

УДК 57.043:577.352.43:51-76

Л.Г. Кулешова, І.Ф. Коваленко, С.Є. Коваленко, Т.С. Цибулько, О.І. Гордієнко*

Транспортні характеристики плазматичних мембран клітин перещеплювальної культури РК-15

UDC 57.043:577.352.43:51-76

L.G. Kuleshova, I.F. Kovalenko, S.Ye. Kovalenko, T.S. Tsibulko, O.I. Gordienko*

Transport Characteristics of Plasma Membranes of PK-15 Passaged Cells

Реферат: Значення коефіцієнтів проникності для молекул води і криопротекторів є необхідними для вибору оптимальної тривалості експозиції клітин у криозахисних середовищах на етапі їх підготовки до криоконсервування, а також для пошуку оптимальних швидкостей охолодження і відігрівання при заморожуванні-відтаюванні клітинних суспензій. Для аналітичної оцінки коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин РК-15 із використанням фізико-математичного моделювання було отримано необхідні числові значення таких параметрів клітин, як осмотично неактивний об'єм α та поверхнево-об'ємне відношення γ . Коефіцієнти проникності k_p плазматичних мембран клітин РК-15 для молекул криопротекторів 1,2-ГД, ЕГ, ДМСО і гліцерину, а також коефіцієнти фільтрації L_p для молекул води за температур 25, 15, і 5°C визначено шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму клітин від часу експозиції в досліджуваних розчинах теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникних речовин за умови їх максимального збігу. Розраховано значення енергії активації процесу трансмембранного переносу молекул даних речовин.

Ключові слова: клітини РК-15, криопротектори, фізико-математична модель, коефіцієнти проникності, коефіцієнт фільтрації, енергія активації.

Abstract: The values of permeability coefficients to water molecules and cryoprotectants are demanded to select the optimal duration of exposure of cells in cryoprotective media at the stage of their preparation for cryopreservation, as well as to find optimal cooling and warming rates during the freeze-thawing of cell suspensions. The necessary numerical values of such cell parameters as the osmotically inactive volume α and the surface-area-to-volume ratio γ were obtained for the analytical evaluation of the permeability coefficients of the PK-15 cells' plasma membranes using physico-mathematical modeling. The permeability coefficients k_p of the plasma membranes of PK-15 cells to 1,2-PD, EG, DMSO and glycerol cryoprotectants molecules, as well as the filtration coefficients L_p to water molecules at temperatures of 25, 15 and 5°C were determined by approximating the experimental data of the change in relative volume of cells on exposure time in the studied solutions by theoretical curves calculated on the basis of physical and mathematical model of passive transport of water and permeable substances under the condition of their maximum coincidence. The value of the activation energy of the transmembrane transfer of molecules of these substances is calculated.

Key words: PK-15 cells, cryoprotectants, physical-mathematical model, permeability coefficients, filtration coefficient, activation energy.

На всіх етапах технологічного циклу низькотемпературного консервування клітини багаторазово піддаються змінам осмолярності позаклітинного середовища, в результаті чого на клітинній мембрані виникають значні перепади осмотичного тиску. Реакція клітин на екстремальні чинники, які неминуче супроводжують процес криоконсервування, зумовлюється, зокрема, транспортними та механічними властивостями клітинних мембран, характерними для кожного типу клітин. У зв'язку з цим визначення коефіцієнтів проникності для молекул води й криопротекторів є необхідним для вибору оптимальної тривалості експозиції клітин у криозахисних

At all the stages of low-temperature preservation technological cycle, the cells are repeatedly subjected to changes in osmolarity of extracellular environment, resulting in significant differences in osmotic pressure on a cell membrane. The response of cells to extreme factors, which inevitably accompany the cryopreservation is determined, in particular, by the transport and mechanical properties of cell membranes characteristic of each cell type. In this regard, the determination of permeability coefficients to water molecules and cryoprotectants is needed to select the optimal duration of cell exposure in cryoprotective media to prepare them for cryopreservation, as well as to find optimal cooling and warming rates

Відділ низькотемпературного консервування, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 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: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Надійшла 04.07.2020

Прийнята до друку 08.02.2021

Received July, 04, 2020

Accepted February, 08, 2021

© 2021 O.I. Gordienko, 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.

середовищах на етапі їх підготовки до кріоконсервування, а також для пошуку оптимальних швидкостей охолодження та відігрівання під час заморожування-відтаювання клітинних суспензій [12, 14, 15]. Поєднання теоретичного моделювання й експериментального вивчення поведінки клітин у неізотонічних середовищах за різних температур є ефективним інструментом для можливості прогнозування найбільш оптимальних умов їх кріоконсервування [4, 10, 15].

Мета роботи – визначення коефіцієнта фільтрації та коефіцієнтів проникності для кріопротекторів 1,2 пропандіолу, етиленгліколю, диметилсульфоксиду та гліцерину плазматичних мембран клітин РК-15 за різних температур та енергії активації проникання цих речовин.

Матеріали і методи

Дослідження виконувалися на перещеплювальній клітинній лінії РК-15 з урахуванням рекомендацій комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків).

