

УДК 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

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

Коефіцієнти проникності мембран ентероцитів миші для води і криопротекторів

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

V.V. Ogurtsova, S.Ye. Kovalenko, I.F. Kovalenko, O.I. Gordiyenko*

Permeability Coefficients of Murine Enterocyte Membranes for Water and Cryoprotectants

Реферат: Визначення осмотичної реакції клітин і транспортних властивостей мембрани є необхідною ланкою кріобіологічних досліджень і розробки оптимальних умов кріоконсервування конкретних видів клітин. У роботі волюмометричним методом встановлено коефіцієнти проникності ентероцитів миші для води та криопротекторів: етиленгліколю (ЕГ), гліцерину, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилсульфоксиду (ДМСО). Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин за їх контакту з гіпертонічними розчинами криопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь, які описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів. Показано, що коефіцієнти фільтрації вірогідно не відрізняються між собою в розчинах криопротекторів 1,2-ПД, ДМСО та гліцерину ((1,42; 1,3; 1,24)×10⁻¹⁴ м³/Н·с відповідно) та є майже у два рази більшими у розчині ЕГ (2,4×10⁻¹⁴ м³/Н·с). Мембрани ентероцитів миші мають найбільший коефіцієнт проникності до ЕГ – 4,79×10⁻⁷ м/с, що, ймовірно, пов'язано з його негативною дією на мембрани ентероцитів. Для 1,2-ПД, ДМСО та гліцерину коефіцієнт проникності становить (0,672; 0,530; 0,134)×10⁻⁷ м/с відповідно. Отримані дані можуть бути використані для підбору оптимального режиму кріоконсервування цих клітин.

Ключові слова: ентероцити миші, коефіцієнт фільтрації, коефіцієнт проникності, криопротектори.

Реферат: Определение осмотической реакции клеток и транспортных свойств мембраны является необходимым звеном кробиологических исследований и разработки оптимальных условий крисконсервирования конкретных видов клеток. В работе с помощью волюмометрического метода установлены коэффициенты проницаемости энтероцитов мыши для воды и криопротекторов: этиленгликоля (ЭГ), глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО). Экспериментально полученные временные зависимости объема клеток при их контакте с гипертоническими растворами криопротекторов аппроксимировали численными решениями системы нелинейных уравнений, описывающих эту зависимость в приближении линейной термодинамики необратимых процессов. Показано, что коэффициенты фильтрации достоверно не отличаются между собой в растворах криопротекторов 1,2-ПД, ДМСО и глицерина ((1,42; 1,3; 1,24)×10⁻¹⁴ м³/Н·с соответственно) и почти в два раза больше в растворе ЭГ (2,4×10⁻¹⁴ м³/Н·с). Наибольший коэффициент проницаемости мембран энтероцитов мыши получен для ЭГ – 4,79×10⁻⁷ м/с, что, вероятно, связано с его негативным действием на мембраны энтероцитов. Для 1,2-ПД, ДМСО и глицерина коэффициент проницаемости составляет (0,672; 0,530; 0,134)×10⁻⁷ м/с соответственно. Полученные данные могут быть использованы для подбора оптимального режима крисконсервирования этих клеток.

Ключевые слова: энтероциты мыши, коэффициент фильтрации, коэффициент проницаемости, криопротекторы.

Abstract: Osmotic response of cells and transport properties of membrane are essential for cryobiological research in terms of choosing the optimal conditions to cryopreserve the specific cell type. In the present study we have found the permeability coefficients of murine enterocytes to water and such cryoprotectants as: ethylene glycol (EG), glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO). The experimental time dependencies of cell volume revealed during their contact with hypertonic solutions of cryoprotectants were fitted with numeric solutions of nonlinear equations describing this dependence in terms of linear thermodynamics of irreversible processes. The found filtration coefficients had no significant differences in cryoprotectant solutions of 1,2-PD, DMSO and glycerol ((1.42; 1.3; 1.24)×10⁻¹⁴ m³/N·sec, respectively) and were almost twice higher in EG solution (2.4)×10⁻¹⁴ m³/N·sec. The membranes of murine enterocytes showed the highest penetration rate for EG 4.79×10⁻⁷ m/s which was probably due to its negative effect on enterocyte membranes. Permeability coefficient for 1,2-PD, DMSO and glycerol was (0.672; 0.530; 0.134)×10⁻⁷ m/s, respectively. The obtained data can be used in selection of the most proper regimen of cryopreservation for these cells.

Key words: murine enterocytes, filtration coefficient, permeability coefficient, cryoprotectants.

Заморожування-відтавання залишається основним методом консервування клітин. Спостереження за осмотичними реакціями клітин і транспортними властивостями мембрани є необхідною ланкою кріобіологічних досліджень і розробки оптимальних умов кріоконсервування конкретних видів клітин [7].

Freeze-thawing is the main method for long term preservation of cells. Studying the osmotic cell reactions and transport properties of membrane is a mandatory step of cryobiological research and choosing of optimal conditions for cryopreservation of specific cells [2].

