

УДК 57.043:51-76

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

Теоретична оцінка оптимальної лінійної швидкості охолодження суспензії клітин РК-15

UDC 57.043:51-76

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

Theoretical Estimation of Optimal Linear Cooling Rate for PK-15 Cell Suspension

Реферат: На збереженість клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи пошкоджуючих чинників. Перший тип кріопшкодженнь виникає під час кристалізації позаклітинного середовища і викликаний зневодненням клітин, підвищенням концентрації та іонної сили поза- та внутрішньоклітинних розчинів. При збільшенні швидкості охолодження ступінь пошкодженнь першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії пошкоджуючих чинників. Другий тип кріопшкодження – внутрішньоклітинна кристалізація, ймовірність якої зростає за високих швидкостей охолодження, вважається максимально згубною для клітин. У роботі визначено оптимальну лінійну швидкість охолодження клітин РК-15 за допомогою фізико-математичної моделі, яка описує ймовірність кріопшкодження клітин при лінійному режимі заморожування та ґрунтується на двохфакторній теорії кріопшкодження, термодинамічній теорії гомогенної кристалізації та загальній теорії процесів активаційного типу. Результати розрахунку показали, що в діапазоні швидкостей охолодження $<0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ кріопшкодження клітин РК-15 відбувається в основному внаслідок впливу ефектів розчину, а при швидкостях охолодження $>2,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ – переважно в результаті внутрішньоклітинної кристалізації. Залежність відсотка пошкоджених клітин від швидкості охолодження має порівняно широкий мінімум в діапазоні швидкостей охолодження $0,5 \dots 2,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Ключові слова: клітини РК-15, двохфакторна теорія кріопшкодження, внутрішньоклітинна кристалізація, ефекти розчину, фізико-математична модель.

Abstract: Preservation of cells during crystallization of the cell suspension is influenced by two types of damaging factors. The first type of cryoinjury occurs during the crystallization of the extracellular environment and is caused by dehydration of cells, increasing the concentration and ionic strength of extracellular and intracellular solutions. As the cooling rate rises, the damage rate of the first type decreases as a result of the reduced time of action of damaging factors. The second type of cryoinjury is intracellular crystallization, the probability of which enhances at high cooling rates, is considered the most destructive to cells. The optimal linear cooling rate for PK-15 cells is determined using a physico-mathematical model, which describes the probability of cryoinjury of cells in the linear freezing mode and is based on the two-factor theory of cryoinjury, thermodynamic theory of homogeneous crystallization and general theory of activation-type processes. The findings have shown that within the range of cooling rates $< 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ the cryoinjury of PK-15 cells occurs mainly due to the effects of the solution, and at cooling rates $> 2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ this was mainly resulted from an intracellular crystallization. The dependence of the percentage of damaged cells on the cooling rate has a relatively wide minimum within the range of cooling rates of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min} \dots 2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Key words: PK-15 cells, two-factor theory of cryoinjury, intracellular crystallization, solution effect, physical and mathematical model.

Наразі загальноприйнятим є уявлення про те, що найбільш суттєві чинники кріопшкодження клітин безпосередньо або опосередковано пов'язані з утворенням і ростом кристалів льоду у клітинній суспензії, яка заморожується [4, 5, 7, 14, 18]. Експериментально і теоретично показано, що збереженість клітин під час кріоконсервування куполоподібно залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації [14]. Оптимальну швидкість охолодження можна пояснити створеною Мейзуром двохфакторною теорією кріопшкодження [12]. Під час охолодження суспензії клітин до температури нижче точки замерзання клітини та їхнє навколишнє середо-

Currently, the most significant factors of cell cryoinjury are generally accepted to be directly or indirectly related to the formation and growth of ice crystals in the cell suspension, subjected to freezing [1, 2, 5, 13, 18]. It has been experimentally and theoretically shown that the safety of cells during cryopreservation depends in a dome-like mode on the cooling rate at the crystallization stage [13]. The optimal cooling rate can be explained by the two-factor theory of cryoinjury created by Mazur [11].

When the cell suspension is cooled to a temperature below freezing, the cells and their environment initially remain in an unfrozen supercooled

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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 14.07.2020

Прийнята до друку 31.08.2021

Received July, 14, 2020

Accepted August, 31, 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.

вище спочатку залишаються у незамороженому переохолодженому стані. Оскільки більш ефективні джерела утворення зародків льоду знаходяться у позаклітинному середовищі, то спочатку лід формується у позаклітинному розчині між -2 і -15°C , тоді як внутрішньоклітинний розчин залишається переохолодженим [9]. Внаслідок цього переохолоджена внутрішньоклітинна вода має вищий хімічний потенціал, ніж вода в частково замерзлому позаклітинному розчині, який знаходиться в рівновазі з фазою льоду. Хімічна рівновага може досягатися або проникненням внутрішньоклітинної води крізь мембранний бар'єр у позаклітинний розчин, або утворенням внутрішньоклітинного льоду. Спосіб, за допомогою якого досягається рівновага, зумовлений швидкістю охолодження клітин та здатністю води до виходу з клітини назовні. Це масоперенесення обмежується гідравлічною проникністю (L_p) плазматичної мембрани клітини та площею її поверхні, доступної для виходу води. Якщо вихідний потік води є недостатнім для встановлення хімічної рівноваги (у випадку високих швидкостей охолодження), то теплообмін домінуватиме над масообміном. Отже, внутрішньоклітинний розчин стане надмірно переохолодженим і буде формуватися внутрішньоклітинний лід. Якщо вихід води є достатнім (за більш низьких швидкостей охолодження), то масоперенесення превагуватиме над теплоперенесенням, зневоднення клітини буде забезпечувати підтримку хімічної рівноваги, що відтермінує утворення внутрішньоклітинного льоду. Проте, зрештою, за більш низьких температур внутрішньо- та позаклітинний розчини повністю затвердіють унаслідок формування евтектичної суміші.