Коефіцієнти фільтрації L_p і проникності k_p для кріопротекторів мембран клітин лінії РК-15 визначали волюмометричним методом. В експерименті 1 мкл суспензії клітин вносили в комірку планшета, який розміщували безпосередньо на робочому столику конфокального мікроскопа «Axio Observer ZI» («Carl Zeiss», Німеччина) (об'єктив $\times 40$). Після цього у такому ж об'ємі (1:1) у комірку додавали 2М розчини кріопротекторів, виготовлені на середовищі культивування DMEM/F12. Досліджували кінетику зміни об'єму клітин у часі в процесі зневоднення 1М розчинами кріопротекторів і його відновлення на етапі проникнення кріопротектора в клітини. Оскільки візуально клітини лінії РК-15 мають округлу форму, то їх первісний (V_0) і поточний (V_t) об'єми, а також площу поверхні S_0 , S_t можна оцінювати за площею перетину зображення або діаметром клітин. Морфометричний аналіз здійснювали з використанням комп'ютерної програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss»).

Числові значення коефіцієнтів фільтрації L_p і проникності k_p мембран клітин лінії РК-15 для молекул 1,2 пропандіолу (1,2-ПД), етиленгліколю (ЕГ), диметилсульфоксиду (ДМСО) і гліцерину (Гл) було визначено за температур 25, 15, і 5°C шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму клітин від часу експозиції у досліджуваних розчинах теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникних речовин за умови їх максимального збігу [1].

during freeze-thawing of cell suspensions [7, 12, 15]. The combination of theoretical modeling and experimental study of cell behavior in non-isotonic media at different temperatures is an effective tool for predicting the most optimal conditions of their cryopreservation [5, 9, 15].

The aim of this research was to determine the filtration and permeability coefficients to 1,2-propanediol, ethylene glycol, dimethyl sulfoxide and glycerol cryoprotectants of plasma membranes of PK-15 cells at different temperatures and activation energies of penetration of these substances.

Materials and methods

The studies were performed in the PK 15 cell line taking into account the recommendations of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv).

The filtration L_p and permeability k_p coefficients to cryoprotectants of PK 15 cell membranes were determined by volumetric method. In the experiment, 1 μ l of cell suspension was introduced into a tray well and placed directly on the working table of the Axio Observer ZI confocal microscope ('Carl Zeiss', Germany) ($\times 40$). Then, 2M cryoprotectant solutions prepared with DMEM / F12 culture medium were added to the well in the same volume (1:1). The kinetics of cell volume change over time during the dehydration of 1M solutions of cryoprotectants and its recovery at the stage of penetration of cryoprotectants into cells was studied. Since visually the PK-15 cells have a rounded shape, their initial and current volumes V_0 , V_t , as well as the surface area S_0 , S_t can be estimated by the cross-sectional area of the image or diameter of cells. Morphometric analysis was performed using the 'AxioVision Rel. 4.6' software ('Carl Zeiss').

Numerical values of filtration coefficients L_p and permeability k_p of PK-15 cell membranes to the molecules of 1,2-propanediol (1,2-PD), ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol were examined at temperatures of 25, 15, and 5°C by approximating experimental data on the change in relative cell volume on time of exposure in the studied solutions by theoretical curves calculated on the basis of physical and mathematical models of passive transport of water and permeable substances in case of their maximum coincidence [1].

The results were statistically processed by means of Student's t test. The 'Excel' software ('Microsoft', USA) was used for calculations.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням *t*-критерію Стьюдента. Для розрахунків використовували пакет комп'ютерної програми «Excel» («Microsoft», США).

Результати та обговорення

Для аналітичної оцінки коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин РК-15 із використанням фізико-математичного моделювання було визначено необхідні числові значення їх осмотично неактивного об'єму α та поверхнево-об'ємного відношення γ . Для визначення осмотично неактивного об'єму отримали залежності зміни відносного об'єму клітин РК-15 у гіпертонічних розчинах непроникувальної речовини (NaCl). Одержані результати в координатах Бойля–Вант-Гоффа наведено на рис. 1, згідно з яким осмотично неактивний об'єм клітин РК-15 становить 0,23.

Поверхнево-об'ємне відношення клітин ($\gamma_0 = S_0/V_0 = 6/D$) для розрахунків визначали у первісній суспензії перед додаванням кріопротекторів за всіх досліджуваних температур. Середні значення γ_0 з вимірювання діаметрів 50–75 клітин за температур 25, 15 та 5°C становлять $(4,4 \pm 0,58) \times 10^5$; $(4,26 \pm 0,18) \times 10^5$ та $(4,15 \pm 0,17) \times 10^5 \text{ м}^{-1}$ відповідно.

На рис. 2–5 подано графіки зміни відносного об'єму клітин РК-15 під час їх експозиції в 1М розчинах досліджуваних кріопротекторів за температур 25, 15 і 5°C, отриманих на підставі експериментальних морфометричних даних (точки), які апроксимовані теоретичними залежностями, розрахованими в тих самих експериментальних умовах (суцільні лінії). Експериментальні точки є середніми значеннями відносного об'єму клітин у полі зору мікроскопа на даний момент часу.