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

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: olga.gordiyenko.ipcc@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: olga.gordiyenko.ipcc@gmail.com

Надійшла 26.04.2016
Прийнята до друку 25.05.2016

Received April, 26, 2016
Accepted May, 25, 2016

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 221–228.
© 2016 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 221–228.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

У процесі заморожування клітинної суспензії клітини зазнають температурного та осмотичного стресу [11, 12]. Коли суспензія клітин охолоджується до температури нижче точки замерзання, клітини та навколишнє середовище спочатку залишаються у незамороженому переохолодженому стані. Оскільки більш ефективні джерела утворення зародків льоду знаходяться у позаклітинному середовищі, то лід спочатку формується в позаклітинному розчині між -2 і -15°C , тоді як внутрішньоклітинний розчин залишається переохолодженим [9]. У даному випадку переохолоджена внутрішньоклітинна вода має вищий хімічний потенціал, ніж вода в частково замерзломому 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, залежить від швидкості охолодження клітин та здатності до виходу води з клітини назовні. Це масоперенесення обмежується гідравлічною проникністю (L_p) плазматичної мембрани клітини та площею її поверхні, доступної для виходу води. Кількість води, яка повинна вийти для відновлення хімічної рівноваги, залежить від початкової осмотичності внутрішньоклітинного розчину та температури, до якої охолоджується суспензія клітин. Якщо вихідний потік води є недостатнім для встановлення хімічної рівноваги (у випадку високих швидкостей охолодження), то теплообмін домінуватиме над масообміном. Таким чином, внутрішньоклітинний розчин стане надмірно переохолодженим і буде формуватися внутрішньоклітинний лід. У випадку, коли вихід води є адекватним (за більш низьких швидкостей охолодження), масоперенесення превалюватиме над теплоперенесенням, клітини будуть зневоднюватись у достатній мірі для підтримки хімічної рівноваги, що відтермінує утворення внутрішньоклітинного льоду. Проте, зрештою за більш низьких температур внутрішньо- та позаклітинний розчини цілком затвердіють унаслідок формування евтектичної суміші.

Крім того, для кріобіології важливим параметром клітинних мембран є їх проникність для кріопротекторів. Від значення цього параметра залежать умови еквілібрації клітин у кріопротекторному середовищі до початку охолодження, а також умови відмивання клітин від кріопротектора після розморожування. Кріопротектори проникають крізь клітинні мембрани зазвичай шляхом пасивної [1] та полегшеної дифузії (крізь спеціальні канали) або за допомогою спеціальних механізмів транспорту [10, 13]. Пасивна проникність мембрани для кон-

Freezing of cell suspensions is accompanied with thermal and osmotic stresses onto the cells [9, 10]. When a cell suspension temperature during cooling passes the freezing point, the cells and their environment remain unfrozen and supercooled. Since more effective sources of ice nucleation are located in extracellular environment, an ice is formed primarily in extracellular solution in the temperature range of -2 to -15°C , and the intracellular medium remains supercooled [7]. In this case, intracellular supercooled water has a higher chemical potential than the one in the partially frozen extracellular solution being in equilibrium with an ice phase. Chemical equilibrium can be achieved either by outflux of intracellular water through a membrane barrier to the extracellular solution, or by the formation of an intracellular ice. The way by which the equilibrium could be achieved depends on the cell suspension cooling rate and ability of water to leave the cell. The mass transfer is restricted by hydraulic permeability (L_p) of plasma membrane of cell and surface area available for water outflow. The amount of water which should outflow to restore the chemical equilibrium depends on initial osmolality of intracellular solution and the final temperature of cell suspension cooling. If the outflow of water is insufficient for the chemical equilibrium recovery (*i. e.* at high cooling rates), the heat exchange will dominate over the mass transfer. Thus, intracellular solution will be excessively supercooled and intracellular ice would be formed. If the water outflow is sufficient (at lower cooling rates) a mass transfer would prevail over the thermal one, and the cells will be dehydrated sufficiently to maintain the chemical equilibrium and the formation of an intracellular ice will be postponed. Finally the intra- and extracellular solutions completely solidify at lower temperatures due to the formation of eutectic mixture.

In addition, permeability for cryoprotectants is a peculiarity of cell membranes being very important for cryobiology. Features of cell equilibration in cryoprotective medium before cooling or the parameters of cell washing procedure after freeze-thawing as well depend on this parameter. Cryoprotectants usually penetrate through cell membranes by diffusion, either passive [3] or facilitated (through special channels), as well as due the special transport mechanisms [8, 13]. Passive permeability of membrane for a particular substance is determined by physical and chemical properties of molecules of the substance contributing to their possible interaction with membrane macromolecules. For example it has been shown, that for many substances the specific values of their permeability and coefficients of distribution between hydrophobic phase and water are almost directly proportional. This testifies to permeation of these substances through the lipid bilayer



кретної речовини визначається фізико-хімічними властивостями молекул цієї речовини, які впливають на їх можливу взаємодію з макромолекулами мембрани. Наприклад показано, що між величинами проникності багатьох речовин і коефіцієнтами розподілу між гідрофобною фазою та водою існує залежність, близька до прямої пропорційності. Це свідчить про проникання цих речовин крізь ліпідний бішар мембрани. У той же час відомо, що такі малі гідрофільні молекули, як мочеви́на та етиленгліколь на рівні з водою легко проникають крізь мембрани деяких клітин. Проникність плазматичних мембран для полярних гідрофільних молекул має сильну залежність від їх розміру [8].

