, склад кріозахищеного середовища, при якому поряд з насиченням кріопротектором, клітини збезводнюються. Обидва ці фактори знижують ймовірність кристалізації всередині клітини під час заморожування клітинних суспензій.

Виявлено закономірності, опираючись на які можна здійснювати цілеспрямоване керування початковим станом ембріона з метою підвищення його кріостійкості.

Положення, які відносяться на захист.

1. На початковій стадії осмотична реакція яйцеклітин та ембріонів миші при експозиції їх в гіпертонічних розчинах солей та кріопротекторів задовільно описується рівняннями масопереносу Kedem-Katchalsky, що дозволяє вимірювати коефіцієнти проникності їх мембран для молекул води та кріопротектора, а також об'єму частку осмотично неактивних речовин всередині клітини методом підбору значень цих параметрів, при яких рівняння зазначених рівнянь погоджується з експериментальними даними про залежність об'єму клітин від часу в тих же умовах.

2) Значення коефіцієнтів проникності мембран яйцеклітин та ембріонів миші для молекул води та кріопротектора залежить від змісту останнього в позаклітинному середовищі.

3) Значення коефіцієнта проникності клітинних мембран для молекул ДМСО збільшується в ряду "яйцеклітина-зігота-двоклітинний ембріон-чотирьохклітинний ембріон".

4) Попереднє збезводнення бластомерів ембріонів миші у гіпертонічному розчині кріопротектора веде до зменшення клітинного об'єму, після досягнення якого починається формування мембранних пухирів у ході набухання клітин, що свідчить про зменшену здатність клітинного цитоматриксу до розтягнення.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на Хvii та Хviii конференціях молодих вчених (Харків, 1989, 1991),

на щорічних робочих нарадах по проблемі "Консервація генетичних ресурсів" (Пушнін, 1990, 1994), на її Міжнародній конференції "Успіхи сучасної кріобіології" (Харків, 1992).

Публікації. По матеріалам дисертації опубліковано 9 робіт.

Об'єм та структура роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, глави власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури, який включає 212 робіт. Робота викладена на 92 сторінках машиннописного тексту, містить 49 малюнків та 5 таблиць.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

У роботі використовували яйцеклітини та ембріони, одержані від самок мишей лінії свва або гібридних самок  $F_1$  від схрещування (сва х свва). Для здобуття більшої кількості статевих клітин застосовували метод гормональної суперовуляції. День виявлення копуляційної пробки вважався першим днем вагітності. Статеві клітини здобували промиванням відпрепарованих яйцепроводів фізіологічним розчином Дельбекко при кімнатній температурі по стандартній методиці. В експериментах використовували клітини, які мали цільні зона *pellicula* та плазматичні мембрани, прозору цитоплазму та правильну форму бластомерів.

Всього у роботі було використано 2500 ембріонів та яйцеклітин миші.

Дослідження проводилися на експериментальному стенді, який включає інтерференційно-поляризаційний мікроскоп, кріоприставку з програмним блоком керування температурним режимом і кінокамеру.

Здійснювачася фотографічна реєстрація бахідного стану клітини. Потім робили заміну середовища Дельбекко на розчин, дія якого випробувалася, і починали кінореєстрацію кінетики осмотичної реакції клітини. Контроль за температурою в об'єкті під час охолодження здійснювався хромель-копелевим термометром, яка була розміщена безпосередньо у препараті.

негативне зображення клітини просцирували за допомогою фотозбільшувача на однорідній за товщиною папір і методом виміру ваги фотографічних зображень клітин визначали кінетику змінення в'дносно площі фотографічного зображення клітини, а також за допомогою приладу МАГ1 (Паннов Є.Я та ін., 1986).

У роботі використовувалися розчини ДМСО, 1,2-ЦД,  $\text{NaCl}$  та сахарози, приготовані на бідистильованій воді. Осмотичний тиск розчи-

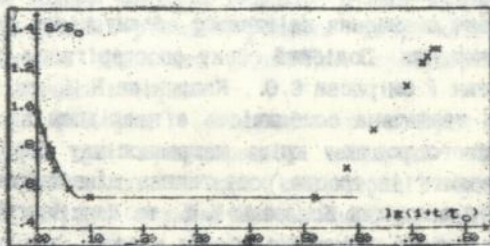
нів визначався за допомогою мікросометра ОМКА-Ц-01. Значення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран яйцеклітин та ембріонів миші для молекул води ( $L_p$ ), кріопротектора (K1), а також об'ємної частки осмотично неактивних речовин всередині клітини  $\alpha$  вимірювали наступним чином. Визначену експериментально залежність відносної площі зображення клітини від часу апроксимували чисельним рішенням (на ЕОМ) рівнянь Kedem-Katchalsky при як найкраще (за методом найменших квадратів) підібраних значеннях параметрів  $L_p$ , K1 та  $\alpha$ , які фігурують у цих рівняннях.

