

УДК 577.35

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

Визначення осмотично неактивного об'єму ентероцитів миші

UDC 577.35

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

Determination of Osmotically Inactive Volume of Murine Enterocytes**Ключові слова:** ентероцити миші, осмотичний тиск розчину, осмотично неактивний об'єм, проникність.**Ключевые слова:** энтероциты мыши, осмотическое давление раствора, осмотически неактивный объем, проницаемость.**Key words:** mice, enterocytes, osmotic pressure, osmotically inactive volume, permeability.

Найбільш адекватною моделлю для дослідження адгезійних властивостей лактобактерій є епітеліальні клітини тонкого кишечника – ентероцити. Відмінності між ентероцитами різних донорів підвищують варіабельність результатів вивчення бактерійної адгезії *in vitro*. Тому кріоконсервування певної кількості клітин, отриманих із єдиного джерела, може бути одним із шляхів вирішення даної проблеми.

Відомо, що коефіцієнти проникності мембран клітин відіграють важливу роль у процесах, що протікають за низькотемпературного консервування. Коефіцієнти проникності для молекул води значною мірою визначають оптимальні швидкості охолодження під час заморожування, а коефіцієнти проникності речовин, які використовуються як кріопротектори, – часові параметри процедури еквілібрації клітин у середовищі кріоконсервування [1]. Раніше [1, 2] був розроблений алгоритм визначення коефіцієнтів проникності клітинних мембран за змінами об'єму клітин у часі при їх вміщенні в середовище з проникаючою речовиною. Одним із важливих параметрів для розрахунку коефіцієнтів проникності плазматичної мембрани за згаданим алгоритмом є осмотично неактивний об'єм клітини.

Мета роботи – визначення осмотично неактивного об'єму ентероцитів миші.

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. Carter [4]. Тварин забивали дислокацією

Small intestine epithelial cells, *i. e.* enterocytes are the most adequate model in studying adhesive properties of lactobacteria. Differences between enterocytes from different donors increase the variability of results, obtained when investigating bacterial adhesion *in vitro*. Therefore the cryopreservation of the certain amount of cells, derived from the single source may be one of the ways to solve this task.

Coefficients of cell membrane permeability are known to play an important role in the processes, occurring under low temperature preservation. The permeability coefficients for water molecules largely determine the optimal cooling rates during freezing, and those for the substances used as cryoprotectants, greatly specify the time parameters of cell equilibration in cryopreservation medium [2]. There was developed previously [2, 3] the algorithm for determining the permeability coefficients of cell membranes by the changes in cell volume in time while placing them into the medium with a penetrating substance. The osmotically inactive cell volume is one of the important parameters to calculate the permeability coefficients of the plasma membrane according to the mentioned algorithm.

The research aim was to determine the osmotically inactive volume of murine enterocytes.

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

Enterocytes were isolated from murine small intestine with the Carter's method [1]. Animals were sacrificed by cervical vertebrae dislocation. The small intestine was

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: go.olga1787@yandex.ua

Надійшла 20.10.2015
Прийнята до друку 25.01.2016

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 93–97.
© 2016 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Low Temperature Preservation, 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 61016;
tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: go.olga1787@yandex.ua

Received October, 20, 2015
Accepted January, 25, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 93–97.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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 і 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 і 0,94% полівінілпіролідону («Sigma», США) із середньою м.м. 40000. 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 середовищі Хенкса та пропускали через подвійний нейлоновий фільтр.

Для визначення осмотично неактивного об'єму клітини вміщували у розчини непроникаючої речовини (NaCl) із концентраціями від 0,15 до 1,5 моль/л. Об'єм розчинів на порядок перевищував початковий об'єм клітинної суспензії. Мікроскопічне зображення клітин у цих розчинах отримували за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина) при збільшенні $\times 40$. Об'єм клітин апроксимували об'ємом зрізаного конуса. Лінійні розміри клітин (висоту, малий та великий діаметри зрізаного конуса) визначали за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss»). Кількість виміряних клітин у кожному розчині в експерименті становила $n \geq 45$.