Аналіз отриманих залежностей показав, що мінімальний об'єм, якого сягають клітини РК-15 під час дегідратації у 1М розчинах досліджуваних кріопротекторів, становить у середньому $0,44V_0 \pm 0,02$ (рис. 2–5). Час досягнення мінімального об'єму зростає при зниженні температури експозиції клітин і залежить від співвідношення коефіцієнтів фільтрації та проникності у середовищі відповідного кріопротектора. Так, якщо в 1М розчині 1,2-ПД за температури 25°C цей час становить 28 с, то за 5°C він досягає 45 с. Така сама тенденція спос-

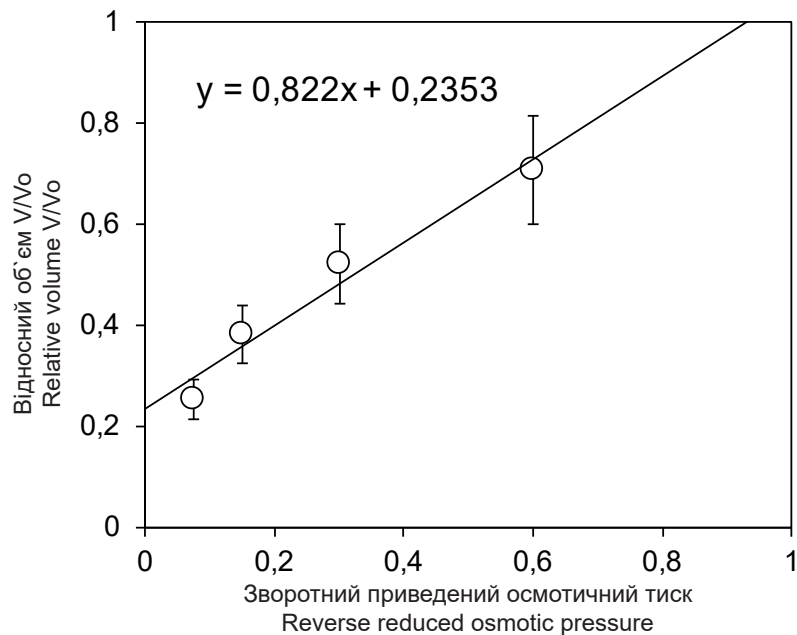


Рис. 1. Зміна відносного об'єму клітин РК-15 в координатах Бойля–Вант-Гоффа.

Fig. 1. Change in relative volume of PK-15 cells in the Boyle–Van't Hoff coordinates.

Results and discussion

For the analytical evaluation of the permeability coefficients of the plasma membranes of PK-15 cells using physical and mathematical modeling, the required numerical values of their osmotically inactive volume α and surface-volume ratio γ were determined. To examine the osmotically inactive volume, the dependences of the change in relative volume of PK-15 cells in hypertonic solutions of impermeable substance (NaCl) were obtained. The obtained results in Boyle–Van't-Hoff coordinates are shown in Fig. 1, according to which the osmotically inactive volume of PK-15 cells makes 0.23.

The cell-area- to-volume ratio of cells ($\gamma_0 = S_0/V_0 = 6/D$) for calculations was determined in the initial suspension before complementing with cryoprotectants at all test temperatures. The average values of γ_0 from the measurement of the diameters of 50–75 cells at temperatures of 25, 15 and 5°C are $(4.4 \pm 0.58) \times 10^5$; $(4.26 \pm 0.18) \times 10^5$ and $(4.15 \pm 0.17) \times 10^5 \text{ m}^{-1}$, respectively.

Figures 2–5 show the graphs of changes in the relative volume of PK-15 cells during their exposure to 1M solutions of the studied cryoprotectants at temperatures of 25, 15, and 5°C, obtained on the basis of experimental morphometric data (points) approximated by theoretical dependences calculated in the same experimental conditions (solid lines). Experimental points are the average

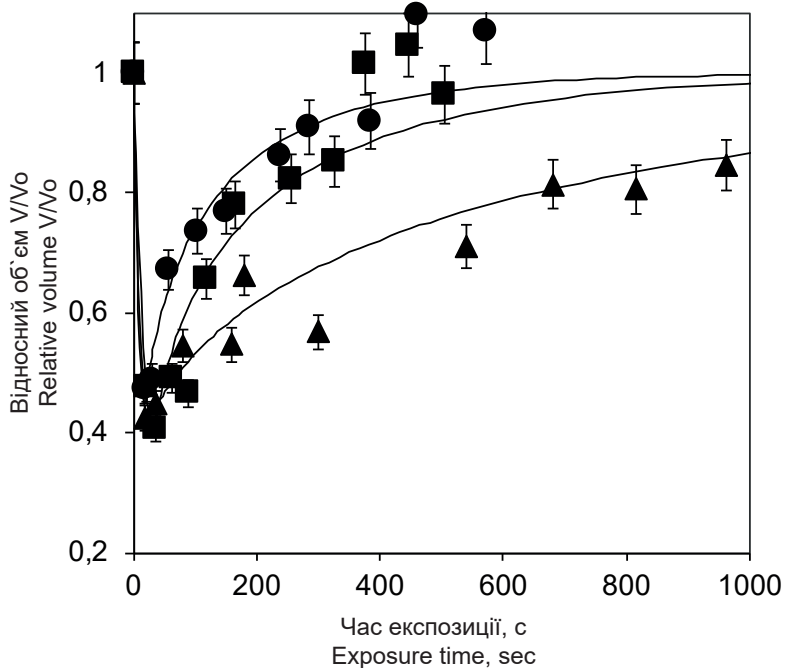


Рис. 2. Залежність відносного об'єму клітин РК-15 від часу експозиції в 1М розчині ДМСО: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

Fig. 2. Dependence of relative volume of PK-15 cells on exposure time to 1M DMSO solution: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

терігається в 1М розчинах ЕГ, ДМСО та Гл. За температури 25°C час досягнення мінімального об'єму клітин у 1М розчині ЕГ становить 19 с, а за 5°C – 41 с. У 1М розчині ДМСО за аналогічних температур цей час становить 20 і 32 с, а в 1М розчині Гл – 24 і 38 с відповідно. Це обумовлено збільшенням в'язкості розчинів і уповільненням дифузійних процесів за умов зниження температури. Відомо, що за температури 25°C величини в'язкості криопротекторів Гл, 1,2-ПД, ЕГ та ДМСО становлять 0,95, 0,043, 0,017 і 0,002 Па·с відповідно [7].

