

УДК 577.35

ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ШВИДКИХ ДВОХСТУПІНЧАСТИХ РЕЖИМІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ

О.В. Сакун, О.І. Гордієнко, Є.О. Гордієнко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, 61015, Харків, gordienko@gala.net

Надійшла до редакції 1 червня 2009 р.

Прийнята 26 червня 2009 р.

Виходячи із загальновідомих уявлень про кінетику фазових перетворень при охолодженні багатокомпонентних розчинів та трансмембранного переносу речовин побудована кількісна модель кріопшкодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у кріозахисному розчині при нелінійних режимах охолодження на етапі її кристалізації. Побудована теоретична модель підтверджена експериментальною частиною роботи, що свідчить про адекватність висунутих модельних уявлень щодо кріопшкодження клітин на етапі кристалізації клітинної суспензії у конкретному розчині „диметилсульфоксид (10 об.%) - 0,135М хлориду натрію - вода” при експоненціальних режимах охолодження. Показано, що механізм кріозахисної дії швидкого двохступінчастого охолодження принципово не відрізняється від оптимального з погляду двохфакторної теорії кріопшкодження режиму охолодження зі сталою швидкістю. Встановлено, що оптимальний нелінійний режим охолодження дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* може бути реалізований шляхом занурення контейнера з цим біооб’єктом в охолоджену до -35°C рідину на 20-25 хвилин з подальшим швидким охолодженням у рідкому азоті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нелінійні режими охолодження, кріопшкодження, пересичення внутрішньоклітинного розчину, внутрішньоклітина кристалізація, *Saccharomyces cerevisiae*.

THEORETICAL ANALYSIS OF EFFICIENCY OF RAPID TWO-STEP FREEZING REGIMENS

A.V. Sakun, O.I. Gordiyenko, E.A. Gordiyenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015, gordienko@gala.net

On the basis of traditional concepts on phase transition kinetics during cooling of multi-component solutions and transmembrane transfer of substances we developed the quantitative model of cryodamage of yeast-like fungi *Saccharomyces cerevisiae* suspension in the cryoprotective solution in non-linear cooling regimens at its crystallization stage. The designed theoretical model is verified by the experiments, testifying to the adequacy of the proposed model concept about cryodamage of cells at the stage of cell suspension crystallization, in particular solution of “dimethyl sulfoxide (10% v/v) – sodium chloride (0.135 M) – water” under exponential cooling regimen. The mechanism of cryoprotective effect of rapid two-step cooling was shown to have no substantial differences from optimal from the point of view of two factor theory of cryodamage cooling regimen with a constant cooling rate. It is established that optimal non-linear cooling regimen of yeast-like fungi cells *Saccharomyces cerevisiae* could be implemented by plunging of the container carrying the cell suspension into the liquid cooled down to -35°C for 20-25 minutes with following rapid cooling in liquid nitrogen.

KEY WORDS: non-linear cooling regimens, cryodamage, intracellular solution saturation, intracellular crystallization, *Saccharomyces cerevisiae*.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ БЫСТРЫХ ДВУХСТУПЕНЧАТЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

А.В. Сакун, О.И. Гордиенко, Е.А. Гордиенко

Институт проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, 61015, Харків, gordienko@gala.net

Выходя из общеизвестных представлений о кинетике фазовых превращений при охлаждении многокомпонентных растворов и трансмембранного переноса веществ построена количественная модель криоповреждения суспензии дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* в криозащитном растворе при нелинейных режимах охлаждения на этапе ее кристаллизации. Построенная теоретическая модель подтверждена экспериментальной частью работы, которая свидетельствует об адекватности выдвинутых модельных представлений о криоповреждении клеток на этапе кристаллизации клеточной суспензии в конкретном растворе „диметилсульфоксид (10 об.%) - 0,135М хлорида натрия - вода” при экспоненциальных режимах охлаждения. Показано, что механизм криозащитного действия быстрого двухступенчатого охлаждения принципиально не отличается от оптимального с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения режима охлаждения с постоянной скоростью. Установлено, что оптимальный нелинейный режим охлаждения дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* может быть реализован путем погружения контейнера с этим биообъектом в охлажденную до -35°C жидкость на 20-25 минут с последующим быстрым охлаждением в жидком азоте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нелинейные режимы охлаждения, криоповреждение, пресыщение внутриклеточного раствора, внутриклеточная кристаллизация, *Saccharomyces cerevisiae*.