Таким чином, на збереженість клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи пошкоджуючих чинників. Перший тип кріопшкоджень виникає під час кристалізації позаклітинного середовища і викликаний зневодненням клітин, підвищенням концентрації та іонної сили поза- та внутрішньоклітинних розчинів за рахунок перетворення частини розчинника у лід. За збільшення швидкості охолодження ступінь пошкоджень першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії пошкоджуючих чинників [8, 9]. Другий тип кріопшкодження клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, які викликають ті ж самі ефекти, що і чинники першого типу, і крім того здатні механічно руйнувати мембранні структури [4, 18]. Внутрішньоклітинна кристалізація, ймовірність якої зростає при високих швидкостях охолодження, вва-

state. Since the more efficient sources of ice germ formation are in the extracellular environment, ice is initially formed in the extracellular solution between -2 and -15°C , while the intracellular solution remains supercooled [8]. As a result, supercooled intracellular water has a higher chemical potential than that in a partially frozen extracellular solution that is in equilibrium with an ice phase. Chemical equilibrium can be achieved either by the penetration of intracellular water through the membrane barrier into the extracellular solution, or by the intracellular ice formation. The method by which equilibrium is achieved is determined by the rate of cell cooling and the ability of water to exit the cell. This mass transfer is limited by the hydraulic permeability (L_p) of the plasma membrane of the cell and its surface area available for water release. If the released water flow is insufficient to establish chemical equilibrium (in the case of high cooling rates), heat transfer will dominate over mass transfer. Therefore, the intracellular solution will become excessively supercooled and intracellular ice will form. If the water release is sufficient (at lower cooling rates), then mass transfer will prevail over heat transfer, dehydration of the cell will ensure the maintenance of chemical equilibrium, which delays the formation of intracellular ice. However, eventually, at lower temperatures, the intracellular and extracellular solutions solidify completely due to the formation of a eutectic mixture.

Thus, the preservation of cells during the crystallization of their suspension is influenced by two types of damaging factors. The first type of cryoinjury occurs during the crystallization of the extracellular environment and is caused by dehydration of cells, increasing the concentration and ionic strength of extracellular and intracellular solutions by converting part of the solvent into ice. With increasing cooling rate, the degree of damage of the first type decreases due to the reduced time of action of damaging factors [7, 8]. The second type of cryoinjury of cells is caused by the formation of intracellular ice crystals, which originate the same effects as the factors of the first type, and are also able to mechanically destroy membrane structures [1, 18]. Intracellular crystallization, the probability of which increases at high cooling rates, is considered the most destructive for cells [9, 13–16].

The purpose of this research was to determine the optimal linear cooling rate for PK-15 cells using a physico-mathematical model that describes the probability of cryoinjury of cells in the linear freezing mode and is based on the two-factor theory of cryoinjury, thermodynamic theory of



жається максимально згубною для клітин [10, 14–17].

Мета роботи – визначення оптимальної лінійної швидкості охолодження клітин РК-15 за допомогою фізико-математичної моделі, яка описує ймовірність кріопшкодження клітин при лінійному режимі заморожування та ґрунтується на двофакторній теорії кріопшкодження, термодинамічній теорії гомогенної кристалізації та загальній теорії процесів активаційного типу,

Теоретичне обґрунтування

Для теоретичної оцінки значення оптимальної з погляду двофакторної теорії кріопшкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії нами була розглянута ймовірність пошкодження клітин як факторами, пов'язаними з внутрішньоклітинною кристалізацією, так і з такими, що визначаються впливом позаклітинного розчину [6]. Для визначення швидкостей охолодження, за яких відбувається внутрішньоклітинна кристалізація і, отже, загибель клітин, була розглянута залежність ймовірності внутрішньоклітинної кристалізації від переохолодження внутрішньоклітинного розчину. Таку залежність визначали, спираючись на термодинамічну теорію утворення кристалів у розчинах і загальну теорію процесів активаційного типу [2]. У роботі Ye.O. Gordiyenko та співавт. [6] було отримано вираз для ймовірності утворення внутрішньоклітинного кристалу льоду в одиницю часу в пересиченому внутрішньоклітинному розчині:

$$W_1 = \frac{1}{\langle t \rangle_i} = \frac{[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2}{A} \exp \left\{ -\frac{B}{T^3 [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2} \right\}, \quad (1)$$

де $\langle t \rangle_i$ – середній час, необхідний для утворення кристала льоду в пересиченому бінарному водному розчині при температурі T ; A – постійна величина, яка має розмірність часу та забезпечує практично миттєву ($<0,1$ с) кристалізацію води за її максимально можливого (до -40°C)

переохолодження [6]; $\hat{c} \equiv \frac{c}{c_0}$, $\hat{c}(\hat{T})$ – концент-

рація позаклітинного розчину, за якої він знаходиться в термодинамічній рівновазі з льодом при температурі T ; c_0 – вихідна (до заморожування) концентрація розчиненої речовини позаклітин-

ного розчину; $\hat{T} = \frac{T}{T_{k0}}$ – приведена температура;

T – поточне значення розчину, T_{k0} – значення

homogeneous crystallization and general theory of activation-type processes.