Статистичну обробку цифрових даних проводили за методом Ст'юдента. При цьому протягом усієї роботи довірчий інтервал розраховували для ймовірності попадання до нього  $P = 0,95$ .

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЙХ ОБГОВОРЕННЯ.

Дослідження осмотичної реакції яйцеклітин та ембріонів миші в гіпер- та гіпertonічних водних розчинах хлориду натрія та сахарози.

В гіпертонічних водних розчинах NaCl в концентрації у діапазоні 0,6M-2,0M об'єм клітин зменшується внаслідок їх збездволення за перші 10 - 45 с експозиції, після чого настає фаза стабілізації клітинного об'єму на мінімальному рівні. Мінімальне значення відносного об'єму клітин в гіпертонічних розчинах NaCl незначно змінюється при збільшенні концентрації солі від 0,6M до 2,0M. Але при концентрації позаклітинного NaCl 1,0M та вище стаціонарне значення об'єму збездволеної клітини зберігається лише протягом 15-20 хвилин, після чого клітинний об'єм всупереч теоретичному прогнозу (на основі теорії Kedem-Katchalsky) починає збільшуватися (має 1).



Мал. 1. Залежність відносної площі зображення blastomera двоклітинного ембріона миші від часу його експозиції в 1,0M водному розчині NaCl (— — теоретично розрахована залежність; x x x — експериментальні значення).

Напевне, після тривалої експозиції ембріонів миші в розчинах з підвищеним вмістом солі їх плазматичні мембрани втрачають властивість вибіркової проникності, і електроліт здатен проникати всередину клітини. В деяких експериментах набухання супроводжується формуванням та ростом на клітинній поверхні мембранних пухирів.

Після того, як ембріони миші були занурені в гіпотонічний розчин  $\text{NaCl}$  (0,078 M), спостерігалось їх поступове набухання. В багатьох випадках при експозиції клітин в таких умовах процес набухання супроводжувався формуванням на поверхні плазматичних мембран зігот, двох- та чотирьохклітинних ембріонів миші мембранних пухирів. Цей ефект ми вважаємо зв'язаним з локальним відшаруванням плазматичної мембрани від цитоматриксу, який досягає у цих випадках межі розтягнення. Останнє, в свою чергу, зумовлено гелеподібними властивостями цитоматриксу. Осмотичні сили, які прикладаються до клітинної мембрани, вимагають дальшого збільшення об'єму клітини, і формування мембранних пухирів є безпосереднім продовженням процесу їх обводнення, якому перешкоджує обмежене розтягнення внутрішньоклітинного матриксу. Об'єм цитоматрикса при цьому не змінюється, і осмотична реакція здійснюється, головним чином, за рахунок об'єму мембранного пухиря. Слід підкреслити, що збільшення об'єму клітини під час набухання та формування мембранних пухирів в гіпотонічних умовах відбувається не відразу, а після деякої затримки, яка в обох випадках складає приблизно 30 - 60 с. Це явище, здається, пов'язано з наявністю специфічних цитоплазматичних зв'язків та необхідністю подолання деякого енергетичного бар'єра подо розриву зв'язку плазматичної мембрани з цитоскелетовими структурами.

Виявлено ефект зменшення клітинного об'єму після досягнення ім максимального значення. Подібний ефект спостерігався раніше і для інших типів клітин (Омірська Є. О., Каззюкіна Н. Н. та ін., 1987). Ми вважаємо, що зазначена особливість є наслідком витоку частини внутрішньоклітинного розчину крізь макроскопічну пору, до формування якої приводить ізотропне розтягнення плазматичної мембрани за механізмом, що описаний Ковловим М. М. та Маркіним В. С. (1984). Згідно з нашими даними, значення об'єму клітин, при якому розвивається таке розтягнення, в 0,078M-ному водному розчині  $\text{NaCl}$ , складає  $1,45 \times 10^6 \pm 0,15 \times 10^6$ .

