

УДК 57.043.086:611.36.018.1:577.1

Л.Г. КУЛЕШОВА

## Механизм постгипертонического лизиса изолированных гепатоцитов крысы при регидратации

UDC 57.043.086:611.36.018.1:577.1

L.G. KULESHOVA

## Mechanism of Post-hypertonic Lysis of Isolated Rat Hepatocytes During Rehydration

В работе методом световой микроскопии изучена кинетика регуляции клеточного объема изолированных гепатоцитов крысы при изменении тоничности внеклеточной среды, моделирующем процессы дегидратации и регидратации клеток в условиях роста и плавления внеклеточных кристаллов льда. Установлено, что постгипертонический лизис гепатоцитов крысы осуществляется или порционным выбросом части внутриклеточного содержимого, или непрерывным его оттоком во внеклеточную среду. Осмотическая активность клеток при последующих циклических осмотических нагрузках свидетельствует о сохранности полупроницаемых свойств мембраны и “залечивании” мембранной поры.

**Ключевые слова:** световая микроскопия, гепатоциты крысы, гипертония, регидратация, мембрана, постгипертонический лизис.

В роботі методом світлової мікроскопії вивчена кінетика регуляції клітинного об'єму ізольованих гепатоцитів щура при зміні тоничності позаклітинного середовища, що моделює процеси дегідратації та регідратації клітин в умовах росту і плавлення позаклітинних кристалів льоду. Доведено, що постгіпертонічний лізис гепатоцитів щура здійснюється або порційним викидом частини внутрішньоклітинного вмісту або безперервним його відтоком у позаклітинне середовище. Осмотична активність клітин при подальших циклічних осмотичних навантаженнях свідчить про збереження напівпроникних властивостей мембрани і “заліковування” мембранної пори.

**Ключові слова:** світлова мікроскопія, гепатоцити щура, гіпертонія, регідратація, мембрана, постгіпертонічний лізис.

The kinetics of cell volume control in the isolated rat hepatocytes when varying an extracellular medium tonicity, simulating the processes of dehydration and rehydration of cells under the conditions of growth and melting of extracellular ice crystals was studied with light microscopy. Post-hypertonic lysis of rat hepatocytes was shown to be realised by either discrete release of a part of endocellular content, or its continuous outflow to extracellular environment. Cell osmotic activity under following cyclic osmotic loadings testified to a preservation of membrane semi-permeable properties and “healing” of the membrane pore.

**Key-words:** light microscopy, rat hepatocytes, hypertony, rehydration, membrane, post-hypertonic lysis.

Согласно существующим теоретическим представлениям гипотонический лизис клеток происходит в результате флуктуационного образования макроскопической поры в изотропно растянутой клеточной мембране [1, 2, 7]. Чтобы в мембране возникло изотропное растяжение, ее форма должна стать сферической. Движущей силой оводнения клетки является перепад осмотического давления между вне- и внутриклеточным растворами. Увеличение радиуса клетки до значения  $R > R_0$  приводит к появлению изотропного натяжения мембраны  $\sigma$ , величину которого определяют по закону Гука:

$$\sigma = \Gamma \left( \frac{S - S_0}{S_0} \right),$$

According to current theoretic conceptions, cell hypotonic lysis is a result of a macroscopic pore fluctuation formation in isotropically extended cell membrane [1, 2, 7]. For the appearance of isotropic extension in the membrane, its shape should become spherical. A driving force of cell hydration is an osmotic pressure gradient between extra- and intracellular solutions. The enlargement of cell radius up to the value of  $R > R_0$  results in an appearance of isotropic extension of membrane  $\sigma$ , determined by Hooke's law:

$$\sigma = \Gamma \left( \frac{S - S_0}{S_0} \right),$$

where  $S$  and  $S_0$  are the areas of membrane surface in

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* 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

\* 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

где  $S$  и  $S_0$  – площади поверхности мембраны в растянутом и недеформированном состояниях соответственно ( $S > S_0$ ):  $S = 4\pi R^2$ ,  $S_0 = 4\pi R_0^2$ .

При образовании поры за счет тепловых флуктуаций преодолевается энергетический барьер  $\Delta F$ , величина которого определяется механическими характеристиками и величиной изотропного растяжения клеточной мембраны [7]:

$$\Delta F = \frac{\pi\gamma^2}{\Gamma\left(\frac{S - S_0}{S_0}\right)},$$

где  $\gamma$  – свободная энергия единицы длины кромки поры;  $\Gamma$  – модуль изотропного растяжения клеточной мембраны.

При достаточно большом относительном растяжении клеточной мембраны  $(S - S_0)/S_0$  высота энергетического барьера  $\Delta F$  уменьшается, и поэтому возникновение в мембране макромолекулярной поры неизбежно. Через образовавшуюся пору часть внутриклеточного содержимого выбрасывается из клетки наружу под действием трансмембранного перепада давления  $\Delta P$ , который связан с изотропным растяжением мембраны следующим образом:

$$\Delta P = \frac{2\Gamma(S - S_0)}{S_0 R_0}.$$

При этом объем и радиус клетки, а также изотропное напряжение мембраны уменьшаются до значений, при которых существование макромолекулярной поры оказывается энергетически невыгодно [1, 7], и пора “залечивается”. После “залечивания” поры мембрана клетки не утрачивает свойства избирательной проницаемости по отношению к растворенным во вне- и внутриклеточной среде веществам.

Указанные теоретические представления о механизме гипотонического лизиса имеют универсальный характер и применимы для любого типа клеток при учете их индивидуальных особенностей. Однако в литературе имеются лишь косвенные экспериментальные подтверждения реализации данного механизма, полученные только при исследовании процесса гипотонического лизиса эритроцитов человека [3, 8, 11, 13, 14].

Цель работы – изучить особенности постгипертонического лизиса изолированных гепатоцитов крысы.

Клетки данного типа способны осуществлять эндоцитоз веществ с большой молекулярной массой и сравнительно крупных липосом. При этом клеточная мембрана гепатоцитов испытывает значительные деформации [6]. Поэтому вполне вероятно, что механические характеристики

stretched and non-deformed states, correspondingly ( $S > S_0$ ):  $S = 4\pi R^2$ ,  $S_0 = 4\pi R_0^2$ .

During pore formation by means of thermal fluctuations the energy barrier  $\Delta F$  is overcome, and its magnitude is determined by both mechanical characteristics and cell membrane isotropic extension value [7]:

$$\Delta F = \frac{\pi\gamma^2}{\Gamma\left(\frac{S - S_0}{S_0}\right)},$$

where  $\gamma$  is a free energy of length unit of pore edge;  $\Gamma$  is the modulus of isotropic extension of cell membrane.

At quite high relative extension of cell membrane  $(S - S_0)/S_0$  the energy barrier height,  $\Delta F$ , is diminished, and consequently the appearing of membrane macroscopic pore is foregone. Through the formed pore the part of intracellular content is released out of the cell under effect of transmembrane pressure gradient,  $\Delta P$ , being associated with membrane isotropic extension as follows:

$$\Delta P = \frac{2\Gamma(S - S_0)}{S_0 R_0}.$$

Herewith the cell volume and radius, as well as membrane isotropic extension reduce down to the values, where the existence of the macroscopic pore appears energetically disadvantageous [1,7], and it is “healed”. After pore “healing” the cell membrane does not lose its selective permeability properties in respect of the substances dissolved in extra- and intracellular medium.

The above mentioned theoretical conceptions about the mechanisms of hypotonic lysis are of common nature and applicable for any type of cells with taking into account their peculiarities. Nevertheless there are just indirect experimental proofs for implementing the given mechanism in literature data, obtained only when studying the process of hypotonic lysis of human erythrocytes [3, 8, 11, 13, 14].

This research aim was to study the features of post-hypertonic lysis of isolated rat hepatocytes.

The cells of the given type are capable to realise endocytosis of substances with a high molecular weight and relatively large liposomes. Thereat the cell membrane of hepatocytes experiences a considerable deformation [6]. Therefore it is very likely, that the mechanical properties of hepatocyte membranes essentially differ from cell membranes of other types and have considerable differences between the quantitative properties of hypotonic lysis and hypotonic hemolysis.