У табл. 1 подано отримані коефіцієнти проникності k_p плазматичних мембран клітин РК-15 для молекул криопротекторів 1,2-ПД, ЕГ, ДМСО і Гл, у табл. 2 – коефіцієнти фільтрації L_p для молекул води залежно від температури експозиції, а також значення енергії активації E_A процесу трансмембранного переносу молекул даних речовин. Порівняння коефіцієнтів проникності k_p плазматичної мембрани клітин РК-15 за 25°C дозволяє вибудувати наступну послідовність досліджених криопротекторів: $k_{1,2-ПД} > k_{ЕГ} > k_{ДМСО} > k_{Гл}$.

values of the cells' relative volume in the microscope field of view at a given time.

Analysis of the obtained dependences demonstrated that the minimum volume reached by PK-15 cells during dehydration in 1M solutions of the studied cryoprotectants was in average $0.44V_0 \pm 0.02$ (Fig. 2–5). The time to reach the minimum volume increases with decreasing the cell exposure temperature and depends on the ratio of filtration and permeability coefficients in the medium of the corresponding cryoprotectant. Thus, if in a 1M solution of 1,2-PD at a temperature of 25°C this time is 28 s, then at 5°C it reaches 45 s. The same trend is observed in 1M solutions of EG, DMSO and glycerol. At a temperature of 25°C, the time to reach the minimum cell volume in 1M EG solution is 19 s, and at 5°C this is 41 s. In 1M DMSO solution at similar temperatures, this time makes 20 and 32 s, and in 1M glycerol solution it is 24 and 38 s, respectively. This is due to the increase in the viscosity of solutions and the slowing down of diffusion when temperature decreases. It is known that at a temperature of 25°C the viscosity values of glycerol, 1,2-PD, EG and DMSO cryoprotectants are 0.95, 0.043, 0.017 and 0.002 Pa·s, respectively [14].

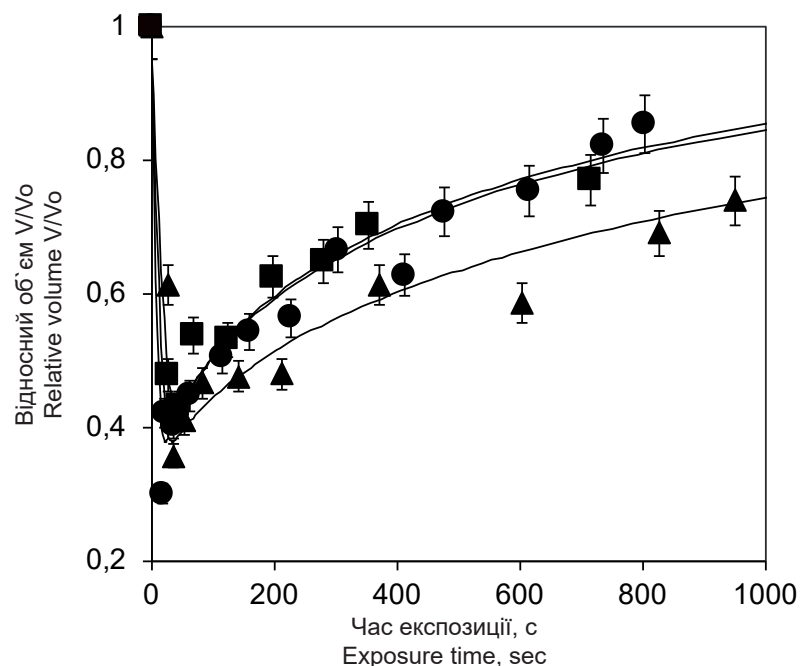


Рис. 3. Залежність відносного об'єму клітин РК-15 від часу експозиції в 1М розчині Гл: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

Fig. 3. Dependence of relative volume of PK-15 cells on exposure time to 1M glycerol solution: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

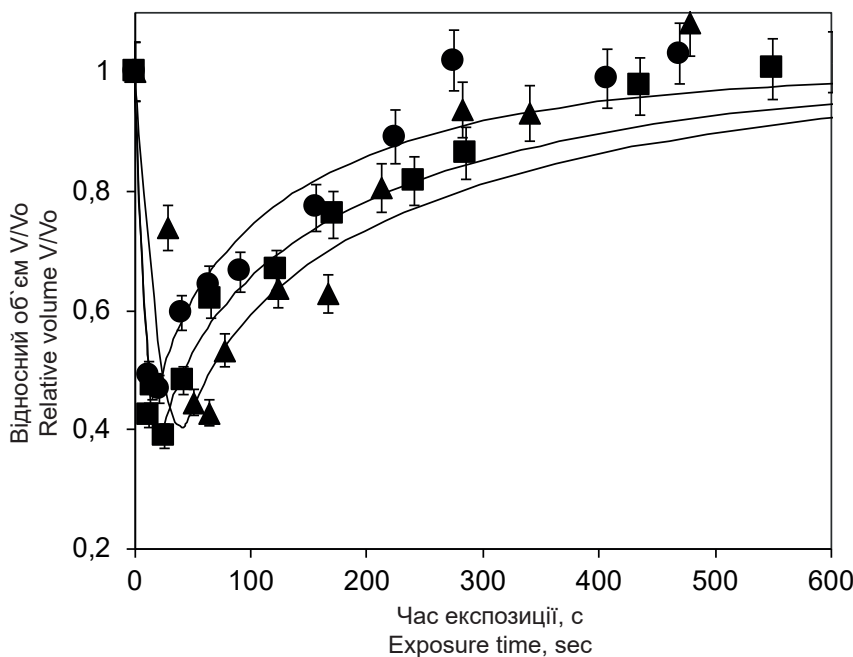


Рис. 4. Залежність відносного об'єму клітин РК-15 від часу експозиції в 1М розчині ЕГ: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

