

## Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО

UDC 57.043:579.2:57.086.8

I.F. KOVALENKO\*, S.V. KOSCHIY, E.V. TIMOFEEVA, A.V. SAKUN,  
S.YE. KOVALENKO, I.P. VYSEKANTSEV, L.F. ROZANOV

## Permeability of SPEV Cell Membranes for Water and DMSO Molecules

С использованием метода волюмометрии определены коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО. Установлено, что при увеличении размеров клеток проницаемость их мембран для молекул ДМСО уменьшается. Численное моделирование осмотического поведения клеток СПЭВ при замораживании в присутствии ДМСО показало, что при охлаждении со скоростью 1°C/мин дегидратация клеток СПЭВ происходит в диапазоне температур -7,5...-13°C, а увеличение скорости охлаждения до 5°C/мин и выше может стать причиной внутриклеточной кристаллизации.

**Ключевые слова:** коэффициенты проницаемости, клетки СПЭВ, волюмометрия.

З використанням методу волюмометрії визначені коефіцієнти проникності мембран клітин СПЕВ для молекул води та ДМСО. Встановлено, що при збільшенні розмірів клітин проникність їх мембран для молекул ДМСО зменшується. Чисельне моделювання осмотичної поведінки клітин СПЕВ при заморожуванні в присутності ДМСО показало, що при охолодженні зі швидкістю 1°C/хв дегідратація клітин СПЕВ відбувається в діапазоні температур -7,5...-13°C, а збільшення швидкості охолодження до 5°C/хв і вище може бути причиною внутрішньоклітинної кристалізації.

**Ключові слова:** коефіцієнти проникності, клітини СПЕВ, волюмометрія.

Using the volumetry method there were defined the permeability coefficients of SPEV cell membranes for water and DMSO. It has been established that with increasing the volumes of cell dimensions their membrane permeability for DMSO molecules reduces. Numeric modeling of osmotic behavior of SPEV cells during freezing in DMSO presence has shown that during cooling with 1°C/min the dehydration of SPEV cells occurs within the temperature range of -7.5...-13°C and the rise of cooling rate up to 5°C/min and higher may be the cause of intracellular crystallization.

**Keywords:** permeability coefficients, SPEV cells, volumetry.

Перевиваемые клеточные культуры часто используются как модель для решения многих проблем общебиологического значения, таких как дифференцировка клеток, межклеточные контакты, канцерогенез, передача наследственной информации, получение высокоэффективных вакцин и противовирусных препаратов в достаточном количестве. Известно, что клетки в процессе длительного культивирования могут изменять свои исходные свойства [2]. В связи с этим актуально создание криобанков перевиваемых клеточных культур, а также разработка новых эффективных и надежных методов криоконсервирования этих клеток.

Большинство известных методов криоконсервирования перевиваемых клеточных культур базируется на эмпирическом подходе, использовании интуитивных представлений о путях оптимизации условий криоконсервирования. Но такой метод не

Inoculated cell cultures are frequently used as the model for solving many tasks of general biological value, such as cell differentiation, intercellular contacts, cancerogenesis, transfer of hereditary information, obtaining of highly efficient vaccines and anti-viral formulations in a sufficient quantity. It is known that the cells during long-term culturing may change their initial properties [2]. In this connection the establishment of cryobanks of inoculated cell cultures has become an actual task, as well as the development of new effective and reliable cryopreservation protocols for these cells.

The majority of available cryopreservation methods for inoculated cell cultures is based on empirical approach using intuitive notions about the ways of optimizing the cryopreservation conditions. However this method does not answer the question about admissible limits of varying different factors during cryopreservation.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38  
(057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373  
3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

даёт ответа на вопрос о допустимых пределах варьирования различных факторов при криоконсервировании.

Основой поиска оптимальных методических решений при разработке методов криоконсервирования может стать экспериментально-теоретический подход, использующий модифицированную физико-математическую модель Кедем-Качальского [1]. Такой подход направлен на оптимизацию процессов массообмена в системе “клетка – окружающая среда” в цикле криоконсервирования и требует конкретизации данных о составе вне- и внутриклеточной среды, проницаемости и морфометрических параметрах клеток. Актуальность исследований процессов массообмена определяется и тем, что они, согласно двухфакторной теории криоповреждения, являются основными при оптимизации условий криоконсервирования [1].

