

УДК 577.352.4

В.В. Огурцова, С.Є. Коваленко, І.Ф. Коваленко, О.І. Гордієнко\*

## Енергія активації проникання молекул води та кріопротекторів крізь плазматичні мембрани ентероцитів миші та динаміка їх зневоднення в процесі заморожування

UDC 577.352.4

V.V. Ogurtsova, S.Ye. Kovalenko, I.F. Kovalenko, O.I. Gordienko\*

## Activation Energy of Water and Cryoprotectant Molecules Penetration Through Plasma Membrane of Murine Enterocytes and Dynamics of Their Dehydration During Freezing

**Реферат:** У першому наближенні вплив охолодження на проникність клітинних мембран і, отже, на кінетику зміни об'єму клітини і концентрацій розчинених всередині неї речовин можна врахувати, вважаючи, що змінення коефіцієнтів фільтрації і проникності плазматичної мембрани для розчиненої речовини підкоряється ареніусовій залежності. У роботі визначені коефіцієнти проникності мембран ентероцитів миші для молекул води та кріопротекторів гліцерину, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилсульфоксиду (ДМСО) за температури 12°C і розраховані величини енергії активації їх проникання. Отримано часову залежність зневоднення ентероцитів під час охолодження зі швидкостями 5, 1, 0,5 та 0,1 град/хв. Отримані графіки зневоднення ентероцитів вказують на те, що найкращим режимом заморожування цих клітин з погляду запобігання внутрішньоклітинної кристалізації є низькі швидкості охолодження, аж до 0,1 град/хв, а найкращим кріопротектором порівняно з гліцерином та ДМСО – 1,2-ПД, у середовищі з яким досягається прийнятний рівень зневоднення вже за швидкості 0,5 град/хв. Враховуючи тривалість виживання ентероцитів миші, яка є найбільшою в розчині цього кріопротектора порівняно з гліцерином та ДМСО, можна прийти до висновку, що найкращим із досліджених кріопротекторів для заморожування ентероцитів миші є 1,2-ПД.

**Ключові слова:** ентероцити миші, кріопротектори, коефіцієнт фільтрації, коефіцієнт проникності, швидкість охолодження, зневоднення.

**Реферат:** В первом приближении влияние охлаждения на проницаемость клеточных мембран и, следовательно, на кинетику изменения объема клетки и концентраций растворенных внутри нее веществ можно учесть, считая, что изменения коэффициентов фильтрации и проницаемости плазматической мембраны для растворенного вещества подчиняется аррениусовой зависимости. В работе определены коэффициенты проницаемости мембран энтероцитов мыши для молекул воды и криопротекторов глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО) при температуре 12°C и рассчитаны величины энергии активации их проникновения. Получена временная зависимость обезвоживания энтероцитов при охлаждении со скоростями 5, 1, 0,5 и 0,1 град/мин. Полученные графики обезвоживания энтероцитов указывают на то, что наилучшим режимом замораживания этих клеток с точки зрения предотвращения внутриклеточной кристаллизации являются низкие скорости охлаждения, вплоть до 0,1 град/мин, а наилучшим криопротектором по сравнению с глицерином и ДМСО – 1,2-ПД, в среде с которым достигается приемлемый уровень обезвоживания уже при скорости 0,5 град/мин. Учитывая, что время выживания энтероцитов мыши также наибольшее в растворе этого криопротектора по сравнению с глицерином и ДМСО, можно прийти к выводу, что наилучшим из исследованных криопротекторов для замораживания энтероцитов мыши является 1,2-ПД.

**Ключевые слова:** энтероциты, мышь, криопротекторы, коэффициент фильтрации, коэффициент проницаемости, скорость охлаждения, обезвоживание.

**Abstract:** In the first approximation one could take into account the effect of cooling on cell membrane permeability and, consequently, the kinetics of a change in cell volume and concentrations of dissolved substances inside it, if the changes in filtration and plasma membrane permeability coefficients for the dissolved solution will comply the Arrhenius law. We determined here the permeability coefficients of murine enterocyte membranes for water molecules and glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectants at 12°C and calculated the values of activation energy of their penetration. There was obtained a time dependence of enterocyte dehydration during cooling with 5, 1, 0.5 and 0.1 deg/min rates. The obtained graphs of enterocyte dehydration indicated the low cooling rates down to 0.1 deg/min to be the most appropriate for using in freezing regimen for these cells to prevent intracellular crystallization, and 1,2-PD as the most convenient cryoprotectant as compared with glycerol and DMSO, allowing to reach an acceptable level of dehydration even at 0.5 deg/min cooling rate. Assuming the fact, that the survival time of murine enterocytes was also the highest in this cryoprotectant solution unlike glycerol and DMSO, we might conclude 1,2-PD to be the best cryoprotectant among the studied ones to freeze murine enterocytes.

**Key words:** enterocytes, mice, cryoprotectants, filtration coefficient, permeability coefficient, cooling rate, dehydration.