Коефіцієнт проникності ембріонів миші для молекул води майже

не залежить від концентрації електроліта в оточуючому клітинні середовищі в області гіпертонічних концентрацій електроліта (табл. 1) Стадія дроблення статистично достовірно не впливає на величину водної проникності плазматичних мембран. Об'ємна частка осмотично неактивних речовин всередині клітки, згідно з нашими даними, складає приблизно 27%.

Таблиця 1

Залежність коефіцієнта фільтрації плазматичних мембран двохклітинних ембріонів миші та об'ємної частки осмотично неактивних речовин всередині клітини від концентрації NaCl в позаклітинному розчині ( $\pi=7,4$ ; температура  $23^{\circ}\text{C}$ );  $r < 0,5$ .

Концентрація NaCl, М	$L_p \times 10^{13}$ , $\text{м}^3/\text{сн}$	$\alpha$
0,078	$53,4 \pm 8,4$	---
0,6	$3,7 \pm 0,31$	$0,28 \pm 0,041$
0,8	$4,5 \pm 0,36$	$0,27 \pm 0,0064$
1,0	$5,0 \pm 0,38$	$0,27 \pm 0,04$
1,2	$5,2 \pm 0,41$	$0,27 \pm 0,04$
1,5	$6,1 \pm 0,46$	$0,25 \pm 0,051$

Аналіз сдержаних залежностей об'єму клітин від часу свідчить про те, що площа плазматичної мембрани бластоміра двохклітинного ембріона миші може збільшуватися у 1,5 рази без виникнення ізо-тропного розтягнення. Це можна пояснити тим, що близько третини площі клітинної мембрани запасено у мікроскладках.

Експериментально одержані залежності відносної площі фотографічного зображення яйцеклітин та ембріонів миші при їх експозиції в 0,5 та 1,0М водних розчинах сахарози цілком задовільно погоджується з теоретичним рішенням рівнянь Kedem-Katchalsky для цих умов, що дозволяє визначити відповідні транспортні характеристики їх плазматичних мембран.

Коефіцієнт фільтрації плазматичних мембран двохклітинних ембріонів миші при концентрації сахарози 0,5М складає  $3,35 \times 10^{-13} \pm 0,19$   $\text{м}^3/\text{сн}$ , а при концентрації сахарози 1,0М -  $3,1 \times 10^{-13} \pm 0,21$   $\text{м}^3/\text{сн}$ . Об'ємна частка осмотично неактивних речовин всередині клітин складає  $0,22 \pm 0,04$  та  $0,25 \pm 0,05$  при концентраціях сахарози 0,5М та 1,0М, відповідно.

на відміну від розчинів NaCl навіть тривала експозиція яйцеклітин та ембріонів миші в гіпертонічних водних розчинах сахарози

(протягом 40-50 хвилин) не викликає втрати вибіркової проникності їх плазматичних мембран, і клітини перебувають у збезводненому стані. Як і передбачає теорія, заміна гіпертонічного розчину на ізотонічний (середовище Дальбекко) приводить до вертання клітинного об'єму до первісного значення. Послідовна заміна позаклітинного розчину на розведене родю у співвідношенні 1:1 середовище Дальбекко, викликає набухання бластомірів та формування на їх поверхні мембранних пухирів. Якщо після цього повернути набулі клітини до гіпертонічного розчину сахарози (1,0М), то спостерігається стиснення клітин в цілому, включаючи і мембранні пухирі. Це свідчить про те, що плазматична мембрана в області мембранних пухирів не втрачає властивості вибіркової проникності.

#### Дослідження осмотичної реакції яйцеклітин та ембріонів миші в водних розчинах кріопротекторів.

За допомогою волюметричного методу виміряно коефіцієнти проникності мембран яйцеклітин та двоклітинних ембріонів миші для молекул ДМСО та 1,2-ПД та об'ємна частка осмотично неактивних речовин всередині клітин залежні від початкової молярної концентрації кріопротектора, температури (10°C; 15°C; 25°C) та рН (4,5-8,6) середовища екваїбрації, та стадії розвитку ембріона. У роботі використовувались водні розчини ДМСО та 1,2-ПД з концентраціями 0,3М; 1,28М; 2,56М; 3,84М та 1,32М; 2,64М; 3,96М відповідно.

Після закінчення проникність мембран ембріонів миші для молекул ДМСО достовірно збільшується в порівнянні з проникністю мембран яйцеклітин (Табл. 2). Ця обставина свідчить про те, що ембріони на різних стадіях дозрівання легше насичити кріопротектором і, таким чином, забезпечити їх криозахист в порівнянні з незаплідженими яйцеклітинами.

