

УДК 57.043:577.352.4:539.21

Л.Г. КУЛЕШОВА\*, И.Ф. КОВАЛЕНКО

## Определение транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточной кристаллизации

UDC 57.043:577.352.4:539.21

L.G. KULESHOVA\*, I.F. KOVALENKO

## Determining Transport Characteristics for Cell Plasma Membranes under Extracellular Crystallisation

В работе проведена экспериментальная проверка адекватности теоретической модели, которая аналитически описывает процессы трансмембранного переноса веществ при росте кристаллов льда в окружающей клетки среде. В рамках принятых в модели допущений получено удовлетворительное совпадение теоретических и экспериментальных зависимостей изменения относительного объема клеток почек сирийского хомячка при различных условиях замораживания. Количественно оценены транспортные характеристики плазматических мембран указанных клеток, проанализированы наиболее вероятные причины их зависимости от исходной концентрации проникающего в клетки криопротектора и скорости охлаждения.

**Ключевые слова:** внеклеточная кристаллизация, плазматические мембраны, проницаемость.

В роботі проведена експериментальна перевірка адекватності теоретичної моделі, яка аналітично описує процеси трансмембранного переносу речовин в умовах росту кристалів льоду у позаклітинному середовищі. В рамках прийнятих у моделі припущень одержано задовільний збіг теоретичних та експериментальних залежностей зміни відносного об'єму клітин нирок сирійського хом'ячка в різних умовах заморожування. Кількісно оцінено транспортні характеристики плазматичних мембран вказаних клітин, проаналізовано найбільш імовірні причини їх залежності від початкової концентрації проникаючого в клітини криопротектора і швидкості охолодження суспензії.

**Ключові слова:** позаклітинне льодоутворення, плазматичні мембрани, проникність.

Experimental proving of theoretical model adequacy, analytically describing processes of transmembrane substance transfer during ice crystal growth in extracellular medium was carried-out in the work. Within the frames of model's assuming there was obtained a satisfactory fitting of theoretical and experimental dependencies of a change in relative volume of golden hamster kidney cells under different freezing conditions. Transport characteristics of plasma membranes in mentioned cells were quantitatively estimated and the most probable reasons of their dependency on initial concentration of cell penetrative cryoprotectant and cooling rate were analysed.

**Key-words:** extracellular crystallisation, plasma membrane, permeability.

Нарушение термодинамического равновесия в системе “клетка -окружающая среда” при образовании и росте внеклеточных кристаллов может компенсироваться двумя путями: за счет непрерывного оттока воды из клетки или образования внутриклеточных кристаллов льда при значительном переохлаждении цитоплазмы. В обоих случаях при достаточно низких температурах повреждение клеток неизбежно или вследствие чрезмерного обезвоживания и сжатия клеток, или в результате явлений, развивающихся при формировании внутриклеточных кристаллов льда (действия кристаллизационного давления на мембрану, рекристаллизации). Следовательно, трансмем-

Disorder of thermodynamic equilibrium in “cell-environment” system during formation and growth of extracellular crystal can be compensated by two ways: due to a continuous water flow out of cells or intracellular ice crystal formation at a considerable cytoplasm overcooling. In both cases at quite low temperatures cell damage is inevitable either due to an over-dehydration and cell shrinking or as a result of phenomena, developing during intracellular ice crystal formation (effect of crystallising pressure to a membrane, re-crystallisation). Consequently a transmembrane water flow out of cell should, on one hand, provide a slight dehydration and, on an other hand, to exclude the probability of intracellular ice

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

бранный поток воды из клетки должен, с одной стороны, обеспечить щадящее обезвоживание, с другой – исключить вероятность внутриклеточного льдообразования или уменьшить количество внутриклеточного льда. Оптимальная скорость охлаждения соответствует наибольшей скорости, при которой еще не образуются кристаллы льда внутри клеток. Роль проникающих криопротекторов, прежде всего, состоит в том, чтобы при каждой заданной субнулевой температуре уменьшить количество образующегося льда вне- и внутри клеток.

Трансмембранные потоки воды и проникающих криопротекторов лимитируются особенностями строения клеточных мембран различных клеток и характеризуются коэффициентами фильтрации (проницаемости для молекул воды)  $L_p$  и проницаемости для молекул криопротектора  $k_p$ . Определенное значение оптимальной скорости замораживания для данного типа клеток обусловлено именно индивидуальностью транспортных характеристик их плазматических мембран.

Таким образом, возможность количественного прогноза реакции клеток на замораживание для данного температурного режима и определенного типа клеток базируется на знании *a priori* таких важных биофизических параметров, как  $L_p$  и  $k_p$ , при субнулевых температурах.

В работе [1] разработан алгоритм расчета изменения объема и концентрации растворенных внутриклеточных веществ в процессе кристаллизации клеточной суспензии при наличии проникающего криопротектора. Указанный алгоритм предполагает, что коэффициенты  $L_p$  и  $k_p$  с уменьшением температуры кристаллизующейся суспензии подчиняются аррениусовым зависимостям, и мембрана при этом остается интактной

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

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

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

Если охлаждение производится со скоростью  $\beta$ , то

$$T_0 \frac{d}{dt} = \beta \frac{d}{d\hat{T}}, \quad (2)$$

formation or reduce intracellular ice amount. Optimal cooling rate corresponds to the highest rate, when ice crystals have not formed yet inside cells.