Fig. 4. Dependence of relative volume of PK-15 cells on exposure time to 1M EG solution: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

Коефіцієнти проникності k_p для криопротекторів і коефіцієнт фільтрації L_p плазматичних мембран клітин РК-15 закономірно знижуються зі зниженням температури експозиції клітин. Порівняння коефіцієнтів фільтрації L_p плазматичних мембран клітин РК-15 за температури 25°C (див. табл. 2) у 1М розчинах криопротекторів показало, що вони мають наступну послідовність: $L_{p,DMSO} > L_{p,EG} > L_{p,Gl} > L_{p,1,2-PD}$. За температури 5°C коефіцієнт фільтрації статистично не відрізняється у середовищах гідрофільних криопротекторів (1,2-ПД, ЕГ, Гл), але є значно більшим у середовищі з відносно гідрофобним криопротектором ДМСО. Найвищий коефіцієнт фільтрації L_p плазматичних мембран клітин РК-15 у розчині ДМСО може бути обумовлений його впливом на стан мембрани клітин внаслідок проникання молекул ДМСО крізь ліпідний бішар.

Здатність дифільних молекул ефективно проникати в клітини визначається співвідношенням їх гідрофобно-гідрофільних властивостей, а також просторовою геометрією молекул. Відомо, що пасивна дифузія малих гідрофільних молекул крізь клітинні мембрани може відбуватися крізь сталі канали, що утворюються інтегральними мембранними білками [9, 11, 13], а також крізь динамічні пори в ліпідному бішарі, існування яких обумовлено тепловими флуктуаціями і дефектами упакування ліпідів [6]. Водночас гідрофільні речовини крізь суцільний

Table 1 presents the obtained permeability coefficients k_p of plasma membranes of PK-15 cells to cryoprotective molecules 1,2 PD, EG, DMSO and glycerol, Table 2 – demonstrates the filtration coefficients L_p to water molecules depending on the exposure temperature, as well as the activation energy E_A of the transmembrane transfer of the molecules of these substances. Comparison of the permeability coefficients k_p of the plasma membrane of PK-15 cells at 25°C allows building the following sequence of the studied cryoprotectants: $k_{1,2-PD} > k_{EG} > k_{DMSO} > k_{glycerol}$.

The permeability coefficients k_p to cryoprotectants and the filtration coefficient L_p of the plasma membranes of PK-15 cells naturally decrease with reducing cell exposure temperature. Comparison of the filtration coefficients

L_p of the plasma membranes of PK-15 cells at a temperature of 25°C (see Table 2) in 1M solutions of cryoprotectants showed that they have the following sequence: $L_{p,DMSO} > L_{p,EG} > L_{p,glycerol} > L_{p,1,2-PD}$. At a temperature of 5°C, the filtration coefficient does not differ significantly in the media of hydrophilic cryoprotectants (1,2-PD, EG, glycerol),

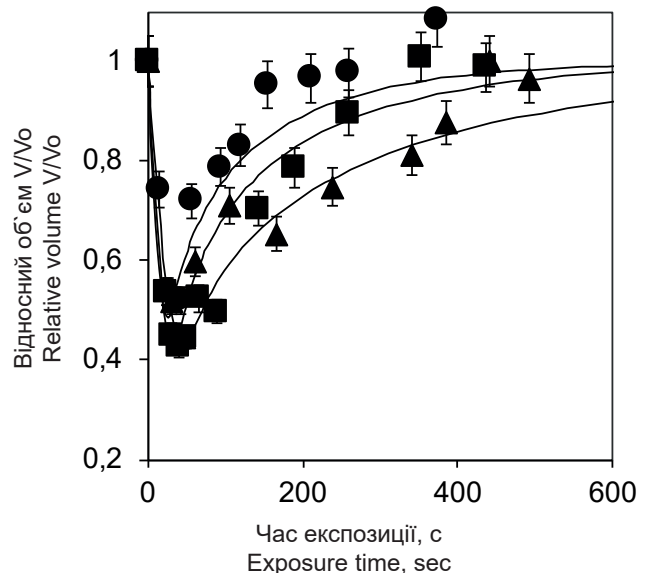


Рис. 5. Залежність відносного об'єму клітин РК-15 від часу експозиції в 1М розчині 1,2-ПД: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

Fig. 5. Dependence of the relative volume of PK-15 cells on exposure time to 1M 1,2-PD solution: ● – 25°C, ■ – 15°C, ▲ – 5°C.