Метою роботи було визначення коефіцієнтів проникності ентероцитів миші для молекул води та кріопротекторів, які часто використовуються під час кріоконсервування клітинних суспензій. Для дослідження було вибрано такі кріопротекторні речовини, як етиленгліколь (EG), гліцерин, 1,2-пропандіол (1,2-ПД) та диметилсульфоксид (ДМСО).

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом із біоетики (Київ, 2013) і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Ентероцити виділяли з тонкого кишечника миші за методом J.H. Carter [6]. Тварин забивали дислокацією шийних хребців. Тонку кишку видаляли на 4 см нижче пілоруса та на 5 см вище сліпої кишки, промивали розчином 0,15 М NaCl кімнатної температури для видалення кишкового вмісту та нарізали на сегменти розміром 10 см. Сегменти вивертали за допомогою пластикового стержня та промивали в крижаному середовищі Хенкса («Biowest», Франція). Стержні з сегментами поміщали у пластиковий флакон із гіпотонічним розчином та інкубували 10 хв при 37°C. Розчин містив 65,7% середовища Дюльбеко (фосфатний буфер без Mg²⁺ або Ca²⁺, pH 7,0); 34,25% тридистильованої води та 0,94% полівінілпіролідону («Sigma», США) із середньою м. м. 40 000. Осмолярність розчину складала 195 мОсмоль/л. Далі розчин видаляли, до сегментів додавали 30 мл того ж розчину кімнатної температури (22...25°C) та інкубували впродовж години з вібрацією 90–100 хв⁻¹ на платформі Шутера. Після цього суспензію клітин, які відділилися від кишкової поверхні, переливали у пробірки та осаджували центрифугуванням 10 хв при 500g. Надосад середовища видаляли, а клітини ресуспендували в крижаному

of membrane. At the same time, it is known that small hydrophilic molecules such as urea and ethylene glycol easily penetrate via the membranes of some cells like water does. The permeability of plasma membrane for polar hydrophilic molecules strongly depends on their size [4].

The research aim was to determine the permeability coefficients of murine enterocytes for molecules of water and cryoprotectants, which are conventionally used for cryopreservation of cell suspensions. There were investigated the following cryoprotective substances: ethylene glycol (EG), glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO).

Materials and methods

The experiments in animals were performed according to the General Ethical Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress of Bioethics (Kyiv, 2013) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Enterocytes were isolated from murine small intestine by the method of J.H. Carter [1]. The animals were sacrificed by dislocation of the cervical vertebrae. Small intestine was removed by 4 cm below the pylorus and 5 cm above the cecum, washed with 0.15 M NaCl solution of room temperature to remove intestinal contents and cut into the 10 cm segments. The segments were turned-out using a plastic rod and washed with ice-cold Hanks' medium (Biowest, France). The rods with segments were placed into a plastic vial with a hypotonic solution and incubated for 10 min at 37°C. The solution contained 65.7% Dulbecco's medium (phosphate buffer without Mg²⁺ and Ca²⁺, pH 7.0); 34.25% tridistilled water and 0.94% polyvinylpyrrolidone (Sigma, USA) with an average MW of 40,000. The solution osmolarity was 195 mOsmol/l. Thereafter the solution was removed, the segments were supplemented with 30 ml of the same solution of room temperature (22...25°C) and incubated for an hour with 90–100 min⁻¹ vibration on Shutter platform. Thereafter the cell suspension detached from the intestinal surface was poured into test tubes and sedimented for 10 min at 500g. Supernatant was removed and the cells were re-suspended in an ice-cold Hanks' medium and passed through a double nylon filter.

The coefficients of filtration and permeability for cryoprotectants of enterocyte membranes were determined by volumetric method. The cells were transferred into a binary solution (0.15 M NaCl – 1M cryoprotectant), which volume significantly exceeded the initial volume of cell suspension. The kinetics of cell size changes was studied in the solutions of four cryoprotectants (EG, glycerol, 1,2-PD and DMSO) at



середовищі Хенкса та пропускали через подвійний нейлоновий фільтр.

Коефіцієнти фільтрації та проникності для кріопротекторів мембран еритроцитів визначали волюмометричним методом. Клітини переносили у бінарний розчин (0,15 М NaCl – 1 М кріопротектора), об'єм якого на порядок перевищував початковий об'єм клітинної суспензії. Досліджували кінетику зміни розмірів клітин у розчинах чотирьох кріопротекторів (ЕГ, гліцерин, 1,2-ПД та ДМСО) при температурі 25°C за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина) (масляно-імерсійний об'єктив ×63). Об'єм клітин апроксимували об'ємом зрізаного конуса. Лінійні розміри клітин (висота, малий та великий діаметри зрізаного конуса) визначали за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss»). Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин за їх контакту з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь, що описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів [3].

