УДК 57.043:577.352.4

О.В. Сакун, В.В. Марушенко, І.Ф. Коваленко,
А.Ю. Сіренко, І.П. Висеканцев, О.В. Давидова, О.І. Гордієнко*

Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів

UDC 57.043:577.352.4

O.V. Sakun, V.V. Maruschenko, I.F. Kovalenko,
A.Yu. Sirenko, I.P. Vysekantsev, O.V. Davydova, O.I. Gordiyenko*

Temperature Effect on Membrane Permeability Coefficients of Yeast-Like Fungi *Saccharomyces cerevisiae* for Water and Cryoprotectant s

Визначені біофізичні параметри клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae:* осмотично неактивний об'єм, коефіцієнт фільтрації в середовищах з кріопротекторами (гліцерин, 1,2-пропандіол та диметилсульфоксид) та коефіцієнти проникності для цих кріопротекторів при температурах 25 та 10°С. Для визначення вказаних параметрів використовували удосконалені рівняння масопереносу крізь мембрани клітин, отримані у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів. Розраховані величини енергії активації проникання молекул води та кріопротекторів крізь клітинні мембрани.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, проникність, кріопротектори, енергія активації.

Определены биофизические параметры клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: осмотически неактивный объем, коэффициент фильтрации в средах с криопротекторами (глицерин, 1,2-пропандиол, диметилсульфоксид) и коэффициенты проницаемости для этих криопротекторов при температурах 25 и 10°С. Для определения указанных параметров использовали усовершенствованные уравнения массопереноса через мембраны клеток, полученные в приближении линейной термодинамики необратимых процессов. Рассчитаны величины энергии активации проникновения молекул воды и криопротекторов через клеточные мембраны.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, проницаемость, криопротекторы, энергия активации.

The biophysical parameters of yeast cell Saccharomyces cerevisiae, osmotically inactive volume, filtration coefficients in the cryoprotectant containing media and permeability coefficients for the cryoprotectants glycerol, 1,2-propane diol, dimethyl sulfoxide, were determined at the temperatures of 25 and 10°C. For determination of the parameters the improved equations of mass transfer via cell membranes were used. The equations are based on the approach of linear thermodynamics of irreversible processes. The values of activation energy of water and cryoprotectants molecules penetration via cell membranes were calculated.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, permeability, cryoprotectants, activation energy.

Найбільш поширеним способом підтримки мікроорганізмів є періодичні їх пересіви на свіже живильне середовище [1, 2]. Проте проблема ефективної за кінцевими результатами, а також обґрунтованої за трудомісткістю і вартістю консервації культур мікроорганізмів обумовлена збільшенням кількості та різноманітністю культур, що зберігаються [5]. Кріоконсервування клітинних суспензій, зокрема мікроорганізмів, залишається основним методом їх тривалого збереження без можливої зміни генетичного складу. Правильний вибір режимів низькотемпературного консервування дозволяє тривалий час підтримувати мікроорганізми у стані, що забезпечує їх повернення до життєдіяльності без зміни початкових властивостей і зниження кількості життєздатних клітин. Оптимальними режимами заморожування для

The most widely spread way to support microorganism culture is their periodic replating on a fresh nutrient medium [1, 2]. However the problem of microorganism culture preservation to be efficient by the final results, as well substantiated by labour intensity and cost, is stipulated by the augmentation of quantity and variety of cultures under preservation [5]. The cryopreservation of cell suspensions, namely microorganisms, remains the principal method for their long-term preservation without any possible changes in genetic composition. Correct selection of low temperature preservation regimens enables a long-term support of microorganism in the state, providing their return to vital activity without any changes in the initial properties and a decrease in viable cell number. Either slow freezing rates (1–10°C/min) or two-step freezing programs with a slow freezing at the first stage and

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

* *Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію:* вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: gordienko@gala.net

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: gordienko@gala.net

дріжджових клітин вважають повільні швидкості заморожування (1–10°C/хв) або двохетапні програми заморожування з повільним заморожуванням на першому етапі і наступним зануренням у скраплений азот [11, 12, 14]. В роботі [14] показано, що виживання клітин, зокрема дріжджів, залежить також від швидкості відігрівання. При швидкому відігріванні (500°C/хв) знайдено два максимуми виживання: при повільній швидкості охолодження (від 1до 10°C/хв) та при надшвидкому охолодженні (~10^4 °C/хв) [9].