Відділ низькотемпературного консервування, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла 23.05.2017

Прийнята до друку 18.07.2017

Received May, 23, 2017

Accepted July, 18, 2017

© 2017 V.V. Ogurtsova et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Порушення термодинамічної рівноваги в системі «клітина – навколишнє середовище» під час утворення і розвитку позаклітинних кристалів льоду може компенсуватися двома шляхами: або за рахунок відтоку води з клітини, або за рахунок утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду за значного переохолодження цитоплазми. У реальних системах обидва шляхи присутні в різних поєднаннях. Для підвищення збереженості клітин трансмембранний потік води повинен бути таким, щоб, з одного боку, забезпечити м'яке зневоднення, а з іншого – виключити ймовірність внутрішньоклітинного льодоутворення або максимально зменшити кількість внутрішньоклітинного льоду. Трансмембранний потік води залежить від швидкості охолодження клітинної суспензії і лімітується транспортними характеристиками плазматичних мембран клітин. Отже, оптимальною швидкістю охолодження, специфічною для конкретного типу клітин, є та максимальна швидкість, за якої трансмембранний водний потік забезпечує достатнє зневоднення клітин для виключення внутрішньоклітинного льодоутворення, але не спричинює порушення конформації біомакромолекул. Відмінності у транспортних характеристиках плазматичних мембран різного типу клітин та ймовірності внутрішньоклітинного льодоутворення зумовлюють існування різних чисельних значень оптимальних швидкостей охолодження. У першому наближенні вплив охолодження на проникність клітинних мембран і, отже, на динаміку зміни об'єму клітини і концентрацій розчинених всередині неї речовин можна врахувати, вважаючи, що змінення коефіцієнтів фільтрації та проникності плазматичної мембрани для розчиненої речовини підкоряється ареніусовій залежності [1]:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[ \frac{E_{Aw}}{RT_1} \left( 1 - \frac{T_0}{T} \right) \right] \quad (1)$$

$$k_s(T) = k_s(T_0) \exp \left[ \frac{E_{As}}{RT_1} \left( 1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \quad (2)$$

де  $L_p$  – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани;  $k_s$  – коефіцієнт проникності для проникаючої розчиненої речовини;  $T_0$  – температура клітинної суспензії до початку охолодження;  $E_{Aw}$  та  $E_{As}$  – відповідно енергія активації процесу проникання крізь плазматичну мембрану молекул води та розчиненої речовини;  $R$  – універсальна газова стала.

У нашій попередній роботі [3] були визначені коефіцієнти фільтрації та проникності для етиленгліколю (ЕГ), гліцерину, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилсульфоксиду (ДМСО) плазматичних мембран еритроцитів миші за температури 25°C. Показано, що коефіцієнт фільтрації еритроцитів миші у розчині ЕГ майже у 2 рази більший, ніж у

Disorder of thermodynamic equilibrium in the 'cell – environment' system during formation and development of extracellular ice crystals may be compensated in two ways: either due to water outflow from a cell or via intracellular ice crystal formation following significant cytoplasmic supercooling. In real systems, both possibilities exist in various combinations. In order to improve the cell integrity a transmembrane water should flow in such a way as to provide a mild dehydration, on the one hand, and to exclude the probability of intracellular ice formation or minimize the amount of intracellular ice, on another hand. Transmembrane water flow depends on cooling rate of cell suspension, and is limited by transport characteristics of plasma cell membrane. Thus, the optimal cell type-specific cooling rate is such a maximum rate, when the transmembrane water flow provides sufficient cell dehydration to exclude intracellular ice formation, and in the same time does not disorder any conformation of biomacromolecules. Differences in plasma membrane transport characteristics of various cell types and the probability of intracellular ice formation stipulate the existence of different numerical values for optimal cooling rates. In the first approximation the impact of cooling on cell membrane permeability and, consequently, dynamics of a change in cell volume and concentrations of dissolved substances inside it may be taken into account, considering the changes of the filtration and plasma membrane permeability coefficients for a dissolved substance as complying to Arrhenius law [4]:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[ \frac{E_{Aw}}{RT_1} \left( 1 - \frac{T_0}{T} \right) \right] \quad (1)$$

$$k_s(T) = k_s(T_0) \exp \left[ \frac{E_{As}}{RT_1} \left( 1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \quad (2)$$

where  $L_p$  is cell membrane filtration coefficient,  $k_s$  is permeability coefficient for penetrating dissolved substance,  $T_0$  is temperature of cell suspension prior to cooling,  $E_{Aw}$  and  $E_{As}$  are activation energies of water molecules and dissolved substance penetration through plasma membrane, respectively, and  $R$  is universal gas constant.

As previously reported [8] we determined the filtration and permeability coefficients of ethylene glycol (EG), glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) for murine enterocyte plasma membranes at 25°C. Filtration coefficient of murine enterocytes in EG solution was shown to be almost twice higher than that in 1,2-PD, DMSO and glycerol solutions, and the permeability coefficient for EG molecules was 10 times greater than permeability coefficients for these cryoprotectants. This fact was suggested as a reason of EG toxic effect on enterocyte membranes. The supposition was confirmed by the

розчинах 1,2-ПД, ДМСО і гліцерину, а коефіцієнт проникності для молекул EG на порядок більший за коефіцієнти проникності для цих кріопротекторів. Було висловлене припущення, що це може бути причиною токсичної дії EG на мембрани ентероцитів. Така думка підтверджується даними спостереження за тривалістю виживання клітин у розчинах досліджених кріопротекторів. За цією характеристикою кріопротектори можна розташувати у низці 1,2-ПД > ДМСО, гліцерин > EG.

Метою роботи було визначення енергії активації процесів проникання молекул води та кріопротекторів (гліцерин, 1,2-ПД, ДМСО) крізь плазматичні мембрани ентероцитів миші та динаміки їх зневоднення в процесі заморожування. Етиленгліколь був виключений з дослідження через його негативну дію на плазматичні мембрани ентероцитів миші.