### Materials and methods

The experiments were performed by light microscopy using of MBI-15U microscope (LOMO,

мембран гепатоцитов существенно отличаются от мембран других типов клеток и имеют значительное отклонение количественных характеристик процесса гипотонического лизиса от гипотонического гемолиза.

### Материалы и методы

Исследования проведены методом световой микроскопии с использованием микроскопа МБИ-15У (ЛОМО, Ленинград). Кинетику морфологического ответа изолированных гепатоцитов крысы на последовательное изменение тоничности внеклеточной среды, моделирующее процессы дегидратации и регидратации клеток в условиях роста и плавления внеклеточных кристаллов льда, регистрировали фотографически. При съемке во всех экспериментах использовали увеличение 200.

Гепатоциты, выделенные из печени крыс по методу [10], были предоставлены для исследований отделом криобиохимии ИПКиК НАНУ.

В качестве гипертонического реагента использовали проникающий криопротектор ДМСО в концентрации 2, 5, 15, 20 % (вес/объем). Растворы криопротектора готовили на среде суспендирования гепатоцитов: 250 мМ сахарозы; 5 мМ KCl; 0,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,4 мМ  $\text{NaHPO}_4$ ; 0,8 мМ  $\text{MgSO}_4$ ; 1,2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 10 мМ трис; 1% альбумина. Осмотическое давление растворов измеряли на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Медлабортехника, Одесса), полученные данные приведены в таблице, рН 7,4. Время экспозиции изолированных гепатоцитов в гипертонических растворах ДМСО составляло 30 мин при температуре 24°C.

Тоничность внеклеточной среды после гипертонического воздействия на клетки снижали дозированным ступенчатым введением в суспензию клеток дистиллированной воды.

Все экспериментальные манипуляции проводили непосредственно на столике микроскопа, что позволяло наблюдать с самого начала за реакцией клеток. Для этой цели была сконструирована специальная камера, представляющая собой предметное стекло с прорезанной канавкой, один конец которой сообщался с ячейкой для клеточной суспензии. Объем ячейки  $5 \times 18 \times 0,30 \text{ мм}^3$  (27 мкл) создавали закрепленными на предметном стекле покровными стеклами. Суспензию клеток вносили в канавку, по которой под действием капиллярных сил она попадала в ячейку. Таким же образом добавляли соответствующие гипертонические растворы криопротектора и аликвоты дистиллированной воды.

Сохранность гепатоцитов оценивали по окрашиванию витальным красителем (0,2%-м трипановым синим), который вводили в суспензию клеток

(Russia). Kinetics of the reaction of rat isolated hepatocytes for the series of extracellular medium tonicity variations, simulating the processes of cell dehydration and rehydration under conditions of growth and melting of extracellular ice crystals, was photographically recorded. The magnification for all experimental photos was 200.

Hepatocytes, isolated from rat liver by the method [10], were provided by the Department of Cryobiology of the Institute.

As the hypertonic reagent we used the penetrative cryoprotectant DMSO under concentrations of 2, 5, 15 and 20% (weight/volume). The cryoprotectant solutions were prepared with hepatocyte suspending medium: 250 mM of sucrose; 5 mM of KCl; 0.4 mM of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.4 mM  $\text{NaHPO}_4$ ; 0.8 mM of  $\text{MgSO}_4$ ; 1.2 mM of  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM of tris-HCl; 1% of albumin. Osmotic pressure of the solutions was measured with ОМКА 1С-01 osmometer (Medlabortekhnika, Ukraine), the obtained data are listed in the Table, pH 7.4. The time of isolated hepatocytes exposure to DMSO hypertonic solutions made 30 min at 24°C.

Extracellular medium tonicity after hypertonic effect on cells was diminished by a stepwise addition of distilled water into cell suspension.

All experimental manipulations were performed directly on the microscope table, allowing the cell reaction monitoring from the very beginning. For this purpose we designed the special chamber, comprising the subject glass with a cut groove, connected to the chamber with a cell suspension. The chamber dimensions of  $5 \times 18 \times 0.30 \text{ mm}^3$  (27  $\mu\text{l}$ ) were made by cover glass pieces fixed on the subject glass. Cell suspension placed into the groove appeared in chamber on account of capillary force action. In the same way the appropriate cryoprotectant hypertonic solutions and distilled water aliquots were added to the chamber.

Осмотическое давление гипертонических растворов ДМСО

Osmotic pressure of DMSO solutions

Среда Medium	Осмотическое давление, мОсм/л Osmotic pressure, mOsm/l	Приведенное осмотическое давление $\pi/\pi_0$ Normalised osmotic pressure $\pi/\pi_0$
Среда суспендирования Suspending medium	364	1,16
2% ДМСО 2% DMSO	580	1,84
5% ДМСО 5% DMSO	970	3,08
15% ДМСО 15% DMSO	2250	7,14
20% ДМСО 20% DMSO	2890	9,17



до гипертонического воздействия. Исходная сохранность клеток составляла 75-80%.

Поскольку интактные изолированные гепатоциты крысы имеют практически округлую форму с диаметром большого сечения около 18-20 мкм, их объем  $V_0$  можно оценить по площади фотографического изображения  $S_0$ :

$$V_0 = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} S_0^{\frac{3}{2}}$$

Кинетические кривые изменения относительной площади клеток получали методом морфометрии. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера для вероятности  $P = 0,95$ .

Эксперименты проведены в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и положениями "Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985).

### Результаты и обсуждение

Перенос интактных гепатоцитов крысы в гипотонию при однократном разведении суспензии сопровождался мгновенным (40 с) оводнением клеток. При этом относительная площадь гепатоцитов увеличивалась в среднем в 1,4 раза. В таком состоянии гепатоциты находились в период наблюдения. Морфологически отмечались вакуолизация и разрыхление внутриклеточного содержимого, а также его перераспределение по всему объему клетки (рис. 1).

При введении в суспензию гепатоцитов гипертонических растворов ДМСО наблюдалась традиционная для проникающих веществ двухфазная реакция клеток: обезвоживание и восстановление исходного объема клеток, при котором часть внутриклеточной воды замещалась криопротектором. Важно указать, что фаза быстрого проникновения ДМСО в гепатоциты практически завершалась на первой минуте экспозиции клеток в растворах криопротектора. Далее следовало более медленное восстановление осмотического равновесия в системе "клетка – среда". Выраженных морфологических изменений гепатоцитов в процессе гипертонической экспозиции отмечено не было.

После насыщения гепатоцитов криопротектором различной концентрации в клеточной суспензии ступенчато снижали тоничность внеклеточной среды. Анализ данного этапа исследований показал, что характер постгипертонического ответа

Integrity of hepatocytes was estimated by supravital staining by 0.2% trypan blue, which was added into cell suspension prior to hypertonic effect. The initial integrity of the cells made 75-80 %.

As the intact isolated rat hepatocytes are of virtually spherical shape with diameter of greater section of about 18-20  $\mu\text{m}$ , their volume  $V_0$  can be estimated by its photo image area  $S_0$ .

The kinetic curves of relative cell area were obtained by morphometry. Statistical analysis of the results was performed by Student-Fisher's method for probability of  $p=0.95$ .

The experiments were conducted according to the principles of European convention on protection of vertebrate animals used for experiments and other scientific purposes (Strasbourg, 1985) and "General principles of experiments in animals", approved by the 1st National Congress in Bioethics (Kiev, 2001).

### Results and discussion

Transfer of intact rat hepatocytes into a hypotony with one-step dilution of the suspension was accompanied by an abrupt (40 s) cell hydration. Thereat the hepatocytes' relative area increased in about 1.4 times. The hepatocytes remained in this state during all the observation time. There were observed the vacuolisation and loosening of the cell content, as well as its reallocating in the whole cell volume (Fig. 1).