Існування оптимальної швидкості охолодження було пояснено в межах двохфакторної теорії Мейзура [15]. При різній швидкості охолодження змінюється внесок двох конкуруючих типів пошкоджень, пов’язаних із збезводненням клітин, з одного боку, та внутрішньоклітинною кристалізацією, з іншого. Зі збільшенням збезводнення клітини зменшується величина ефективного переохолодження протоплазми та імовірність утворення кристалів усередині клітини. Як надмірне збезводнення, так і внутрішньоклітинна кристалізація приводять до пошкодження клітинних структур [3]. Отже, для кожного типу клітин існує оптимальна (забезпечує максимальну збереженість) швидкість охолодження, що прямо пов’язана зі швидкістю, з якою внутрішньоклітинна вода може виходити з клітин, тобто з коефіцієнтом проникності клітинної мембрани для води. Оскільки проникність для молекул води мембран різних видів клітин може відрізнятись на декілька порядків, то і значення оптимальної швидкості охолодження для цих клітин суттєво відрізняються. Так, наприклад, для еритроцитів людини оптимальна швидкість охолодження становить біля 3000°C/хв, а ооцитів миші – 0,1°C/хв. Надзвичайно високе значення оптимальної швидкості охолодження для еритроцитів людини з погляду двохфакторної теорії пояснюється дуже високою проникністю їх мембран для води і великим поверхнево-об’ємним відношенням [3].

Додавання кріопротектора до клітинної суспензії, як правило, приводить до зсуву оптимальної швидкості охолодження у бік менших значень. Це пов’язано зі здатністю кріопротекторів утруднювати процеси утворення та росту кристалів, досягнення клітиною мінімального об’єму. Важливого значення при цьому набувають здатність кріопротектора проникати в клітини та швидкість проникання. Отже, іншим суттєвим кріобіологічним параметром клітинної мембрани є її проникність для кріопротекторів.

Однією з важливих характеристик транспортних процесів є їх залежність від температури. Вплив температури на константи швидкостей, що характеризують хімічні або біологічні процеси, часто аналізують в термінах емпіричної енергії ак-

following immersion into a liquid nitrogen are considered as the optimal freezing regimens for yeast cells [11, 12, 14]. As reported [14], the survival of cells, especially yeast, is also dependent on thawing rate. Under rapid thawing (500°C/min) there were found out the two survival maxima: under slow cooling rate (from 1 to 10°C/min) and ultrarapid cooling one (~10^4 °C/min) [9].

The existence of optimal cooling rate was explained within the frames of Mazur’s two-factor theory [15]. The contribution of two competitive types of damages, associated to cell dehydration from one side, and intracellular crystallisation from another one, changes under different cooling rates. With increasing cell dehydration, there are reduced the value of protoplasm efficient overcooling and statistically significance of crystal formation inside cell. Both excessive dehydration and intracellular crystallisation result in cell structure damaging [3]. Thus, for each cell type there is the optimal (providing maximum preservation) cooling rate, directly associated to the one, with which intracellular water may release from cells, *i. e.* with cell membrane permeability coefficient for water. Since the water molecules’ permeability through membranes of different cell types may be several order different, the values of optimal cooling rate for cells are significantly distinguished. Thus, for human erythrocytes and murine oocytes the optimal cooling rate is about 3,000 and 0.1°C/min, correspondingly. Ultrahigh value of optimal cooling rate for human erythrocytes from the point of view of two-factor theory is explained by a very high permeability of their membranes for water and a high surface-volume ratio [3].

Addition of cryoprotectant to cell suspensions generally results in a shift of optimal cooling rate towards lower values. This is associated to the capability of cryoprotectants to complicate the processes of crystal formation and growth, as well the reaching the minimum volume by a cell. At the same time of importance are the capability of cryoprotectant to penetrate into cells and the penetration rate. Thus, another essential cryobiological parameter of cell membrane is its penetration for cryoprotectants.

One of the important characteristics of transport processes is their dependence on temperature. Temperature effect on rate constants, characterising either chemical or biological processes, are often analysed in terms of empirical activation energy (E_A). Penetration of water and dissolved substances through the artificial and natural membranes by the different, structurally stipulated ways, is characterised by the distinctive values of visible activation energy. The values of activation energy within 12–25 kJ/mol range, corresponding to those of diffusive activation energy in a volume solution, are generally consistent with the substance penetration by a channel mechanism. During

тивації (E_A). Проникання води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різними структурно обумовленими шляхами характеризуються відмінними значеннями видимої енергії активації. Проникненню речовин за канальним механізмом відповідають, як правило, значення енергії активації в діапазоні 12–25 кДж/моль, які узгоджуються з величинами енергії активації дифузії в об'ємному розчині. При проникненні молекул шляхом розчинення та дифузії в ліпідному матриксі енергія активації набуває значень 30–85 кДж/моль і навіть більших [16, 18]. Тобто визначення величин енергії активації проникності для молекул різних речовин є можливістю з'ясувати механізми їх проникання крізь плазматичні мембрани конкретних клітин. В той же час, для описання процесів, що відбуваються з клітиною впродовж охолодження, важливо враховувати залежність різних параметрів, зокрема проникності плазматичних мембран для молекул води та кріопротекторів, від температури.

Мета роботи – визначення коефіцієнтів проникності клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для молекул води і кріопротекторів та величин енергії активації процесу їх проникання.