Експериментальні дослідження теоретично обґрунтовані наступним чином. У випадку двокомпонентного розчину непроникаючої (k -ої) речовини рівняння, що описує зміну клітинного об'єму у часі (t), має вигляд [2]:

$$dy / dt = \frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1 - \alpha)}{y - \alpha} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right], \quad (1)$$

де $y \equiv \frac{V}{V_0}$ – відносний об'єм клітини (V_0 – початковий об'єм клітини); $\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \pi_0 \right)^{-1}$ – характерний час проникання молекул води крізь мембрану (S – площа поверхні плазматичної мембрани клітини; L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани; π_0 – початкове значення осмотичного тиску внутрішньоклітинного і позаклітинного розчинів, тобто осмотичний тиск фізіологічного розчину, який дорівнює $7,8 \times 10^5$ Н/м²);

$\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n v_k N_{k0}$ – осмотично неактивний об'єм

removed 4 cm below the pylorus and 5 cm above the cecum, then washed with 0.15 M NaCl solution of room temperature for intestinal content removal, and cut into 10 cm segments. They were next turned inside out using a plastic rod and washed in ice Hanks' solution (Biowest, France). Rods with the segments were placed into a plastic bottle with hypotonic solution and incubated for 10 min at 37°C. The solution contained 65.7% Dulbecco's medium (phosphate buffer without Mg²⁺ or Ca²⁺, pH 7.0); 34.25% tridistilled water and 0.94% polyvinylpyrrolidone (Sigma, USA), average molecular weight of 40000. The solution osmolarity was 195 mOsm/l. The solution was then removed, the segments were supplemented with 30 ml of the same solution of room temperature (22...25°C) and incubated for 1 hr with vibration of 25–100 min⁻¹ on a shaker platform. Afterwards the suspension of the cells, detached from intestinal surface, was poured into vials and precipitated by centrifugation for 10 min at 500g. The medium supernatant was removed and cells were resuspended in ice Hanks' solution and passed through a double nylon filter.

To specify the osmotically inactive volume the cells were placed into the non-penetrating substance (NaCl) solution with concentrations ranging from 0.15 to 1.5 mol/l. The volume of solutions exceeded by an order the initial volume of cell suspension. The cells in the solutions were microscopically imaged with microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) using power 40 magnification. Cell volume was approximated with that of a truncated cone. Cell linear dimensions (height, small and large diameters of a truncated cone) were determined using AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss). A number of measured cells in each solution in the experiment was $n \geq 45$.

Experimental investigations were theoretically substantiated as follows. In case of the two-component solution of non-penetrating (k -th) substance the equation, describing the change in cell volume in time (t), takes the following form [3]:

$$dy / dt = \frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1 - \alpha)}{y - \alpha} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right], \quad (1)$$

where $y \equiv \frac{V}{V_0}$ – relative cell volume (V_0 – initial cell volume); $\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \pi_0 \right)^{-1}$ – characteristic time of water molecules penetration through the membrane (S – surface area of cell plasma membrane; L_p – filtration coefficient of the cell membrane; π_0 – initial value of osmotic pressure of intracellular and extracellular solutions, *i. e.* osmotic pressure of physiological saline equals to 7.8×10^5 Н/м²);

$\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n v_k N_{k0}$ – osmotically inactive cell volume (v_k – partial molar volume of k -th substance);



клітини (v_k – парціальний молярний об'єм k -ої речовини); $n_k = \frac{N_k}{\sum_{i=1}^n N_i}$ – мольна частка k -го компонента в розчині (N_k – кількість молів k -го компонента в розчині; n_k^{out} – мольна частка розчиненої у позаклітинному розчині k -ої речовини); n_{k0}^{in} – початкове значення мольної частки розчиненої у внутрішньоклітинному розчині речовини.

Осмотичний тиск k -го компонента розчину визначається як $\pi_k = \frac{RTn_k}{v_w}$, де v_w – парціальний молярний об'єм води.

При $t \rightarrow \infty$ (тобто $t \gg \tau_w$) зміна відносного об'єму клітини в розчині непроникаючої речовини $\frac{dy}{dt} \rightarrow 0$, отже отримуємо

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{y-\alpha} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right] = 0, \quad (1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \quad (2)$$

$$\text{або } y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}} = \alpha + (1-\alpha)x, \quad (3)$$

де $x = \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}}$.