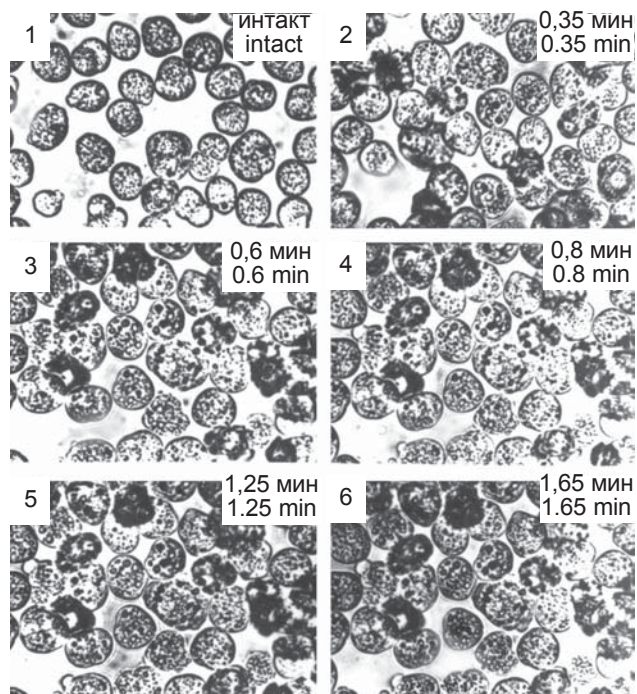


Рис. 1. Развитие морфологической реакции интактных гепатоцитов крысы при однократном разведении среды суспендирования.

Fig. 1. Development of morphological response in rat intact hepatocytes during single dilution of suspending medium.

клеток на стрессовое воздействие, вызванное регидратацией, зависит от исходной гипертоничности внеклеточной среды и, следовательно, от степени насыщения клеток криопротектором.

Общей начальной постгипертонической реакцией гепатоцитов явилось связанное с оводнением резкое увеличение их размера. На поверхности клеток отмечалось массовое формирование мембранных пузырей (блебов). При коалесцировании блебов наблюдалось постепенное разделение гиалоплазмы и гранулоплазмы гепатоцитов: между клеточной мембраной и компактной гранулоплазмой отчетливо различалась прозрачная зона гиалоплазмы. Такая стрессовая морфология гепатоцитов была характерна при оводнении клеток независимо от исходной концентрации ДМСО в растворе.

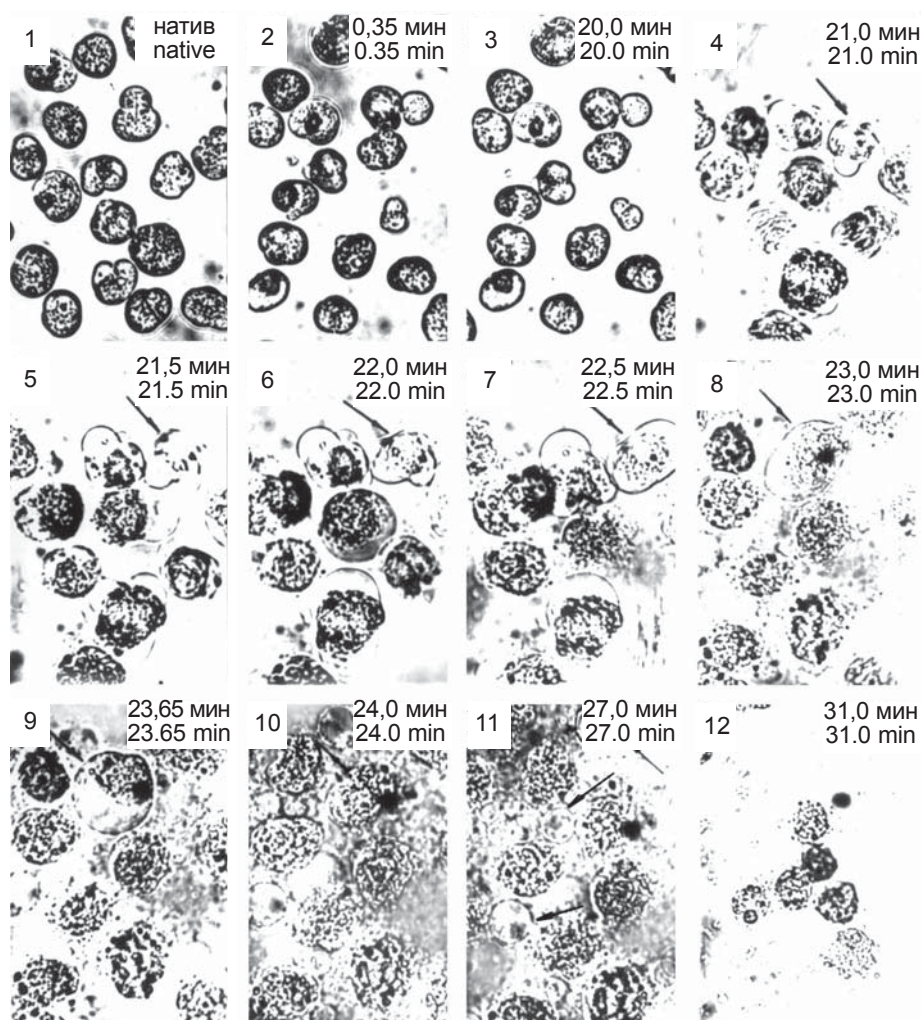
Дальнейшее поведение гепатоцитов определялось уровнем насыщения клеток криопротектором и степенью растяжения мембраны при регидратации.

Так, после насыщения гепатоцитов крысы 2%-м раствором ДМСО при однократном снижении тоничности внеклеточной среды относительная площадь клеток увеличивалась за 3,6 мин в 3,4 раза, что приводило к разрыву клеточной мембраны (рис. 2.9). Высвободившиеся мембранные липиды замыкались во внеклеточной среде в везикулы (рис. 2.10, 11). Визуально гранулоплазма выглядела разрыхленной, но оставалась структурно связанной, о чем свидетельствовало ее сжатие при повторном гипертоническом воздействии 15%-го раствора ДМСО (рис. 2.12).

При насыщении гепатоцитов крысы 5%-м раствором ДМСО последующее двукратное разведение клеточной суспензии сопровождалось возрастанием относительной площади клеток в течение 4 мин в 3 раза (рис. 3.5-10). В таком напряженном состоянии

When introducing into hepatocyte suspension the DMSO hypertonic solutions a typical for the case of penetrative substances biphasic reaction was observed: dehydration and recovery of initial cell volume, where the part of intracellular water was substituted by the cryoprotectant. It is necessary to emphasize, that the phase of rapid DMSO penetration into the hepatocytes was virtually terminated during the first minute of cell exposure to cryoprotectant solutions. Then it was followed by slower recovery of osmotic balance in the "cell-medium" system. There were no manifested morphological changes of hepatocytes during a hypertonic exposure.

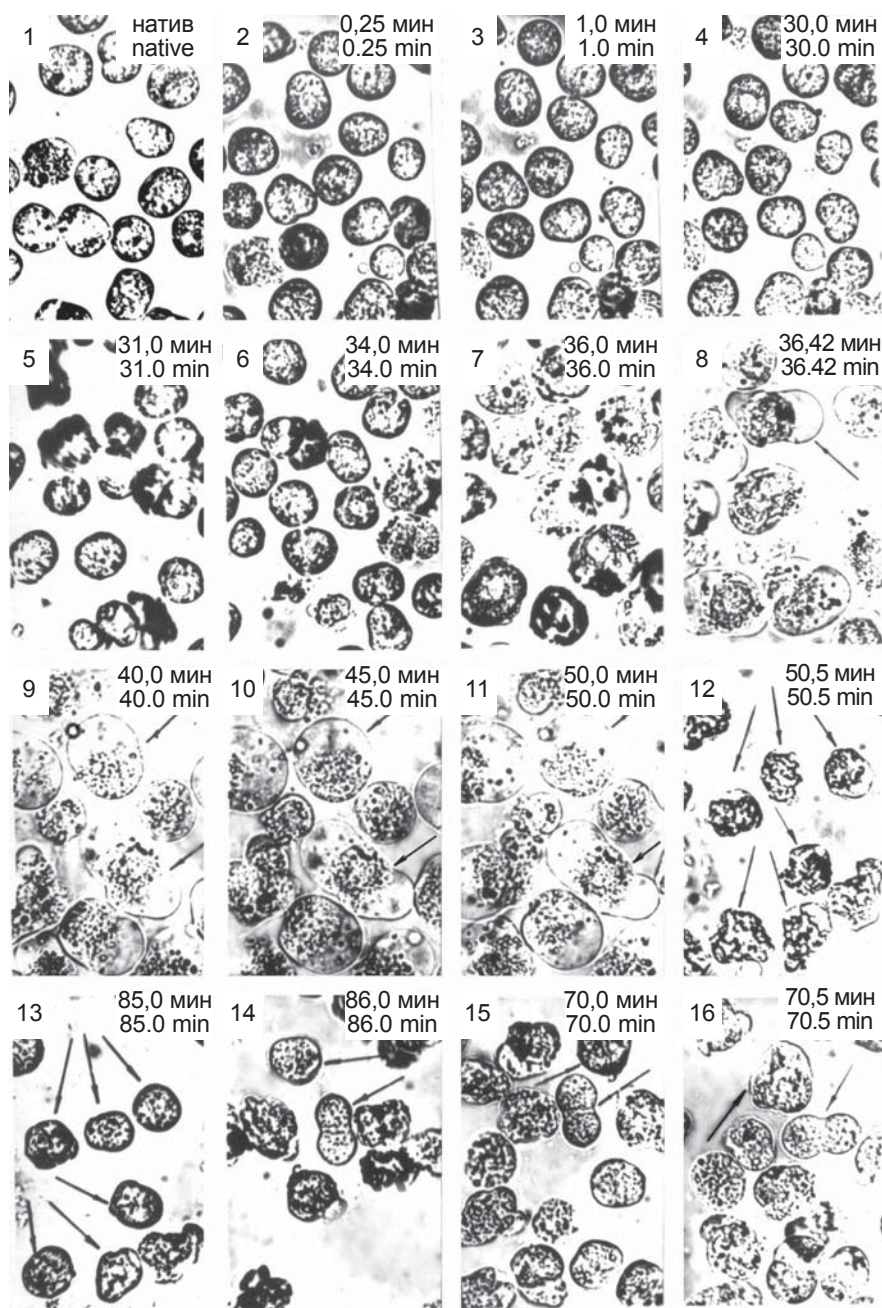
After saturation of hepatocytes with the cryoprotectant under various concentrations a step-wise