Theoretical substantiation

To theoretically estimate the value of the optimal from the point of view of two-factor theory of cryoinjury cooling rate at linear freezing conditions of the cell suspension, we considered the probability of cell damage as factors associated with intracellular crystallization and those determined by the influence of extracellular solution [4]. To determine the cooling rates at which intracellular crystallization occurs and, consequently, cell death, the dependence of the probability of intracellular crystallization on the supercooling of the intracellular solution was considered. This dependence was determined based on the thermodynamic theory of crystal formation in solutions and the general theory of activation-type processes [6]. As it was reported [4], an expression was obtained for the probability of formation of an intracellular ice crystal per unit time in a supersaturated intracellular solution:

$$W_1 = \frac{1}{\langle t \rangle_i} = \frac{[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2}{A} \exp \left\{ -\frac{B}{T^3 [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2} \right\}, \quad (1)$$

where $\langle t \rangle_i$ is the average time required for an ice crystal formation in a supersaturated binary aqueous solution at a temperature of T ; A is a constant value that has the dimension of time and provides almost instantaneous (<0.1 s) seconds crystallization of water at its maximum possible (up to

-40°C) supercooling [4]; $\hat{c} \equiv \frac{c}{c_0}$, $\hat{c}(\hat{T})$ – concent-

ration of extracellular solution at which it is in thermodynamic equilibrium with ice at temperature T ; c_0 – initial (before freezing) concentration of so-

lute in the extracellular solution; $\hat{T} = \frac{T}{T_{k0}}$ – reduced

temperature; T is the current value of the solution, T_{k0} is the melting point of the solution;

$\hat{c}_{in} = \frac{c_{in}}{c_0}$ reduced concentration of solutes in intra-

cellular solution; c_{in} is the current value of the total molar fraction of substances dissolved inside the cell.

The probability of formation of an intracellular ice crystal in a supersaturated intracellular solution during the crystallization of the extracellular solution (W^*) is determined by the time integ-



температури плавлення розчину; $\hat{c}_{in} = \frac{c_{in}}{c_0}$ – приведена концентрація розчинених речовин у внутрішньоклітинному розчині; c_{in} – поточне значення сумарної мольної частки розчинених всередині клітини речовин.

Імовірність утворення внутрішньоклітинного кристалу льоду в пересиченому внутрішньоклітинному розчині за час кристалізації позаклітинного розчину (W^*) визначається інтегралом за часом (t) від моменту часу початку кристалізації (t_{k0}) в позаклітинному розчині до моменту часу (t_E), при якому температура позаклітинного розчину стає рівною його евтектичній температурі:

$$W^* = \int_{k_0}^{t_E} W_1 dt. \quad (2)$$

Оптимальним для запобігання пошкодженню клітин внутрішньоклітинними кристалами льоду є режим охолодження $T(t)$, при якому імовірність внутрішньоклітинної кристалізації мінімальна у порівнянні з іншими режимами охолодження:

$$W^* = \int_{k_0}^{t_E} [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2 \exp \left\{ -\frac{B}{T^3 [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2} \right\} dt \rightarrow \min. \quad (3)$$

Оскільки в рамках двохфакторної теорії кріопшкодження утворення кристалу льоду в клітині неминуче призводить до її загибелі, ймовірність W^* у формулах (2), (3) можна ототожити з ймовірністю загибелі клітини за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації. Крім того, оскільки в клітинній суспензії, яка заморожується, дуже велика кількість клітин, то їх сукупність можна розглядати як статистичний ансамбль і ототожити ймовірність W^* із часткою клітин, які пошкоджуються на етапі кристалізації клітинної суспензії в результаті внутрішньоклітинного льодоутворення.

Пошкодження клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії обумовлене не тільки утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, але й так званими ефектами розчину, внаслідок яких ступінь пошкодження клітин збільшується з підвищенням концентрації розчину, що контактує з клітинними структурами, і тривалістю експозиції клітин у ньому [11, 13]. Імовірність кріопшкодження клітин на етапі кристалізації ефектами розчину визначаємо найпростішою залежністю від концентрації внутрішньо- (c_{in}) і позаклітинного (\hat{c}) гіпертонічних розчинів та тривалості контакту з ними, яка враховує дві указані вище характерні особливості дії цього чинника на

ral (t) from the time of crystallization (t_{k0}) in the extracellular solution to the time (t_E) at which the extracellular solution temperature becomes equal to its eutectic temperature:

$$W^* = \int_{k_0}^{t_E} W_1 dt. \quad (2)$$

Optimal for preventing cell damage by intracellular ice crystals is the cooling mode $T(t)$, in which the probability of intracellular crystallization is minimal compared to other cooling modes:

$$W^* = \int_{k_0}^{t_E} [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2 \exp \left\{ -\frac{B}{T^3 [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2} \right\} dt \rightarrow \min. \quad (3)$$