Transmembrane water flows and those for penetrative cryoprotectants are limited by the peculiarities of cell membrane structure of different cells and are characterised by filtration coefficients  $L_p$  (permeability for water molecules) and  $k_p$  (that for cryoprotectant molecules). Certain value of optimal freezing rate for this type of cells is stipulated namely by distinction of transport characteristics of their plasma membranes.

Thus, the possibility for quantitative forecasting cell response to freezing for this temperature regimen and a certain cell type is based on *a priori* knowing such important biophysical parameters as  $L_p$  and  $k_p$  at subzero temperatures.

The algorithm for calculating changes in volume and concentration of dissolved intracellular substances during cell suspension crystallisation at the presence of penetrative cryoprotectant was designed in the paper [1]. The mentioned algorithm suggests that  $L_p$  and  $k_p$  coefficients with a decrease in temperature of crystallising suspension follow Arrhenius dependencies, and membrane remains thereby intact

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

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

where  $T_0$  is initial temperature of cell suspension (before cooling beginning);  $U_0$  and  $U_1$  are the activation energies of transfer process through plasma membrane of water molecules and dissolved substance, correspondingly;  $R_0$  is universal gas constant.

If cooling is realised with rate  $\beta$ , then

$$T_0 \frac{d}{dt} = \beta \frac{d}{d\hat{T}}, \quad (2)$$

where  $\hat{T}$  is relative temperature of suspension

$$\hat{T} = \frac{T}{T_0}.$$

Extracellular ice is thought to occur at a zero overcooling of extracellular medium and to be under thermodynamic equilibrium with surrounding solution during freezing. The authors [1] neglect the effect, related to curvature and sizes of ice crystals and corresponding Laplace's effects.

The work was aimed to experimentally verify proposed in the paper [1] algorithm for calculating cell volume by comparing experimental data about change in cell volume during cell suspension crystallisation and those estimated, obtained using the

где  $\hat{T}$  – относительная температура суспензии

$$\hat{T} = \frac{T}{T_0}.$$

Считается, что внеклеточный лед возникает при нулевом переохлаждении внеклеточной среды и находится в процессе замораживания в термодинамическом равновесии с окружающим его раствором. Эффектами, связанными с кривизной и размерами кристаллов льда и соответствующими лаплассовыми эффектами, авторы работы [1] пренебрегают.

Цель работы – экспериментальная проверка предложенного в работе [1] алгоритма расчета объема клеток путем сравнения экспериментальных данных об изменении объема клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии и расчетных данных, полученных по указанному алгоритму в условиях, соответствующих проведенным экспериментам.

### Материалы и методы

Экспериментальный материал исследований – перевиваемая культура клеток почек сирийского хомячка (ВНК-21). Проведенные эксперименты не противоречат “Общим принципам экспериментов на животных”, одобренным Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г., Киев, Украина) и согласуются с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Кинетику изменения клеточного объема в условиях внеклеточной кристаллизации изучали световой криомикроскопией [5]. Клетки суспендировали в среде Игла, содержащей 10% сыворотки. Концентрация клеток составляла  $9,7 \times 10^5$  клеток в 1 мл. В качестве криопротектора использовали глицерин, конечную концентрацию которого варьировали от 2,5 до 10% (объем/объем). Для формирования различной первичной морфологии кристаллов, характер которой существенно влияет на массообмен клетки с окружающей средой [3], суспензию клеток охлаждали в рабочей камере криомикроскопа одноэтапно со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-25^\circ\text{C}$  или двухэтапно со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до температуры начала фазового перехода и далее – со скоростью  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-25^\circ\text{C}$ . Для исключения переохлаждения в суспензию дополнительно вносили затравочные кристаллы AgJ. Скорость отогрева составляла  $3^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Экспериментальные кривые изменения клеточного объема в зависимости от субнулевой температуры в процессе замораживания были получены обработкой фотоизображений клеток методом вольюмометрии. Учитывая, что клетки почек сирийского

mentioned algorithm under conditions, corresponding to performed experiments.

### Materials and methods

As experimental material we used golden hamster kidney cell inoculated culture (ВНК-21). The performed experiments do not contradict the “General Principles of Experiments in Animals”, approved by the National Congress on bioethics (20.09.01, Kiev, Ukraine) and correlate with statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Kinetics of cell volume change under conditions of extracellular crystallisation was studied with light cryomicroscopy [5]. Cells were suspended in 10% serum-contained Eagle’s medium. Cell concentration made  $9.7 \times 10^5$  cells in 1 ml. As cryoprotectant we used glycerol, which final concentration varied from 2.5 to 10% (v/v). In order to form different primary crystal morphology, which character considerably affects cell mass exchange with environment [3], cell suspension was one-step cooled down in operating chamber of cryomicroscope with  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  rate down to  $-25^\circ\text{C}$  or by two-step with  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  rate down to phase transfer beginning temperature and then with  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  down to  $-25^\circ\text{C}$ . Inoculating AgJ crystals were additionally introduced into suspension to exclude overcooling. Thawing rate was  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ . Experimental curves of cell volume change depending on subzero temperature during freezing were obtained by processing cell photo images with volumetry method. Taking into account the fact, that golden hamster kidneys cells are in the shape close to a sphere (10-12  $\mu\text{m}$  big section diameter) and if knowing a relative change in cell visible section square  $S/S_0$  on temperature, a change in relative volume was determined by the ratio

$$\frac{V}{V_0} = \left( \frac{S}{S_0} \right)^{3/2}, \quad (3)$$

where  $S$  is current square,  $S_0$  is initial square,  $V$  and  $V_0$  are current and initial cell volume, correspondingly.