Теоретичне обґрунтування експериментальних досліджень. Для аналізу та трактування результатів дослідження процесів масоперенесення між суспендованими у багатокомпонентному розчині клітинами та навколишнім середовищем ми використовували нелінійні рівняння, які узагальнюють рівняння Кедем-Качальського, та переходять у них у граничному випадку, коли об'ємні частки розчинених речовин стають достатньо малими, що ними можна знехтувати. У випадку, коли через мембрану проникають тільки молекули розчинника, тобто води, і однієї (*s*-ої) із розчинених у *n*-компонентному розчині речовин, рівняння мають вигляд [2]:

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{1}{\tau_w} \left[\sigma_s \Delta \hat{\pi}_s + \frac{1 + \sigma_s \Delta \hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n \Delta \hat{\pi}_k \right]; \quad (1)$$

$$\frac{d\hat{\pi}_s^{in}}{dt} = -\frac{\sigma_s (1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{y - \alpha} \frac{dy}{dt} + \frac{1}{\tau_s} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{y - \alpha} \left(\Delta \pi_s + \frac{\Delta \hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n \Delta \hat{\pi}_k \right); \quad (2)$$

$$\hat{\pi}_k^{in} = \hat{\pi}_{k0}^{in} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in})(1 - \alpha)}{(1 + \hat{\pi}_{s0}^{in})(y - \alpha)}, \quad (3)$$

де $y = V/V_0$ – відносний об'єм клітини; V – об'єм клітини; V_0 – початкове значення об'єму клітини; $\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \frac{RT}{v_s} \right)^{-1}$, $\tau_s = \left(\frac{S}{V_0} k_s \right)^{-1}$ – величини, що мають розмірність часу; S – площа поверхні клітинної

25°C using Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany, oil-immersion ×63 objective). The volume of cells was approximated with the truncated cone. Linear dimensions of cells (height, small and large diameter of truncated cone) were examined using AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss, Germany). The experimentally determined time dependencies of cell volume during their contact with hypertonic solutions of cryoprotectants were fitted with numerical solutions of nonlinear equations describing this dependence in terms of linear thermodynamics of irreversible processes [6].

Theoretical background of experiments. To analyze and interpret the research data of a mass transfer between the environment and the cells suspended in multicomponent solution we used nonlinear generalizations of the Kedem-Katchalsky equations and the equations *per se* in terminal cases when the volume fractions of solutes are so small that could be neglected. In the case when only solvent molecules penetrate through the membrane, *i. e.* water, and one (*s*-th) of dissolved in solution of *n*-component substances, equations are as follows [5]:

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{1}{\tau_w} \left[\sigma_s \Delta \hat{\pi}_s + \frac{1 + \sigma_s \Delta \hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n \Delta \hat{\pi}_k \right]; \quad (1)$$

$$\frac{d\hat{\pi}_s^{in}}{dt} = -\frac{\sigma_s (1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{y - \alpha} \frac{dy}{dt} + \frac{1}{\tau_s} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{y - \alpha} \left(\Delta \pi_s + \frac{\Delta \hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n \Delta \hat{\pi}_k \right); \quad (2)$$

$$\hat{\pi}_k^{in} = \hat{\pi}_{k0}^{in} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in})(1 - \alpha)}{(1 + \hat{\pi}_{s0}^{in})(y - \alpha)}, \quad (3)$$

where $y = V/V_0$ – relative cell volume; V – cell volume; V_0 – initial value of cell volume; $\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \frac{RT}{v_s} \right)^{-1}$, $\tau_s = \left(\frac{S}{V_0} k_s \right)^{-1}$ – values with time dimensions; S – surface area of cell membrane; L_p – cell membrane filtration coefficient; R – universal gas constant; T – absolute temperature; v_s (v_k) – partial molar volume of dissolved substance penetrating (non-penetrating) through the cell membrane; k_s – permeability coefficient of the cell membrane relative to penetrating dissolved substance; σ_s – reflex coefficient of cell membrane, relative to penetrating dissolved substance; $\Delta \pi_s$ і $\Delta \pi_k$ – are the transmembrane differentials of normalised osmotic pressure of substances penetrating and non-penetrating through cell membrane, respectively; the subscripts *s*, *k* and *w* denote the values, referred to dissolved substances (penetrating and non-pene-