**Рис. 2.** Морфологическая реакция гепатоцитов крысы на последовательное изменение внеклеточной осмотичности: 1 – интактные гепатоциты; 2, 3 – экспозиция в 2%-м растворе ДМСО; 4 – регидратация; 5-8 – отслоение мембраны; 9 – сферуляция; 10, 11 – разрыв клеточной мембраны и формирование везикул во внеклеточной среде; 12 – сжатие гранулоплазмы после введения 15%-го раствора ДМСО.

**Fig. 2.** Morphological response of rat hepatocytes to a gradual change in extracellular osmotic rate: 1 – intact hepatocytes; 2, 3 – exposure in 20% DMSO; 4 – rehydration; 5-8 – membrane exfoliation; 9 – spherulation; 10, 11 – cell membrane rupture and vesicle formation in extracellular medium; 12 – granule shrinkage after introducing 15% DMSO.





**Рис. 3.** Морфологическая реакция гепатоцитов крысы на последовательное изменение внеклеточной осмотичности: 1 – интактные гепатоциты; 2-4 – экспозиция в 5%-м растворе ДМСО; 5-7 – регидратация; 8-11 – отслоение мембраны; 12 – сжатие гепатоцитов после повторного воздействия на клетки 5%-го раствора ДМСО; 13 – сглаживание мембраны; 14-16 – набухание клеток после повторной регидратации.

**Fig. 3.** Morphological response of rat hepatocytes to a gradual change in extracellular osmotic rate: 1 – intact hepatocytes; 2-4 – exposure into 5% DMSO; 5 – rehydration; 8-11 – membrane exfoliation; 12 – hepatocyte shrinking after repeated 5% DMSO effect on cells; 13 – membrane flattening; 14-16 – cell swelling after repeated rehydration.

мембраны клетки стабилизировались (рис. 3.11). Повторное введение в суспензию 5%-го раствора ДМСО вызывало резкое обезвоживание клеток. Мембрана выглядела складчатой (рис. 3.12). При дальнейшей экспозиции отмечали медленное сглаживание мембраны и незначительное снижение относительной площади клеток (рис. 3.13).

hypertonic effect of 15% DMSO solution (Fig. 2.12). During saturation of rat's hepatocytes with 5% DMSO solution the following two-fold dilution of cell suspension was accompanied with a rise in relative area of cells for 4 min thrice (Fig. 3.5-10). In such a strained state cell membranes stabilized (Fig. 3.11). Repeated introduction into the suspension of 5%

decrease of extracellular medium tonicity was performed. The analysis of this experimental stage showed that the nature of post-hypertonic reaction of the cells to the stress effect, caused by rehydration, depended on initial hypertonicity of extracellular medium and consequently on a rate of cell saturation by cryoprotectant.

A general initial post-hypertonic reaction of hepatocytes was an abrupt size enlargement associated with hydration. A massive formation of membrane blebs on the cell surface was observed. At bleb confluence a gradual separation of hepatocyte hyaloplasm and granuloplasm was observed: there was a clearly distinguished transparent hyaloplasm zone between a cell membrane and compact granuloplasm. Such a stress morphology of hepatocytes was characteristic at cell hydration irrespectively of initial DMSO concentration in solution.

Further behavior of hepatocytes was examined by the saturation rate of cells with cryoprotectant and the one of membrane extension during rehydration.

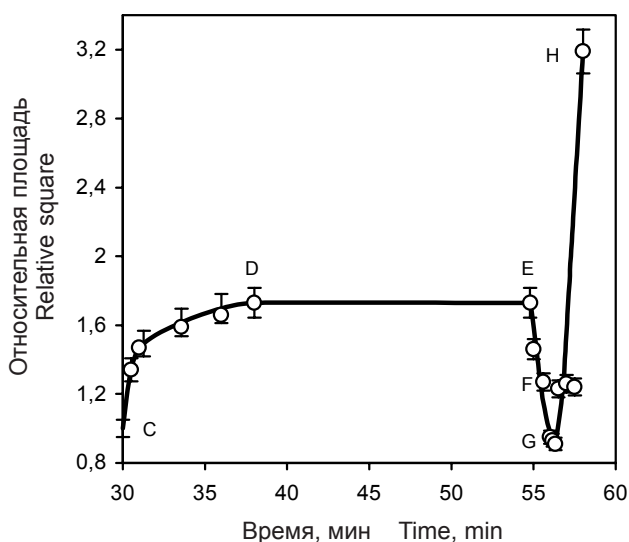
So, after saturation of rat's hepatocytes with 2% DMSO at a single reduction of tonicity of extracellular medium a relative area of cells increased for 3.6 min in 3.4 times, resulting in cell membrane rupture (Fig. 2.9). Released membrane lipids were locked in extracellular medium into vesicles (Fig. 2.10, 11). Visually granuloplasm looked loosened but remained structurally bound that was confirmed by its shrinking at repeated

Однако исходный размер клеток не восстанавливался, что, возможно, связано с увеличением объема гранулоплазмы при ее разрыхлении в результате предшествующего оводнения клеток. Последующее разведение клеточной суспензии вновь сопровождалось набуханием клеток без разрыва клеточной мембраны (рис. 3.14-16).

При насыщении гепатоцитов крысы 15%-м раствором ДМСО ступенчатое снижение тоничности внеклеточного раствора приводило к развитию постгипертонического ответа клеток различного характера, зависящего от степени напряжения плазматической мембраны клеток при достижении осмотического равновесия в системе.

Так, при однократном разведении суспензии относительная площадь клеток увеличивалась за 8 мин в 1,7 раза (рис. 4, CD; 5.3), и в течение 17 мин состояние гепатоцитов оставалось стабильным (рис. 4, DE). После lag-фазы наблюдался мгновенный (15 с) сброс мембранного напряжения (рис. 4, EF; 5.4). Относительная площадь клеток после "схлопывания" мембраны составляла 1,27. Последующее введение в суспензию 20%-го раствора ДМСО приводило к осмотическому сжатию клеток (рис. 4, FG; 5.5), а снижение внеклеточной тоничности сопровождалось возрастанием относительной площади клеток в 3,2 раза и разрывом клеточной мембраны гепатоцитов (рис. 4, GH).