При зниженні температури експозиції процеси збезводнення та повертання клітинного об'єму до первісного значення сповільнюються (табл. 3).

Енергія активації пасивного транспорту молекул ДМСО крізь плазматичні мембрани бластомірів 2-клітинних ембріонів миші в області температур 10°C-25°C складає 33 кДж/моль, а енергія активації процесу переносу молекул води в тих же умовах складає 30,9 кДж/моль.

Коефіцієнт проникності мембран яйцеклітин та ембріонів миші для молекул ДМСО зменшується при збільшенні концентрації ДМСО в

ряду 0,3М, 1,28М, 2,56М, 3,84М (табл. 3).

Таблиця 2.

Залежність коефіцієнтів фільтрації, проникності мембран яйце-клітин (ембріонів) мшні для молекул ДМСО та об'ємної частки осмотично неактивних речовин всередині клітини від стадії розвитку ембріона (Т=25°C; рн=7,4; концентрація ДМСО-3,84М).

Стадія розвитку	$L_p \times 10^{13}$ м <sup>3</sup> /сн	$K \times 10^7$ м/с	$\alpha$
яйцеклітина	1,00 ± 0,05	1,9 ± 0,06	0,32 ± 0,04
зігота	1,02 ± 0,06	5,2 ± 0,07	0,30 ± 0,05
2 - кліт. ембріон	1,05 ± 0,05	5,3 ± 0,07	0,29 ± 0,04

Таблиця 3.

Залежність коефіцієнтів проникності плазматичних мембран бластомерів двоклітинних ембріонів мшні для молекул ДМСО та води від температури та концентрації криопротектора (рн=7,4).

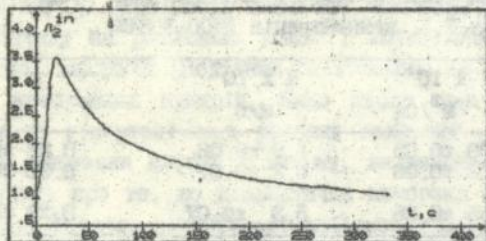
Температура, °C	Концентрація ДМСО, М	$K \times 10^7$ , м/с	$L_p \times 10^{13}$ , м <sup>3</sup> /сн
23	0,3	5,32 ± 0,06	14,20 ± 0,10
23	1,28	15,00 ± 0,20	9,62 ± 0,46
23	2,56	8,10 ± 0,32	3,70 ± 0,60
23	3,84	5,30 ± 0,07	1,05 ± 0,05
15	3,84	2,31 ± 0,13	0,73 ± 0,06
10	3,84	0,98 ± 0,12	0,59 ± 0,05

Проникність плазматичних мембран ембріонів мшні для молекул 1,2-ПД при збільшенні концентрації цього криопротектора, навпаки, має тенденцію збільшуватися, що можливо пов'язано з різним впливом 1,2-ПД та ДМСО на мембранні та цитоскелетові структури ембріонів, але, судячи з відомих із літератури даних щодо успішного виживання цих криопротекторів при криоконсервування зародкових клітин мшні, згаданий вище вплив є зворотним.

Показано, що насичення клітин криопротектором на 90-95% при кімнатній температурі відбувається вже за перші 4-5 хвилини експозиції в гіпертонічних розчинах ДМС і за 1-2 хвилини - в гіпертонічних розчинах 1,2-ПД, після чого концентрації криопротектора всередині клітини стає лише на 2-5х втче, ніж його концентрація в позаклітинному середовищі, і далі залишається майже незмінною.

Концентрація електролітів та інших розчинених всередині кліти-

ни речовин дуже швидко (протягом 40-50 с) досягає пікового значення, а потім спадає до первісних або навіть нижчих за них значень протягом часу, необхідного для повернення об'єму клітини до первісного значення (Мал. 2).



Мал. 2. Теоретично розрахована залежність осмотичного тиску (концентрації) електролітів всередині бластоміра двохклітинного ембріона миші протягом його експозиції в 3,95М-ному водному розчині 1,2-ПД ( $T=25^{\circ}C$ ,  $\rho_1=7,4$ ).

З одержаних нами даних випливає, що пік концентрації електролітів всередині клітини та тривалість впливу гіпертонічного розчину солей на внутрішньоклітинні структури збільшуються по мірі зростання вихідної концентрації крипротектора в позаклітинному середовищі та зменшення проникності мембран для молекул крипротектора. Збільшення об'єму клітин до значень, що перевищують первісне, веде до зниження концентрації електроліту всередині клітини до менших, ніж у нормі, значень.