Since, within the framework of the two-factor theory of cryoinjury, the formation of an ice crystal in a cell inevitably leads to its death, the probability of W^* in formulas (2), (3) can be identified with the probability one of cell death due to intracellular crystallization. In addition, since the cell suspension that is frozen contains a very large number of cells, the set of cells can be considered as a statistical ensemble and the probability of W^* can be identified with the proportion of cells damaged during crystallization of the cell suspension by intracellular ice formation.

Cell damage during crystallization of cell suspension is caused not only by the formation of intracellular ice crystals, but also by the so-called effects of the solution, as a result of which the degree of cell damage increases with a rise in concentration of solution in contact with cell structures and duration of cell exposure [10, 12]. The probability of cryoinjury of cells at the crystallization stage by the effects of solution is determined by the simplest dependence on the concentration of intra- (c_{in}) and extracellular (\hat{c}) hypertonic solutions and duration of contact with them, which takes into account the two characteristics of this factor on biological objects during cryopreservation:

$$W^{**} = \frac{1}{2D} \int_{k_0}^{t_E} (c_{in} \hat{c}) dt. \quad (4)$$

The constant D is equal to the duration of exposure of cells in a cryoprotective solution at its melting point, at which 50% of cells lose viability. The choice of subintegral expression as the product of concentrations of extracellular and intracellular solutions takes into account the fact that damage to structural and functional elements of the cell can occur as a result of direct contact of the outer surface of cell membrane with the surrounding solution and as a result of intracel-



біологічні об'єкти під час криоконсервування:

$$W^{**} = \frac{1}{2D} \int_{k_0}^{t_E} (\hat{c}_{in} \hat{c}) dt. \quad (4)$$

Константа D дорівнює тривалості експозиції клітин у криозахисному розчині за температури його плавлення, при якій життєздатність втрачають 50% клітин. Вибір підінтегрального виразу як добутку концентрацій поза- та внутрішньоклітинного розчинів враховує ту обставину, що пошкодження структурних та функціональних елементів клітини може відбуватись як в результаті безпосереднього контакту зовнішньої поверхні мембрани клітини з навколишнім розчином, так і внаслідок дії внутрішньоклітинного гіпертонічного розчину на субклітинні структури. У загальному випадку при заморожуванні клітин $c_{in} \neq c_{out}$.

Клітини РК-15 проявляють більшу чутливість до дії охолоджених розчинів, ніж винятково стійкі дріжджові клітини *Saccharomyces cerevisiae*, але є стійкішими за ентероцити миші [6]. Для них було вибрано проміжні значення константи D = 60, 300 та 600 хв.

Ефекти розчину і внутрішньоклітинна кристалізація пошкоджують клітини незалежно одне від одного, тому ймовірність (W) пошкодження клітин на етапі кристалізації при заморожуванні клітинної суспензії дорівнює сумі указаних вище ймовірностей (3) та (4): $W = W^* + W^{**}$. При заданій постійній швидкості охолодження

$$\frac{dT}{dt} = -\beta (\beta > 0) \text{ отримуємо:}$$

$$W = \frac{T_{k0}}{\beta A} \int_{k_0}^{t_E} [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2 \exp \left\{ -\frac{B}{T^3 [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2} \right\} d\hat{T} - \frac{T_{k0}}{2D\beta} \int_{k_0}^{t_E} (\hat{c}_{in} \hat{c}) d\hat{T} = \min. \quad (5)$$

Результати та обговорення

Для визначення на підставі одержаного виразу (5) залежності відсотка пошкоджених клітин від швидкості охолодження спочатку необхідно знайти залежності $\hat{c}(\hat{T})$ та $c_{in}(\hat{T})$. Клітини РК-15, які були отримані у відділі криоендокринології ІПКіК НАН України, зберігалися в низькотемпературному банку ІПКіК НАН України у криозахисному середовищі з 10% ДМСО. Формулу, що описує криву плавлення потрійного розчину «диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода», одержали шляхом апроксимації методом найменших квадратів поліномом другого ступеня [3]. Таким чином, одна з необхідних для оцінки

lular hypertonic solution. Generally when freezing cells this is $c_{in} \neq c_{out}$.

PK-15 cells are more sensitive to cooled solutions than exceptionally resistant *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, but are more resistant than mouse enterocytes [4]. Intermediate values of the constant D = 60, 300 and 600 min were chosen for them.