Матеріали і методи

Клітини дріжджів *S. cerevisiae* вирощували на скошеному сусло-агаровому середовищі при 22°С впродовж 48 годин. Культура дріжджів на цьому етапі знаходиться у стаціонарній фазі росту. Клітини змивали з агарової підложи фізіологічним розчином та використовували в експерименті.

Коефіцієнт фільтрації та коефіцієнти проникності мембран дріжджів для кріопротекторів визначали вольюмометричним методом. Клітини вміщували у бінарний розчин (0,15 М NaCl, 1М кріопротектор), об'єм якого на порядок перевищував початковий об'єм клітинної суспензії. Досліджували кінетику зміни розмірів клітин у розчинах трьох кріопротекторів (гліцерин, 1,2-пропандіол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО)) при температурах 25 та 10°С за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Німеччина) з використанням масляно-імерсійного об'єктива ×63. Об'єм клітин апроксимували об'ємом розтягнутого еліпсоїда обертання. Лінійні розміри клітин (довжину великої та малої осі еліпсоїда) у різних часових точках визначали за допомогою програми Axio Vision Rel. 4.6 (Carl Zeiss, Німеччина). Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин при їх контакті з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь, що описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів [3].

molecule penetration via dissolution and diffusion in a lipid matrix, the activation energy gets values of 30–85 kJ/mol and even higher [16, 18]. So, the determining of activation energy values of permeability for molecules of different substances is the possibility to reveal the mechanisms of their penetration through plasma membranes of specific cells. At the same time, in order to describe the processes, occurring with a cell during cooling, of importance is to take into account the dependency of different parameters on a temperature, especially permeability of plasma membranes for molecules of water and cryoprotectants.

The research was aimed to determine the permeability coefficients for *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells for water and cryoprotectant molecules and the activation energy values of their penetration process.

Materials and methods

The *S. cerevisiae* yeast cells were cultured on wort-agar slope at 22°C for 48 hrs. Yeast culture at this stage is in a stationary growth phase. Cells were washed from an agar substrate with physiological solution and used in the experiment.

Filtration coefficient and those of yeast membrane permeability for cryoprotectants were volumometrically determined. Cells were placed in a binary solution (0.15 M NaCl, 1M cryoprotectant), which volume was higher order than initial one of cell suspension. The kinetics of cell size change in three cryoprotective solutions (glycerol, 1,2-propane diol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO)) at 25 and 10°C using Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) oil-immersion lens, ×63, was under study. Cell volume was approximated by the prolate spheroidal volume. Linear dimension of cells (transversal line and minor axis lengths) in different time points were determined using the Axio Vision Rel. 4.6 (Carl Zeiss) software. The experimentally defined time dependencies of cell volume during contact with hypertonic cryoprotective solutions were approximated by computational solutions of the system of nonlinear equations, describing this dependency in approximating linear thermodynamics of irreversible processes [3].

Values of activation energy E_A of water and cryoprotective molecule transfer were determined by the slope of plot *In k vs.* $1/T$ (Arrhenius plot), where k is the constant of process rate (in our case K is permeability coefficient or L_p is filtration coefficient).

Data were statistically processed using MS Excell software and Student's t-criterion.

Results and discussion

The coefficients L_p and K of yeast membranes for cryoprotectants were obtained by optimal approximation of experimental points by theoretic curves, i.e. equation system solutions [3] (Figure):

Величини енергії активації (E_A) процесів переносу молекул води та кріопротекторів визначали з нахилу графіків *ln k* від $1/T$ (графік Ареніуса), де k є константа швидкості процесу (в нашому випадку K – коефіцієнт проникності або L_p – коефіцієнт фільтрації).

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Excel з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Коефіцієнти L_p і K мембран дріжджів для кріопротекторів отримували шляхом оптимальної апроксимації експериментальних точок теоретичними кривими, тобто рішеннями системи рівнянь [3] (рисунок):

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

$$\frac{d\hat{\pi}_s^{in}}{dt} = -\frac{\sigma_s(1+\hat{\pi}_s^{in})\hat{\pi}_s^{in}}{(y-\alpha)}\frac{dy}{dt} +$$