Цель работы – определение коэффициентов проницаемости клеток СПЭВ для молекул воды и диметилсульфоксида, а также моделирование их осмотического поведения при криоконсервировании с использованием полученных коэффициентов проницаемости.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки перевиваемой клеточной культуры СПЭВ (эмбриональная почка свиньи), диаметр которых в эксперименте составлял 14–22 мкм.

Перевиваемая клеточная линия СПЭВ была выращена в культуральных матрасах в среде 199 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 100 ед/мл канамицина. Клетки инкубировали при 37°C до образования монослоя, затем переводили в суспензионное состояние, обрабатывая монослой смесью раствора Версена с трипсином (4:1) [3].

Исследования проводили на инвертированном микроскопе МБИ-13 (“ЛОМО”). Для изучения динамики осмотической реакции клеток СПЭВ на добавление 1М раствора ДМСО суспензию клеток фотографировали через определенные промежутки времени. Полученные данные представляли в виде зависимостей относительных объемов отдельных клеток от времени экспозиции в растворе ДМСО.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток СПЭВ для молекул воды  $L_p$  и криопротектора  $K_p$  определяли, сопоставляя экспериментальные значения изменения относительного объема клетки от времени экспозиции  $y(t)$  с решениями уравнений теоретической модели для заданных экспериментальных условий.

Процессы массопереноса через клеточные мембраны при наличии одного проникающего и

The basis of the search for optimal methodical solutions during the development of cryopreservation protocols may be a combined experimental and theoretical approach using modified physical-mathematical model of the Kedem-Katchalsky one [1]. This approach is directed to optimize the processes of mass exchange in the “cell-environment” system in cryopreservation cycle and requires the specifying of the data on the composition of extra- and intracellular medium, permeability and morphometric parameters of cells. The actuality of studying the mass exchange processes is determined by the fact that according to two-factor theory of cryodamage they are the main ones during optimization of cryopreservation conditions [1].

The research aim is examining the permeability coefficients of SPEV cells for water and DMSO molecules, as well as modeling their osmotic behavior during cryopreservation using the obtained permeability coefficients.

### Materials and methods

The cells of SPEV, inoculated cell culture (porcine embryonic kidney) served as the research object, their diameter in the experiment made 14–22  $\mu\text{m}$ .

Inoculated cell line SPEV was grown in cultural flask in medium 199 with adding 10% fetal calf serum and 100 units/ml kanamycin. The cells were incubated at 37°C up to the formation of monolayer, afterwards they were transferred into suspension state with treating the monolayer with the mixture of Versene solution and trypsin (4:1) [3].

The studies were performed with inverted microscope MBI-13 (“LOMO”, Russia). To examine the dynamics of osmotic reaction of SPEV cells on the adding of 1M DMSO solution the cell suspension was photographed in certain time periods. The obtained data were represented as the dependences of relative volumes of separate cells on exposure time in DMSO solution.

The permeability coefficients of plasma membranes of SPEV cells for water molecules  $L_p$  and cryoprotective agent  $K_p$  were examined by comparing the experimental values of the changes in cell relative volume on exposure time  $y(t)$  with solving the equations of theoretical model for the set experimental conditions.

The processes of mass transfer via cell membranes in the presence of one penetrating agent and those non-penetrating are described by the system of equations [1]:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[ \sigma_1 (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - 1 \right] \\ \frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{dt} = -\frac{1}{\tau_1} \left[ (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y-\alpha} \end{array} \right.$$

непроникающего вещества описываются системой уравнений [1]:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[ \sigma_1 (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - 1 \right] \\ \frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{dt} = -\frac{1}{\tau_1} \left[ (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y-\alpha}, \end{cases}$$

где  $y$  – относительный объём клетки ( $y = V/V_0$ ;  $V_0$  – начальный объём клетки);  $\tau_0$  и  $\tau_1$  – комплексы параметров  $\tau_0 = 1/L_p \gamma_0 \pi_0^{in}$ ,  $\tau_1 = 1/K_p \gamma_0$ ;  $\gamma_0$  – поверхностно-объёмное отношение клетки

$$\gamma_0 = \frac{S_0}{V_0} = \frac{4r^2}{4/3r^3} = \frac{3}{r} = \frac{6}{D};$$