Таблиця 1. Коефіцієнти проникності k_p плазматичних мембран клітин РК-15 для молекул криопротекторів залежно від температури та енергія активації їх проникання

Table 1. Permeability coefficients k_p of PK-15 cells' plasma membranes to cryoprotectant molecules depending on temperature and energy of activation of their penetration

Криопротектор Cryoprotectant	Коефіцієнт проникності $k_p \times 10^9$, м/с Permeability coefficient $k_p \times 10^9$ m/s			Енергія активації E_A , кДж/моль Activation energy E_A , kJ/mol
	25°C	15°C	5°C	
1,2-ПД 1,2-PD	10,07 ± 0,5	8,86 ± 0,32	3,25 ± 0,08	38,95
ЕГ EG	6,59 ± 0,41	4,21 ± 0,13	3,58 ± 0,06	21,01
ДМСО DMSO	5,62 ± 0,18	3,64 ± 0,11	0,89 ± 0,13	63,47
Гліцерин Glycerol	0,91 ± 0,09	0,84 ± 0,03	0,43 ± 0,02	25,82

ліпідний шар проникають надзвичайно повільно через низьку вірогідність переходу гідрофільних молекул із водного оточення у гідрофобне середовище. Але в усіх випадках розмір молекул буде впливати на коефіцієнти проникності: через обмеження розмірів сталих / флукуаційно утворюваних пор або внаслідок залежності енергії переходу з водної фази в ліпідну від площі поверхні молекули. При зростанні ліпофільних властивостей молекул збільшується ймовірність їх проникання шляхом розчинення в ліпідній фазі. Тому такі речовини достатньо легко проникають у клітини шляхом дифузії крізь ліпідний бішар, оскільки для них він є значно меншим енергетичним бар'єром. Здатність речовин розчинятися у ліпідах характеризується коефіцієнтом їх розподілу K_p у системі «вода-гідрофобна фаза». Відомо, що між коефіцієнтом розподілу K_p розчинних у ліпідах речовин і коефіцієнтом проникності k_p молекул

but is much higher in the medium with a relatively hydrophobic cryoprotectant DMSO. The highest filtration coefficient L_p of plasma membranes of PK-15 cells in DMSO solution may be due to its effect on the state of cell membrane due to the penetration of DMSO molecules through the lipid bilayer.

The ability of diphilic molecules to effectively penetrate into cells is determined by the ratio of their hydrophobic-hydrophilic properties, as well as the spatial geometry of the molecules. It is known that passive diffusion of small hydrophilic molecules through cell membranes can occur via through constant channels formed by integral membrane proteins [4, 6, 8] as well as through dynamic pores in the lipid bilayer, the existence of which is stipulated by thermal fluctuations and lipid packaging defects [11]. At the same time, hydrophilic substances penetrate the solid lipid layer extremely slowly due to the low probability

Таблиця 2. Коефіцієнти фільтрації L_p плазматичних мембран клітин РК-15 залежно від температури

Table 2. Filtration coefficients L_p of PK-15 cells' plasma membranes depending on temperature

Криопротектор Cryoprotectant	Коефіцієнт проникності $k_p \times 10^9$, м/с Permeability coefficient $k_p \times 10^9$ m/s			Енергія активації E_A , кДж/моль Activation energy E_A , kJ/mol
	25°C	15°C	5°C	
1,2-ПД 1,2-PD	2,04 ± 0,22	2,25 ± 0,32	1,44 ± 0,44	12,00
ЕГ EG	3,26 ± 0,64	3,21 ± 0,14	1,37 ± 0,15	29,86
ДМСО DMSO	3,57 ± 0,31	2,13 ± 0,42	2,06 ± 0,44	18,94
Гліцерин Glycerol	2,91 ± 0,19	1,84 ± 0,34	1,33 ± 0,23	26,85

цих речовин крізь клітинні мембрани існує тільки якісна кореляція. Коефіцієнти проникності k_p також суттєво залежать від розміру й форми проникних крізь мембрану молекул: за однакових розчинності в ліпідах і молекулярних масах нижчу проникність мають молекули з розгалуженою структурою. Коефіцієнти розподілу K_p у системі «*n*-октанол–вода» Гл, ЕГ, 1,2-ПД і ДМСО становлять 0,0027, 0,040, 0,076, 0,247 відповідно [5, 8]. Відомі розміри (діаметр (*d*), довжина (*l*) та об'єм (*V*), молекул кріопротекторів: Гл – $d = 4,7\text{Å}$, $l = 5,2\text{Å}$, $V = 90,2\text{Å}^3$; ЕГ – $d = 2,6\text{Å}$, $l = 5,2\text{Å}$, $V = 27,6\text{Å}^3$; 1,2-ПД – $d = 3,7\text{Å}$, $l = 5,0\text{Å}$, $V = 53,7\text{Å}^3$; ДМСО – $d = 3,2\text{Å}$, $l = 4,6\text{Å}$, $V = 36,97\text{Å}^3$ [3]. Дані про коефіцієнти розподілу K_p свідчать про те, що Гл, 1,2-ПД і ЕГ мають виражені гідрофільні властивості. Отже, трансмембранне перенесення молекул цих речовин може здійснюватися гідрофільними порами. У роботі О.І. Гордієнко та співавт. [2] розглянуто вірогідність проникання молекули крізь пору сталого розміру. Очевидно, якщо максимальний розмір молекули не перевищує діаметра пори (*a*), то молекула крізь пору може проходити з довільною орієнтацією в просторі. Навпаки, якщо довжина (*l*) та діаметр (*d*) молекули перевищують розмір пори, то молекула не може пройти крізь мембранну пору через геометричні обмеження. У проміжному випадку ($l > a > d$) молекула може потрапити в пору тільки за умов певної орієнтації в просторі відносно пори: коли її вісь відхиляється від осі пори на кут (θ), що не перевищує деякого значення (θ_m), яке залежить від співвідношення лінійних розмірів молекули (*d*, *l*) та діаметра пори (*a*). Вірогідність орієнтації молекули в інтервалі кутів $0 < \theta < \theta_m$ визначає вірогідність проникання молекули крізь пору. З огляду на геометричні параметри молекули 1,2-ПД можна припустити, що розмір гідрофільних пор мембран клітин РК-15 перевищує $3,7\text{Å}$. Водночас значення енергії активації проникання 1,2-ПД може свідчити про його часткове проникання крізь ліпідний бішар.