The effects of the solution and intracellular crystallization damage the cells independently of each other, so the probability (W) of cell damage at the stage of crystallization during freezing of the cell suspension is equal to the sum of the above probabilities (3) and (4): $W = W^* + W^{**}$. At a given

constant cooling rate $\frac{dT}{dt} = -\beta (\beta > 0)$ we obtain:

$$W = \frac{T_{k0}}{\beta A} \int_{k_0}^{t_E} [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2 \exp \left\{ -\frac{B}{T^3 [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}]^2} \right\} d\hat{T} - \frac{T_{k0}}{2D\beta} \int_{k_0}^{t_E} (\hat{c}_{in} \hat{c}) d\hat{T} = \min. \quad (5)$$

Results and discussion

To determine the dependence of the percentage of damaged cells on the cooling rate on the basis of the obtained expression (5), it is first necessary to find the dependences $\hat{c}(\hat{T})$ and $c_{in}(\hat{T})$. PK-15 cells, which were obtained at the Department of Cryoendocrinology of IPC&C of NAS of Ukraine, were stored at a low-temperature bank of IPC&C of NAS of Ukraine in a cryoprotective medium with 10% DMSO. The formula describing the melting curve of the ternary solution 'dimethyl sulfoxide – sodium chloride – water' was obtained by approximation by the least squares method by a polynomial of the second degree [15]. Thus, one of the needed to be estimated for the optimal constant cooling rate of the dependences in the case we are considering is:

$$\hat{c}(\hat{T}) = -83,595\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,355. \quad (6)$$

The second of the required dependences $c_{in} = c_{in}(\hat{T})$ described by the equations presented by Ye.O. Gordiyenko [3], which, taking into account the law of Arrhenius and the definition, lead to the expression:

$$\frac{d\hat{c}_{in}}{d\hat{T}} = \frac{T_{k0} \hat{c}_{in}^2 \exp \left[\frac{E}{RT_{k0}} \left(1 - \frac{1}{T} \right) \right]}{(1-\alpha) \tau_w (T_{k0}) \beta} [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}], \quad (7)$$

where τ_w and E – the characteristic time and energy of activation of the penetration of water



оптимальної постійної швидкості охолодження залежностей у випадку, який ми розглядаємо, має вигляд:

$$\hat{c}(\hat{T}) = -83,595\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,355. \quad (6)$$

Друга з шуканих залежностей $\hat{c}_{in} = \hat{c}_{in}(\hat{T})$ описується поданими у роботі Є.О. Гордієнка [1] рівняннями, які з урахуванням закону Ареніуса і визначення приводять до виразу:

$$\frac{d\hat{c}_{in}}{d\hat{T}} = \frac{T_{k0} \hat{c}_{in}^2 \exp\left[\frac{E}{RT_{k0}}\left(1 - \frac{1}{\hat{T}}\right)\right]}{(1-\alpha)\tau_w(T_{k0})\beta} [\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in}] \quad (7)$$

де τ_w і E – характерний час та енергія активації проникання молекул води крізь клітинну мембрану; R – універсальна газова стала.

Розв'язуючи це рівняння чисельно при різних швидкостях охолодження β і початкових умовах $\hat{c}_{in}(0) = 1$, $\hat{T}(0) = 1$ ($\hat{T}_E \leq \hat{T} \leq 1$) з урахуванням того, що для клітин РК-15 при заморожуванні у кріозахисному середовищі з 1М кріопротектором ДМСО $\alpha = 0,23$, $T_{k0} = 268,9$ К, $\hat{c}(\hat{T}) = -83,595\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,355$, $D = 60, 300, 600$ хв, $A = 0,15, 1,5, 15$ хв, та підставляючи отримані рішення в (5), знаходимо ймовірність пошкодження клітин РК-15 на етапі кристалізації.

На рис. 1 та 2 подані залежності ймовірності кристалотворення за різних швидкостей охолодження та значень коефіцієнта A , на рис. 3 і 4 – ймовірності пошкодження клітин РК-15 розчином ДМСО за різних швидкостей охолодження та значень коефіцієнта D . За різних постійних швидкостях охолодження β , значеннях $A = 0,15$ хв, $D = 300$ хв отримуємо залежність відсотка пошкоджених клітин двома типами чинників (рис. 5): внутрішньоклітинною кристалізацією (крива 3) та ефектами розчину (крива 2). Відсоток клітин, що пошкоджуються за рахунок сумарної дії обох типів чинників, представлений на рисунку кривою 1. Таким чином, розрахована оптимальна швидкість охолодження клітин РК-15 становить $-1^\circ\text{C}/\text{хв}$.

Як витікає з результатів розрахунку (рис. 5), за швидкостей охолодження $\beta \leq 0,5^\circ\text{C}/\text{хв}$ кріопошкодження клітин РК-15 відбувається тільки внаслідок ефектів розчину і визначається інтегралом (4), а за швидкостей охолодження $\beta \geq 2,5^\circ\text{C}/\text{хв}$ – переважно в результаті внутрішньоклітинної кристалізації і визначається інтегралом (3). Залежність сумарного внеску цих чинників у кріопошкодження клітин має порівняно широкий мінімум у діапазоні швидкостей охолодження $0,5 \dots 2,5^\circ\text{C}/\text{хв}$.