$\gamma_1$  – коэффициент отражения для проникающего через мембрану вещества;  $\pi_0^{in}$  – осмотическое давление изотонического раствора;  $\hat{\pi}_1^{out}$  и  $\hat{\pi}_1^{in}$  – приведенное осмотическое давление первого растворённого вещества вне- и внутри клетки соответственно ( $\hat{\pi}_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_0^{in}$ ,  $\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_0^{in}$ );  $\alpha$  – объёмная доля осмотически неактивных веществ внутри клетки.

Значение  $\alpha$  определяли экстраполяцией нанесенной на график зависимости относительного объема клеток от  $\pi_0^{in}/\pi$  ( $\pi$  – осмотическое давление гипертонического внеклеточного раствора хлористого натрия) к нулевому значению аргумента.

Коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ определяли, решая дифференциальные уравнения. Коэффициент отражения клеточной мембраны  $\sigma_1$  во всех расчётах принимали равным 0,95.

Используемая нами физико-математическая модель достаточно адекватно описывает и осмотическое поведение клеток на этапе замораживания. Решениями модели при известных значениях  $L_p$  и  $K_p$  являются зависимости  $y(T)$ ,  $\pi_1^{in}(T)$  и  $\pi_2^{in}(T)$  от температуры. Такие решения несложно получить для линейных режимов охлаждения, перейдя к новым переменным:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{dT}{\beta} = \frac{dy}{dT} \beta,$$

где  $\beta$  – скорость охлаждения ( $\beta = dT/dt$ );

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp\left[-\frac{U_0}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T}\right)\right];$$

where  $y$  is cell relative volume  $y = V/V_0$ , here  $V_0$  – initial cell volume;  $\tau_0$  and  $\tau_1$  – the complexes of parameters  $\tau_0 = 1/L_p \gamma_0 \pi_0^{in}$ ,  $\tau_1 = 1/K_p \gamma_0$ , here  $\gamma_0$  – cell surface to volume ratio

$$\gamma_0 = \frac{S_0}{V_0} = \frac{4}{3} \frac{r^2}{r^3} = \frac{3}{r} = \frac{6}{D};$$

$\gamma_1$  – reflection coefficient for penetrating through membrane substance;  $\pi_0^{in}$  – osmotic pressure of isotonic solution;  $\pi_1^{out}$  and  $\pi_1^{in}$  are values of normalized pressure of the first dissolved substance out- and inside the cell, correspondingly ( $\hat{\pi}_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_0^{in}$ ,  $\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_0^{in}$ );  $\alpha$  – volumetric share of osmotically inactive substance inside a cell.

The value  $\alpha$  was found with extrapolation of plotted dependence of relative volume of cells from  $\pi_0^{in}/\pi$  ( $\pi$  is osmotic pressure of hypertonic extracellular solution of sodium chloride) to zero value of the argument.

Permeability coefficients of SPEV cell membranes were examined by solving the differential equations. The reflection coefficient of cell membrane  $\sigma_1$  in all the calculations was assumed as equal to 0.95.

Used by us physical-mathematical model quite adequately describes the osmotic behavior of cells at freezing stage. The solutions of the model at the known values  $L_p$  and  $K_p$  are the dependences  $y(T)$ ,  $\pi_1^{in}(T)$  and  $\pi_2^{in}(T)$  on temperature. These solutions can be easily obtained for linear cooling regimens changing to new variables:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{dT}{\beta} = \frac{dy}{dT} \beta,$$

where  $\beta$  is cooling rate ( $\beta = dT/dt$ );

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp\left[-\frac{U_0}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T}\right)\right];$$

$$K_p(T) = K_p(T_0) \exp\left[-\frac{U_1}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T}\right)\right];$$

where  $T_0$  – initial temperature of cell suspension;  $U_0$  and  $U_1$  – activation energies of transfer of water molecules and dissolved substance through plasma membrane, correspondingly;  $R_0$  – universal gas constant.