### Матеріали та методи

Експерименти на тваринах проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених VI Національним конгресом із біоетики (Київ, 2016) і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Ентероцити виділяли з тонкого кишечника миші за методом J.H. Carter [3, 6]. Коефіцієнти фільтрації та проникності для кріопротекторів мембран ентероцитів за зниженої температури (12°C) визначали з часової залежності об'єму клітин, вміщених у бінарний розчин «1М кріопротектор – 0,9% NaCl». Зміну розмірів клітин у розчинах кріопротекторів гліцерину, 1,2-ПД та ДМСО на фізіологічному розчині фіксували за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина) (масляно-імерсійний об'єктив  $\times 63$ ). Об'єм клітин апроксимували об'ємом зрізаного конуса. Лінійні розміри клітин (висоту, малий та великий діаметри зрізаного конуса) визначали за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss», Німеччина). Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин під час їх контакту з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь, які описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів шляхом підбору оптимальних значень шуканих коефіцієнтів [1]. Величини енергії активації процесів проникання молекул води та кріопротекторів визначали з рівнянь (1) та (2).

Алгоритм розрахунку зміни об'єму клітин і концентрацій розчинених внутрішньоклітинних речовин у процесі кристалізації клітинної суспензії у присутності проникаючого кріопротектора [1] пе-

data for cell survival duration in the solutions of the studied cryoprotectants. According to this feature the cryoprotectants could be arranged in the series of 1,2-PD > DMSO, glycerol > EG.

The research aim was to determine the activation energy of penetration processes of water molecules and cryoprotectants (glycerol, 1,2-PD, DMSO) through plasma membranes of murine enterocytes and dynamics of their dehydration during freezing. The EG was excluded from the study because of its negative effect on murine enterocyte plasma membranes.

### Materials and methods

The experiments in animals were performed according to the General Ethical Principles of Experiments in Animals, approved by the 6<sup>th</sup> National Congress of Bioethics (Kyiv, 2016) and the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Enterocytes were isolated from murine small intestine by the method of J.H. Carter [1, 8]. The filtration and permeability coefficients for cryoprotectants of enterocyte membranes at a reduced temperature (12°C) were determined from volume vs. time dependence of the cells, placed in a binary solution of 1 M cryoprotectant – 0.9% NaCl. Changed cell dimensions in solutions of glycerol, 1,2-PD and DMSO in physiological saline were recorded with Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany, oil-immersion  $\times 63$  objective). The cell volume was approximated with a truncated cone. Linear dimensions of cells (height, small and large diameter of truncated cone) were examined using AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss, Germany). The experimentally determined time dependencies of cell volume during their contact with hypertonic solutions of cryoprotectants were fitted with numerical solutions of nonlinear equations, describing this dependence in terms of linear thermodynamics of irreversible processes via selecting the optimal values of required coefficients [4]. The values of activation energy of penetration processes of water molecules and cryoprotectants were determined from the equations (1, 2).

The algorithm for calculating a change in cell volume and concentrations of dissolved intracellular substances during cell suspension crystallisation in the presence of penetrating cryoprotectant [4] assumes the filtration coefficients of cell membranes  $L_p$  and their permeability for cryoprotectant  $k_s$  with a decrease in temperature of crystallising suspension as subjected to the Arrhenius dependence, wherein the membrane remains intact. The system of differential equations, describing the dynamics of a change in relative cell volume and concentrations of substances penetrating



редбачає, що коефіцієнти фільтрації клітинних мембран  $L_p$  та їх проникність для криопротектора  $k_s$  зі зниженням температури суспензії, яка кристалізується, підпорядковується ареніусовій залежності, і мембрана при цьому залишається інтактною. Система диференціальних рівнянь, що описує динаміку зміни відносного об'єму клітини і концентрацій проникаючої та не проникаючої через плазматичну мембрану речовин всередині клітини в процесі позаклітинної кристалізації, має вигляд:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dT} &= p \exp[a(T-1)/T] \left\{ \sigma \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[ 1 + \sigma \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \pi_2^{out} \right\}, \\ \frac{d\pi_1^{in}}{dT} &= \frac{p}{y-\alpha} \left\{ [\sigma \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1+\sigma \Phi_{out}) \pi_2^{out}] \times \right. \\ &\times [(1-\sigma)\pi_{1\infty} - \pi_1^{in}] \times \exp[a(T-1)/T] - q \times \\ &\times (\pi_1^{in} - \Phi_{out} \pi_2^{out}) \exp[b(T-1)/T] \left. \right\}, \end{aligned} \quad (3)$$

де  $\Phi_{out} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}$ ;  $\pi_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_{20}^{in}$ ,  $\pi_2^{out} = \pi_2^{out} / \pi_{20}^{in}$  – приведені значення позаклітинного осмотичного тиску проникаючої

каючої  $\pi_1^{out} = \frac{\pi_{1\infty} - g_0 \pi_1^{in}(V/V_0 - \alpha)}{1 - g_0 V/V_0}$  та непрони-

каючої  $\pi_2^{out} = \frac{\pi_{2\infty} - (1-\alpha)g_0 \pi_{20}^{in}}{1 - g_0 V/V_0}$  речовин відпо-