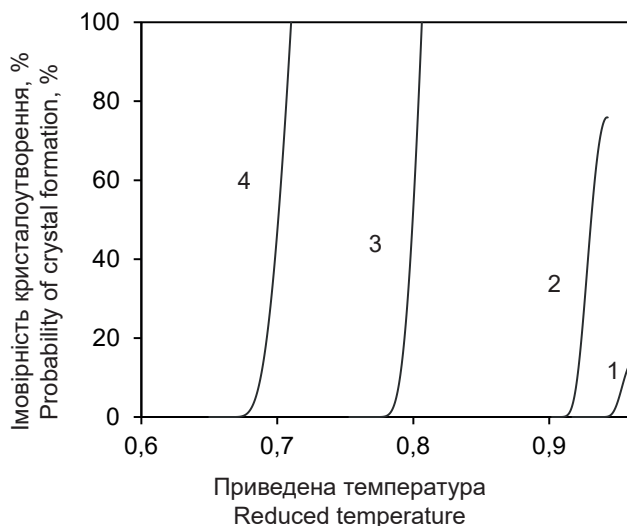


Рис. 1. Імовірність кристалотворення при різних швидкостях охолодження: 1 – $0,5^\circ\text{C}/\text{хв}$; 2 – $1^\circ\text{C}/\text{хв}$; 3 – $5^\circ\text{C}/\text{хв}$; 4 – $10^\circ\text{C}/\text{хв}$.

Fig. 1. Probability of crystal formation at different cooling rates: 1 – $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$; 2 – $1^\circ\text{C}/\text{min}$; 3 – $5^\circ\text{C}/\text{min}$; 4 – $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

molecules through the cell membrane; R – universal gas constant.

Solving this equation numerically at different cooling rates β and initial conditions, taking into account $c_{in}(0) = 1$, $\hat{T}(0) = 1$ ($\hat{T}_E \leq \hat{T} \leq 1$) the fact that for PK-15 cells when frozen in a cryoprotective medium with 1M cryoprotectant DMSO $\alpha = 0,23$, $T_{k0} = 268.9$ К, $\hat{c}(\hat{T}) = -83,595\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,355$, $D = 60, 300, 600$ min, $A = 0.15, 1.5, 15$ min and sub-

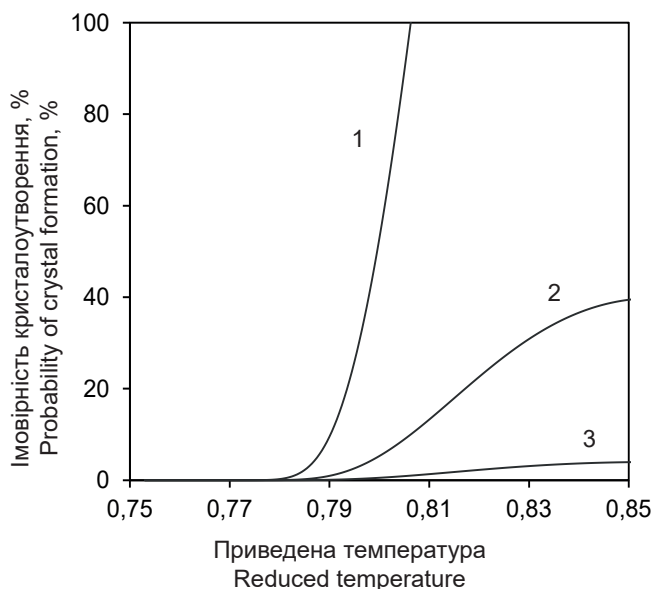


Рис. 2. Імовірність кристалотворення при різних значеннях коефіцієнта A : 1 – $0,15$ хв; 2 – $1,5$ хв; 3 – 15 хв.

Fig. 2. Probability of crystal formation at different values of the coefficient A : 1 – 0.15 min; 2 – 1.5 min; 3 – 15 min.



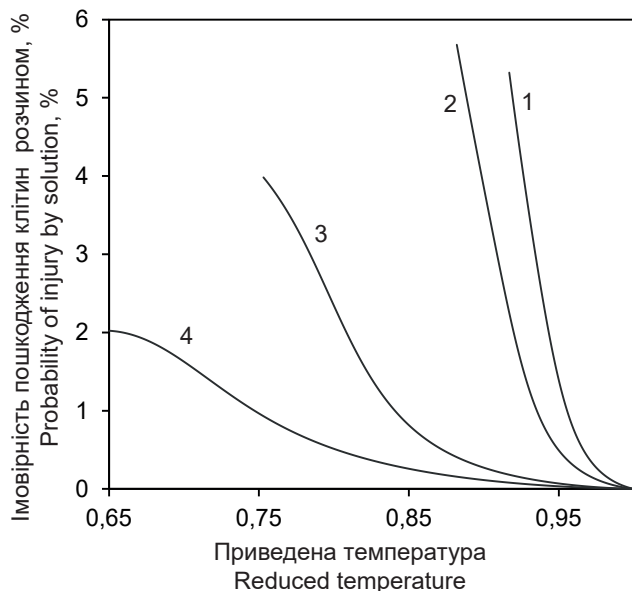


Рис. 3. Імовірність пошкодження клітин РК-15 розчином ДМСО при різних швидкостях охолодження: 1 – 0,5 °C/хв; 2 – 1 °C/хв; 3 – 5 °C/хв; 4 – 10 °C/хв.