Як в ізотонічних, так і в гіпертонічних водних розчинах ДМСО та 1,2-ПД бластоміри ембріонів миші протягом тривалої експозиції досягають розмірів, що перевищують початкові. При цьому спостерігаються наступні морфологічні змінення. В 3,84М-ному водному розчині ДМСО, як тільки об'єм бластомірів двохклітинних ембріонів перевищував первісний на  $10\pm 6\%$ , набухання клітини як цілого зупинялось. Після цього на поверхні бластомірів в багатьох випадках формувалися мембранні пухирі. Як правило, спочатку на мембрані з'являлися невеликі вищупання, що мали сферичну форму. Оптична щільність пухирів була значно нижчою, ніж щільність решти вмісту клітини. Границя між прозорим пухирем та оптично щільним вмістом клітини була виразною. Об'єм пухирів поступово збільшувався. Крім поступового росту кожного окремого пухиря спостерігалось і стрибкоподібне збільшення радіусів пухирів за рахунок їх злиття. При

цьому дрібні мембранні пухирі зливалися в більші, а остання, більш щільна частина цитоматриксу бластомера не збільшувалася у розмірі або навіть трохи зменшується. Імовірно, під час фази збезводнення структури всередині клітини зближуються між собою, що може привести до формування зшивок між ними. За рахунок формування сітки зшивок цитоматрикс не може розтигнутися під впливом осмотичних сил до об'ємів, які значно перевищують первісне значення. Під впливом осмотичних сил плазматична мембрана в деяких випадках відшаровується від більш корсткої структури цитоматриксу, і надалі збільшення об'єму клітини відбувається тільки за рахунок сумарного об'єму мембранних пухирів.

У 0,3М-ному водному розчині ДМСО формування мембранних пухирів на поверхні бластомерів двоклітинних ембріонів на відміну від випадку 3,84М-го водного розчину ДМСО починається при досягненні їх відносним об'ємом значення  $1,31\text{v}_0 \pm 0,09\text{v}_0$ . У випадку зіготи формування мембранних пухирів починається, коли відносний об'єм досягає значення  $1,05\text{v}_0 \pm 0,1\text{v}_0$ . Яйцеклітина на відміну від зіготи та ембріонів набухає рівномірно, без формування пухирів на мембрані. Її вміст дифузно розподіляється по всьому об'єму клітини. Цей факт у світлі описаних вище уявлень можна пояснити тим, що запліднювання яйцеклітини приводить до більш міцного структурування її цитоплазми, ніж в початковому (до запліднення) стані. Додаткове структурування цитоплазми після запліднення яйцеклітини повинно перешкоджати формуванню кристалів льоду всередині клітини під час її заморожування і таким чином підвищувати кристостійкість ембріонів в порівнянні з яйцеклітинами. Приблизно на 30-тій хвилині експозиції двоклітинного ембріону або зіготи мити у 0,3М-ному водному розчині ДМСО в деяких випадках спостерігалася видавлявання частини плазматичної мембрани за межі *zona pellucida*. Це явище, а також аналіз залежностей об'єму клітин від часу свідчить про те, що плазматична мембрана ембріона має значний резерв площі поверхні, що, в свою чергу, функціонально зумовлено специфічною готовністю цих клітин до дроблення.

Аналіз морфологічних змін та особливостей осмотичної поведінки ембріонів у 0,3М-ному та гіпертонічних водних розчинах ДМСО, відхилення відповілі клітин від передбаченої з позицій мембранної теорії показує, що в регуляції клітинного об'єму значна роль належить цитоплазматичним структурам. Цитоматрикс клітини здібен

чинити опір дії сил розтягнення в умовах зниженої та підвищеної тоничності середовища, що, найімовірніше, зумовлено його фізичними та структурними властивостями. Стиснення клітин внаслідок дегідратації не є необхідною умовою структурування цитоплазми. Згідно з нашими даними, по мірі надухання ембріонів в 2,6М та 3,96М-них розчинах 1,2-ПД на мембрані бластомерів з'являлися пухирі при відносному об'ємі  $1,06v_0 \pm 0,07v_0$ , а в 1,32М-ному водному розчині 1,2-ПД формування мембранних пухирів відбувалося в середньому при більш вищих значеннях відносного об'єму бластомерів -  $1,22v_0 \pm 0,1v_0$ . Але та обставина, що мембранні пухирі під час експозиції клітин в гіпертонічних розчинах з'являються при значеннях відносної площі фотографічного зображення клітини, приблизно,  $1,1x_0$  (де  $x_0$  - початкове значення площі фотографічного зображення клітини), а у випадку контакту клітин з ізотонічним розчином - при значно більшій відносній площі, свідчить про те, що стиснення клітин внаслідок початкової дегідратації може привести до додаткового структурування їх цитоплазми.