При двукратном ступенчатом разведении суспензии относительная площадь клеток увеличивалась за 4 мин в 2,9 раза (рис. 6, CD). В таком



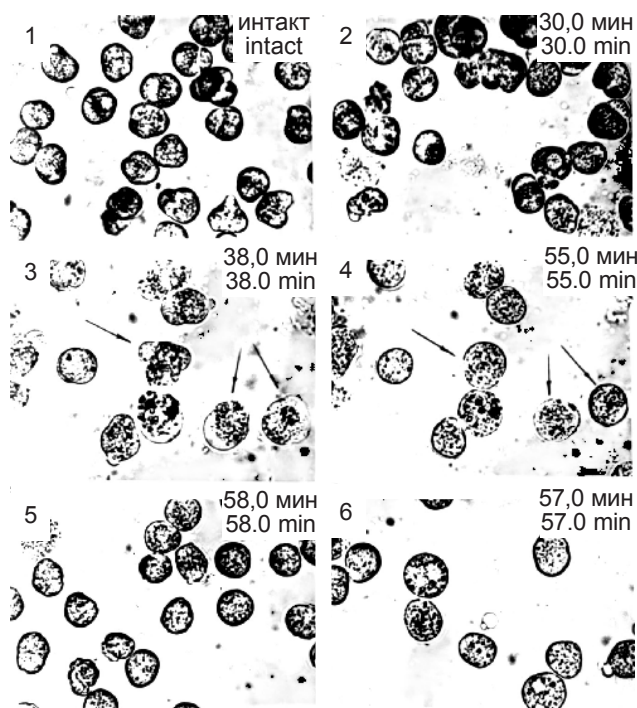
**Рис. 4.** Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов крысы ( $S_t/S_0$ ) при однократном снижении внеклеточной осмотичности после насыщения клеток 15%-м раствором ДМСО (CDEF) и повторном циклическом изменении внеклеточной осмотичности (FGH).

**Fig. 4.** Kinetics of change in rat hepatocyte relative area ( $S_t/S_0$ ) under single reduction of extracellular osmotic rate after cell saturation with 15% DMSO (CDEF) and repeated cyclic change in extracellular osmotic rate (GFH).

DMSO solution caused a sharp cell dehydration. Membrane looked folded (Fig. 3.12.). With following exposure there were noted a slow membrane smoothing and slight reduction of relative cell area (Fig. 3.13). However initial size of cells did not recover that is likely related to an increase in the volume of granulo-plasm at its loosening resulted from preceding cell saturation with water. Following dilution of cell suspension again was accompanied with cell swelling with no rupture of cell membrane (Fig. 3.14-16).

During saturation of rat's hepatocytes with 15% DMSO a step-wise reduction in the tonicity of intercellular solution resulted in the development of post-hypertonic response of cells of various characters, depending on the rate of cell membrane tension at achieving osmotic balance in the system.

So, at a single dilution of the suspension a relative area of cells increased for 8 min in 1.7 times (Fig. 4, CD; 5.3), for 17 min the state of hepatocytes remained stable (Fig. 4, DE). After lag-phase there was observed the flashy (15 s) reset of membrane tension (Fig. 4, EF; 5.4). Relative area of cells after "discharging" of membrane made 1.27. The following introduction into



**Рис. 5.** Морфологическая реакция гепатоцитов крысы на последовательное изменение внеклеточной осмотичности: 1 – интактные гепатоциты; 2 – 30 мин экспозиции в 15%-м растворе ДМСО; 3 – 8 мин после регидратации; 4 – сброс мембранного напряжения; 5 – сжатие гепатоцитов после воздействия 20%-го раствора ДМСО; 6 – набухание клеток после повторной регидратации.

**Fig. 5.** Morphological response of rat hepatocytes to a gradual change in extracellular osmotic rate: 1 – intact hepatocytes; 2 – 30 min exposure to 15% DMSO; 3 – 8 min after rehydration; 4 – membrane tension reset; 5 – hepatocyte shrinking after 20% DMSO effect; 6 – cell swelling after repeated rehydration.

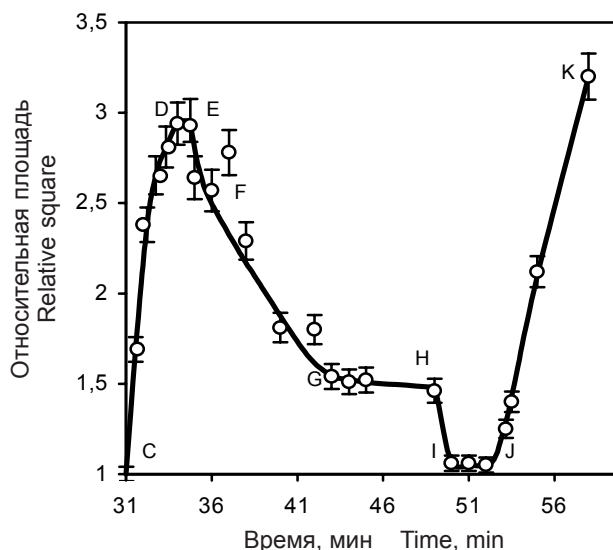


напряженном состоянии клеточной мембраны гепатоциты оставались не более 45 с (рис. 6, DE). Далее наблюдался сброс мембранного напряжения, который реализовался в два этапа: скачкообразное уменьшение (15 с) размера клеток (рис. 6, EF) и последующее непрерывное его уменьшение (около 9 мин) до значения  $1,5 S_0$  (рис. 6, FG). При дальнейшей экспозиции уменьшение размера клеток существенно замедлялось, а при достижении значения  $1,3 S_0$  – стабилизировалось (рис. 6, GH). Повторное гипертоническое воздействие на клеточную суспензию 15%-м раствором ДМСО сопровождалось осмотическим сжатием гепатоцитов практически до исходного размера (рис. 6, HI). Гепатоциты оставались осмотически активными и при последующем разведении клеточной суспензии (рис. 6, JK), в результате которого относительная площадь клеток увеличивалась в 3,2 раза. Однако массовое разрушение гепатоцитов не отмечалось. Плазматическая мембрана клеток принимала неправильную форму и сохраняла связи с цитоматриксом лишь на некоторых участках. Гранулоплазма имела фрагментированный вид и распределялась по объему гепатоцитов.

Троекратное ступенчатое разведение суспензии после насыщения гепатоцитов 15%-м раствором ДМСО сопровождалось максимально возможным оводнением клеток и разрывом клеточной мембраны (рис. 7). В процессе осмотического набухания клеток наблюдалось полное отслоение клеточной мембраны от цитоматрикса и ее сферуляция (рис. 7.12-14). Максимальное напряжение мембраны соответствовало критической площади клеток около  $5,6 S_0$ . При этом гранулоплазма оставалась структурно связанной и после разрыва клеточной мембраны (рис. 7.15, 16).

При насыщении гепатоцитов крысы 20%-м раствором ДМСО трехкратное снижение внеклеточной тоничности сопровождалось постепенным (в течение 10,7 мин) оводнением клеток, приводящим к увеличению их относительной площади в 2,3 раза (рис. 8, CD; 9.5-7). Затем наблюдался резкий сброс (15 с) мембранного напряжения до относительной площади клеток равной 1,4 (рис. 8, DE), которая в последующем не изменялась (рис. 9.8, 9). В местах формирования блебов наблюдался локальный разрыв мембраны с выходом содержимого гиалоплазмы во внеклеточную среду (рис. 9.7-9).

Таким образом, ступенчатая регидратация гепатоцитов крысы, исходно насыщенных различной концентрацией ДМСО, приводит к возникновению трансмембранного перепада осмотического давления, под действием которого клетки оводняются так, что их объем значительно превосходит исходный. Образование мембранных блебов (эффект “вскипания” мембраны) при оводнении



**Рис. 6.** Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов крысы ( $S_t/S_0$ ) при двукратном ступенчатом снижении внеклеточной осмотичности после насыщения клеток 15%-м раствором ДМСО (CDEF) и повторном циклическом изменении внеклеточной осмотичности (HIJK).