Таким чином, визначаючи об'єм клітин за $t \gg \tau_w$ у серії розчинів непроникаючої речовини зі зростаючою концентрацією, знаходимо залежність асимптотичного відносного об'єму від оберненого приведенного осмотичного тиску розчину, що дозволяє визначити осмотично неактивний об'єм клітин.

Усереднені за даними чотирьох експериментів розміри еритроцитів у розчинах непроникаючої речовини (NaCl) зі зростаючою концентрацією та значення осмотичного тиску розчинів подано в таблиці, залежність асимптотичного відносного об'єму клітин від оберненого приведенного осмотичного тиску – на рисунку.

Для визначення осмотично неактивного об'єму еритроцитів миші експериментальні дані апроксимували рішенням рівняння (3) методом найменших квадратів. Умова мінімального відхилення експериментальних точок від лінійної залежності (2) має вигляд:

$$[0,79 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,3M}]^2 + [0,7 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,5M}]^2 + [0,63 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,8M}]^2 + [0,57 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,0M}]^2 + [0,56 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,2M}]^2 + [0,54 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,5M}]^2 = \min. \quad (4)$$

Здійснюємо диференціювання за α :

$$2[0,79 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,3M}](x_{0,3M} - 1) + 2[0,7 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,5M}](x_{0,5M} - 1) + 2[0,63 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,8M}](x_{0,8M} - 1) + 2[0,57 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,0M}](x_{1,0M} - 1) + 2[0,56 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,2M}](x_{1,2M} - 1) + 2[0,54 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,5M}](x_{1,5M} - 1) = 0. \quad (5)$$

$n_k = \frac{N_k}{\sum_{i=1}^n N_i}$ – mole fraction of k -th component in so-

lution; N_k – number of moles of k -th component in solution; n_k^{out} – mole fraction of k -th substance dissolved in extracellular solution; n_{k0}^{in} – initial value of mole fraction of the substance, dissolved in extracellular solution.

Osmotic pressure of k -th component of the solution is determined as $\pi_k = \frac{RTn_k}{v_w}$, where v_w is a partial molar volume of water.

At the $t \rightarrow \infty$ (i.e. $t \gg \tau_w$) a change in relative cell volume in the non-penetrating substance solution is $\frac{dy}{dt} \rightarrow 0$, therefore we obtain

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{y-\alpha} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right] = 0, \quad (1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \quad (2)$$

$$\text{or } y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}} = \alpha + (1-\alpha)x, \quad (3)$$

where $x = \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}}$.

Thus, when assuming a cell volume as $t \gg \tau_w$ in a series of non-penetrating substance solutions with increasing concentration, we get the dependence of asymptotic relative volume vs. the reciprocal normalized osmotic pressure of the solution, that enables determining the osmotically inactive cell volume.

The dimensions of enterocytes in non-penetrating substance (NaCl) solutions with increasing concentration and the values of osmotic pressure of the solutions, averaged by the data of four experiments, are shown in the Table, the dependence of asymptotic relative cell volume vs. the reciprocal normalized osmotic pressure is done in Figure.

To determine an osmotically inactive volume of murine enterocytes the experimental data were approximated by solving the equation (3) using the method of the least squares. The condition of the minimum deviation of experimental points from the linear dependence (2) is as follows:

$$[0,79 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,3M}]^2 + [0,7 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,5M}]^2 + [0,63 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,8M}]^2 + [0,57 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,0M}]^2 + [0,56 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,2M}]^2 + [0,54 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,5M}]^2 = \min. \quad (4)$$

If differentiating by α , we get:

$$2[0,79 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,3M}](x_{0,3M} - 1) + 2[0,7 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,5M}](x_{0,5M} - 1) + 2[0,63 - \alpha - (1-\alpha)x_{0,8M}](x_{0,8M} - 1) + 2[0,57 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,0M}](x_{1,0M} - 1) + 2[0,56 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,2M}](x_{1,2M} - 1) + 2[0,54 - \alpha - (1-\alpha)x_{1,5M}](x_{1,5M} - 1) = 0. \quad (5)$$