According to the theoretical approaches [1] during intracellular crystallisation an osmotic equilibrium in the system of relatively penetrative  $\pi_1$  and non-penetrative  $\pi_2$  through plasma membrane substances with respect of a volume part of freeze-resistant liquid  $\chi$  fraction is described with following equations:

$$\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \frac{(1 - \alpha g_0) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}} (y - \alpha) g_0}{1 - g_0 y - \chi(1 - g_0)}; \quad (4)$$

$$\hat{\pi}_2^{\text{out}} = \frac{(1 - \alpha g_0) \hat{\pi}_{2\infty} - (1 - \alpha) g_0}{1 - g_0 y - \chi(1 - \alpha g_0)},$$

where  $\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \pi_1^{\text{out}} / \pi_{20}^{\text{in}}$ ,  $\hat{\pi}_2^{\text{out}} = \pi_2^{\text{out}} / \pi_{20}^{\text{in}}$  are norma-

хотя бы имеют близкую к сферической форму (диаметр большого сечения 10-12 мкм) и зная относительное изменение площади видимого сечения клетки  $S/S_0$  от температуры, изменение относительного объема определяли по соотношению

$$\frac{V}{V_0} = \left( \frac{S}{S_0} \right)^{3/2}, \quad (3)$$

где  $S$  – текущая площадь;  $S_0$  – исходная площадь;  $V$  и  $V_0$  – текущий и исходный объем клетки соответственно.

Согласно теоретическим подходам [1] при внеклеточной кристаллизации осмотическое равновесие в системе относительно проникающего  $\pi_1$  и непроникающего  $\pi_2$  через плазматическую мембрану веществ с учетом объемной доли незамерзающей жидкой фракции  $\chi$  описывается следующими равенствами:

$$\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \frac{(1 - \alpha g_0) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}} (y - \alpha) g_0}{1 - g_0 y - \chi(1 - g_0)}; \quad (4)$$

$$\hat{\pi}_2^{\text{out}} = \frac{(1 - \alpha g_0) \hat{\pi}_{2\infty} - (1 - \alpha) g_0}{1 - g_0 y - \chi(1 - \alpha g_0)},$$

где  $\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \pi_1^{\text{out}} / \pi_{20}^{\text{in}}$ ,  $\hat{\pi}_2^{\text{out}} = \pi_2^{\text{out}} / \pi_{20}^{\text{in}}$  – приведенные значения внеклеточного осмотического давления веществ: проникающего

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

непроникающего

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

$\hat{\pi}_1^{\text{in}}$  – приведенное значение внутриклеточного осмотического давления проникающего через плазматическую мембрану вещества

$$\hat{\pi}_1^{\text{in}} = \pi_1^{\text{in}} / \pi_{20}^{\text{in}},$$

$\pi_1^{\text{in}}$  – осмотическое давление проникающего через плазматическую мембрану вещества внутри клетки;  $\pi_{20}^{\text{in}}$  – начальное значение суммарного осмотического давления непроникающих веществ внутри клетки;  $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$  – асимптотические значения осмотического давления проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ, соответствующие равномерному их распределению вдоль системы;  $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$  – приведен-

ные значения осмотического давления внеклеточных веществ: для проникающего

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

непроникающего

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

$\hat{\pi}_1^{\text{in}}$  – нормализованное значение осмотического давления проникающего через плазматическую мембрану вещества

$$\hat{\pi}_1^{\text{in}} = \pi_1^{\text{in}} / \pi_{20}^{\text{in}},$$

$\pi_1^{\text{in}}$  – осмотическое давление проникающего через плазматическую мембрану вещества внутри клетки;  $\pi_{20}^{\text{in}}$  – начальное значение осмотического давления непроникающих веществ внутри клетки;  $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$  – асимптотические значения осмотического давления проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ, соответствующие их равномерному распределению вдоль системы;  $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$  – нормализованные асимптотические значения осмотического давления веществ: для проникающего

$$\hat{\pi}_{1\infty} = \pi_{1\infty} / \pi_{20}^{\text{in}};$$

непроникающего

$$\hat{\pi}_{2\infty} = \pi_{2\infty} / \pi_{20}^{\text{in}};$$

$y$  – относительный объем клетки

$$y = \frac{V}{V_0};$$

$g_0$  – начальное значение отношения общего объема клетки к общему объему клеточной суспензии;  $\alpha$  – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ.

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику изменения относительного объема клетки и концентраций проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ внутри клетки во время внеклеточной кристаллизации имеет следующий вид:

$$\frac{dy}{d\hat{T}} = p \exp\left[ a \left( \frac{\hat{T} - 1}{\hat{T}} \right) \right] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - \left[ 1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty} (1 - \alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}} (y - \alpha) g_0}{\hat{\pi}_{2\infty} (1 - \alpha g_0) - (1 - \alpha) g_0} \right] \hat{\pi}_2^{\text{out}} \right\}, \quad (5)$$

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

ные асимптотические значения осмотического давления веществ: проникающего

$$\hat{\pi}_{1\infty} = \pi_{1\infty} / \pi_{20}^{\text{in}};$$

непроникающего

$$\hat{\pi}_{2\infty} = \pi_{2\infty} / \pi_{20}^{\text{in}};$$

$y$  – относительный объем клетки

$$y = \frac{V}{V_0};$$

$g_0$  – начальное значение отношения суммарного объема клеток к полному объему клеточной суспензии;  $\alpha$  – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ.