Osmotic behavior of cells during freezing with various rates was forecasted by the insertion of the found values  $L_p$  and  $K_p$  into the model equation.

The system of differential equations describing the kinetics of the change of cell relative volume and concentration of penetrating through plasma membrane substance inside a cell during extracellular crystallization has the appearance [1]:

$$K_p \left[ T \right] K_p \left[ T_0 \right] \exp \left[ \frac{U_1}{R_0 T_0} - \frac{T_0}{T} \right],$$

где  $T_0$  – исходная температура клеточной суспензии;  $U_0$  и  $U_1$  – энергии активации процесса переноса через плазматическую мембрану молекул воды и растворённого вещества соответственно;  $R_0$  – универсальная газовая постоянная.

Прогнозирование осмотического поведения клеток при замораживании с различными скоростями осуществляли, подставляя в уравнения модели найденные значения  $L_p$  и  $K_p$ .

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику изменения относительного объема клетки и концентрацию проникающего через плазматическую мембрану вещества внутрь клетки в процессе внеклеточной кристаллизации, имеет вид [1]:

$$\frac{dy}{d\hat{T}} = p \exp \left[ a(\hat{T}-1)/\hat{T} \right] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[ 1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \hat{\pi}_2^{out} \right\},$$

$$\frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{d\hat{T}} = \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{out}) \hat{\pi}_2^{out} \right] \times \right. \\ \left. \times [(1-\sigma_1)\hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{in}] \times \right.$$

$$\left. \times \exp[\alpha(\hat{T}-1)/\hat{T}] - q(\hat{\pi}_1^{in} - \Phi_{out}\hat{\pi}_2^{out}) \exp[b(\hat{T}-1)/\hat{T}] \right\};$$

где  $\hat{T}$  – относительная температура суспензии ( $\hat{T} = T/T_0$ );  $g_0$  – начальное значение отношения суммарного объема клеток к полному объему системы;  $p, q, a, b$  – безразмерные комплексы:

$$p \approx \frac{T_0}{\Delta T_0}, \quad q \approx \frac{\Delta_0(T_0)}{\Delta_1(T_0)}, \quad a \approx \frac{U_0}{R_0 T_0}, \quad b \approx \frac{U_1}{R_0 T_0}.$$

Кинетику изменения концентрации внеклеточного раствора в процессе замораживания задавали при расчетах аналитически путем аппроксимации фазовой диаграммы плавления водного раствора ДМСО [2] в следующем виде:

$$C = 1,273 \cdot 10^{-5} \times T^4 - 0,0128 \times T^3 + 4,8324 \times T^2 - 801,939 \times T + 49674,1;$$

где  $T$  – текущая температура.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5%.

$$\frac{dy}{d\hat{T}} = p \exp \left[ a(\hat{T}-1)/\hat{T} \right] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[ 1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \hat{\pi}_2^{out} \right\};$$

$$\frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{d\hat{T}} = \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{out}) \hat{\pi}_2^{out} \right] \times \right. \\ \left. \times [(1-\sigma_1)\hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{in}] \times \right.$$

$$\left. \times \exp[\alpha(\hat{T}-1)/\hat{T}] - q(\hat{\pi}_1^{in} - \Phi_{out}\hat{\pi}_2^{out}) \exp[b(\hat{T}-1)/\hat{T}] \right\};$$

where  $\hat{T}$  – relative temperature of suspension ( $\hat{T} = T/T_0$ );  $g_0$  – initial value of the ratio of total cell volume to bulk volume of the system;  $p, q, a, b$  – dimensionless complexes:

$$p \approx \frac{T_0}{\Delta T_0}, \quad q \approx \frac{\Delta_0(T_0)}{\Delta_1(T_0)}, \quad a \approx \frac{U_0}{R_0 T_0}, \quad b \approx \frac{U_1}{R_0 T_0}.$$

The kinetics of changes in concentration of extracellular solution during freezing was determined when calculating analytically by means of approximation of phase diagram of melting for aqueous solution of DMSO [2] as follows:

$$C = 1.273 \cdot 10^{-5} \times T^4 - 0.0128 \times T^3 + 4.8324 \times T^2 - 801.939 \times T + 49674.1;$$

where  $T$  – current temperature.