Дослідження осмотичної реакції яйцеклітин та ембріонів миші в розчинах "диметилсульфоксид - NaCl - вода".

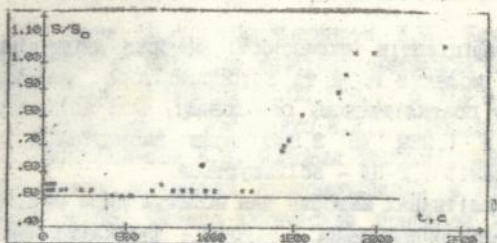
на початку експозиції клітин в гіпертонічних розчинах "3,84М ДМСО - NaCl - вода" з концентрацією NaCl 0,3М, 0,6М, 0,8М експериментально одержані залежності відносної площі зображення бластомерів ембріонів та яйцеклітин миші добре погоджуються з теоретичними, але через деякий час (близько 25-30 хвилин) спостерігається значне відхилення експериментальних даних від розрахованих. Об'єм клітин починається збільшуватися (Мал. 3).

Імовірно, що цей ефект, як і у випадках гіпертонічних водних розчинів NaCl, пов'язаний з тим, що мембрани клітин після вказаного часу втрачають властивість вибіркової проникності та стають профікними для позаклітинного розчину.

Коефіцієнт проникності плазматичних мембран клітин не залежить від концентрації NaCl в позаклітинному середовищі і зростає в ряду "незапліднена яйцеклітина-зігота-двоклітинний ембріон-чотирьохклітинний ембріон" (табл. 4).

Експозиція клітин у водному розчині, який містить як проникаючий до клітини компонент (кріотектор), так і не проникаючий крізь клітинну мембрану речовину (NaCl), що створює вищий, ніж

фізіологічний, осмотичний тиск, приводить не тільки до насичення клітини кріопротектором до концентрації, яка незначно відрізняється від його позаклітинної концентрації, але й до збезводнення клітин.



Мал. 3. Залежність відносної площі зображення бластомера двоуклітинного ембріона миші від часу його експозиції в трійному розчині - 3,84М ДМСО - 0,8М NaCl - вода\* (— - теоретично розрахована залежність; ххх - експеримент).

Таблиця 4.

Залежність коефіцієнтів проникності мембран ембріонів миші для молекул ДМСО та води від концентрації NaCl та стадії розвитку ембріона миші в трійному розчині - 3,84М ДМСО - NaCl-вода\* ( $\rho_1 = 7,4$ ;  $T = 25^\circ\text{C}$ ).

Стадія дроблення	Концентрація NaCl, М	$L_p \cdot 10^{13}$ м <sup>3</sup> /см	$K \cdot 10^7$ м/с	$\alpha$
4-кліт.	0,078	$1,36 \pm 0,05$	$10,7 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,04$
2-кліт.	0,078	$1,42 \pm 0,05$	$5,6 \pm 0,16$	$0,27 \pm 0,05$
2-кліт.	0,15	$1,35 \pm 0,06$	$5,4 \pm 0,15$	$0,30 \pm 0,04$
2-кліт.	0,30	$1,26 \pm 0,06$	$5,6 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,05$
2-кліт.	0,60	$1,40 \pm 0,11$	$5,3 \pm 0,19$	$0,33 \pm 0,07$
2-кліт.	0,80	$1,42 \pm 0,12$	$5,1 \pm 0,27$	$0,34 \pm 0,06$

Обидва ці фактори (насичення клітин кріопротектором та їх збезводнення, накладаючись один на одного, як відомо, зменшують імовірність формування льоду всередині клітини, чим підвищують кріостійкість ембріонів та яйцеклітин.

#### ВИСНОВКИ.

1. Значення коефіцієнта фільтрації плазматичних мембран яйцеклітин та ембріонів миші не залежить від концентрації хлориду натрія в гіпертонічному позаклітинному середовищі, а також від запліднення яйцеклітини та стадії розвитку ембріону.