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику изменения относительного объема клетки и концентраций проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ внутри клетки в процессе внеклеточной кристаллизации, имеет вид:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{d\hat{T}} &= p \exp\left[\frac{a(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \right. \\ &\left. - \left[ 1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \hat{\pi}_2^{\text{out}} \right\}, \\ \frac{d\hat{\pi}_1^{\text{in}}}{d\hat{T}} &= \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \right. \right. \\ &\left. \left. - (1 + \sigma_1 \Phi_{\text{out}}) \hat{\pi}_2^{\text{out}} \right] \times [(1 - \sigma_1) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}}] \times \right. \\ &\left. \times \exp\left[\frac{\alpha(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right] - q(\hat{\pi}_1^{\text{in}} - \Phi_{\text{out}} \hat{\pi}_2^{\text{out}}) \times \right. \\ &\left. \times \exp\left[\frac{b(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right] \right\}, \end{aligned} \quad (5)$$

где

$$\begin{aligned} \Phi_{\text{out}} &= \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}; \\ p &\equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}; q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}; a \equiv \frac{U_0}{R_0 T_0}; b \equiv \frac{U_1}{R_0 T_0}; \\ \tau_0 &= (\gamma_0 L_p \pi_{20}^{\text{in}})^{-1}; \tau_1 = (\gamma_0 k_p)^{-1}, \end{aligned}$$

здесь  $\gamma_0$  – исходное поверхностно-объемное отношение клетки;  $\sigma_1$  – коэффициент отражения плазматической мембраны для проникающего через мембрану вещества.

Уравнения (5) решали численно методом Рунге-Кутты 4-го порядка.

Кинетику изменения концентрации  $C$  внеклеточного раствора при расчетах задавали аналити-

$$\begin{aligned} & - (1 + \sigma_1 \Phi_{\text{out}}) \hat{\pi}_2^{\text{out}} \times [(1 - \sigma_1) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}}] \times \\ & \times \exp\left[\frac{\alpha(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right] - q(\hat{\pi}_1^{\text{in}} - \Phi_{\text{out}} \hat{\pi}_2^{\text{out}}) \times \\ & \times \exp\left[\frac{b(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right], \end{aligned} \quad (5)$$

where

$$\begin{aligned} \Phi_{\text{out}} &= \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}; \\ p &\equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}; q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}; a \equiv \frac{U_0}{R_0 T_0}; b \equiv \frac{U_1}{R_0 T_0}; \\ \tau_0 &= (\gamma_0 L_p \pi_{20}^{\text{in}})^{-1}; \tau_1 = (\gamma_0 k_p)^{-1} \end{aligned}$$

here  $\gamma_0$  is initial surface-volume cell ratio;  $\sigma_1$  is coefficient of plasma membrane reflection for penetrative through membrane substance.

Equation (5) was solved with Runge-Kutta method of the 4<sup>th</sup> order. Kinetics of change in extracellular solution concentration  $C$  during calculations was analytically approximated using melting phase diagram of glycerol aqueous solution [4]

$$C = -8,19 \cdot 10^{-4} T^3 + 0,58 T^2 - 1,40 \cdot 10^2 + 1,12 \cdot 10^4, \quad (6)$$

where  $T$  is current temperature.

Transport coefficients  $L_p$  and  $k_p$  in equations (5) were chosen as the best matching of estimated data with experimental dependencies of cell volume change on temperature during crystallisation.

## Results and discussion

Fig. 1 shows an osmotic reaction of golden hamster kidney cells during formation and development of extracellular ice crystals of different morphology. There is a considerable decrease in cell size with temperature decrease. During thawing a rehydration and gradual recovery of initial cell size are observed.

Fig. 2 demonstrates the estimated and experimental kinetic curves of change in relative cell volume under different conditions of cell suspension freezing, testifying to their satisfactory coincidence.

Fig. 3 and 4 show the obtained in crystallisation area of cell suspension dependencies of efficient coefficients for membrane permeability of golden hamster kidney cells for glycerol,  $K_p$  and water,  $L_p$  molecules on the initial cryoprotectant concentration in the medium, and on cooling rate as well. Permeability coefficients reduce with the augmentation of cryoprotectant initial concentration in suspension according to the mentioned below regression equations: during cooling cell suspension by one-step program

$$L_p = 11.3760 - 1.0741C; k_p = 8.9655 - 0.8467C$$

чески аппроксимацией фазовой диаграммы плавления водного раствора глицерина [4]

$$C = -8,19 \cdot 10^{-4} T^3 + 0,58 T^2 - 1,40 \cdot 10^2 + 1,12 \cdot 10^4, \quad (6)$$

где  $T$  – текущая температура.

Транспортные коэффициенты  $L_p$  и  $k_p$  в уравнениях (5) подбирали из условия наилучшего совпадения расчетных данных с экспериментальными зависимостями изменения клеточного объема от температуры в процессе кристаллизации.