Розміри еритроцитів у розчинах NaCl та значення осмотичного тиску розчинів
 Enterocyte dimensions in NaCl solutions and values of osmotic pressure for solutions

Концентрація NaCl, М NaCl concentration, M	Об'єм клітин у суспензії, 10 ³ мкм ³ Volume of cells in suspension, 10 ³ μm ³	Відносний об'єм клітин Relative cell volume	Осмотичний тиск розчину, мОсм/л Osmotic pressure of solution, mOsm/l	Приведений осмотичний тиск Normalized osmotic pressure	Обернений приведений осмотичний тиск Reciprocal normalized osmotic pressure
0,15	8,64 ± 0,85	1	277	1	1
0,3	6,82 ± 0,58	0,79	554	2	0,5
0,5	6,05 ± 0,7	0,7	921	3,32491	0,3
0,8	5,4 ± 0,7	0,63	1477	5,3321	0,19
1	4,94 ± 0,6	0,57	1846	6,66426	0,15
1,2	4,8 ± 0,7	0,56	2216	8	0,125
1,5	4,65 ± 0,7	0,54	2763	9,9747	0,1

Підставляємо в рівняння значення x , які відповідають різним концентраціям розчинів NaCl (0,3; 0,5; 0,8; 1,2 та 1,5 М) (таблиця) та отримуємо

$$2[0,79 - \alpha - (1 - \alpha)0,5](0,5 - 1) + 2[0,7 - \alpha - (1 - \alpha)0,3](0,3 - 1) + 2[0,63 - \alpha - (1 - \alpha)0,19](0,19 - 1) + 2[0,57 - \alpha - (1 - \alpha)0,15](0,15 - 1) + 2[0,56 - \alpha - (1 - \alpha)0,125](0,125 - 1) + 2[0,54 - \alpha - (1 - \alpha)0,1](0,1 - 1) = 0, \quad (6)$$

звідки $\alpha = 0,51$.

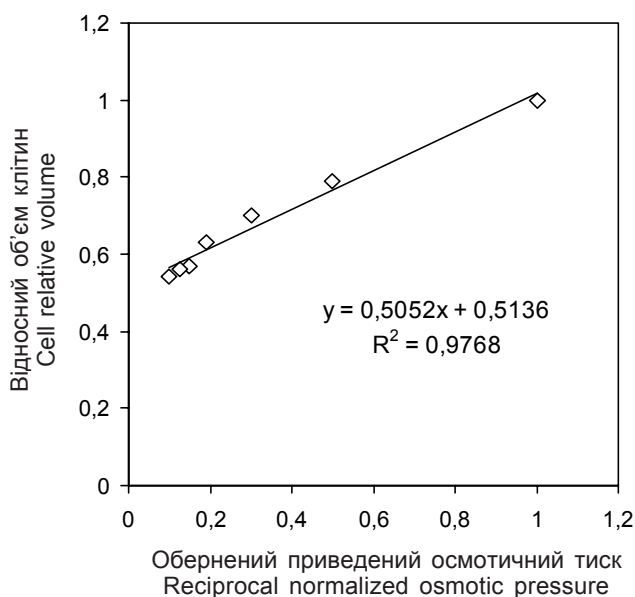
За перетином апроксимованої прямої з віссю ординат на рисунку або з рівняння (6) отримуємо значення осмотично неактивного об'єму $\alpha = 0,51$ для еритроцитів миші. За аналогічними розрахунками для

When entering the x values into the obtained equation, corresponding to different concentrations of NaCl solutions (0.3, 0.5, 0.8, 1.2 and 1.5 M) (Table), we obtain the following equation:

$$2[0,79 - \alpha - (1 - \alpha)0,5](0,5 - 1) + 2[0,7 - \alpha - (1 - \alpha)0,3](0,3 - 1) + 2[0,63 - \alpha - (1 - \alpha)0,19](0,19 - 1) + 2[0,57 - \alpha - (1 - \alpha)0,15](0,15 - 1) + 2[0,56 - \alpha - (1 - \alpha)0,125](0,125 - 1) + 2[0,54 - \alpha - (1 - \alpha)0,1](0,1 - 1) = 0, \quad (6)$$

where from $\alpha = 0.51$.