З урахуванням значення коефіцієнта розподілу K_p ДМСО в системі «*n*-октанол–вода», яке значно перевищує такий для інших розглянутих кріопротекторів, ДМСО може бути віднесено до розчинних у ліпідах сполук. У зв'язку з цим велика частка його надходження в клітини може забезпечуватися прониканням крізь ліпідний бішар, про що свідчить і суттєво більше значення енергії активації E_A . Найменший коефіцієнт проникності k_p молекул Гл, очевидно, пов'язаний як з його винятковою гідрофільністю

of transition of hydrophilic molecules from the aqueous medium to the hydrophobic one. But in all cases, the size of the molecules will affect the permeability coefficients: due to the limitation of the sizes of constant / fluctuation-formed pores or due to the dependence of the energy of the transition from the aqueous phase to the lipid surface area of the molecule. With the growth of lipophilic properties of molecules, the probability of their penetration by dissolving in the lipid phase increases. Therefore, such substances are quite easy to penetrate into cells by diffusion through the lipid bilayer, because for them it is a much smaller energy barrier. The ability of substances to dissolve in lipids is characterized by the coefficient of their partition K_p in the 'water-hydrophobic phase system'. It is known that there is only a qualitative correlation between the partition coefficient K_p of lipid-soluble substances and the permeability coefficient k_p of molecules of these substances through cell membranes. The permeability coefficients k_p also strongly depend on the size and shape of the membrane-permeable molecules: with the same solubilities in lipids and molecular weights, molecules with a branched structure have lower permeability. The K_p partition coefficients in the '*n*-octanol – water' system glycerol, EG, 1,2-PD and DMSO are 0.0027, 0.040, 0.076, 0.247, respectively [10, 13]. Molecule dimensions (diameter (*d*), length (*l*) and volume (*V*): glycerol – $d = 4.7\text{Å}$, $l = 5.2\text{Å}$, $V = 90.2\text{Å}^3$; EG – $d = 2.6\text{Å}$, $l = 5.2\text{Å}$, $V = 27.6\text{Å}^3$, 1,2-PD – $d = 3.7\text{Å}$, $l = 5.0\text{Å}$, $V = 53.7\text{Å}^3$, DMSO – $d = 3.2\text{Å}$, $l = 4.6\text{Å}$, $V = 36.97\text{Å}^3$ [3]. Data on the partition coefficients of K_p indicate that glycerol, 1,2-PD and EG have pronounced hydrophilic properties. Therefore, transmembrane transfer of molecules of these substances can be carried out by hydrophilic pores. O.I. Gordiyenko *et al.* [2] considered the probability of penetration of a molecule through a pore of constant size. Obviously, if the maximum size of the molecule does not exceed the pore diameter (*a*), the molecule can pass through the pore with arbitrary orientation in space. In contrast, if the length (*l*) and diameter (*d*) of the molecule exceed the pore size, the molecule cannot pass through the membrane pore due to geometric constraints. In the intermediate case ($l > a > d$), the molecule can enter the pore only under conditions of a certain orientation in space relative to the pore: when its axis deviates from the one of the pore at an angle (θ) not exceeding a certain value (θ_m), which depends on the ratio of the linear dimensions of molecule (*d*, *l*) and the diameter of the pore (*a*). The probability of orientation of the molecule within the range of angles $0 < \theta < \theta_m$ determines the



(коефіцієнт розподілу значно менший порівняно з іншими гідрофільними кріопротекторами), так і з геометричними параметрами його молекули, яка має найбільший діаметр серед розглянутих кріопротекторів.

Висновок

Отримані характеристики клітин РК-15 (поверхнево-об'ємне відношення, осмотично неактивний об'єм, коефіцієнт фільтрації та коефіцієнти проникності) для низки кріопротекторів можуть бути використані для визначення оптимальних режимів охолодження під час кріоконсервування.