2. Тривала експозиція клітин (25-30 хвилин) у концентрованих розчинах  $\text{NaCl}$  - вода - приводить до втрати плазматичними мембранами яйцеклітин та ембріонів м'якої властивості вибіркової проникності.

3. Значення коефіцієнтів проникності мембран яйцеклітин та ембріонів м'якої для молекул води та кріопротектора залежать від вмісту останнього в позаклітинному середовищі; при збільшенні концентрації ДМСО від 1,28М до 3,84М вони зменшуються, а при збільшенні концентрації 1,2-ПД - збільшуються.

4. Проникність клітинних мембран для молекул ДМСО збільшується в ряду - незапліднена яйцеклітина - зігота - двоуклітинний ембріон - чотирьохклітинний ембріон - і майже не залежить від концентрації  $\text{NaCl}$  в позаклітинному середовищі.

5. Об'ємна частка осмотично неактивних речовин всередині статевих клітин м'якої складає  $0,27 \pm 0,03$ , біля третини площі поверхні плазматичних мембран ембріонів м'якої запасено у вигляді мікро-складок.

6. Експозиція клітин в водному розчині, що містить як проникаючий до клітини компонент (кріопротектор), так і не проникаючу речовину ( $\text{NaCl}$ ), що створює вищий, ніж фізіологічний, осмотичний тиск, приводить не тільки до насичення клітин кріопротектором, але одночасно і до збездоднення клітин.

7. Оптимальний час експозиції яйцеклітин та ембріонів м'якої у розчинах ДМСО та 1,2-ПД, необхідний для їх насичення кріопротектором при температурі  $25^{\circ}\text{C}$  складає 4-5 хвилин; пікове значення концентрації електролітів всередині клітини та тривалість впливу гіпертонічного розчину солей на структури всередині клітини збільшуються по мірі росту початкової концентрації кріопротектора в позаклітинному середовищі та зменшення проникності клітинних мембран до нього.

8. Після більш сильного та тривалішого збездоднення клітин, а також після запліднення яйцеклітин формування мембранних пухирів на їх поверхні протягом дальшого набухання відбувається при більш низькому значенні клітинного об'єму.

9. Змінена рН позаклітинного розчину в діапазоні 4,0 - 9,0 не має значного впливу на осмотичну реакцію яйцеклітин та ембріонів м'якої протягом їх експозиції в гіпо- та гіпертонічних розчинах  $\text{NaCl}$  та кріопротекторів.

Впровадження результатів роботи: Результати дисертаційної роботи впроваджені у лекційному курсі на кафедрі гістології, цитології та ембріології Харківського Медичного Університету.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

1. Гордиенко Е.А., Смольянинова Е.И. Коэффициенты проницаемости яйцеклетки мыши для диметилсульфоксида в области температур 25°C -10°C // деп. в ВИНТИ 16.02.1990, № 972-В-9 с.

2. Розанов Л.Ф., Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г., Смольянинова Е.И. Фазовая теория стрессинга клеток как основа для новой концепции криопореджения и криозащиты клеточных структур// в сб. Физико-химические процессы в криобиологических системах - Харьков.-1991.-С.134-140.

3. Смольянинова Е.И. Неспецифические реакции яйцеклеток и эмбрионов мыши в гипертонических растворах криопротекторов// в сб. Влияние холода на биологические объекты.- К., Наук.думка.-С.61-65.

4. Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Осмотическое поведение яйцеклеток и эмбрионов мыши. Роль цитоскелета//Проблемы криобиологии.- 1992.- № 4.- С.26-32.

5. Гордиенко Е.А., Смольянинова Е.И. Количественное измерение транспортных характеристик мембран яйцеклеток и эмбрион<sup>3</sup> мыши в зависимости от pH и осмотического давления внеклеточной среды//II Междунар. конф. "Успехи современной криобиологии" тез. докл., Харьков, 21-25 апреля 1992.-Харьков,1992.- С.44.

6. Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Роль цитоскелета в осмотических реакциях клеток// II Междунар. конф. "Успехи современной криобиологии" тез. докл., Харьков, 21-25 апреля 1992.-С.153.

7. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Смольянинова Е.И. К вопросу о механизме осмотического лизиса // Биол. мемор.-1993.-т.10,№6.-С.651-655.

8. Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Влияние концентрации внеклеточного хлористого натрия на проницаемость мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды// Проблемы криобиологии.- 1993.- №4.-С.25-28.