According to the intersection of approximation straight line with the ordinate axis in the Figure or from the equation (6) we obtain the values of osmotically



Залежність асимптотичного (за $t \gg t_w$) відносного об'єму клітин від оберненого приведенного осмотичного тиску розчину хлориду натрію (усереднені дані). Перетин апроксимованої прямої з віссю ординат на рівні 0,51.

Dependency of asymptotic (at $t \gg t_w$) relative volume of cells vs. reciprocal normalized osmotic pressure of NaCl solution (averaged data). Intersection of approximation straight line with the ordinate axis makes 0.51.



кожного окремого експерименту були отримані наступні значення осмотично неактивного об'єму α : 0,59; 0,53; 0,46; 0,48. Виходячи з цих даних, маємо середнє значення $\alpha = 0,51 \pm 0,06$.

Отримане значення осмотично неактивного об'єму еритроцитів є більшим ніж, наприклад, еритроцитів людини ($\alpha = 0,43$) [5] або дріжджоподібних клітин *Saccharomyces cerevisiae* ($\alpha = 0,27$) [3]. Очевидно це пов'язано з розвиненою мережею мембранних систем усередині еритроцитів (багато мітохондрій, синтетичний апарат – рибосоми і гранулярна ендоплазматична мережа, велике ядро) [6] та тим, що частину їх об'єму визначають мікрворсинки, що є виростами плазмолемі еритроцитів, всередині яких містяться філаменти і мікротрубочки актиноміозинового комплексу.

Таким чином, у роботі отримано значення осмотично неактивного об'єму еритроцитів миші, яке буде використано для розрахунку коефіцієнтів проникності їх мембран для води та кріопротекторів.

inactive volume α for murine enterocytes, making $\alpha = 0.51$. By the similar calculations for each experiment the following values of osmotically inactive volume α were obtained: 0.59; 0.53; 0.46; 0.48. Proceeding from these data we have the average value of $\alpha = 0.51 \pm 0.06$.

The obtained value of osmotically inactive volume of enterocytes is higher than, *e. g.*, for human erythrocytes ($\alpha = 0,43$) [5] or *Saccharomyces cerevisiae* yeast-like cells ($\alpha = 0,27$) [4]. This is apparently due to an extensive network of membrane systems inside the enterocytes (many mitochondria, synthetic apparatus: ribosomes and granular endoplasmic reticulum, large nucleus) [6], as well as to the fact that a part of their volume is determined by microvilli, being the processes of enterocyte plasma membrane, inside of which there are filaments and microtubules of actin-myosin complex.

Thus, we obtained here the value of osmotically inactive volume of murine enterocytes to be used for calculating the permeability coefficients of their membranes for water and cryoprotectants.

Література

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий // К.: Наук. думка, 1994. – 144 с.
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. 2 (21). – С. 75–80.
3. Сакун О.В., Коваленко І.Ф., Сіренко А.Ю. та ін. Коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2008. – Вип. 7, №814. – С. 140–146.
4. 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.
5. Solomon A.K., Toon M.R., Dix J.A. Osmotic properties of human red cells // J. Membr. Biol. – 1986. – Vol. 91. – P. 259–273.
6. Weiser M.M., Noumeir M.M., Quaroni A., Kirsh K. Synthesis of plasmalemmal glycoproteins in intestinal epithelial cells // J. Cell. Biol. – 1978. – Vol. 77. – P. 722–734.

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. Gordiyenko Ye.O., Pushkar N.S. Physical basis for low temperature preservation of cell suspensions. Kyiv: Naukova dumka; 1994.
3. 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.
4. 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.
5. Solomon A.K., Toon M.R., Dix J.A. Osmotic properties of human red cells. J Membr Biol 1986; 91: 259–273.
6. Weiser M.M., Noumeir M.M., Quaroni A., Kirsh K. Synthesis of plasmalemmal glycoproteins in intestinal epithelial cells. J Cell Biol 1978; 77: 722–734.