The results of experiments were statistically processed using the method of Student-Fisher. The statistical significance of differences was assessed by means of t-criterion with 5% significance level.

## Results and discussion

When processing the obtained dependences of SPEV cell relative volume on exposure time in 1M DMSO solution its has been found that the cells of various sizes recover the volumes with different rates. In this connection we attempted to use the differential approach when defining the permeability coefficients for the cells with different sizes.

Fig. 1 shows the characteristic experimental dependences of the volume changes for the cells with different sizes vs. the contact time with DMSO solution and the theoretical curves, extrapolating osmotic behavior of cells. It has been established that the cell rehydration time with big initial volume after dehydration phase increases. According to calculations of the permeability coefficients this dependence is associated not only to lesser surface-volume ratio of big size cells, but also likely to the change of properties



## Результаты и обсуждение

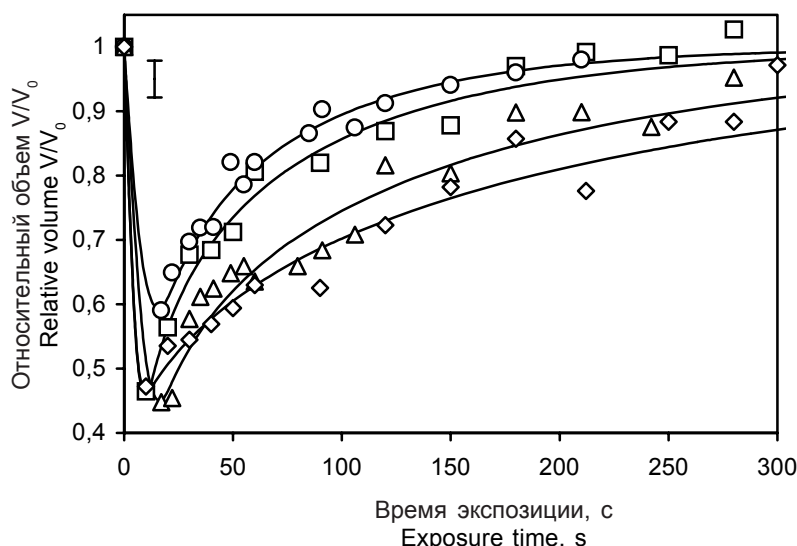
При обработке полученных зависимостей относительного объема клеток СПЭВ от времени экспозиции в 1М растворе ДМСО установлено, что клетки разных размеров восстанавливают объем с разной скоростью. В связи с этим мы предприняли попытку подойти к определению коэффициентов проницаемости клеток разных размеров дифференцированно.

На рис. 1 представлены характерные экспериментальные зависимости изменения объемов клеток разных размеров от времени контакта с раствором ДМСО и экстраполирующие осмотическое поведение клеток теоретические кривые. Установлено, что время регидратации клеток с большим исходным объемом после фазы дегидратации увеличивается. Согласно расчетам коэффициентов проницаемости такая зависимость связана не только с меньшим поверхностно-объемным отношением клеток больших размеров, но и, по-видимому, с изменением свойств, определяющих проницаемость мембран для молекул ДМСО.

В таблице приведены средние значения коэффициентов проницаемости клеток разных размеров для молекул воды и ДМСО. Коэффициент фильтрации мембран клеток разных размеров имеет пределы  $(5,30 \pm 3,20) \times 10^{14} \div (14,3 \pm 5,2) \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ . При этом, хотя и имеются достоверные отличия между отдельными группами клеток, зависимость  $L_p$  от размера клетки выражена неявно. В то же время с увеличением размеров клеток коэффи-

Значения коэффициентов проницаемости клеток разных диаметров для молекул воды и ДМСО  
Values of permeability coefficients of cells of different diameters for water and DMSO molecules