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

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

де π_s^{in} і π_k^{in} – осмотичний тиск проникаючої і не проникаючої крізь клітинну мембрану внутрішньої речовини, відповідно; π_{s0}^{in} і π_{k0}^{in} – початкові значення; t – час; π_s^{out} і π_k^{out} – осмотичний тиск проникаючої і не проникаючої крізь клітинну мембрану зовнішньої речовини, відповідно; V – об'єм клітини; V_0 – початковий об'єм клітини; $y = V/V_0$ – відносний об'єм клітини; σ_s – коефіцієнт відбиття мембрани до розчиненої речовини, що проникає крізь неї; α – об'ємна частка не проникаючої крізь клітинну мембрану речовини всередині клітини;

$$\tau_w = \left(\frac{S}{V_0}L_p\frac{RT}{\upsilon_s}\right)^{-1},$$

$$\tau_s = \left(\frac{S}{V_0}k_s\right)^{-1} -$$

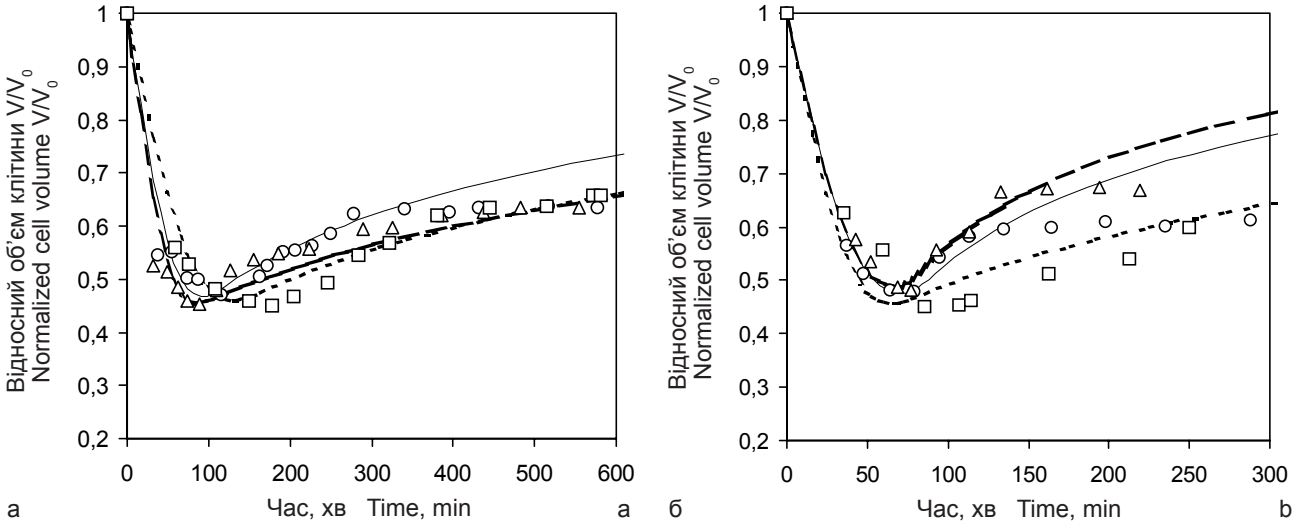
$$\frac{dy}{dt} = -\frac{1}{\tau_w}\left(\sigma_s \Delta\hat{\pi}_s + \frac{1+\sigma_s\hat{\pi}_s^{in}}{1+\hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k\neq w,s)}^{n} \Delta\hat{\pi}_k\right);$$

$$\frac{d\hat{\pi}_s^{in}}{dt} = -\frac{\sigma_s(1+\hat{\pi}_s^{in})\hat{\pi}_s^{in}}{(y-\alpha)}\frac{dy}{dt} +$$

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

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

where π_s^{in} and π_k^{in} are osmotic pressures of penetrative and non-penetrative through cell membrane intracellular substances, correspondingly; π_{s0}^{in} and π_{k0}^{in} are the initial values; t is time; π_s^{out} and π_k^{out} are the osmotic pressures of penetrative and non-penetrative through cell membrane extracellular substances, correspondingly; V is cell volume; V_0 is initial value of cell volume; $y = V/V_0$ is a relative cell volume; σ_s is reflection coefficient of cell membrane to a dissolved substance, peneteating through it; α is a volume part of non-penetrative through cell membrane substances inside a cell;



Експериментальні (точки) та теоретичні (лінії) залежності відносного об'єму клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* від часу в гіпертонічних розчинах кріопротекторів при температурах 25 та 10°С: ○ – гліцерин; △ – 1,2-ПД; □ – ДМСО.

Experimental (points) and theoretical (lines) dependencies of a relative volume of *S. cerevisiae* yeast cells on time in hypertonic solutions of cryoprotectants at 25 (a) and 10°C (b): ○ – glycerol; △ – 1,2-PD; □ – DMSO.