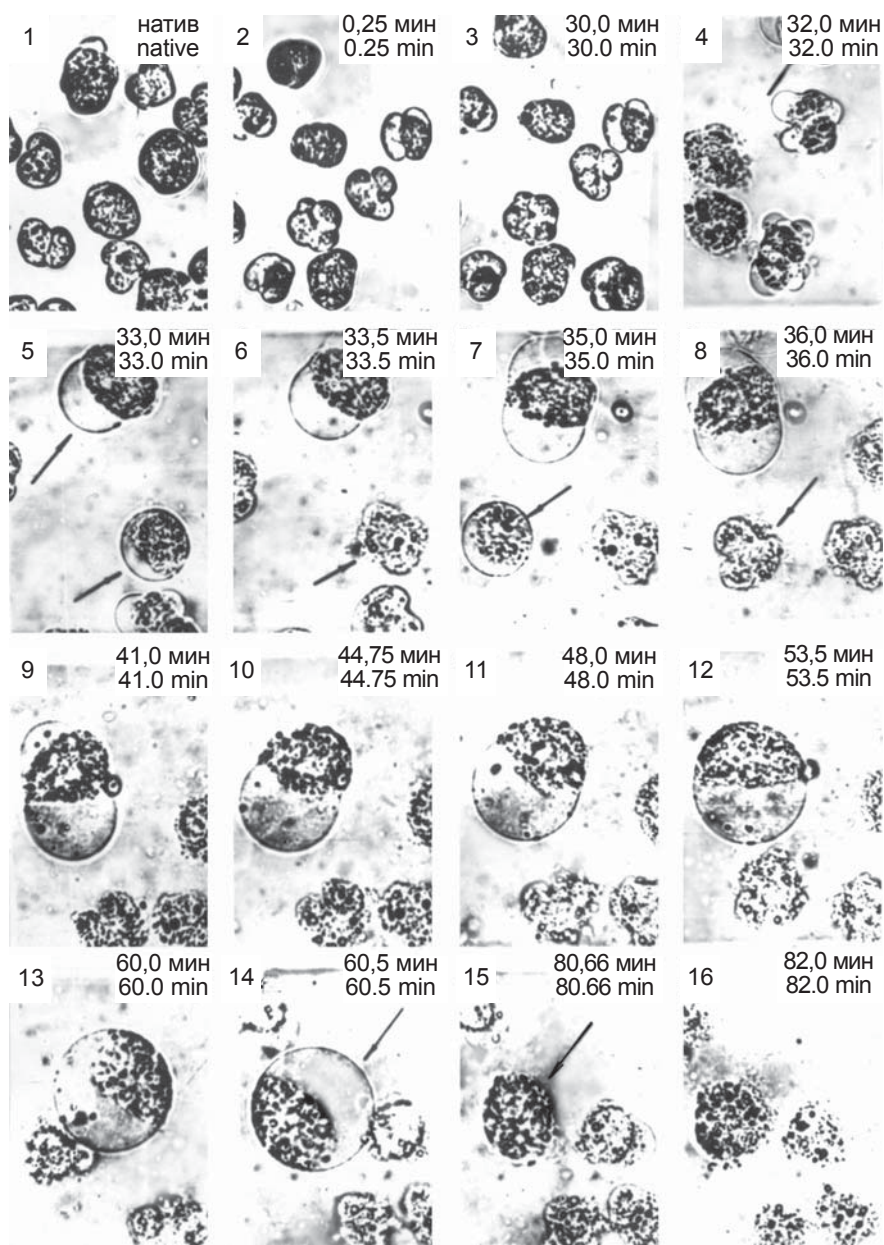
**Fig. 6.** Kinetics of change in rat hepatocyte relative area ( $S_t/S_0$ ) under two-fold graded reduction of extracellular osmotic rate after cell saturation with 15% DMSO (CDEF) and repeated cyclic change in extracellular osmotic rate (GFH).

the suspension of 20% DMSO solution resulted in osmotic shrinking of cells (Fig. 4, FG; 5.5) and the reduction of extracellular tonicity was accompanied with a rise in relative area in 3.2 times and rupture of cell membrane of hepatocytes (Fig. 4, GH).

At two-fold stepwise dilution of suspension a relative area of cells increased for 4 min in 2.9 times (Fig. 6, CD). In such a strained state of cell membrane the hepatocytes kept not more than 45 seconds (Fig. 6, DE). Afterwards there was found a reset of membrane tension, which occurred in two stages: spasmodic decrease (15 s) of cell size (Fig. 6, EF) and following its continuous decline (about 9 min) down to the value of  $1.5 S_0$  (Fig. 6, FG). With further exposure the decrease in cell size significantly slowed down and when approaching the value of  $1.3 S_0$  it stabilized. Repeated hypertonic effect on cell suspension with 15% DMSO solution was accompanied with shrinking of hepatocytes practically up to initial size (Fig. 6, HI). Hepatocytes remained osmotically active and with following dilution of cell suspension (Fig. 6, JK) resulted in increasing a relative area of cells in 3.2 times. However no bulk destruction of hepatocytes was found. Plasma membrane of cells took improper shape and kept the bonds with cytomatrix on some sites. Granuloplasm looked fragmented and distributed along the volume of hepatocytes.

Three-fold stepwise dilution of the suspension after saturation of hepatocytes with 15% DMSO solution was accompanied with maximally possible saturation





**Рис. 7.** Морфологическая реакция гепатоцитов крысы на последовательное изменение внеклеточной осмотичности: 1 – интактные гепатоциты; 2, 3 – экспозиция в 15%-м растворе ДМСО; 4 – регидратация; 6-14 – отслоение и сферуляция мембраны; 15,16 – гранулоплазма после разрыва клеточной мембраны.

**Fig. 7.** Morphological response of rat hepatocytes to a gradual change in extracellular osmotic rate: 1 – intact hepatocytes; 2, 3 – exposure to 15% DMSO; 4 – rehydration; 6-14 – membrane spherulation and exfoliation; 15, 16 – granuloplasm after cell membrane rupture.

свидетельствует о том, что в норме между клеточной мембраной и цитозолем как целым имеются слабые нековалентные связи, которые сравнительно легко разрываются под действием осмотических сил. Вследствие резкого коллапса цитоплазматического содержимого и утраты связи клеточной мембраны с гранулоплазмой наблюдается разделение гиалоплазмы и гранулоплазмы.

Из теоретических соображений следует что, при достаточно большом растяжении мембраны

of cells with water and rupture of cell membrane (Fig. 7). In the process of osmotic swelling of cells there was observed a complete exfoliation of cell membrane from cytomatrix and its spherulation (Fig. 7.12-14). Maximal tension of membrane corresponded to critical area of cells about  $5.6 S_0$ . Herewith granuloplasm remained structurally bound even after the rupture of cell membrane (Fig 7.15, 16).

When saturating rat's hepatocytes with 20% DMSO solution a three-fold reduction of extracellular tonicity was accompanied with a gradual (for 10.7 min) saturation of cells with water, resulting in an increase of their relative area in 2.3 times (Fig. 8, CD; 9.5-7). Then there was observed a sharp reset (15 sec) of membrane tension down to relative area of cells equal to 1.4 (Fig. 8, DE), which later did not change (Fig. 9.8, 9). In the sites of formation of blebs there was found a local membrane rupture with a release of the hyalo-plasm content into extra-cellular medium (Fig. 9.7-9).

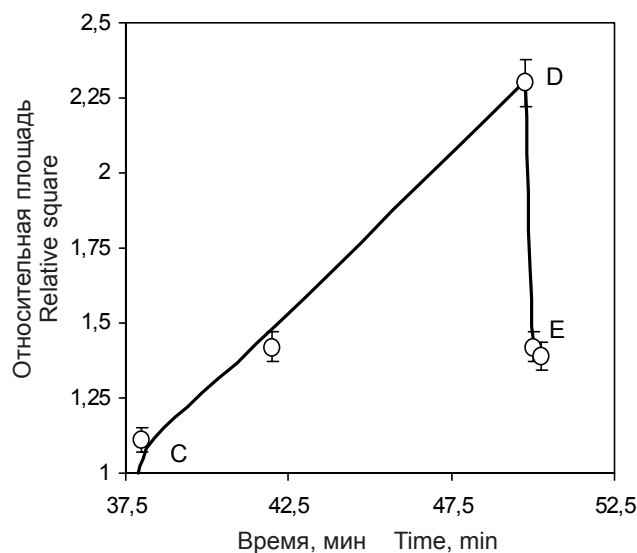
Thus stepwise rehydration of rat's hepatocytes initially saturated with different concentration of DMSO results in appearance of transmembrane differential of osmotic pressure under the effect of which the cells are saturated with water in such an extent that their volume significantly exceeds initial one. The formation of membrane blebs (effect of membrane "boiling") under saturation with water testifies to the fact that in the norm between cell

membrane and cytosol as a whole there are weak non-covalent bonds, which are comparatively easy to be broken under osmotic forces. Due to a sharp collapse of cytoplasm content and loss of the connection of cell membrane with granuloplasm there is observed a separation of hyalo-plasm and granuloplasm.