Диаметр клетки D, мкм Cell diameter D, $\mu\text{m}$	Коэффициент фильтрации, $L_p \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ Filtration coefficient, $L_p \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{N}\cdot\text{s}$	Коэффициент проницаемости для ДМСО, $K_p \times 10^8 \text{ м/с}$ Permeability coefficient for DMSO, $K_p \times 10^8 \text{ м/s}$
14,4 $\pm$ 0,47	5,41 $\pm$ 0,58	12,00 $\pm$ 4,00
15,9 $\pm$ 0,50	8,28 $\pm$ 2,57	7,36 $\pm$ 2,07
17,9 $\pm$ 0,74	5,30 $\pm$ 3,20	4,61 $\pm$ 0,50
20,3 $\pm$ 0,82	14,3 $\pm$ 5,2	3,80 $\pm$ 0,60



**Рис. 1.** Характерные экспериментальные зависимости относительных объемов клеток СПЭВ от времени контакта с раствором ДМСО и теоретические кривые, экстраполирующие осмотическое поведение клеток (средние диаметры клеток, мкм: 1 – 14,4; 2 – 15,9; 3 – 17,9; 4 – 20,3).

**Fig. 1.** Characteristic experimental dependences of relative volumes of SPEV cells on time of contact with DMSO solution and theoretical curves extrapolating osmotic behavior of cells, mean diameters of cells,  $\mu\text{m}$  (1 – 14.4; 2 – 15.9; 3 – 17.9; 4 – 20.3).

determining the permeability of membranes for DMSO molecules.

The table covers the mean values of permeability coefficients of the cells with different sizes for water and DMSO molecules. Filtration coefficient of cell membranes of different sizes has the limits  $(5.30 \pm 3.20) \times 10^{14} \div (14.3 \pm 5.2) \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{N}\cdot\text{s}$ . Herewith though there are significant differences between some groups of cells, the  $L_p$  dependence on cell size is slightly manifested. At the same time with the rise of cells sizes the permeability coefficient of their membranes for DMSO molecules reduces, however the statistically significant differences are found only for the cells, the sizes of those significantly differ.

Using the calculated permeability coefficients and corresponding geometrical cell parameters there was modeled osmotic behavior of cells at the stage of their freezing with different cooling rates.

Fig. 2 shows the dependence of relative volume of SPEV cells with average sizes of 14.4; 15.9 and 20.3  $\mu\text{m}$  on temperature during cooling with the rates of 1, 5 and 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ . The presented data testify to the fact that with the rising of the cell size its dehydration rate during freezing increases slightly. With cooling rate of 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$  large cells approach the extreme dehydration during cooling down to  $-7.5$  and the small ones down to  $-12.8^\circ\text{C}$ , with the cooling rate of 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$  the dehydration period extends down to  $-23.8$  and to  $-38.3^\circ\text{C}$ , correspondingly, with the cooling rate of 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$  the dehydration rate of cells within the subzero temperature range is insignificant.

циент проницаемости их мембран для молекул ДМСО уменьшается, однако достоверные отличия обнаруживаются только для клеток, размеры которых значительно отличаются.

Используя вычисленные коэффициенты проницаемости и соответствующие геометрические параметры клеток, моделировали осмотическое поведение клеток на этапе их замораживания с различными скоростями охлаждения.

На рис. 2 представлены зависимости относительного объема клеток СПЭВ со средними размерами 14,4; 15,9 и 20,3 мкм от температуры при охлаждении со скоростями 1, 5 и 10°С/мин. Представленные данные свидетельствуют о том, что с увеличением размера клетки скорость её обезвоживания при замораживании возрастает незначительно. Со скоростью охлаждения 1°С/мин крупные клетки достигают предельного уровня обезвоживания при охлаждении до -7,5°С, а мелкие – до -12,8°С, со скоростью охлаждения до 5°С/мин диапазон обезвоживания расширяется до -23,8°С и до -38,3°С соответственно, при скорости охлаждения 10°С/мин степень обезвоживания клеток в диапазоне субнулевых температур незначительна.

Таким образом, в результате охлаждения клеток СПЭВ со скоростями выше 1°С/мин вероятность внутриклеточного кристаллообразования может увеличиваться из-за роста внутриклеточного переохлаждения, снижению уровня которого способствует дегидратация. Этот прогноз согласуется с данными проведенных нами криомикроскопических исследований [4].