мембрани; L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани; R – універсальна газова константа; T – абсолютна температура; v_s (v_k) – парціальний молярний об'єм проникаючої (не проникаючої) крізь мембрани клітин розчиненої речовини; k_s – коефіцієнт проникності клітинної мембрани щодо проникаючої крізь неї розчиненої речовини; σ_s – коефіцієнт відбиття клітинної мембрани щодо проникаючої крізь неї розчиненої речовини; $\Delta\hat{\pi}_s$ і $\Delta\hat{\pi}_k$ – трансмембранний перепад приведенного осмотичного тиску проникаючої і не проникаючої крізь клітинну мембрану речовин відповідно; нижні індекси s , k і w позначають величини, що відносяться до розчинених речовин (проникаючих та не проникаючих) і розчинника відповідно; $\pi_k = \frac{\pi_k v_k}{RT}$ – приведений осмотичний тиск k -ої розчиненої речовини; π_s^{in} і π_k^{in} – осмотичний тиск проникаючої та не проникаючої крізь клітинну мембрану внутрішньоклітинних речовин відповідно; π_{s0}^{in} і π_{k0}^{in} – початкові значення цих величин; t – час; π_s^{out} і π_k^{out} – осмотичний тиск проникаючої та не проникаючої крізь клітинну мембрану позаклітинних речовин відповідно; $\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n v_k N_{k0}$ – об'ємна частка не проникаючих крізь клітинну мембрану речовин усередині клітини або осмотично неактивний об'єм клітини. Ця величина була визначена нами в попередній роботі [4] і становить для еритроцитів миші $0,51 \pm 0,06$.

Результати та обговорення

Для розрахунку коефіцієнта фільтрації L_p та коефіцієнтів проникності клітинних мембран для кріопротекторів експериментально визначені часові залежності об'єму клітин за їх контакту з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували рішеннями системи рівнянь (1)–(3) (рис. 1). Значення отриманих коефіцієнтів подано в таблиці. Зміни концентрації електролітів у еритроцитах миші та динаміка насичення еритроцитів миші кріопротектором при їх контакті з 1 М розчинами відображено на рис. 2, 3. Вони є важливими для визначення параметрів режиму кріоконсервування для кожного типу клітин, зокрема на етапі їх еквілібрації із кріопротекторним середовищем. Із рис. 2 видно, що піки концентрації внутрішньоклітинного електроліту для ЕГ знаходяться на 16-й секунді еквілібрації, для 1,2-ПД та ДМСО – на 27- та 32-й секундах відповідно, для гліцерину – на 40-й секунді. Цей параметр залежить від співвідношення коефіцієнтів фільтрації та проникності у середовищі відповідного кріопротектора. Час відновлення концентрації електроліту в клітині залежить тільки від коефіцієнта проникності та є найбільшим у нашому випадку

(penetrating ones) and a solvent, respectively, $\pi_k = \frac{\pi_k v_k}{RT}$ – is a normalised osmotic pressure of k -th solved substance; π_s^{in} and π_k^{in} are osmotic pressures of intracellular substances penetrating and non-penetrating through cell membrane, respectively; π_{s0}^{in} and π_{k0}^{in} are the initial values of these variables; t is time, π_s^{out} and π_k^{out} are osmotic pressures of extracellular substances penetrating and non-penetrating through cell membrane, respectively; $\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n v_k N_{k0}$ – volume fraction of non-penetrating through cell membrane substances inside a cell or osmotically inactive cell volume. We determined this value previously [11], for murine enterocytes it made 0.51 ± 0.06 .

Results and discussion

To calculate the coefficients of filtration L_p , and of cell membrane permeability for cryoprotectants the experimentally determined time dependencies of cell volume under their contact with hypertonic solutions of cryoprotectants were fitted with curves resulting from the set of equations (1)–(3) (Fig. 1). Values of the obtained coefficients are presented in the Table. Changes in electrolyte concentration in murine enterocytes and the dynamics of murine enterocyte saturation with cryoprotectant during their contact with 1 M solutions are shown in Figs. 2, 3. They are critical in determining the parameters of cryopreservation regimen for each cell type, in particular during their incubation in cryoprotective medium. The Fig. 2 shows the concentration peaks of intracellular electrolyte for EG, 1,2-PD and DMSO to be at the 16th, 27th and 32nd seconds of equilibration, respectively, and at the 40th second for glycerol. This parameter depends on the ratio of filtration and permeability coefficients in the medium of corresponding cryoprotectant. The time of recovery of cell electrolyte concentration depends on the permeability coefficient only and in our case it is the highest in the medium with glycerol. The inflection point on the curves describing cell saturation with cryoprotectant (Fig. 3) corresponds to the maxima in Fig. 2. From this point the dynamics of cell saturation with a cryoprotectant depends on permeability coefficient only. The graphs show that the cell saturation with glycerol was the slowest as compared to other studied cryoprotectants.

The Table data show the filtration coefficients to have no significant differences in solutions of 1,2-PD, DMSO, glycerol cryoprotectants; moreover they were close to the indices found in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell membranes [12]. At the same time, the filtration coefficient of murine enterocytes in 1 M EG solution was almost twice higher than in solutions of the mentioned cryoprotectants. This may be due to

в середовищі з гліцерином. Точка перегину на графіках динаміки насичення клітин криопротектором (рис. 3) відповідає максимумам на рис. 2. Із цієї точки динаміка насичення клітин криопротектором залежить тільки від коефіцієнта проникності. З графіків видно, що насичення клітин гліцерином відбувається найповільніше у порівнянні з іншими дослідженими криопротекторами.