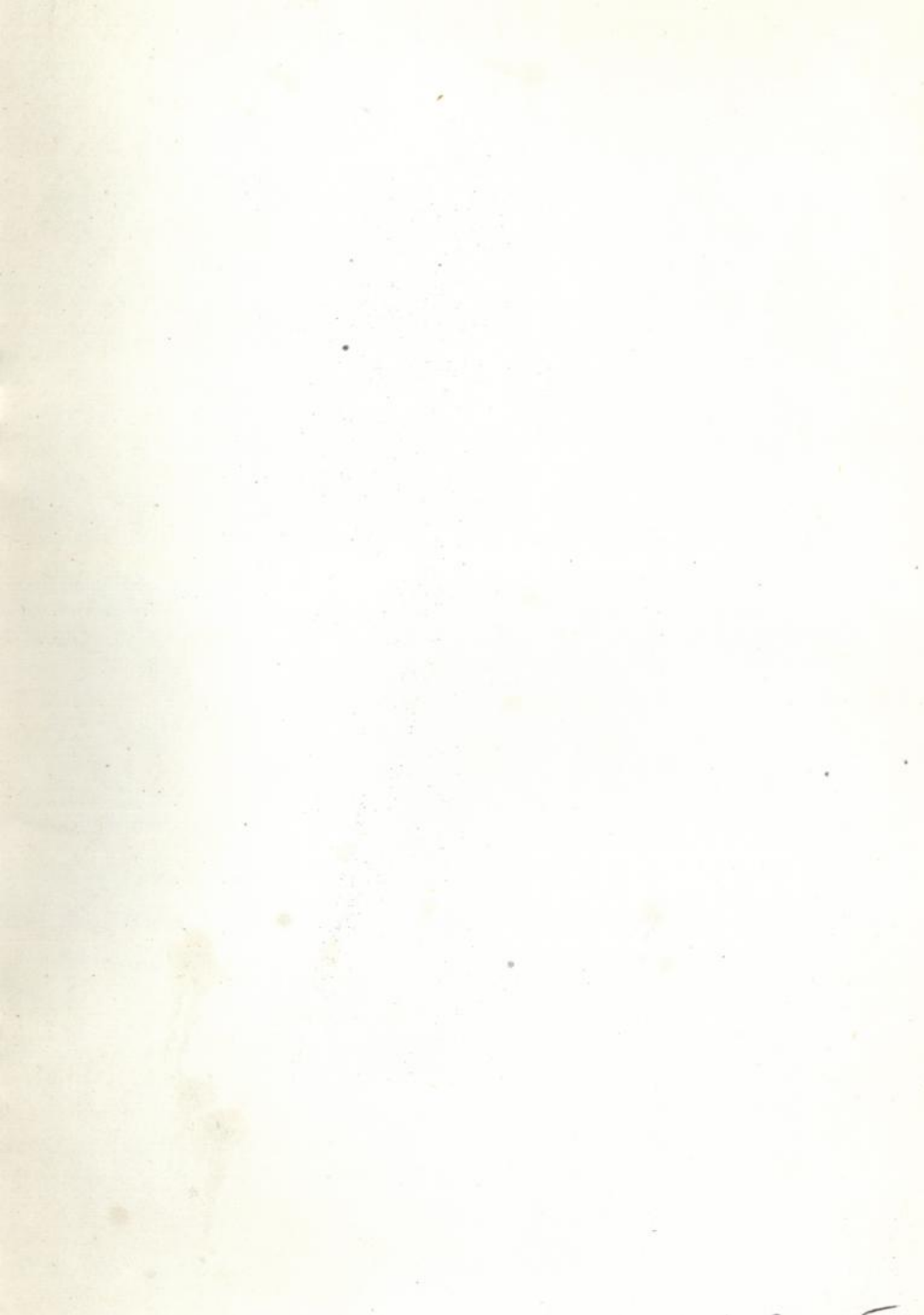
9. Gordienko E.A., Rozanov L.F., Kuleshova L.G., Smolyaninova E.I. Cell membrane bubbling phenomenon in non-isotonic solutions// 29-th Annual meeting of the Society for Cryobiology.- Abstract of papers, June, 14-19, 1992.- Cornell University, Ithaca, New York, USA.- P. 88.

Відповідальний за випуск В.І.Грищенко

Підп. до друку 26.06.94. Формат 60 x 84 1/4  
1,0 ум.-друк.арк., 1,0 обл.-вид. арк. Тираж 100. Зам. 141.

---

Дільниця оперативного друку ХДАУ.



AB 30.755

**AB 30.755**