Наразі для кріоконсервування клітинних суспензій поряд з методами, при яких охолодження біооб'єкта, що заморожується, на етапі кристалізації відбувається з постійною швидкістю, успішно застосовуються і так звані швидкі двоступінчасті режими заморожування [1-3]. Практична реалізація цих режимів заморожування полягає в тому, що контейнер з клітинною суспензією, що заморожується, занурюється в попередньо охолоджений до помірно низької температури T_A рідкий холодоносіть, експонується при цій температурі впродовж 5-30 хвилин, а потім занурюється у дьюар зі скрапленим азотом. Для пояснення кріозахисного ефекту швидких двохступінчастих режимів заморожування, які застосовуються на практиці, розглянемо поданий на рис. 1 ідеалізований режим охолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisia* в розчині диметилсульфоксиду на етапі її кристалізації. Нехай на ділянках OA, BC, DE та EF клітинна суспензія охолоджується зі швидкістю $15^\circ\text{C}/\text{хв}$, тобто зі швидкістю, явно більшою за оптимальну. Припустимо також, що при температурах -15°C , -25°C та -35°C охолодження припиняється і клітинна суспензія витримується при кожній із указаних температур впродовж відповідних проміжків часу $t_B - t_A$, $t_D - t_C$, $t_F - t_E$. На перший погляд ступінчастий режим заморожування повністю суперечить загальноприйнятому уявленню про існування певної оптимальної для кожного біологічного об'єкта значення постійної швидкості охолодження на етапі кристалізації, яке має достатньо глибоке теоретичне обґрунтування у вигляді двофакторної теорії кріопшкодження [4-6] та багаторазове експериментальне підтвердження [4,5,7-14]. Проте, кріозахисну ефективність такого режиму охолодження можна пояснити, не виходячи за межі загальноприйнятих уявлень про те, що оптимальний режим охолодження клітинної суспензії на етапі її кристалізації забезпечує відсутність внутрішньоклітинного льодоутворення поряд з мінімально можливим при цій умові пошкодженням клітин за рахунок їх контакту з розчином, фізико-хімічні характеристики якого в процесі заморожування клітинної суспензії значно відхиляються від нормальних значень.

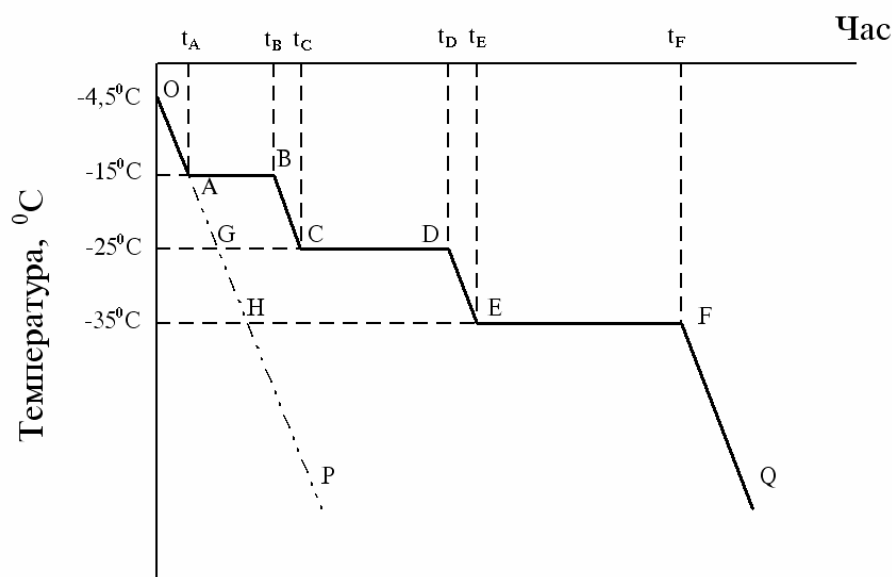


Рис.1 Ідеалізований багаступінчастий режим охолодження суспензії мікроорганізмів

Перейдемо до аналізу процесів, які протікають на етапі кристалізації клітинної суспензії при указаному вище багаступінчастому режимі охолодження. Нехай

$\tilde{c} = \tilde{c}(T)$ - крива плавлення позаклітинного розчину. Тоді при температурі T у термодинамічній рівновазі з позаклітинним льодом знаходиться розчин, концентрація якого дорівнює $\tilde{c}(T)$. Оскільки термодинамічна рівновага між позаклітинними кристалами льоду та оточуючим їх позаклітинним розчином устанавлюється швидко, можна вважати, що в процесі заморожування клітинної суспензії концентрація розчину c_{out} , що знаходиться між кристалами позаклітинного льоду, при будь-якій температурі T дорівнює $\tilde{c}(T)$. В процесі кристалізації клітинної суспензії клітини витісняються в рідку фазу, замкнену між кристалами льоду, і, отже, при кожному значенні температури T знаходяться у гіпертонічному розчині з концентрацією $\tilde{c}(T)$. У міру зниження температури в кожній точці зразка, що заморожується, концентрація оточуючого клітину рідкого розчину підвищується так, що точка (T, \tilde{c}) , яка зображає стан позаклітинного розчину рухається уздовж кривої плавлення.

Тому при заморожуванні клітинної суспензії концентрація позаклітинного розчину в кожний момент часу при даній температурі T дорівнює $\tilde{c}(T)$. З урахуванням цієї обставини пересичення внутрішньоклітинного розчину при заморожуванні клітин збігається з різницею концентрацій між поза- та внутрішньоклітинним розчинами.