Література

1. Гордієнко ЕА, Пушкар НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наукова думка; 1994. 140 с.
2. Гордієнко ОІ. Фізико-математична модель дифузії малих електронейтральних молекул крізь білкові мембранні пори. Фізика живого. 2002; 10(2): 88–94.
3. Гордієнко ОІ, Гордієнко ЕО, Лінник ТП, Компанієць АМ. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів. Проблеми криобіології. 2002; 4: 9–15.
4. Кулешова ЛГ, Коваленко ІФ. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий. Біофізичний вісник. 2008; 20(1): 56–64.
5. Лінник ТП, Бизикина ОВ. Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов. Проблеми криобіології. 2001; 2: 72–9.
6. Маркин ВС, Козлов ММ. Статистика пор в бислоиных липидных мембранах. Биологические мембраны. 1985; 2(2): 205–23.
7. Тодрин АФ, Попивненко ЛІ, Коваленко СЕ. Теплофизические свойства кріопротекторов. II. Динамическая вязкость ряда кріопротекторов, их растворов и смесей. Проблеми криобіології. 2010; 20(3): 266–81.
8. Шевченко НА, Стрибуль ТФ, Розанов ЛФ. Действие многоатомных спиртов, амидов и ДМСО на сохранность меристем винограда и картофеля. Проблеми криобіології. 2004; 3: 79–85.
9. Gordiyenko OI, Gordiyenko YuE, Linnik TP, Gordiyenko EO. Experimental determination of human erythrocyte membrane permeability coefficients for a series of amides. CryoLetters. 2005; 26(1): 65–72.
10. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, et al. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. CryoLetters. 2018; 39(6): 380–5.
11. Gordiyenko OI, Linnik TP, Gordiyenko EA. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. Bioelectrochemistry. 2004; 62: 115–8.
12. Davidson AF, Benson JD, Higgins AZ. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. Theoretical Biology and Medical Modelling. 2014; 11: 13–32.
13. Dix JA, Solomon AK. Role of membrane protein and lipids in water diffusion across cell membranes. BBA. 1984; 773: 219–30.
14. Mullen SF, Li M, Li Y, et al. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene

probability of penetration of the molecule through the pore. Taking into account the geometric parameters of the molecule 1,2-PD, we can assume that the size of the hydrophilic pores of PK-15 cells' membranes exceeds 3.7Å.

At the same time, the value of the activation energy of 1,2-PD penetration may indicate its partial penetration through the lipid bilayer.

Assuming the value of the partition coefficient of K_p DMSO in the system 'n-octanol-water', which significantly exceeds the K_p of other considered cryoprotectants, DMSO can be attributed to lipid-soluble compounds. As a result, a bulk of its entry into cells can be provided by penetration through the lipid bilayer, as evidenced by the significantly higher value of activation energy E_A . The lowest permeability coefficient k_p of glycerol molecules is obviously related to its exceptional hydrophilicity (partition coefficient is much lower compared to other hydrophilic cryoprotectants) and to its molecule geometric parameters, which has the largest diameter among the considered cryoprotectants.

Conclusion

The obtained characteristics for PK-15 cells (surface- area- to- volume ratio, osmotically inactive volume, filtration and permeability coefficients) for a number of cryoprotectants can be used to determine the optimal cooling regimens during cryopreservation.

References

1. Gordiyenko EA, Pushkar NS. Physical fundamentals of low-temperature preservation of cell suspensions. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 140 c.
2. Gordiyenko OI. The physico-mathematical model for the diffusion of small electrically neutral molecules through protein membrane pores. Physics of the Alive. 2002; 10(2): 88–94.
3. Gordiyenko OI, Gordiyenko EO, Linnik TP, Kompaniyets AM. Mechanisms of cryoprotectants penetration through erythrocyte membranes. Problems of Cryobiology. 2002; 4: 9–15.
4. Gordiyenko OI, Gordiyenko YuE, Linnik TP, Gordiyenko EO. Experimental determination of human erythrocyte membrane permeability coefficients for a series of amides. CryoLetters. 2005; 26(1): 65–72.
5. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, et al. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. CryoLetters. 2018; 39(6): 380–5.
6. Gordiyenko OI, Linnik TP, Gordiyenko EA. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. Bioelectrochemistry. 2004; 62: 115–18.
7. Davidson AF, Benson JD, Higgins AZ. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation

- glycol and the appliance toward vitrification. *Fertil Steril*. 2008; 89:1812–25.
15. Todrin AF, Smolyaninova Yel, Timofeyava OV, et al. Physical-mathematical model of substance redistribution between the cell and its hypertonic solution environment of penetrating cryoprotectants with relevance to membrane potential. *CryoLetters*. 2020; 41 (4): 209–15.
 8. Dix JA, Solomon AK Role of membrane protein and lipids in water diffusion across cell membranes. *BBA*. 1984; 773: 219–30.
 9. Kuleshova LG, Kovalenko IF. Theoretical prediction of optimal cooling rates of cell suspensions. *Biophysical Bulletin*. 2008; 20(1): 56–64.
 10. Linnik TP, Bizikina OV. Cryopreservation of roosters sperm. I. Cytotoxicity of diols and amides. *Problems of Cryobiology*. 2001; 2: 72–9.
 11. Markin VS, Kozlov MM. Pore statistics in bilayer lipid membranes. *Biologicheskie membrany*. 1985; 2(2): 205–23.
 12. Mullen SF, Li M, Li Y, et al. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. *Fertil Steril*. 2008; 89:1812–25.
 13. Shevchenko NA, Strybul TF, Rozanov LF. Effect of multiatom alcohols, amides and DMSO on grape and potato meristems integrity. *Problems of Cryobiology*. 2004; 3: 79–85.
 14. Todrin AF, Popivnenko LI, Kovalenko SYe. Thermophysical properties of cryoprotectants. II. Dynamic viscosity of some cryoprotectants, their solutions and mixtures. *Problems of Cryobiology*. 2010; 20(3): 266–81.
 15. Todrin AF, Smolyaninova Yel, Timofeyava OV, et al. Physical-mathematical model of substance redistribution between the cell and its hypertonic solution environment of penetrating cryoprotectants with relevance to membrane potential. *CryoLetters*. 2020; 41 (4): 209–15.