відно;  $\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_{20}^{in}$  – приведені значення внутрішньоклітинного осмотичного тиску проникаючої через плазматичну мембрану речовини;  $\pi_{20}^{in}$  – початкове значення сумарного осмотичного тиску непроникаючих речовин всередині клітини;  $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$  – асимптотичні значення осмотичного тиску проникаючої та не проникаючої через плазматичну мембрану речовин, що відповідають рівномірному їх розподілу уздовж системи;  $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$  – приведені асимптотичні значення осмотичного тиску проникаючої ( $\hat{\pi}_{1\infty} = \pi_{1\infty} / \pi_{20}^{in}$ ) та непроникаючої

( $\hat{\pi}_{2\infty} = \pi_{2\infty} / \pi_{20}^{in}$ ) речовин;  $y = \frac{V}{V_0}$  – відносний об'єм

клітини;  $T = \frac{T}{T_0}$  – відносна температура суспензії;

$$p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}, \quad q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}, \quad a \equiv \frac{E_{Aw}}{RT_0}, \quad b \equiv \frac{E_{As}}{RT_0},$$

$\tau_0 = (\gamma_0 L_0 \pi_{20}^{in})^{-1}$ ,  $\tau_1 = (\gamma_0 K_s)^{-1}$ ;  $\gamma_0$  – вихідне поверх-

and non-penetrating through plasma membrane inside a cell during extracellular crystallisation is as follows:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dT} &= p \exp[a(T-1)/T] \left\{ \sigma \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[ 1 + \sigma \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \pi_2^{out} \right\}, \\ \frac{d\pi_1^{in}}{dT} &= \frac{p}{y-\alpha} \left\{ [\sigma \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1+\sigma \Phi_{out}) \pi_2^{out}] \times \right. \\ &\times [(1-\sigma)\pi_{1\infty} - \pi_1^{in}] \times \exp[a(T-1)/T] - q \times \\ &\times (\pi_1^{in} - \Phi_{out} \pi_2^{out}) \exp[b(T-1)/T] \left. \right\}, \end{aligned} \quad (3)$$

where  $\Phi_{out} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}$ ;

$\pi_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_{20}^{in}$ ,  $\pi_2^{out} = \pi_2^{out} / \pi_{20}^{in}$ ; are normalized values of extracellular osmotic pressure of penetrating

$\pi_1^{out} = \frac{\pi_{1\infty} - g_0 \pi_1^{in}(V/V_0 - \alpha)}{1 - g_0 V/V_0}$  and non-penetrating

$\pi_2^{out} = \frac{\pi_{2\infty} - (1-\alpha)g_0 \pi_{20}^{in}}{1 - g_0 V/V_0}$  substances, respectively;

$\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_{20}^{in}$  – normalized value of intracellular osmotic pressure of the substance, penetrating through plasma membrane;  $\pi_{20}^{in}$  – initial value of total osmotic pressure of non-penetrating substances inside a cell;  $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$  – asymptotic values of osmotic pressure of substances, penetrating and non-penetrating through plasma membrane, corresponding to their uniform distribution along the system;  $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$  – normalized asymptotic values of osmotic pressure of penetrating ( $\hat{\pi}_{1\infty} = \pi_{1\infty} / \pi_{20}^{in}$ ) and non-penetrating

( $\hat{\pi}_{2\infty} = \pi_{2\infty} / \pi_{20}^{in}$ ) substances;  $y = \frac{V}{V_0}$  – relative cell volume;

$T = \frac{T}{T_0}$  – relative temperature of suspension;

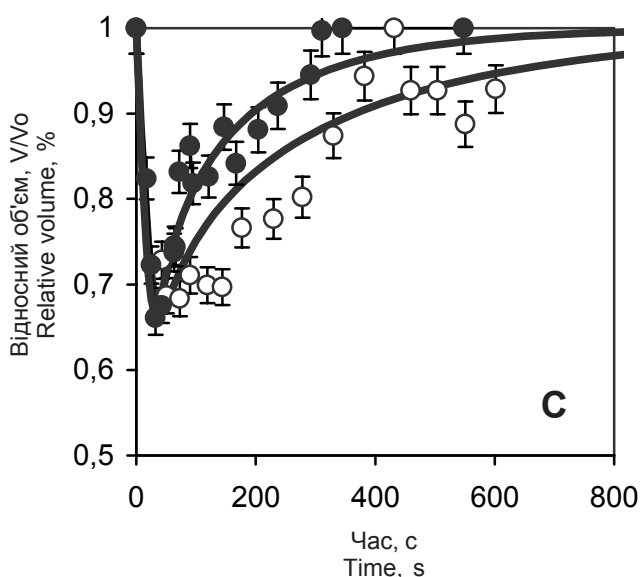
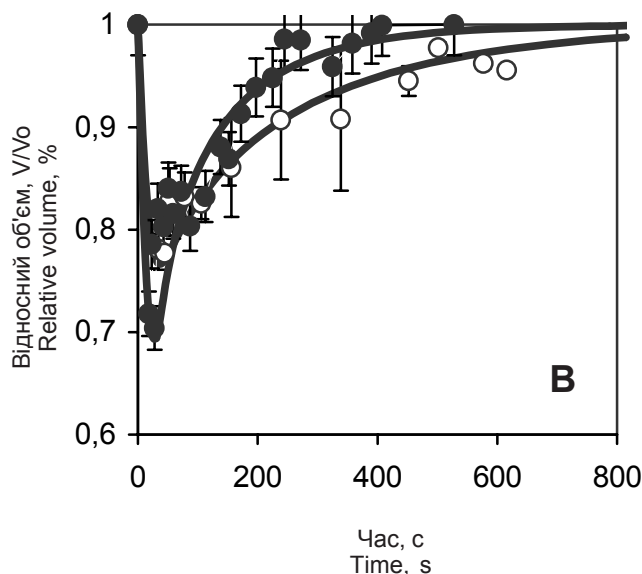
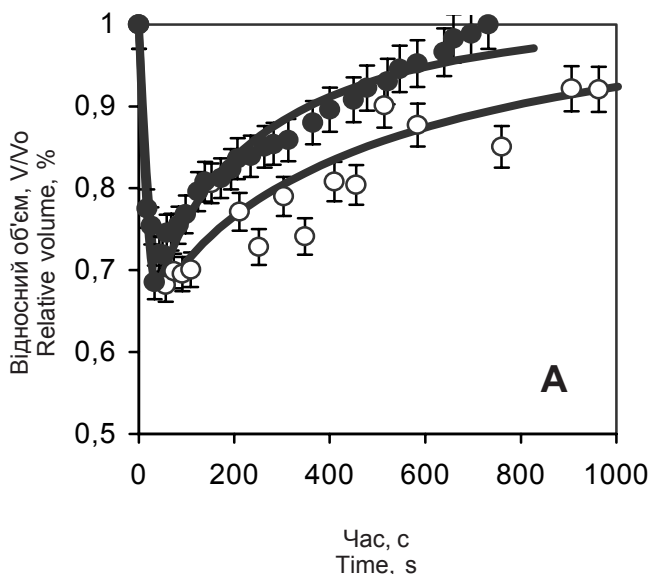
$$p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}, \quad q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}, \quad a \equiv \frac{E_{Aw}}{RT_0}, \quad b \equiv \frac{E_{As}}{RT_0},$$