Fig. 3. Probability of injury to PK-15 cells by DMSO solution at different cooling rates: 1 – 0.5 °C/min; 2 – 1 °C/min; 3 – 5 °C/min; 4 – 10 °C/min.

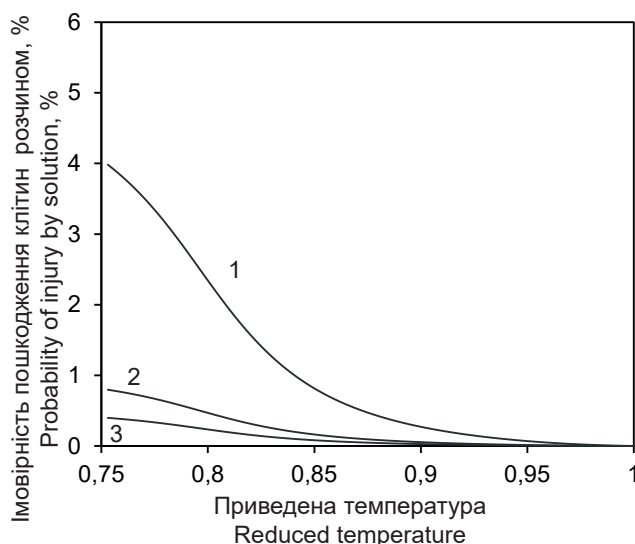


Рис. 4. Імовірність пошкодження клітин РК-15 розчином ДМСО при різних значеннях коефіцієнта D: 1 – 60 хв; 2 – 300 хв; 3 – 600 хв.

Fig. 4. Probability of injury to PK-15 cells by DMSO solution at different values of the coefficient D: 1 – 60 min; 2 – 300 min; 3 – 600 min.

Висновки

Таким чином, застосовані нами алгоритми теоретичної оцінки оптимального значення швидкості охолодження при лінійному режимі заморожування виявилися адекватними для суспензій кардинально відмінних клітин, які відрізняються за чутливістю до різних типів пошкоджуючих чинників. Отримані результати підтверджують

tituting the obtained solutions in (5), we find the probability of damage to PK-15 cells during the crystallization step.

Figs. 1 and 2 show the dependences of the probability of crystal formation at different cooling rates and values of the coefficient A, Figs. 3 and 4 demonstrate the probabilities of damage to PK-15 cells by DMSO solution at different cooling rates and values of coefficient D. At different constant cooling rates β , values of $A = 0.15$ min, $D = 300$ min we obtain the dependence of the percentage of damaged

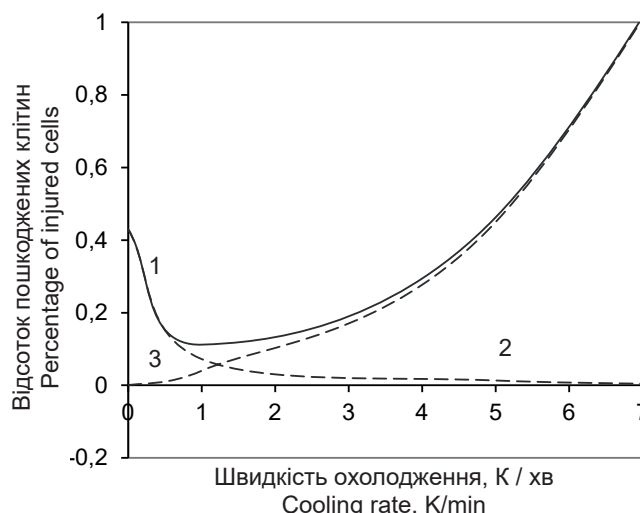


Рис. 5. Відсоток клітин, що пошкоджуються за рахунок сумарної дії (1) ефектів розчину (2) і внутрішньоклітинної кристалізації (3), залежно від швидкості охолодження при заморожуванні суспензії клітин РК-15 в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135M – вода».

Fig. 5. Percentage of cells damaged by the total action (1) of the effects of solution (2) and intracellular crystallization (3), depending on the cooling rate when freezing the suspension of PK-15 cells in a solution of 'dimethyl sulfide (10 volume%) – 0.135M – water'.

cells by two types of factors (Fig. 5): intracellular crystallization (curve 3) and the effects of solution (curve 2). The percentage of cells damaged by the combined action of both types of factors is shown in Figure 1. Thus, the calculated optimal cooling rate of PK-15 cells is $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

As follows from the findings (Fig. 5), at cooling rates of $\beta \leq -0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ cryoinjury of PK-15 cells occurs only due to the effects of the solution and is determined by the integral (4), and at cooling rates $\beta \leq 2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ this is mainly in the result of intracellular crystallization and is determined by the integral (3). The dependence of the total contribution of these factors to the cryoinjury of cells has a relatively wide minimum in the range of cooling rates of $0.5 \dots 2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.



придатність розробленої нами моделі для визначення оптимальної швидкості охолодження клітинної суспензії, що ґрунтується на двохфакторній теорії кріопошкодження, термодинамічній теорії гомогенної кристалізації та загальній теорії процесів активаційного типу.