Із даних таблиці видно, що коефіцієнти фільтрації вірогідно не відрізняються між собою в розчинах криопротекторів 1,2-ПД, ДМСО, гліцерину та є близькими до коефіцієнтів фільтрації мембран дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* [5]. У той же час коефіцієнт фільтрації ентероцитів миші у 1 М розчині ЕГ майже у два рази більший, ніж у розчинах названих криопротекторів. Це може бути пов'язано зі взаємодією ЕГ із компонентами мембрани ентероцитів. Така думка підтверджується результатами спостереження тривалості виживання клітин у розчинах досліджених криопротекторів. За цією характеристикою криопротектори можна розташувати у низці 1,2-ПД > ДМСО, гліцерин > ЕГ.

Коефіцієнти фільтрації та проникності для криопротекторів ентероцитів миші
Filtration and permeability coefficients for cryoprotectants of murine enterocytes

Криопротектор Cryoprotectant	Коефіцієнт фільтрації, $L_p \times 10^{14}, \text{m}^3/\text{H} \cdot \text{c}$ Filtration coefficient, $L_p \times 10^{14}, \text{m}^3/\text{N} \cdot \text{sec}$	Коефіцієнт проникності для криопротектора, $k_s \times 10^7, \text{m/c}$ Coefficient of permeability for cryoprotectant, $k_s \times 10^7, \text{m/s}$
ЕГ EG	$2,4 \pm 0,32$	$4,79 \pm 0,99$
1,2-ПД 1,2-PD	$1,42 \pm 0,17$	$0,672 \pm 0,11$
ДМСО DMSO	$1,3 \pm 0,13$	$0,530 \pm 0,1$
Гліцерин Glycerol	$1,24 \pm 0,14$	$0,134 \pm 0,05$

EG interaction with enterocyte membrane components. This supposition was confirmed by the data for cell survival in the solutions of the studied cryoprotectants. According to this feature the cryoprotectants could be arranged in the series of 1,2-PD > DMSO, glycerol > EG.

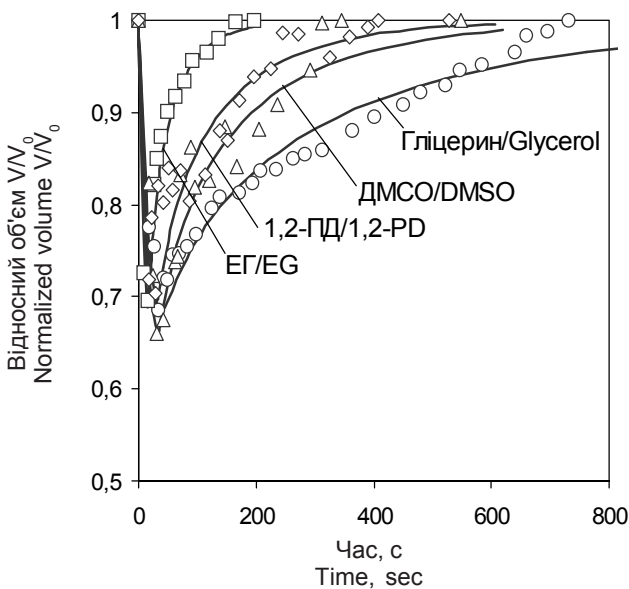


Рис. 1. Апроксимація експериментально визначених часових залежностей об'єму ентероцитів миші при їх контакті з гіпертонічними розчинами криопротекторів рівняннями (1)–(3) пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини.

Fig. 1. Fitting of experimental time dependencies of murine enterocytes volume during their contact with hypertonic solutions of cryoprotectants and the curves resulting from equations (1)–(3) describing passive mass transfer through cell membrane.

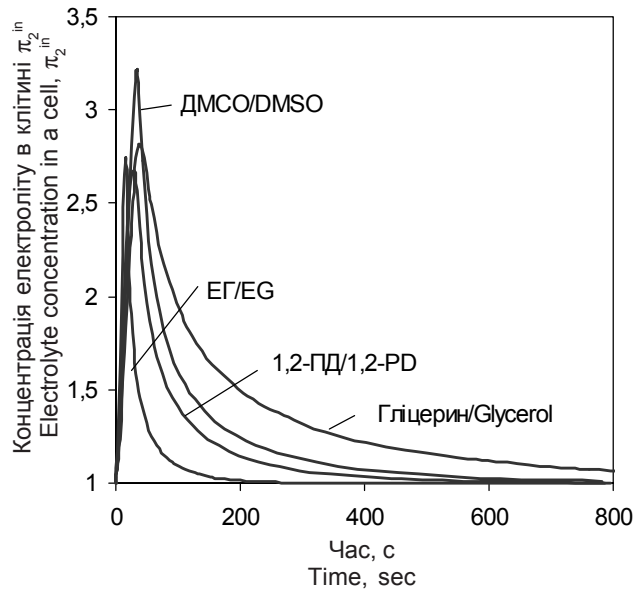


Рис. 2. Зміни концентрації електролітів в ентероцитах миші при їх контакті з 1 М розчинами криопротекторів.