### Результаты и обсуждение

Осмотическая реакция клеток почек сирийского хомячка в процессе формирования и развития внеклеточных кристаллов льда различной морфологии показана на рис. 1. По мере снижения температуры размер клеток заметно уменьшается. При отогреве наблюдаются регидратация и постепенное восстановление исходного размера клеток.

На рис.2 приведены расчетные и экспериментальные кинетические кривые изменения относи-

by two-step one

$$L_p = 22.3170 - 9.0241 \ln(C); k_p = 17.5720 - 7.1053 \ln(C)$$

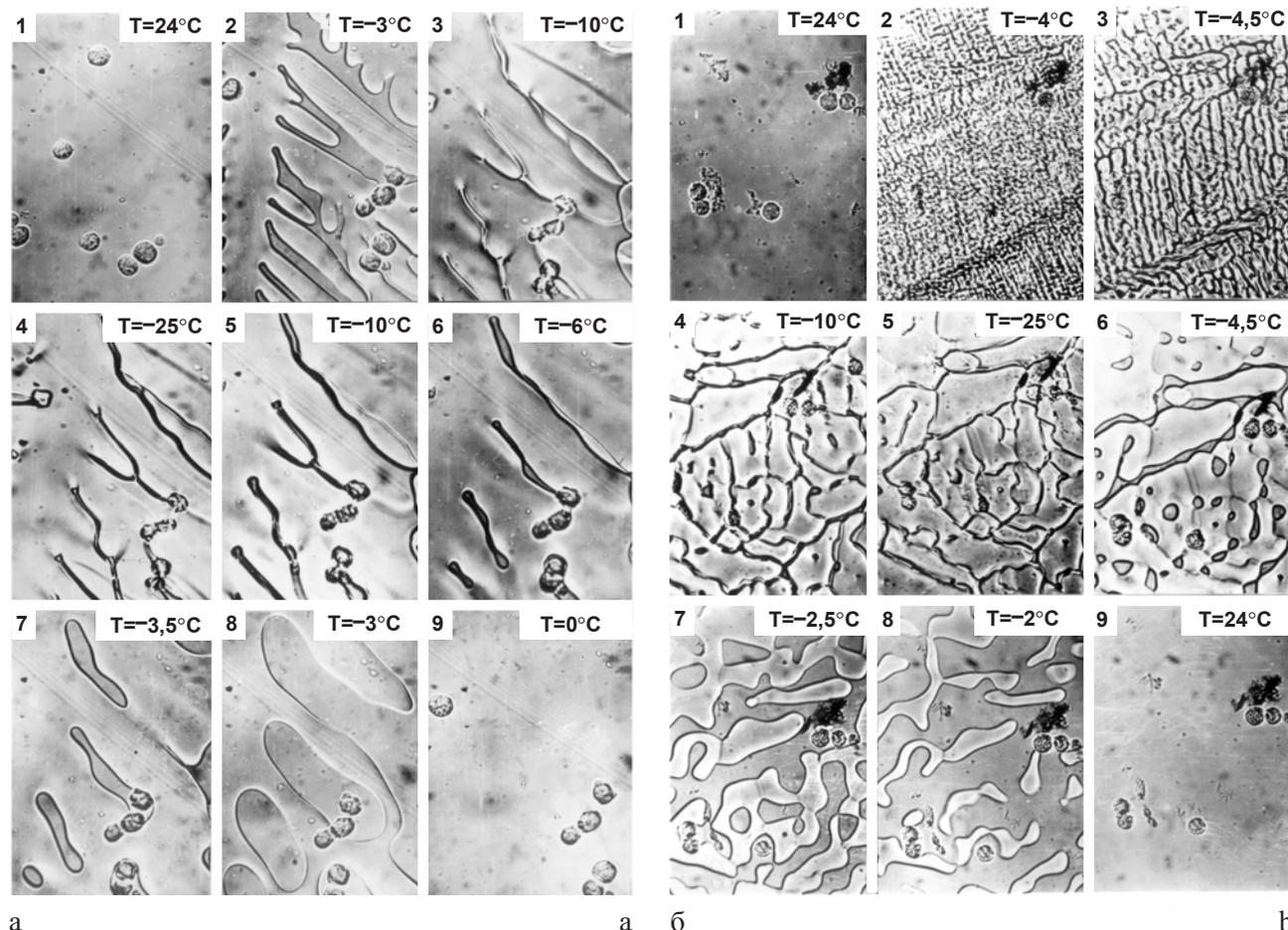
Permeability coefficients  $L_p$  and  $k_p$  are interdependent

$$k_p = L_p (1 - \sigma) \frac{RT}{Kv},$$

where  $v$  is partial molal volume of dissolved substance;  $K$  is the constant, determined for this membrane and this dissolved substance [2, 6, 7]. Therefore dependencies of these coefficients on freezing conditions for cell suspension are similar.