$\tau_0 = (\gamma_0 L_0 \pi_{20}^{in})^{-1}$ ,  $\tau_1 = (\gamma_0 K_s)^{-1}$ ;  $\gamma_0$  – initial surface-volume ratio of cells;  $\sigma$  – reflection coefficient of plasma membrane for the penetrating substance;  $g_0$  – initial value of total cell volume ratio to the total volume of the system;  $\alpha$  – volume fraction of osmotically inactive intracellular substances;  $\beta$  – rate of suspension cooling.

## Results and discussion

The experimentally determined time dependencies of cell volume during contact with hypertonic solutions of cryoprotectants are shown in Fig. 1 (to compare 2 temperatures are shown: 25°C [8] and 12°C). The





**Рис. 1.** Апроксимація експериментально визначених часових залежностей об'єму ентероцитів миші при їх контакті з 1 М розчином криопротектора (А – гліцерин, В – 1,2-ПД, С – ДМСО) за температур 25°C (●) та 12°C (○).

**Fig. 1.** Approximation of experimentally determined dependencies of murine enterocytes at their contact with 1 M solution of CPA (A – glycerol, B – 1,2 PD, C – DMSO) at temperatures of 25°C (●) and 12°C (○).

нево-об'ємне відношення клітини;  $\sigma$  – коефіцієнт відбиття плазматичної мембрани для проникаючої речовини;  $g_0$  – початкове значення відношення сумарного об'єму клітин до загального об'єму системи;  $\alpha$  – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин;  $\beta$  – швидкість охолодження системи.

### Результати та обговорення

Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин під час їх контакту з гіпертонічними розчинами криопротекторів подані на рис. 1 (для порівняння за двох температур – 25°C [3] та 12°C). Отримані за апроксимаціями значення коефіцієнтів фільтрації та проникності, а також розраховані за рівняннями (1) та (2) значення енергій активації процесів переносу молекул води та криопротекторів крізь плазматичні мембрани ентероцитів миші наведено в табл. 1 та 2.

obtained by approximation values of filtration and permeability coefficients, as well as those of activation energies of water and cryoprotectant molecules transport through murine enterocyte plasma membranes, calculated according to the equations (1, 2) are given in the Tables 1, 2.

The values of filtration coefficients we obtained for murine enterocyte membranes were close to the indices found in the yeast *S. cerevisiae* cells, where as the permeability coefficients of enterocyte membranes for cryoprotectants were almost an order of magnitude higher [10]. Plasma membranes of murine enterocytes are characterised by significantly lower permeability to glycerol if compared with two other cryoprotectants (1,2-PD and DMSO), whereas for *S. cerevisiae* the permeability coefficients of all three cryoprotectants are almost the same. Glycerol is known to be the subject of metabolism of yeast cells and their membranes have specialised transport channels for this cryoprotectant [6]. This fact is confirmed by our previously reported values [10] of activation energy of glycerol molecule penetration, which is 26 kJ/mol (this value is characteristic of the channel mechanism of penetration [5]). At the same time, for murine enterocytes the values of activation energies of cryoprotectant penetration are twice higher than for *S. cerevisiae*, thereby indicating the absence of specified channels of penetration for these substances.