шньоклітинних речовин відповідно; π_{s0}^{in} і π_{k0}^{in} – початкові значення цих величин; τ – час; π_s^{out} і π_k^{out} – осмотичний тиск проникаючої і не проникаючої крізь клітинну мембрану позаклітинних речовин відповідно; V – об'єм клітини; V_0 – початкове значення об'єму клітини, $y = V/V_0$ – відносний об'єм клітини; σ_s – коефіцієнт відбиття клітинної мембрани до проникаючої крізь неї розчиненої речовини; α – об'ємна частка не проникаючих крізь клітинну мембрану речовин усередині клітини;

$$\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \frac{RT}{\upsilon_s} \right)^{-1},$$

$$\tau_s = \left(\frac{S}{V_0} k_s \right)^{-1} -$$

величини, що мають розмірність часу; S – площа поверхні клітинної мембрани; L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани; R – універсальна газова константа; T – абсолютна температура; υ_s – парціальний молярний об'єм проникаючої крізь мембрани клітин розчиненої речовини; k_s – коефіцієнт проникності клітинної мембрани до проникаючої крізь неї розчиненої речовини;

$$\hat{\pi}_k = \frac{\pi_k \upsilon_s}{RT} -$$

приведений осмотичний тиск k-ї розчиненої речовини; $\Delta\hat{\pi}_s$ і $\Delta\hat{\pi}_i$ – трансмембранний перепад приведеного осмотичного тиску проникаючої та не проникаючої крізь клітинну мембрану речовин відповідно; індекси s і w позначають величини, які відносяться до розчиненої речовини і розчинника.

У попередній роботі [6] ми визначили осмотично неактивний об'єм α: експериментальні дані залежності асимптотичного (за $t >> \tau_w$) відносного об'єму клітин дріжджів *S. cerevisiae* y_∞ від оберненого осмотичного тиску розчину хлориду натрію апроксимували методом найменших квадратів рівнянням

$$y_\infty = \alpha + \frac{\hat{\pi}_{k0}^{in}(1-\alpha)}{\hat{\pi}_k^{out}} = \alpha + (1-\alpha)x,$$

де $x = \dfrac{\hat{\pi}_{k0}^{in}}{\hat{\pi}_k^{out}}$.

Отримане значення величини осмотично неактивного об'єму становило $\alpha = 0{,}27$. Значення коефіцієнта фільтрації у середовищах з різними кріо-

are the values with time dimension; S is surface area of cell membrane; L_p is the cell membrane filtration coefficient; R is universal gas constant; T is absolute temperature; υ_s is a partial molar volume of dissolved substance, penetrating through cell membranes; k_s is the permeability coefficient of cell membrane to a dissolved substance, penetrating through it;

$$\hat{\pi}_k = \frac{\pi_k \upsilon_s}{RT}$$

is the normalised osmotic pressure of the k-th dissolved substance; $\Delta\hat{\pi}_s$ and $\Delta\hat{\pi}_i$ are the transmembrane fall of the normalised osmotic pressure of penetrative and non-penetrative through cell membrane substance, correspondingly; s and w indices designate the values, related to a dissolved substance and a solvent.

In the previous research [6] we have determined an osmotically inactive volume α: experimental data of dependency of asymptotic ($t >> \tau_w$) relative volume, y_∞, of *S. cerevisiae* yeast cells on a reverse osmotic pressure of sodium chloride solution were approximated using the least square method by the equation:

$$y_\infty = \alpha + \frac{\hat{\pi}_{k0}^{in}(1-\alpha)}{\hat{\pi}_k^{out}} = \alpha + (1-\alpha)x,$$

where $x = \dfrac{\hat{\pi}_{k0}^{in}}{\hat{\pi}_k^{out}}$.

The obtained value of osmotically inactive volume was $\alpha = 0.27$. The filtration coefficient value in the media with different cryoprotectants and the calculated values of activation energy of water molecule penetration through yeast cell membranes in these media are presented in the Table 1, the permeability coefficients for cryoprotectants and the activation energy values are done in the Table 2.

The determined values for filtration coefficients are in a reasonable agreement with those reported [13]. As the result showed, the values of filtration coefficient in the media with glycerol and DMSO were practically consistent and statistically and significantly lower, than in 1,2-PD containing medium. This result was obtained by the both studied temperatures. The energy of activation process of water molecule transmembrane transfer is also the same in two first cases and twice lower in the medium with 1,2-PD. This testifies to its possible effect on cell membranes, resulting in increasing such important characteristic, as filtration coefficient. The 1,2-PD effect on plasma membrane state was noted for murine oocytes as well [10].

The permeability coefficients for all the studied cryoprotectants are not statistically and significantly

Таблиця 1. Коефіцієнти фільтрації клітинних мембран дріжджів *S. cerevisiae* і енергія активації процесу переносу води крізь них, визначені в середовищах різного складу (M±m)

Table 1. Filtration coefficients of *S. cerevisiae* yeast cell membranes and activation energy of water transfer through them are determined in the media with different compositions (M±m)

Склад середовища Medium composition	$L_p \times 10^{14}$, м³/н·с $L_p \times 10^{14}$, m³/N·s		E_A, кДж/моль E_A, kJ/mol
	10°C	25°C	
Гліцерин – вода – NaCl Glycerol – water – NaCl	0,53±0,12	0,9±0,18	24,6
1,2-ПД – вода – NaCl 1,2-P – water – NaCl	0,79±0,1	1,03±0,14	12,4
ДМСО – вода – NaCl MSO – water – NaCl	0,54±0.08	0,92±0,2	24,5

протекторами і розраховані величини енергії активації проникання молекул води крізь мембрани клітин дріжджів в цих середовищах подані в табл. 1, коефіцієнти проникності для кріопротекторів та величини енергії активації їх проникання – у табл. 2.