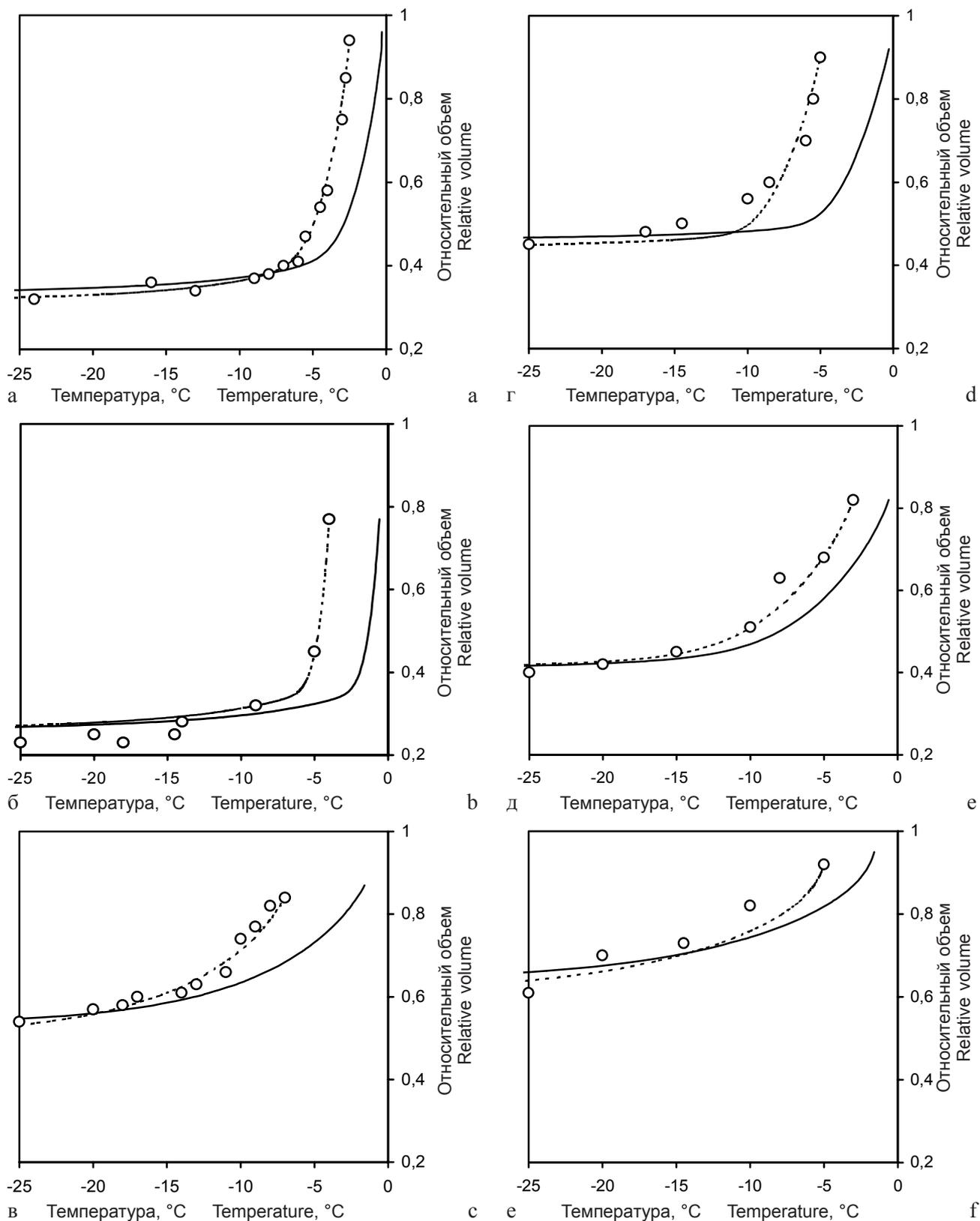
According to theoretical notions of the paper [1] the coefficient of membrane permeability for penetrative cryoprotectant  $k_p$  molecules depends on temperature (see formula 1) but does not depend on cooling rate.

By our data the value of efficient permeability coefficient for glycerol molecules  $k_p$  reduces with the augmentation of initial concentration of solution (see Fig. 3), that can be stipulated by a decrease in crystallisation temperature of extracellular solution at



**Рис. 1.** Кинетика процесса замораживания-отогрева клеток почек сирийского хомячка по программам: одноэтапной (а) и двухэтапной (б) при содержании в суспензионной среде 10%-й концентрации глицерина.

**Fig. 1.** Kinetics of freeze-thawing process of golden hamster kidney cells by the programs: one-step (a) and two-step (b) at the presence of 10% glycerol concentration in suspension medium.



**Рис. 2.** Зависимость относительного объема клеток почек сирийского хомячка от субнулевой температуры при замораживании клеточной суспензии по программам: одноэтапной (а, б, в) и двухэтапной (г, д, е): а, г – 2,5% глицерина, б, д – 5,0% глицерина, в, е – 10% глицерина в суспензионной среде; ○ – экспериментальные данные, сплошная линия – теоретический расчет.

**Fig. 2.** Dependence of relative volume of golden hamster kidney cells on subzero temperature during freezing cell suspension by the programs: one-step (a, b, c) and two-step (d, e, f): a, d – 2.5% glycerol, b, e – 5.0% glycerol, c, e – 10% glycerol in suspension medium; open circles represent experimental data, solid line represents theoretical calculation.

тельного объема клеток в различных условиях замораживания клеточной суспензии, свидетельствующие об их удовлетворительном совпадении.

На рис.3 и 4 представлены полученные в области кристаллизации клеточной суспензии зависимости эффективных коэффициентов проницаемости мембран клеток почек сирийского хомячка для молекул глицерина  $k_p$  и воды  $L_p$  от исходной концентрации криопротектора в среде, а также скорости охлаждения. Коэффициенты проницаемости уменьшаются с увеличением исходной концентрации криопротектора в суспензии согласно нижеприведенным уравнениям регрессии: при охлаждении клеточной суспензии по одноэтапной программе

$L_p=11,3760-1,0741C$ ;  $k_p=8,9655-0,8467C$ ,  
двухэтапной

$L_p=22,3170-9,0241\ln(C)$ ;  $k_p=17,5720-7,1053\ln(C)$ .