Fig. 2. Changes in electrolytes concentration inside murine enterocytes during their contact with 1 M solutions of cryoprotectants.



Мембрани ентероцитів миші мають найбільший коефіцієнт проникності до ЕГ. Це може бути пов'язано з найменшими розмірами молекули ЕГ серед досліджених у цій роботі кріопротекторів. Оскільки молекули ЕГ є гідрофільними (коефіцієнт розподілу між гідрофобною фазою і водою дорівнює 0,04), то можна припустити, що його проникання здійснюється крізь гідрофільні канали. Розміри молекули ЕГ становлять $2,6 \times 5,2 \text{ \AA}$, а об'єм – $27,6 \text{ \AA}^3$, тоді як розміри молекул 1,2-ПД, ДМСО та гліцерину – $3,7 \times 5 \text{ \AA}$ ($53,7 \text{ \AA}^3$), $3,2 \times 4,6 \text{ \AA}$ ($36,97 \text{ \AA}^3$) та $4,7 \times 5,2 \text{ \AA}$ ($90,2 \text{ \AA}^3$) відповідно. Коефіцієнт розподілу 1,2-ПД є близьким до такого для ЕГ ($K_p = 0,076$), а коефіцієнт розподілу для гліцерину на порядок менший ($K_p = 0,005$) [8].

Значно більший коефіцієнт проникності для молекул ЕГ може бути також наслідком токсичної дії ЕГ на мембрани ентероцитів. Із таблиці видно, що коефіцієнт проникності для молекул ДМСО ($K_p = 0,247$) є значно меншим, ніж для молекул ЕГ та близьким до коефіцієнта проникності для молекул 1,2-ПД. При цьому молекули ДМСО є більш гідрофобними порівняно з молекулами 1,2-ПД та ЕГ. Отже, немає підстав вважати, що молекули етиленгліколю можуть вільно проникати крізь ліпідний бішар, не порушуючи його цілісність.

Найменший коефіцієнт проникності мають мембрани ентероцитів для гліцерину. Очевидно, що найбільші розміри молекул гліцерину серед досліджених кріопротекторів є причиною його повільнішого проникання, а висока гідрофільність не сприяє прониканню крізь ліпідний бішар.

Висновки

Таким чином, для ентероцитів миші отримано коефіцієнти фільтрації молекул води та коефіцієнти проникності кріопротекторів (ЕГ, 1,2-ПД, ДМСО, гліцерин). Ці дані можуть бути використані для підбору оптимального режиму кріоконсервування цих клітин. Також показано, що ЕГ негативно впливає на мембрани ентероцитів, порушуючи їх проникні властивості.

Література

1. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Проблеми криобіології. – 2002. – №4. – С. 9–15.
2. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Марущенко В.В., Сакун О.В. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини // Біофізичний вісник. – 2008. – Вип. 21, №2. – С. 75–80.
3. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 143 с.

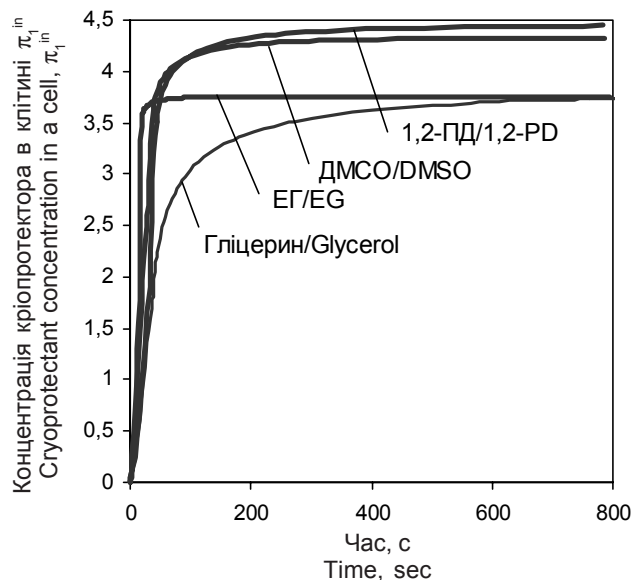


Рис. 3. Динаміка насичення ентероцитів миші кріопротектором при контакті з їх 1 М розчинами.

Fig. 3. Saturation of murine enterocytes with cryoprotectant during contact with their 1 M solutions.