Література

1. Гордієнко ЄО, Гордієнко ОІ, Марущенко ВВ, та ін. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини. Біофізичний Вісник. 2008; 21(2): 75–80.
2. Ландау ЛД, Лифшиц ЕМ. Статистическая физика. Ч.1. Москва: Наука; 1976. 584 с.
3. Тодрін АФ, Попівненко ЛІ, Коваленко СЕ. Теплофізическіє свойства криопротекторів. I. Температура и теплота плавления. Проблемы криобиологии. 2009; 19(2): 163–76.
4. Chang T, Zhao G. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. Adv Sci (Weinh). 2021; 8(6): 2002425.
5. Fahy GM, Wowk B. Principles of Ice-Free Cryopreservation by Vitrification. Methods Mol Biol. 2021; 2180: 27–97.
6. 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.
7. Hunt CJ. Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. Methods Mol Biol. 2017; 1590: 41–77.
8. Li R., Yu G., Azarin SM, Hubel A. Freezing Responses in DMSO-Based Cryopreservation of Human iPS Cells: Aggregates Versus Single Cells. Tissue Eng Part C Methods. 2018; 24(5): 289–99.
9. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. Cryobiology. 1966; 2: 181–92.
10. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates. Cryobiology. 1977; 14(2): 251–72.
11. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Cell Physiol. 1984; 247(3): 125–42.
12. Mazur P, Leibo SP, Chee EHY. A two factors hypothesis of freezing injury. Cell Res. 1972; 71: 345–85.
13. Moussa M, Dumont F, Ferrier-Cornet JM. Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. Biotechnol. Bioeng. 2008; 101(6): 1245–55.
14. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol. 2015; 1257: 3–19.
15. Poisson JS, Acker JP, Briard JG, et al. Modulating Intracellular Ice Growth with Cell-Permeating Small-Molecule Ice Recrystallization Inhibitors. Langmuir. 2019; 35(23): 7452–58.
16. Wesley-Smith J, Walters C, Pammenter NW, Berjak P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. Ann Bot. 2015; 115(6): 991–1000.
17. William N, Acker JP. Transient loss of membrane integrity following intracellular ice formation in dimethyl sulfoxide-treated hepatocyte and endothelial cell monolayers. Cryobiology. 2020; 97: 217–21.

Conclusion

Thus, the algorithms used by us to theoretically assess the optimal value of the cooling rate in the linear freezing mode were adequate for the suspensions of absolutely different cells, which differ in sensitivity to various types of damaging factors. The obtained results confirm the suitability of the model developed by us for determining the optimal cooling rate of the cell suspension, based on the two-factor theory of cryopreservation, thermodynamic theory of homogeneous crystallization and general theory of activation-type processes.

References

1. Chang T, Zhao G. Ice Inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. Adv Sci (Weinh). 2021; 8(6): 2002425.
2. Fahy GM, Wowk B. Principles of ice-free cryopreservation by vitrification. Methods Mol Biol. 2021; 2180: 27–97.
3. Gordiyenko YeO, Gordiyenko OI, Maruschenko VV, et al. An improved model of passive mass transfer across the plasma membrane of the cell. Biophys Bull. 2008; 21(2): 75–80.
4. 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.
5. Hunt CJ. Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. Methods Mol Biol. 2017; 1590: 41–77.
6. Landau LD, Lifshitz EM [Statistical physics]. M.: Nauka; 1976. 584c. Russian.
7. Li R., Yu G., Azarin SM, Hubel A. Freezing responses in DMSO-based cryopreservation of human iPS cells: aggregates versus single cells. Tissue Eng Part C Methods. 2018; 24(5):289–99.
8. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. Cryobiology. 1966; 2: 181–92.
9. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates. Cryobiology. 1977; 14(2): 251–72.
10. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Cell Physiol. 1984; 247(3): 125–42.
11. Mazur P, Leibo SP, Chee EHY. A two factors hypothesis of freezing injury. Cell Res. 1972; 71: 345–85.
12. Moussa M, Dumont F, Ferrier-Cornet JM. Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. Biotechnol Bioeng. 2008; 101(6): 1245–55.
13. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol. 2015; 1257: 3–19.
14. Poisson JS, Acker JP, Briard JG, et al. Modulating intracellular ice growth with cell-permeating small-molecule ice recrystallization inhibitors Langmuir. 2019; 35(23): 7452–58.
15. Todrin AF, Popivnenko LI, Kovalenko SYe. Therm physical properties of cryoprotectants. I. Temperature and heat of melting. Problems of Cryobiology. 2009; 19(2): 163–76.
16. Wesley-Smith J, Walters C, Pammenter NW, Berjak P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. Ann Bot. 2015; 115(6): 991–1000.



18. Yu G, Yap YR, Pollock K, Hubel A. Characterizing Intracellular Ice Formation of Lymphoblasts Using Low-Temperature Raman Spectroscopy. *Biophys J.* 2017; 112(12): 2653–63.
17. William N, Acker JP. Transient loss of membrane integrity following intracellular ice formation in dimethyl sulfoxide-treated hepatocyte and endothelial cell monolayers. *Cryobiology.* 2020; 97: 217–21.
18. Yu G, Yap YR, Pollock K, Hubel A. Characterizing intracellular ice formation of lymphoblasts using low-temperature Raman Spectroscopy. *Biophys J.* 2017; 112(12): 2653–63.