Визначені величини коефіцієнтів фільтрації задовільно узгоджуються з [13]. Результати показали, що значення коефіцієнта фільтрації, визначені в середовищах з гліцерином та ДМСО, практично збігаються і є вірогідно меншими, ніж в середовищі з 1,2-ПД. Такий результат отримано за обох досліджених температур. Енергія активації процесу трансмембранного переносу молекул води також збігається у двох перших випадках і у 2 рази менша в середовищі з 1,2-ПД. Це свідчить про можливу його негативну дію на мембрани клітин, що призводить до збільшення такої важливої характеристики, як коефіцієнт фільтрації. Вплив 1,2-ПД на стан плазматичних мембран був відмічений також і для ооцитів миші [10].

Коефіцієнти проникності для всіх досліджених кріопротекторів вірогідно не відрізняються. Якщо порівнювати проникність мембран дріжджів з проникністю мембран еритроцитів людини, то у останніх проникність для гліцерину значно менша, ніж проникність для 1,2-ПД та ДМСО. Така різниця для еритроцитів людини обумовлена неоднаковими розмірами молекул та ступенем їх гідрофобності або гідрофільності. Показано, що гліцерин не проникає крізь мембрани еритроцитів людини гідрофільними каналами, які є шляхом проникання для молекул води [4]. Проте відомо, що гліцерин – суб'єкт метаболізму дріжджових клітин, мембрани яких мають спеціалізовані канали. If comparing the permeability of yeast membranes with that for human erythrocyte membranes, the latter has much lower permeability for glycerol, than for 1,2-PD and DMSO. This difference for human erythrocytes is stipulated by unequal sizes of molecules and the extent of their hydrophobicity or hydrophilicity. Glycerol was shown as non-penetrative through human erythrocyte membranes via hydrofoil channels, being the penetration ways for water molecules [4]. However, glycerol is known as the subject of yeast cell metabolism, which membranes have special channel for glycerol and water transport [8, 17, 19]. The molecule of 1,2-PD differs from glycerol one by the presence of methyl group instead of third hydroxyl group in glycerol molecule. Therefore 1,2-PD molecule has a higher hydrophobicity, affecting the distribution coefficient of this substance between hydrophobic phase and water, which is several time higher than the one for glycerol (0.076 and 0.005, correspondingly). At the same time the sizes of 1,2-PD molecule are much lower compared to glycerol ones [4]. Thus, 1,2-PD may penetrate through the yeast cell membranes, via the same channels as glycerol. However, the physical and chemical properties of 1,2-PD molecules, being different from those for glycerol, may affect the state of glycerol channels and their penetration for other molecules, especially water. The existence of this effect confirms a significant reduction of the value of activation energy of water molecule penetration in the medium with 1,2-PD. At the same time, the values of activation energy for glycerol and 1,2-PD molecule penetration are not statistically and significantly different, meanwhile for DMSO molecules this parameter is statistically and significantly higher.

The hydrophobicity of DMSO molecules is much higher compared to both glycerol and 1,2-PD ones.

Таблиця 2. Коефіцієнти проникності для кріопротекторів і енергія активації процесу їх переносу крізь клітинні мембрани дріжджів *S. cerevisiae* (M±m)

Table 2. Permeability coefficients for cryoprotectants and activation energy of their transfer through cell membranes of *S. cerevisiae* yeast (M±m)

Речовина Substance	$K \times 10^8$, м/с $K \times 10^8$, m/s		E_A, кДж/моль E_A, kJ/mol
	10°C	25°C	
Гліцерин Glycerol	0,42±0,1	0,74±0,12	26,23
1,2-ПД 1,2-P	0,4±0,13	0,7±0,2	25,75
ДМСО MSO	0,39±0,07	0,88±0,4	37,7

ли транспорту гліцерину і води [8, 17, 19]. Молекула 1,2-ПД відрізняється від молекули гліцерину наявністю метильної групи замість третьої гідроксильної групи в молекулі гліцерину. Тому молекула 1,2-ПД більш гідрофобна, що впливає на коефіцієнт розподілу цієї речовини між гідрофобною фазою і водою, який на порядок перевищує такий для гліцерину (0,076 и 0,005 відповідно). В той же час розміри молекули 1,2-ПД є значно меншими порівняно з молекулами гліцерину [4]. Отже, 1,2-ПД може проникати крізь мембрани дріжджових клітин тими ж каналами, що і гліцерин. Проте фізико-хімічні властивості молекул 1,2-ПД, які відрізняються від таких для гліцерину, можуть впливати на стан гліцеринових каналів та їх проникність для інших молекул, зокрема води. Існування такого впливу підтверджує значне зменшення значення енергії активації проникання молекул води у середовищі з 1,2-ПД. В той же час значення енергії активації проникання молекул гліцерину та 1,2-ПД вірогідно не відрізняються, тоді як для молекул ДМСО цей параметр вірогідно більший.