From theoretical considerations proceed in the fact that at quite big extension of hepatocyte membrane from a cell a part of intracellular content is released, this result in the decrease of cell membrane area and

гепатоцита из клетки выбрасывается часть внутриклеточного содержимого, в результате чего площадь мембраны клетки и её объем уменьшаются (рис. 4, EF; 6, EFGH; 8, DE). Однако в отличие от эритроцитов, для которых макроскопический разрыв образуется сразу же после растяжения их мембран всего лишь на 4% [3, 8, 11, 13, 14], для образования такого разрыва в мембране гепатоцита крысы площадь его мембраны должна увеличиться более, чем на 100%. При этом следует исключить предположение о том, что в интактном изолированном гепатоците часть клеточной поверхности скрыта в микроскладках, поскольку площадь изолированной мембраны можно отождествить с площадью мембранного пузыря или мембраны в целом сразу же после выброса из клетки части внутриклеточного содержимого (рис. 5.3, 4; 7.14; 9.7-8), когда складчатость мембраны явно отсутствует. Значение модуля упругости плазматической мембраны гепатоцитов крысы при ее изотропном растяжении в условиях постгипертонии, рассчитанное нами по экспериментально измеренным морфометрическим параметрам клеток, оказалось аномально низким ( $\Gamma=0,008$  Н/м [4, 9]) по сравнению с таковым для эритроцитов человека ( $\Gamma=0,4$  Н/м). Это свидетельствует о способности мембран гепатоцитов крысы испытывать значительные трансмембранные перепады осмотического давления и деформации при эндцитозе. После формирования поры в мембране гепатоцита и выброса части внутриклеточного содержимого из клетки наружу в процессе постгипертонического лизиса при регидратации пора действительно самопроизвольно “залечивается”, а клеточная мембрана сохраняет свойство избирательной проницаемости. Об этом свидетельствует тот факт, что при повторном циклическом изменении тоничности внеклеточной среды осмотическая реакция клеток качественно сохраняется (рис. 4, FG и GH; 6, HI и JK), что было бы невозможно без самоликвидации разрыва. Необратимый разрыв мембраны набухшего гепатоцита крысы в процессе постгипертонического лизиса сопровождался распадом мембраны на небольшие везикулы (рис. 2.10, 11).

С увеличением концентрации ДМСО в окружающей клетки среде на этапе гипертонического воздействия скорость увеличения объема клеток после добавления к суспензии дистиллированной воды возрастала, так как перепад осмотического давления на мембране при этом также увеличивался. В условиях больших скоростей оводнения разрыв мембраны наступал при более высоком значении объема клеток, чем в условиях малых скоростей. Этот факт также согласуется с выводами, следующими из теоретической модели гипото-

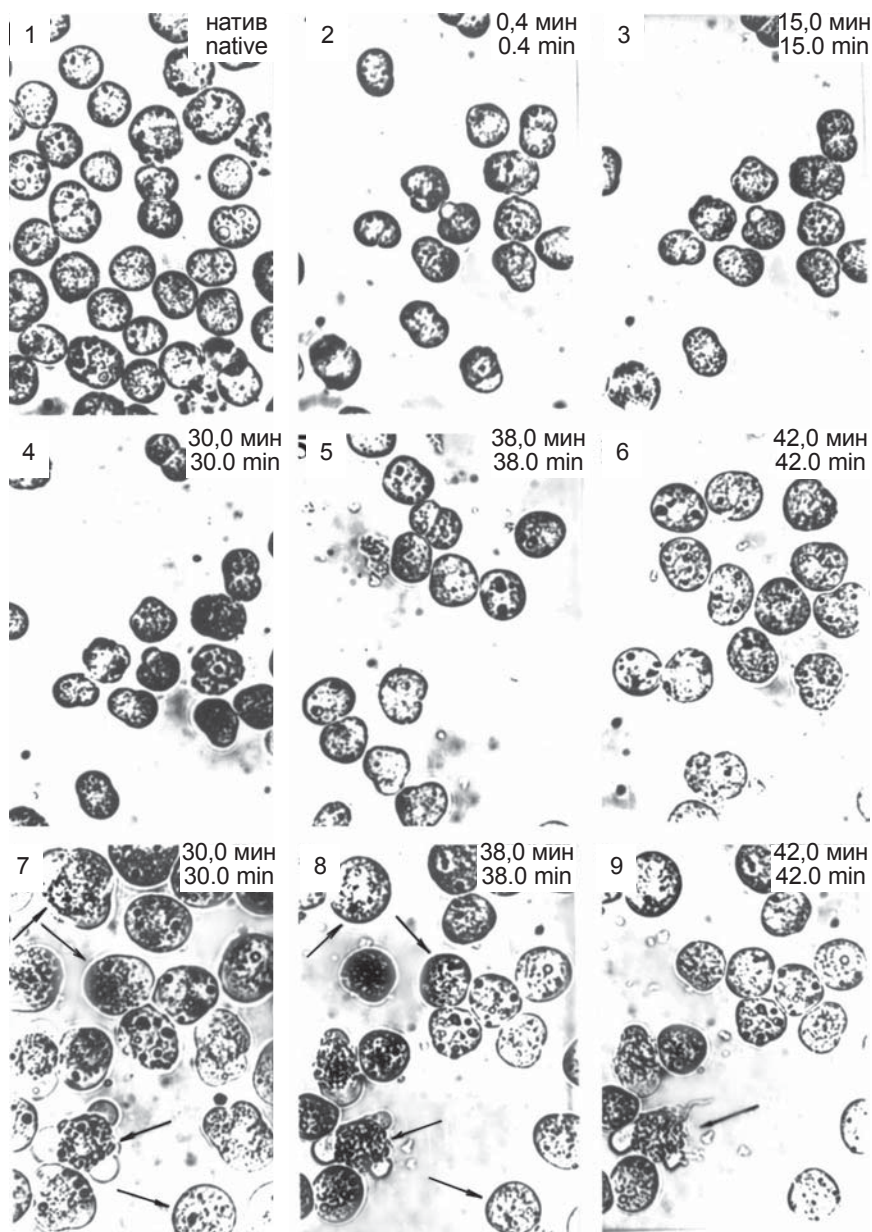


**Рис. 8.** Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов крысы ( $S_t/S_0$ ) при трехкратном ступенчатом снижении внеклеточной осмотичности после насыщения клеток 20%-м раствором ДМСО (CDE).

**Fig. 8.** Kinetics of change in rat hepatocyte relative area ( $S_t/S_0$ ) under three-fold graded reduction of extracellular osmotic rate after cell saturation with 20% DMSO (CDE).

its volume (Fig. 4, EF; 6, EFGH; 8, DE). However in contrast to erythrocytes for those macroscopic rupture forms just after extension of their membranes only by 4% [3, 8, 11, 13, 14], for the formation of such a rupture in rat's hepatocyte membrane the area of its membrane should increase more than by 100%. In this case the supposition about the fact that in intact isolated hepatocyte the part of cell surface is hidden in microfolders should be excluded, since the area of isolated membrane may be identified either with the one of membrane vesicle or membrane in a whole just after the release of intracellular content from a cell (Fig. 5.3, 4; 7.14; 9.7-8), when membrane folding is evidently absent. The value of elastic modulus of plasma membrane of rat's hepatocytes at its isotropic extension under posthypertonic conditions, calculated by us with experimentally measured morphometric parameters of cells, occurred to be abnormally low ( $\Gamma=0.008$  N/m [4, 9]) if compared with that for human erythrocytes ( $\Gamma=0.4$  N/m). This testifies to a capability of rat's hepatocyte membranes to undergo significant transmembrane gradients of osmotic pressure and deformation at endocytosis. After the formation of pore in hepatocyte membrane and the release of a part of intracellular content from a cell outside in the process of posthypertonic lysis at rehydration the pore is actually spontaneously “healed” and cell membrane preserves the property of selective permeability. This is confirmed by the fact that at repeated cyclic change in tonicity of extracellular medium osmotic reaction of cells is qualitatively preserved (Fig. 4, FG and GH; 6, HI and JK), that would be impossible with no self-





**Рис. 9.** Морфологическая реакция гепатоцитов крысы на последовательное изменение внеклеточной осмотичности: 1 – интактные гепатоциты; 2-4 – экспозиция в 20%-м растворе ДМСО; 5-7 – оводнение клеток; 8 – сброс мембранного напряжения; 9 – локальный разрыв мембраны.