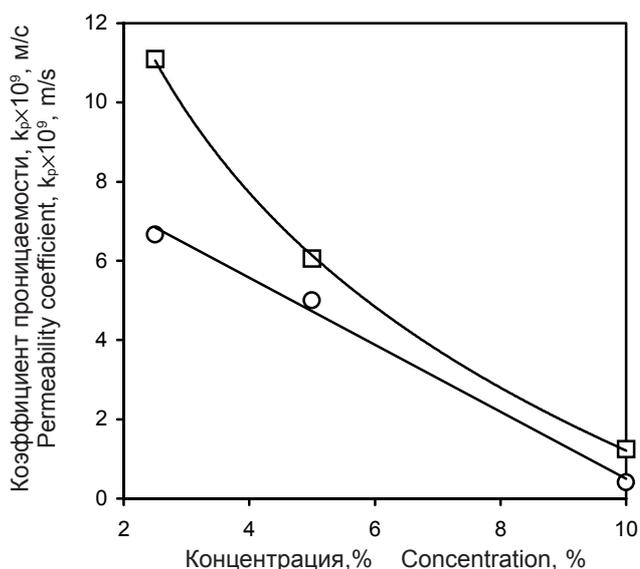
Коэффициенты проницаемости  $L_p$  и  $k_p$  взаимосвязаны

$$k_p = L_p (1 - \sigma) \frac{RT}{K\nu},$$

где  $\nu$  – парциальный молярный объем растворенного вещества;  $K$  – константа, определенная для данной мембраны и данного растворенного вещества [2, 6, 7]. Поэтому зависимости этих коэффициентов от условий замораживания клеточной суспензии аналогичны.

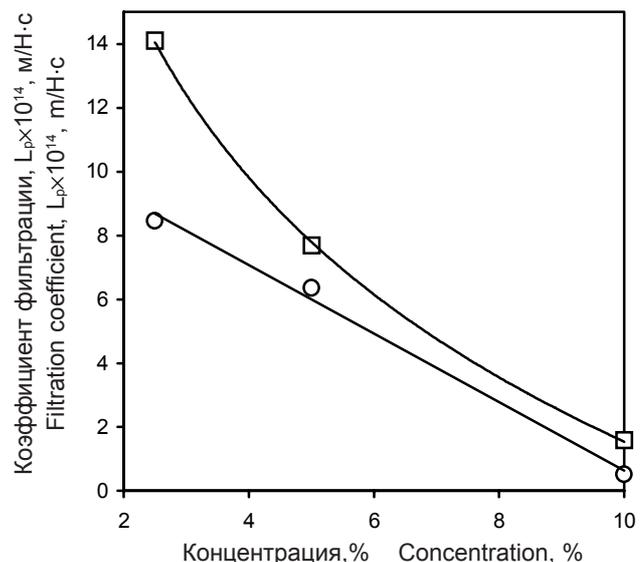
Согласно теоретическим представлениям работы [1] коэффициент проницаемости мембраны для молекул проникающего криопротектора  $k_p$  зависит от температуры (см. формулу 1) и не зависит от скорости охлаждения.

По нашим данным значение эффективного коэффициента проницаемости для молекул глицерина  $k_p$  уменьшается с повышением исходной концентрации раствора (см. рис. 3), что может быть обусловлено понижением температуры кристаллизации внеклеточного раствора при росте концентрации криопротектора в криозащитной среде (закон Аррениуса). Другие расхождения экспериментальных и расчетных данных объясняются не учтенными в теоретическом алгоритме расчета эффектами кривизны кристаллов льда, образующихся в процессе замораживания клеточной суспензии, и переохлаждения, возникающего в тонкой пленке кристаллизующегося раствора. В соответствии с полученными результатами скорость охлаждения при более низких концентрациях криопротектора влияет на кривизну образующихся кристаллов льда значительней, чем при высоких концентрациях. Другими словами,



**Рис. 3.** Зависимость коэффициента проницаемости плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка для молекул глицерина  $k_p$  от его исходной концентрации в суспензионной среде при замораживании по программам:  $\circ$  – одноэтапной;  $\square$  – двухэтапной.

**Fig. 3.** Dependency of permeability coefficient of plasma membranes of golden hamster kidney cells for glycerol molecules  $k_p$  on its initial concentration in suspension medium during freezing by the programs:  $\circ$  – one-step;  $\square$  – two-step.



**Рис. 4.** Зависимость коэффициента фильтрации  $L_p$  плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка от исходной концентрации глицерина в суспензионной среде при замораживании по программам:  $\circ$  – одноэтапной;  $\square$  – двухэтапной.