Отримані значення коефіцієнтів фільтрації мембран ентероцитів миші близькі до величин для дріжджоподібних клітин *Saccharomyces cerevisiae*, тоді як коефіцієнти проникності мембран ентероцитів для кріопротекторів майже на порядок вищі [5]. Плазматичні мембрани ентероцитів миші характеризуються суттєво меншою проникністю для гліцерину порівняно з двома іншими кріопротекторами (1,2-ПД та ДМСО), тоді як для *S. cerevisiae* коефіцієнти проникності всіх трьох кріопротекторів практично однакові. Відомо, що гліцерин є суб'єктом метаболізму дріжджових клітин та їх мембрани мають спеціалізовані канали транспорту даного кріопротектора [10]. Цей факт підтверджується і отриманими нами раніше [5] значеннями енергії активації проникання молекул гліцерину, які становить 26 кДж/моль (така величина характерна для каналного механізму проникання [9]). У той самий час для ентероцитів миші значення енергії активації проникання кріопротекторів є вдвічі більшими, ніж для *S. cerevisiae*, що свідчить про відсутність спеціалізованих каналів проникання для цих речовин. Це пояснює суттєво меншу (у 5 разів) проникність для молекул гліцерину у порівнянні з 1,2-ПД, оскільки розміри молекул гліцерину більші за розміри 1,2-ПД (1,2-ПД –  $3,7 \times 5 \text{ \AA}$  ( $53,7 \text{ \AA}^3$ ), гліцерин –  $4,7 \times 5,2 \text{ \AA}$  ( $90,2 \text{ \AA}^3$ )), а коефіцієнт розподілу між гідрофобною фазою та водою для гліцерину на порядок менший ( $K_p = 0,005$ ), ніж для 1,2-ПД ( $K_p = 0,076$ ) [8].

Значення коефіцієнтів фільтрації та проникності для кріопротекторів були використані нами для оцінки оптимальної швидкості заморожування ентероцитів миші. За допомогою системи рівнянь (3) були розраховані величини відносного об'єму ентероцитів миші при заморожуванні з кріопротекторами гліцерином, 1,2-ПД і ДМСО зі швидкостями охолодження 5, 1, 0,5 та 0,1 град/хв (рис. 2). За результатами аналізу отриманих кривих зневоднення ентероцитів можна зробити висновок, що найкращим режимом їх заморожування (з погляду запобігання внутрішньоклітинної кристалізації) є заснований на низьких швидкостях охолодження, аж до 0,1 град/хв. Це певно пов'язано з відносно малим поверхнево-об'ємним відношенням

Таблиця 1. Коефіцієнти проникності ентероцитів миші для кріопротекторів

Table 1. Permeability coefficients of murine enterocytes to CPAs

Кріопротектор CPA	Коефіцієнт проникності для кріопротектора, $K \cdot 10^{-7}$ , м/с Permeability coefficients to CPAs, $K \cdot 10^{-7}$ , m/s		Енергія активації, $E_{As}$ , кДж/моль Activation energy, kJ/mol
	25°C	12°C	
Гліцерол Glycerol	0,134 ± 0,05	0,056 ± 0,002	47,39
1,2-ПД 1,2-PD	0,672 ± 0,11	0,269 ± 0,087	49,76
ДМСО DMSO	0,530 ± 0,1	0,192 ± 0,05	55,15

This explains a much lower (5 times) permeability for glycerol molecules in comparison with 1,2-PD, since the size of glycerol molecules is larger than that of 1,2-PD ( $3.7 \times 5 \text{ \AA}$  ( $53.7 \text{ \AA}^3$ ) and  $4.7 \times 5.2 \text{ \AA}$  ( $90.2 \text{ \AA}^3$ ) for 1,2-PD and glycerol, respectively), and the distribution coefficient between hydrophobic phase and water is an order of magnitude lower for glycerol ( $K_p = 0.005$ ) than for 1,2-PD ( $K_p = 0.076$ ) [3].

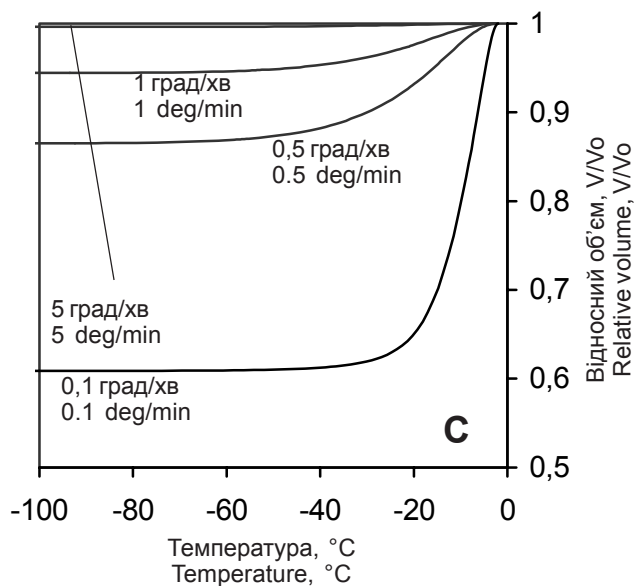
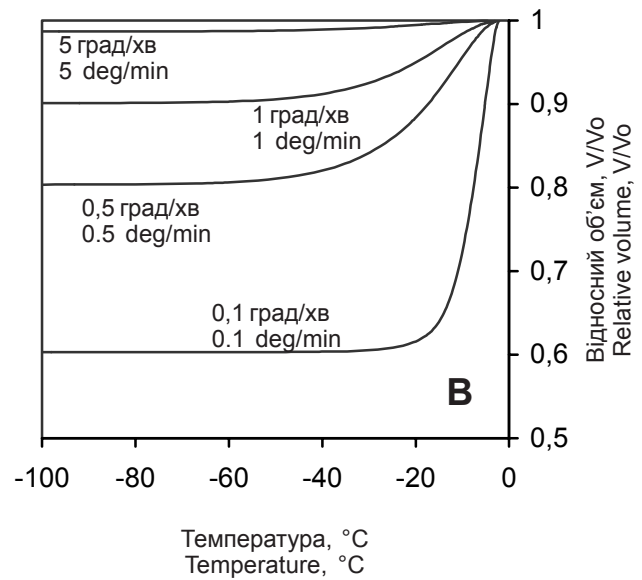
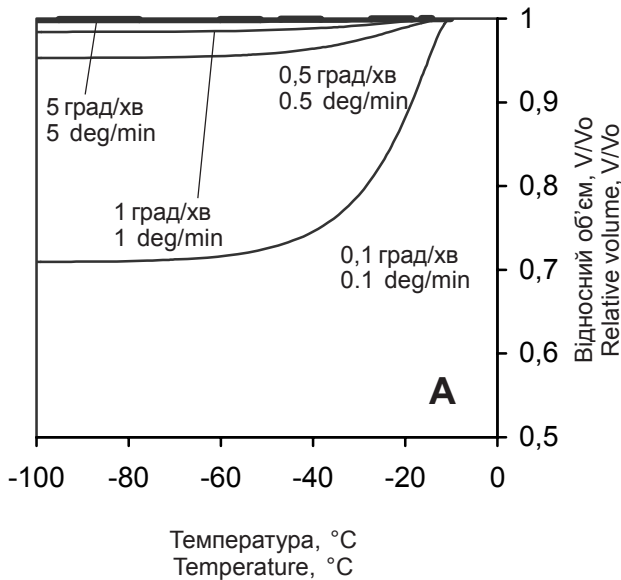
We used the filtration and permeability coefficient values obtained for cryoprotectants to assess the optimal freezing rate for murine enterocytes. By applying the system of equations (3), we calculated the