Відомо, що гідрофобність молекул ДМСО є суттєво вищою порівняно як з молекулами гліцерину, так і 1,2-ПД. Коефіцієнт розподілу для даної речовини становить 0,25 [7], що надає можливість молекулам ДМСО з більшою вірогідністю проникати крізь ліпідний бішар. Це неминуче приводить до збільшення енергії активації проникання молекул цієї речовини крізь мембрану, оскільки саме проникання крізь ліпідний бішар має суттєво більшу енергію активації. Не виключено, що молекули ДМСО можуть проникати крізь клітинні мембрани дріжджів обома шляхами, як і у випадку еритроцитів людини. Щоб визначити внесок того чи іншого механізму проникання, необхідно провести додаткове дослідження з використанням блокаторів білкових каналів.

Висновки

1. Визначені коефіцієнти фільтрації для клітинних мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у середовищах, що містять кріопротекторні речовини. Показано, що у середовищі з 1,2-ПД значення коефіцієнта фільтрації є вірогідно більшим, а значення енергії активації проникання молекул води у два рази меншим, ніж у середовищах з гліцерином та ДМСО. Це свідчить про негативний вплив 1,2-ПД на мембрани дріжджів.

2. Визначені коефіцієнти проникності мембран дріжджів для молекул кріопротекторів (гліцерину, 1,2-ПД, ДМСО) вірогідно не відрізняються. Енергія активації проникання молекул ДМСО є вірогідно більшою, ніж для молекул гліцерину та 1,2-ПД, що свідчить про принаймні часткове проникання молекул ДМСО крізь ліпідний бішар.

The distribution coefficient for this substance is 0.25 [7], that helps DMSO molecule to penetrate through a lipid layer with higher probability. This inevitably results in the augmentation of penetration activation energy of this substance molecules through a membrane, since namely the penetration through a lipid bilayer has much higher activation energy. It is not improbable, that DMSO molecules may penetrate through yeast cell membranes by two ways as in case with human erythrocytes. In order to determine the contribution of any penetration mechanism it is necessary to carry out an additional study using protein channel blockers.

Conclusions

1. There were determined the filtration coefficients for *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell membranes in the media with cryoprotective substances. In medium with 1,2-PD the value of filtration coefficient was shown to be statistically and significantly higher, and that for energy activation of water molecule penetration twice lower, than in the media with glycerol and DMSO. This testifies to the 1,2-PD negative effect on yeast membranes.

2. The determined coefficients of yeast membrane permeability for cryoprotectant molecules (glycerol, 1,2-PD, DMSO) are not statistically and significantly different. The activation energy of penetration of DMSO molecules is statistically and significantly higher, than for glycerol and 1,2-PD ones, testifying to at least a partial penetration of DMSO molecules through a lipid bilayer.

References

1. *Arkadieva E.A.* Factors, affecting the microorganisms' viability and properties under different methods of storage // Nauchn. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki.– 1983.– N4.– P. 93–105.
2. *Gerna R.* Storage of microorganisms // In: Methods of general bacteriology / Ed. by F. Gerhardt.– Moscow: Mir, 1983.– Vol. 1.– P. 512–534.
3. *Gordienko E.A., Pushkar N.S.* Physical grounds for low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 143 p.
4. *Gordienko O.I.* Mechanisms of passive penetration to non-electrolytes and sphericity index of human erythrocytes: Thesis of doctor of sciences (physics and mathematics).– Kharkov, 2005.– 277 p.
5. *Kudokotseva O.V.* The effect of physical and chemical factors of low temperature preservation on *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1986.– 171p.
6. *Sakun O.V., Kovalenko I.F., Sirenko A.Yu. et al.* Permeability coefficients of *Saccharomyces cerevisiae* yeast membranes for water and cryoprotectants // Visnyk of V.N. Karazin Kharkov National University. Series: Biology.– Vol. 814, N8.– 2008.– P. 140–147.
7. *Shevchenko N.A., Stribul T.F., Rozanov L.F.* Effect of polyatom alcohols, amides and DMSO on the integrity of grape and potato meristems // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 79–85.