**Fig. 4.** Dependency of filtration coefficient,  $L_p$  of plasma membranes of golden hamster kidney cells on initial concentration of glycerol in suspension medium during freezing by the programs:  $\circ$  – one-step;  $\square$  – two-step.

a growth of cryoprotectant concentration in cryoprotective medium (Arrhenius law). Other divergence in experimental and estimated data are explained by

повышение исходной концентрации криопротектора во внеклеточной среде влияет на кривизну внеклеточных кристаллов сильнее, чем скорость охлаждения. В результате эффект зависимости кривизны кристаллов от скорости охлаждения при больших исходных концентрациях криопротектора нивелируется. В процессе замораживания мембрана клеток может претерпевать существенные физико-химические изменения, не приводящие к ее однозначному повреждению. Поэтому предположение о сохранении интактности мембраны при замораживании клеточной суспензии также может внести коррективы в расхождение экспериментальных и расчетных данных. Возможно, что значения транспортных характеристик мембран зависят от скорости потоков воды и криопротектора через них. Искажение формы клеточной мембраны в процессе обезвоживания также может влиять на скорость массообмена клеток с окружающей их средой вследствие диффузионных ограничений в примембранных слоях жидкости [2].

Несмотря на указанные расхождения в теоретических и расчетных данных, степень их совпадения, учитывая принятые в теоретической модели приближения, можно считать удовлетворительной.

### Выводы

Описанную теоретическую модель можно применить для расчета важных с точки зрения криобиологии эффектов обезвоживания и переохлаждения клеток, а также концентрирования вне- и внутриклеточных веществ. Экспериментальные зависимости клеточного объема от температуры в процессе кристаллизации клеточной суспензии могут быть использованы для определения транспортных параметров клеточных мембран – коэффициентов фильтрации  $L_p$  и проницаемости для криопротектора  $k_p$ . Кроме того, описанный в данной работе подход сочетания экспериментальных исследований и теоретических расчетов может быть применен для оценки концентрации внутриклеточных веществ и эффективного переохлаждения цитоплазмы с использованием только данных о зависимости объема клеток от температуры при замораживании.

### Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук.думка, 1994.-143 с.
2. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт: Пер.с англ.– М.: Мир,1980.– 150 с.
3. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Роль структуры внеклеточного льда в процессе криоповреждения клеток // Моделирование криобиологических процессов.– Харьков, 1988.– С. 25-34.

unaccounted in theoretical calculation algorithm effects of curvature in ice crystals, formed during cell suspension freezing and overcooling, occurring in a thin film of crystallised solution. According to the results obtained cooling rate at lower cryoprotectant concentrations affects the curvature of formed ice crystals in greater extent than under high concentrations. By other words, an increase in initial concentration of cryoprotectant into extracellular medium much strongly affects the curvature of extracellular crystals than cooling rate. As a result, the effect of crystal curvature dependency on cooling rate under high initial cryoprotectant concentrations is levelled. During freezing cell membrane can undergo significant physical and chemical changes, not leading to its simple damage. Therefore the suggestion about preservation of membrane intactness during cell suspension freezing may also make some corrections in divergence of experimental and estimated data. Values of membrane transport characteristics possibly depend on water and cryoprotectant flow rate through it. The distortion of cell membrane shape during dehydration may also affect the rate of mass exchange with surrounding medium due to diffusive limitations in membrane-adjacent layers of liquid [2].

In spite of mentioned divergence in theoretical and estimated data the degree of their coincidence, taking into account theoretical model approximations accepted, can be considered as satisfactory.

### Conclusions

Described theoretical model can be applied for calculating important for cryobiology effects of cell dehydration and overcooling, as well as for concentrating extra- and intracellular substances. Experimental dependencies of cell volume on temperature during cell suspension crystallisation can be used to determine transport parameters of cell membranes: filtration coefficient,  $L_p$  and the one of permeability for cryoprotectant  $k_p$ . In addition, described in this work approach of combining experimental investigations and theoretical calculations can be applied for evaluating concentrations of intracellular substances and efficient overcooling of cytoplasm using only the data about cell volume dependency on temperature during freezing.

### References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 143 p.
2. Kotyk A., Yanachek K. Membrane transport: Transl. from Engl.– Moscow: Mir, 1980.– 150 p.
3. Kuleshova L.G., Rozanov L.F. Role of intracellular ice structure in process of cell cryodamages / In: Modelling of cryobiological processes.– Kharkov, 1988.– P. 25-34.

4. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.– Киев: Наук. думка, 1977.– 243 с.
  5. Пат. 13671(Україна) МПК<sup>4</sup>G02B21/28. Пристрій для криомікроскопічних досліджень / О.М. Новіков, Л.Г. Кулешова, С.В. Блохін, С.Т. Олійник. Заявлено 24.02.84. Опубл.25.04.97.– Бюл. №2.–С.3.1.309.
  6. Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1958.– Vol. 27, N2.– P.229-246.
  7. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability // J. Gen. Physiol.– 1961.– Vol. 45, N2.– P. 143-179.
4. Pushkar N.S., Belous A.M., Itkin Yu.A. et al. Low temperature crystallisation in biological systems.– Kiev: Naukova Dumka, 1977.– 243 p.
  5. Patent 13671 (Ukraine) IPC<sup>4</sup> G02B21/28. Device for cryomicroscopic investigations / O.M. Novikov, L.G. Kuleshova, S.V. Blokhin, S.T. Olejnik. Applied for 24.02.84. Published 25.04.97.– Bull. N2.– P.3.1.309.
  6. Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1958.– Vol. 27, N2.– P.229-246.
  7. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability // J. Gen. Physiol.– 1961.– Vol. 45, N2.– P. 143-179.

*Поступила 3.08.2004*

*Accepted in 3.08.2004*