Таблиця 2. Коефіцієнти фільтрації ентероцитів миші у присутності кріопротекторів

Table 2. Filtration coefficients of murine enterocytes in CPA presence

Кріопротектор CPA	Коефіцієнт проникності для кріопротектора, $K \cdot 10^{-7}$ , м/с Permeability coefficients to CPAs, $K \cdot 10^{-7}$ , m/s		Енергія активації, $E_{As}$ , кДж/моль Activation energy, kJ/mol
	25°C	12°C	
Гліцерол Glycerol	1,24 ± 0,14	0,558 ± 0,092	44,16
1,2-ПД 1,2-PD	1,42 ± 0,17	0,705 ± 0,099	38,03
ДМСО DMSO	1,3 ± 0,13	0,832 ± 0,26	24,37

relative volume values for murine enterocytes during freezing with glycerol, 1,2-PD and DMSO in case of 5, 1, 0.5 and 0.1 deg/min cooling rates (Fig. 2). Analysis of the obtained curves for enterocyte dehydration allowed to choose the freezing regimen, based on low cooling rates even down to 0.1 deg/min, as the most convenient for enterocyte freezing (in terms of preventing intracellular crystallisation). This is likely due



**Рис. 2.** Зміна відносного об'єму ентероцитів миші при заморожуванні з 1 М криопротектором (А – гліцерин, В – 1,2-ПД, С – ДМСО).

**Fig. 2.** Change in relative volume of murine enterocytes when freezing with 1 M CPA (A – glycerol, B – 1,2-PD, C – DMSO).

цих клітин, яке за нашими даними становить  $\sim 4,6 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$ , що майже у 30 разів менше, ніж у еритроцитів людини ( $\sim 1,33 \times 10^6 \text{ м}^{-1}$  [7]). Величина осмотично неактивного об'єму ентероцитів миші ( $\alpha = 0,51$  [2]) не досягається під час охолодження з дослідженими криопротекторами, навіть за найменшої швидкості охолодження 0,1 град/хв, використаної для розрахунків динаміки зневоднення (рис. 2). Найкращим криопротектором за цим параметром є 1,2-ПД, у середовищі з яким досягається прийнятний рівень зневоднення вже за швидкості 0,5 град/хв (рис. 2, В). Враховуючи, що тривалість виживання ентероцитів миші була також найбільшою в розчині цього криопротектора порівняно з гліцерином та ДМСО [3], можна прийти до висновку, що найкращим із досліджених криопротекторів для заморожування ентероцитів миші може бути 1,2-ПД. Що ж стосується остаточного вибору швидкості охолодження, то він ускладнюється тим, що ентероцити демонструють достатньо малу тривалість виживання в гіпертонічних розчинах у порівнянні, наприклад, з дріжджоподібними клітинами *S. cerevisiae*. Тому під час вибору оптимальних режимів заморожування згідно з двохфакторною теорією крипошкодження слід враховувати вплив чинників розчину [4].

### Висновки

1. Отримано коефіцієнти проникності мембран ентероцитів миші для молекул води і криопротек-

to the relatively low surface-to-volume ratio of these cells, which according to our data is  $\sim 4.6 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$ , being almost 30 times lower, than in human erythrocytes ( $\sim 1.33 \times 10^6 \text{ м}^{-1}$  [2]). The value of osmotically inactive volume of murine enterocytes ( $\alpha = 0.51$  [7]) is not achieved during cooling with the studied cryoprotectants even at the lowest cooling rate of 0.1 deg/min used to calculate the dehydration dynamics (Fig. 2). Considering this parameter, 1,2-PD is the most convenient cryoprotectant, since in the 1,2-PD-contained medium the acceptable level of dehydration is achieved even with 0.5 deg/min rate (Fig. 2B). Taking into account the fact that the murine enterocyte survival time was also the highest in this cryoprotectant solution than in glycerol and DMSO [8], 1,2-PD may be suggested as the most appropriate cryoprotectant among the studied ones to freeze murine enterocytes. As for the final choice of cooling rate, it is complicated by a rather



торів (гліцерин, 1,2-ПД і ДМСО) за температури 12°C та розраховані значення енергії активації проникання цих речовин.