Література

1. *Аркадьева Э.А.* Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Научн.докл.высш. школы. Биол.науки.– 1983.– №4.– С. 93–105.
2. *Герна Р.* Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии / Под. ред. Ф. Герхардта.– М.: Мир, 1983.– Т. 1.– С. 512–534.
3. *Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994.– 143 с.
4. *Гордієнко О.І.* Механізми пасивної проникності до неелектролітів та індекс сферичності еритроцитів людини: Дис. ... докт. фіз.-мат. наук.– Харків, 2005.– 277 с.
5. *Кудокоцева О.В.* Влияние физико-химических факторов низкотемпературного консервирования на расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 171 с.
6. *Сакун О.В., Коваленко І.Ф., Сіренко А.Ю. та інш.* Коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів // Вісник ХНУ ім. В.Н.Каразіна. Серія: біологія.– №814.– 2008.– С. 140–147.
7. *Шевченко Н.А., Стрибуль Т.Ф., Розанов Л.Ф.* Действие многоатомных спиртов, амидов и ДМСО на сохранность меристем винограда и картофеля // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 79–85.
8. *Andre L., Hemming A., Adler L.* Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD^+) // FEBS Letters.– 1991.– Vol. 286, N1–2.– P. 13–17.
9. *Aurich F., Peterson B.* Cooling rate measurement and continuous rapid freezing of cell suspensions by a cryospinning wheel method // Cryo-Letters.– 1985.– Vol. 6, N1.– P. 35–42.
10. *Huang J.Y.J., Chen H.-Y., Tan S.L., Chian R.-C.* Effects of osmotic stress and cryoprotectant toxicity on mouse oocyte fertilization and subsequent embryonic development // Cell Preservation Technoljgies.– 2006.– Vol. 4, N3.– P. 149–160.
11. *Kirsop B., Henry J.* Development of a miniaturised cryopreservation method for the maintenance of a wide range of yeast //Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N3.– P. 194–200.
12. *Lepock J.R., Keith A.D., Kruuv J.* Permeability changes in years after freeze-thaw damage: comparison to reproductive survival // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N4.– P. 277–280.
13. *Levin R. L., Ushiyama M., Cravalho E.G.* Water permeability of yeast cells at subzero temperatures. Volumetric changes in yeast cells during freezing constant cooling rates // J. Membr. Biol.– 1979.– Vol. 46, N2.– P. 91–124.
14. *Mazur P., Schmidt J.J.* Interactions of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast // Cryobiology.– 1968.– Vol. 5, N1.– P. 1–17.
15. *Mazur P.* Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells// Cryobiology.– 1966.– Vol. 2, N4.– P. 181–192.
16. *McElhaney R.N.* The effect of membrane lipids on permeability and transport in procariotes // Structure and Properties of cell membranes.Vol. II. Molecular basis of selected transport systems / Ed. by G. Benga.– Florida:CRC Press, 1985.– P. 20–51.
17. *Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al.* Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem.– 2001.– Vol. 268, N2.– P. 334–343.
18. *Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A. et al.* The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations,nonelectrolytes and water // Ann. N.-Y. Acad. Sci.– 1983.– Vol. 414.– P. 97–124.
19. *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, N6.– P. 3377–3382.

8. *Andre L., Hemming A., Adler L.* Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD^+) // FEBS Letters.– 1991.– Vol. 286, N1–2.– P. 13–17.
9. *Aurich F. Peterson B.* Cooling rate measurement and continuous rapid freezing of cell suspensions by a cryospinning wheel method // Cryo-Letters.– 1985.– Vol. 6, N1.– P. 35–42.
10. *Huang J.Y.J., Chen H.-Y., Tan S.L., Chian R.-C.* Effects of osmotic stress and cryoprotectant toxicity on mouse oocyte fertilization and subsequent embryonic development // Cell Preservation Technoljgies.– 2006.– Vol. 4, N3.– P. 149–160.
11. *Kirsop B., Henry J.* Development of a miniaturised cryopreservation method for the maintenance of a wide range of yeast //Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N3.– P. 194–200.
12. *Lepock J.R., Keith A.D., Kruuv J.* Permeability changes in years after freeze-thaw damage: comparison to reproductive survival // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N4.– P. 277–280.
13. *Levin R. L., Ushiyama M., Cravalho E.G.* Water permeability of yeast cells at subzero temperatures. Volumetric changes in yeast cells during freezing constant cooling rates // J. Membr. Biol.– 1979.– Vol. 46, N2.– P. 91–124.
14. *Mazur P., Schmidt J.J.* Interactions of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast // Cryobiology.– 1968.– Vol. 5, N1.– P. 1–17.
15. *Mazur P.* Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells// Cryobiology.– 1966.– Vol. 2, N4.– P. 181–192.
16. *McElhaney R.N.* The effect of membrane lipids on permeability and transport in procariotes // Structure and Properties of cell membranes.Vol. II. Molecular basis of selected transport systems / Ed. by G. Benga.– Florida:CRC Press, 1985.– P. 20–51.
17. *Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al.* Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem.– 2001.– Vol. 268, N2.– P. 334–343.
18. *Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A. et al.* The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations,nonelectrolytes and water // Ann. N.-Y. Acad. Sci.– 1983.– Vol. 414.– P. 97–124.
19. *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, N6.– P. 3377–3382.

Надійшла 04.11.2008
Рецензент В.В. Рамазанов

Accepted in 04.11.2008