### Выводы

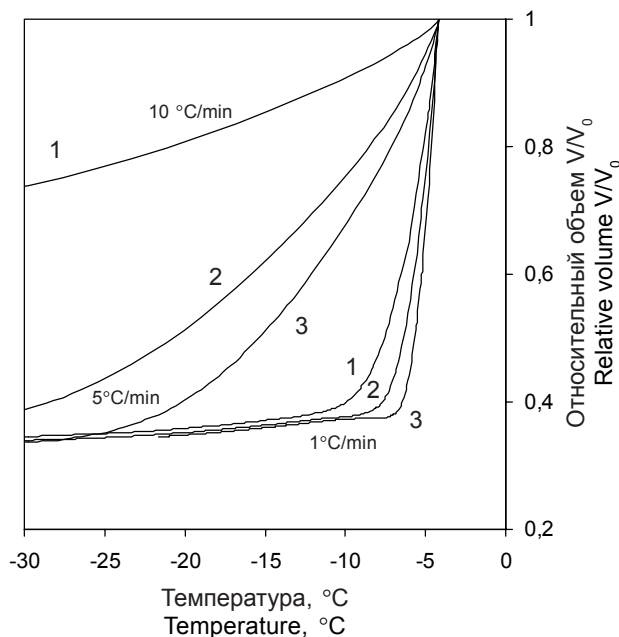
1. С использованием метода волюмометрии и уравнений термодинамики необратимых процессов определены коэффициенты проницаемости клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО.

2. Установлена зависимость транспортных характеристик мембран клеток СПЭВ в несинхронизированной культуре от размера клеток.

3. Результаты теоретического прогнозирования осмотического поведения клеток СПЭВ при замораживании в присутствии ДМСО с использованием определенных коэффициентов проницаемости показали, что при охлаждении клеток СПЭВ со скоростями выше 1°С/мин причиной внутриклеточной кристаллизации может быть недостаточная дегидратация клеток в процессе замораживания.

### Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев:Наук. думка, 1994. – 142 с.



**Рис. 2.** Зависимости относительных объемов клеток СПЭВ от температуры при охлаждении со скоростями 1, 5 и 10°С/мин (средние диаметры клеток, мкм: 1 – 14,4; 2 – 15,9; 3 – 20,3).

**Fig. 2.** Dependences of relative volumes of SPEV cells on temperature during cooling with rates of 1, 5 and 10°С/min (mean diameters of cells, μm: 1– 14.4; 2 – 15.9; 3 – 20.3).

Thus resulted from the cooling of SPEV cells with the rates higher than 1°С/min the probability of intracellular crystal formation may be increased, the reduced level of which is contributed by dehydration. This forecast conforms with our cryomicroscopic findings [4].

### Conclusions

1. Using the volumetry method and the thermodynamic equations of irreversible processes there were defined the coefficients of permeability of SPEV cells for water and DMSO molecules.

2. The dependence of transport characteristics of SPEV cell membranes in non-synchronized culture on cell size has been found.

3. The results of theoretical prediction of osmotic behavior of SPEV cells during freezing in DMSO presence using certain permeability coefficients have shown that during cooling of SPEV cells with the rates higher than 1°С/min the cause of intracellular crystallization may be insufficient dehydration of cells during freezing.

### References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical bases of low temperature preservation of cell suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 142 p.
2. Zakharov A.F. Late reduplication of chromosome in cultured cells of Chinese hamster // Tsytologiya. – 1966. – Vol. 8, N2. – P. 201–207.

2. Захаров А.Ф. Поздняя редупликация хромосом в культивируемых клетках китайского хомячка // Цитология.– 1966.– Т. 8, №2.– С. 201–207.
3. Криобиология и криотехнология / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
4. Розанов Л.Ф., Высеканцев И.П., Петренко Т.Ф. и др. Чувствительность клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и грибов *Candida albicans* к процессам вне- и внутриклеточной кристаллизации // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 18–25.
3. *Cryobiology and cryotechnology* / Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova Dumka, 1987.– 216 p.
4. Rozanov L.F., Vysekantsev I.P., Petrenko T.F. et al. Sensitivity of cells of inoculated cell line of SPEV and *Candida albicans* fungi to the processes of extra- and intracellular crystallization // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 18–25.

*Accepted in 15.01.2008*

*Поступила 15.01.2008*  
*Рецензент А.В. Пахомов*