The membranes of murine enterocytes have the highest permeability coefficient to EG. This may be associated to the lowest dimensions of EG molecule among the studied cryoprotectants. Since the EG molecules are hydrophilic (distribution coefficient between hydrophobic phase and water is 0.04), we may assume its penetration to occur through hydrophilic channels. The EG molecule dimensions are $2.6 \times 5.2 \text{ \AA}$, and the volume is 27.6 \AA^3 , meanwhile the dimensions of 1,2-PD, DMSO and glycerol molecules are $3.7 \times 5 \text{ \AA}$ (53.7 \AA^3), $3.2 \times 4.6 \text{ \AA}$ (36.97 \AA^3) and $4.7 \times 5.2 \text{ \AA}$ (90.2 \AA^3), respectively. The distribution coefficient of 1,2-PD is close to the index of EG ($C_d = 0.076$) and the one for glycerol is ten times lower ($C_d = 0.005$) [4].

A significantly higher coefficient of permeability for EG molecules may also result from a toxic effect of EG on enterocyte membranes. The Table demonstrates that permeability coefficient for DMSO molecules ($C_d = 0.247$) was much lower comparing to the index for EG molecules and close to that for 1,2-PD molecules. In addition, the DMSO molecules are more hydrophobic as compared to 1,2-PD and EG ones. So, there is no reason to suggest the ethylene glycol molecules as capable to freely penetrate through a lipid bilayer without disrupting it.

The lowest permeability coefficient of the enterocyte membranes was found for glycerol. The largest dimensions of glycerol molecules among the studied cryoprotectants were obviously the reason of its slower penetration, and a high hydrophilicity did not allow its penetration through a lipid bilayer.

4. Огурцова В.В., Коваленко С.Є., Коваленко І.Ф., Гордієнко О.І. Визначення осмотично неактивного об'єму ентероцитів миші // Проблеми криобіології і криомедицини. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 93–97.
5. Сакун О.В., Коваленко І.Ф., Сіренко А.Ю. та ін. Коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і криопротекторів // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2008. – Вип. 7, №814. – С. 140–146.
6. Carter J.H., Carter H., Nussbaum J., Eichholz A. Isolation of hamster intestinal epithelial cells using hypoosmotic media and PVP // *J. Cell Physiol.* – 1982. – Vol. 111, №1. – P. 55–67.
7. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates // *Cryobiology.* – 2003. – Vol. 46. – P. 33–42.
8. Gordienko O.I., Linnik T.P., Gordienko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – Vol. 62, №2. – P. 115–118.
9. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells // *Cryobiology.* – 1966. – Vol. 2. – P. 181–192.
10. Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 334–343.
11. Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.-J. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions // *Cryobiology.* – 1988. – Vol. 25. – P. 471–482.
12. Muldrew K., McGann L.E. Mechanisms of intracellular ice formation // *Biophys. J.* – 1990. – Vol. 57. – P. 525–532.
13. Tanghe A., Van Dijck P., Colavizza D., Thevelein J.M. Aquaporin-mediated improvement of freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* is restricted to rapid freezing conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, №6. – P. 3377–3382.

Conclusions

Thus, for murine enterocytes we obtained the coefficients of filtration for water molecules and those of permeability for cryoprotectants (EG, 1,2-PD, DMSO, glycerol). These data can be used in selecting the optimal cryopreservation regimen for these cells. The EG was also demonstrated to negatively affect the enterocyte membranes by disrupting their penetrating properties.

References

1. Carter J.H., Carter H., Nussbaum J., Eichholz A. Isolation of hamster intestinal epithelial cells using hypoosmotic media and PVP. *J Cell Physiol* 1982; 111 (1): 55–67.
2. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. *Cryobiology* 2003; 46: 33–42.
3. Gordienko O.I., Gordienko E.O., Linnik T.P., Kompaniets A.M. Mechanisms of cryoprotectant penetration through erythrocyte membranes. *Problems of Cryobiology* 2002; 4: 9–15.
4. Gordienko O.I., Linnik T.P., Gordienko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. *Bioelectrochemistry* 2004; 62(2): 115–118.
5. Gordiyenko Ye.O., Gordiyenko O.I., Maruschenko V.V., Sakun O.V. Improved model for the passive mass transfer through the cell plasma membrane. *Biophys Bull* 2008; 21(2): 75–80.
6. Gordiyenko Ye.O., Pushkar N.S. Physical basis for low temperature preservation of cell suspensions. Kyiv: Naukova dumka; 1994.
7. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 1966; 2: 181–192.
8. Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 2001; 268: 334–343.
9. Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.-J. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions. *Cryobiology* 1988; 25: 471–482.
10. Muldrew K., McGann L.E. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J* 1990; 57: 525–532.
11. Ogurtsova V.V., Kovalenko S.Ye., Kovalenko I.F., Gordiyenko O.I. Determination of osmotically inactive volume of murine enterocytes. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2016; 26(1): 93–97.
12. Sakun O.V., Kovalenko I.F., Sirenko A.Yu. et al. Membrane permeability coefficients of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to water and cryoprotectants. *V.N. Karazin KhNU Bull Series Biol* 2008; 7(814): 140–146.
13. Tanghe A., Van Dijck P., Colavizza D., Thevelein J. M. Aquaporin-mediated improvement of freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* is restricted to rapid freezing conditions. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 (6): 3377–3382.