2. Розраховано динаміку зміни відносного об'єму ентероцитів миші при заморожуванні з кріопротекторами гліцерином, 1,2-ПД і ДМСО зі швидкостями охолодження 5, 1, 0,5 та 0,1 град/хв.

3. Показано, що найбільш прийнятними для заморожування ентероцитів є низькі швидкості охолодження.

4. Для подальшого дослідження оптимальних умов заморожування ентероцитів ефективним може бути підхід, який розглядає ймовірність пошкодження як за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації, так і пошкоджуючої дії гіпертонічних розчинів.

### Література

1. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 143 с.
2. Огурцова В.В., Коваленко С.Е., Коваленко І.Ф., Гордієнко О.І. Визначення осмотично неактивного об'єму ентероцитів миші // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 93–97.
3. Огурцова В.В., Коваленко С.Е., Коваленко І.Ф., Гордієнко О.І. Коефіцієнти проникності мембран ентероцитів миші для води та кріопротекторів // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 221–228.
4. Сакун О.В., Гордієнко О.І. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії // Біофізичний вісник. – Вип. 22 (1). – 2009. – С. 123–129.
5. Сакун О.В., Марущенко В.В., Коваленко І.Ф. та ін. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів // Проблемы криобиологии. – 2009. – 19, №1. – С. 41–48.
6. Carter J.H., Carter H., Nussbaum J., Eichholz A. Isolation of hamster intestinal epithelial cells using hypoosmotic media and PVP // J. Cell Physiol. – 1982. – Vol. 111, №1. – P. 55–67.
7. Fung Y.C., Tsang W.C.O., Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells // Biorheology. – 1981. – Vol. 18. – P. 369–385.
8. Gordienko O.I., Linnik T.P., Gordienko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols // Bioelectrochemistry. – 2004. – Vol. 62, №2. – P. 115–118.
9. McElhaney R.N. The effect of membrane lipids on permeability and transport in prokaryotes // Structure and Properties of cell membranes. Vol. II: Molecular basis of selected transport systems / G. Benga ed. – Florida: CRC Press, 1985. – P. 20–51.
10. Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol. 268. – P. 334–343.

low survival time of enterocytes in hypertonic solutions, if compared, for example, with the yeastlike *S. cerevisiae* cells. Therefore, the impact of solution factors should be considered when selecting the optimal freezing regimens according to the two-factor theory of cryoinjury [9].

### Conclusions

1. There were obtained the permeability coefficients of murine enterocytes for water and cryoprotectant molecules (glycerol, 1,2-PD and DMSO) at 12°C and calculated the activation energy values of penetration for these substances.

2. The dynamics of changes in the relative volume of murine enterocytes during freezing with glycerol, 1,2-PD and DMSO using 5, 1, 0.5 and 0.1 deg/min cooling rates was assessed.

3. The low cooling rates were shown to be the most convenient for enterocyte freezing.

4. The approach, considering the probability of injury both due to an intracellular crystallisation and damaging effect of hypertonic solutions, may be efficient for further studying the optimal conditions of enterocyte freezing.

### References

1. Carter J.H., Carter H., Nussbaum J., Eichholz A. Isolation of hamster intestinal epithelial cells using hypoosmotic media and PVP. J Cell Physiol 1982; 111 (1): 55–67.
2. Fung Y.C., Tsang W.C.O., Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells. Biorheology 1981; 18: 369–385.
3. Gordienko O.I., Linnik T.P., Gordienko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. Bioelectrochemistry 2004; 62(2): 115–118.
4. Gordiyenko Ye.O., Pushkar N.S. Physical basis for low temperature preservation of cell suspensions. Kyiv: Naukova dumka; 1994.
5. McElhaney R.N. The effect of membrane lipids on permeability and transport in prokaryotes. In: G. Benga, editor. Structure and properties of cell membranes. Vol. II: Molecular basis of selected transport systems. Florida: CRC Press; 1985.
6. Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 2001; 268: 334–343.
7. Oгурцова V.V., Kovalenko S.Ye., Kovalenko I.F., Gordiyenko O.I. Determination of osmotically inactive volume of murine enterocytes. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 93–97.
8. Oгурцова V.V., Kovalenko S.Ye., Kovalenko I.F., Gordiyenko O.I. Permeability coefficients of murine enterocyte membranes for water and cryoprotectants. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 221–228.
9. Sakun O.V., Gordiyenko O.I. Theoretical estimation of cooling rate optimal value in terms of two-factor theory of cryodamages in the linear modes of cell suspension freezing. Biophys Bull 2009; 22(1): 123–129.
10. Sakun O.V., Maruschenko V.V., Kovalenko I.F. et al. Temperature effect on membrane permeability coefficients of yeast-like fungi *Saccharomyces cerevisiae* for water and cryoprotectants. Probl Cryobiol 2009; 19(1): 41–48.