**Fig. 9.** Morphological response of rat hepatocytes to a gradual change in extracellular osmotic rate: 1 – intact hepatocytes; 2-4 – exposure to 20% DMSO; 5-7 – cell hydration; 8 – membrane tension release; 9 – membrane local rupture.

нического гемолиза, и экспериментальными данными для эритроцитов [1, 2, 5, 12].

### Выводы

1. Мембраны гепатоцитов крысы способны испытывать аномально большое растяжение без образования макроскопического разрыва.

2. Постгипертонический лизис гепатоцитов крысы при регидратации осуществляется либо путем порционного выброса части внутриклеточного содержимого, либо путем непрерывного его оттока во внеклеточную среду.

liquidation of rupture. Irreversible rupture of membrane of swollen rat's hepatocyte during post-hypertonic lysis was accompanied with decay of membrane for two big vesicles (Fig. 2.10, 11).

With a rise in DMSO concentration in cell environment at the stage of hypertonic effect the enhanced rate in cell volume after adding to the suspension of distilled water increased, since the gradient of osmotic pressure on membrane herewith was also enhanced. Under high rates of saturation with water the membrane rupture started at higher value of cell volume than under conditions of low rates. This fact is also in accordance with the conclusions proceeding from theoretical model hypotonic hemolysis and experimental data for erythrocytes [1, 2, 5, 12].

### Conclusions

1. Rat's hepatocyte membranes are capable of undergoing abnormally big extension with no formation of macroscopic rupture.

2. Post-hypertonic lysis of rat's hepatocytes during rehydration is performed either by batch release of the part of intracellular content or by its continuous outflow into extracellular medium.

3. Membrane preserves the properties of selective permeability after the formation in it of macroscopic pore, release of the part of intracellular content out of cell and spontaneous "healing" of the pore.

Obtained experimental data are in coordination with theoretical notions about the mechanisms of hypotonic lysis of lipid vesicles and cells [1, 2, 7].

### References

1. Gordienko E.A., Panina Yu.E. Physical and mathematical model of hypotonic hemolysis event of human erythrocytes. Part 1. Stage of swelling // Visnyk KhDU. Biophysical bulletin. – 1998. – N1. – P. 79-85.
2. Gordienko E.A., Panina Yu.E. Physical and mathematical model of hypotonic hemolysis event of erythrocytes. Part 2.



3. Мембрана сохраняет свойства избирательной проницаемости после образования в ней макроскопической поры, выброса части внутриклеточного содержимого из клетки наружу и самопроизвольного “залечивания” поры.

Полученные экспериментальные данные согласуются с теоретическими представлениями о механизме гипотонического лизиса липидных везикул и клеток [1, 2, 7].

### Литература

1. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. Ч. I. Этап набухания // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998.– №1.– С. 79-85.
2. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов. Ч. II. Этап гемолиза // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998.– №2.– С. 54-58.
3. Гордиенко Е.А., Некоз И.А. Реактивный эффект при осмотическом лизисе клеток // Биол. мембраны.– 1989.– Т. 6, №11.– С. 1170-1173.
4. Гордиенко Е.А., Кулешова Л.Г., Тимофеева Е.В. Модуль упругости плазматической мембраны изолированных гепатоцитов крысы // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 279.
5. Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998.– №2.– С. 59-63.
6. Гулак П.В., Дудченко А.М., Зайцев В.В. и др. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства.– М.: Наука, 1985.– 271 с.
7. Козлов М.М., Маркин В.С. Теория осмотического лизиса липидных везикул // Биол. мембраны.– 1984.– Т. 1, №1.– С. 74-78.
8. Некоз И.А., Гордиенко Е.А., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Особенности гемолиза эритроцитов в водных растворах глицерина // Криоконсервирование клеток и тканей: Сб. науч. тр.– Харьков, 1989.– С. 54-61.
9. Тимофеева Е.В., Кулешова Л.Г. Теоретическое обоснование способа оценки модуля изотропного растяжения клеточной мембраны гепатоцитов крысы // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 2004.– №1, 2.– С. 85-87.
10. А.с. №1463757 СССР, С12 №5/00/ Способ получения изолированных клеток печени / Л.П. Кравченко, А.Н. Андриенко, О.А. Семенченко, А.Ю. Петренко, А.Н. Сукач.– №4221432/28-13; Заявлено 02.04.87; Опубл. 07.03.89, Бюл. изобретений №9.– С. 125.
11. Baker R.F. Entry of ferritin into human red cells during hypotonic hemolysis // Nature.– 1967.– Vol. 215, N99.– P. 424-425.
12. Heedman P.A. Hemolysis of individual red blood cell. An interferometer microscopic investigation // Exp. Cell Res.– 1958.– Vol. 14, N1.– P. 9-22.
13. Huhn D., Pauli G.D., Grassmann D. Die Erythrocyten Membran. Feinstruktur der gefriergeätzten Membran nach Einwirkung von hypotonen Loesungen und Saponin // Klin. Wochenschr.– 1970.– Vol. 48, N15.– P. 939-943.
14. Saari J.T., Beck J.S. Probability density function of the red cell membrane permeability coefficient // Biophys. J.– 1974.– Vol. 14, N1.– P. 33-38.
- Stage of hemolysis // Visnyk KhDU. Biophysical bulletin. – 1998.– N1.– P. 54-58.
3. Gordienko E.A., Nekoz I.A. Reactive effect under osmotic lysis of cells // Biol. membrany.– 1989. – Vol. 6, N11.– P. 1170-1173.
4. Gordienko E.A., Kuleshova L.G., Timofeyeva E.V. Elasticity modulus of plasmatic membrane of isolated rat's hepatocytes // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 279.
5. Gordienko O.I., Panina Yu.E., Kovalenko I.F. Determination of erythrocyte membrane permeability coefficient for cryoprotectants // Visnyk KhDU. Biophysical bulletin.– 1998.– N2.– P. 59-63.
6. Gulak P.V., Dudchenko A.M., Zaytsev V.V. et al. Hepatocyte: functional and metabolic properties.– Moscow: Nauka, 1985.– 271 p.
7. Kozlov M.M., Markin E.A. Theory of osmotic lysis of lipid vesicles // Biol. Membrany.– 1984.– Vol. 1, N1.– P. 74-78.
8. Kozlov M.M., Markin E.A., Kuleshova L.G., Rozanov L.F. Peculiarities of erythrocyte hemolysis in glycerol aqueous solutions // Cryopreservation of cells and tissues. Collection of scientific papers.– Kharkov, 1989.– P. 54-61.
9. Timofeyeva E.V., Kuleshova L.G. Theoretical substantiation of assessment way of isotropic extension modulus of rat's hepatocyte cell membrane // Visnyk KhDU. Biophysical bulletin.– 2004.– N1, 2.– P. 85-87.
10. Author's certificate N1463757 USSR, P.12 N 5/00/ Method of obtaining isolated liver cells / L.P. Kravchenko, A.N. Andrienko, O.A. Semenchenko, A.Yu. Petrenko, A.N. Sukach.– N4221432/28-13; Declared 02.04.87; Publ. 07.03.89, Bull. of invention N9.– P. 125.
11. Baker R.F. Entry of ferritin into human red cells during hypotonic hemolysis // Nature.– 1967.– Vol. 215, N99.– P. 424-425.
12. Heedman P.A. Hemolysis of individual red blood cell. An interferometer microscopic investigation // Exp. Cell Res.– 1958.– Vol. 14, N1.– P. 9-22.
13. Huhn D., Pauli G.D., Grassmann D. Die Erythrocyten Membran. Feinstruktur der gefriergeätzten Membran nach Einwirkung von hypotonen Loesungen und Saponin // Klin. Wochenschr.– 1970.– Vol. 48, N15.– P. 939-943.
14. Saari J.T., Beck J.S. Probability density function of the red cell membrane permeability coefficient // Biophys. J.– 1974.– Vol. 14, N1.– P. 33-38.

Accepted in 20.02.2006

Поступила 20.02.2006