Зміна пересичення внутрішньоклітинного розчину, тобто різниці концентрацій між позаклітинним та внутрішньоклітинним розчинами, впродовж проміжку часу $t_B - t_A$, $t_D - t_C$, $t_F - t_E$ описується рішенням модифікованих рівнянь Кедем – Качальського [15]:

$$\ln \frac{x \hat{c}_{in}(0)}{[\hat{c}(T_A) - \hat{c}_{in}(0)][\hat{c}(T_A) - x]} + \hat{c}(T_A)^2 \frac{t - t_0}{(1 - \alpha)} \gamma L_P(T_A) \pi_0 + \tilde{c}(T_A) \left[\frac{\hat{c}(T_A) - \hat{c}_{in}(0) - x}{\hat{c}_{in}(0)[\hat{c}(T_A) - x]} \right] = 0 \quad (1)$$

де введено таке позначення: $x \equiv \hat{c}(T_A) - \hat{c}_{in}$ - приведенне пересичення внутрішньоклітинного розчину. Як видно, роль безрозмірного часу релаксації пересичення клітинного розчину відіграє величина

$$\tau_W = \frac{(1 - \alpha)}{\gamma L_P(T_A) \pi_0 \hat{c}(T_A)^2} \quad (2)$$

Використовуючи відомі дані про геометричні та транспортні характеристики одноклітинних мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*, закон Ареніуса і діаграму плавлення позаклітинного розчину, отримуємо залежність τ_W від температури ізотермічної стадії процесу ступінчастого заморожування конкретно для дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* (табл. 1) і залежність пересичення внутрішньоклітинного розчину цих клітин від часу в процесі заморожування за багатоступінчастою програмою в розчині «диметилсульфоксид (10об.%) - 0,135М NaCl-вода», режимні параметри якої подані в таблиці 2 (рис.2).

Таблиця 1

Залежність характерного часу трансмембранного переносу молекул води крізь мембрани одноклітинних мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* від температури адаптації T_A

$T_A, ^\circ\text{C}$	25	-15	-25	-35	-45	-55
$\tau_W, \text{хв}$	0,83	5,47	8,74	14,54	19,0	34,0

Розрахунки показують, що швидке багатоступінчасте охолодження із зупинками за дискретного набору температур $T_{Ai} (i=1,2,\dots,n)$ на час порядку τ_{Ai} при багатоступінчастому режимі охолодження, який ми розглядаємо, приводить до декількох невеликих сплесків пересичення, не достатніх для пошкодження великої кількості клітин. На стадіях охолодження OA, BC, DE та FQ пересичення зростає, а при температурах адаптації -15°C , -25°C , -35°C падає так, як показано на рис.2. Необхідно, щоб на етапі кожної температурної зупинки пересичення внутрішньоклітинного розчину клітин, що заморожуються, впало до нуля. Інакше на етапі після температурної зупинки воно може виявитись настільки великим, що створяться внутрішньоклітинні кристали льоду і пошкодять клітини. Очевидно, при кожній наступній більш низькій температурі адаптації у низці -15°C , -25°C , -35°C тривалість температурної зупинки повинна бути більшою, ніж на попередній зупинці, оскільки характерний час трансмембранного переносу води, який визначає кінетику зниження ступеня пересичення внутрішньоклітинного розчину, експоненціально збільшується зі зниженням температури.

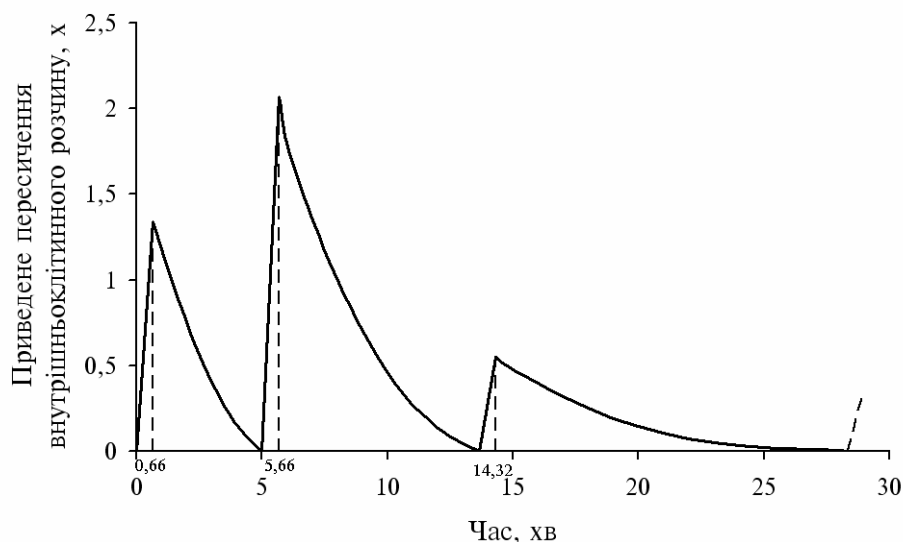


Рис. 2 Залежність пересичення внутрішньоклітинного розчину дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisia* від часу на ділянках АВ, CD та EF при їх заморожуванні в розчині «диметилсульфоксид (10об.%) - 0,135M NaCl-вода» за багатоступінчастою програмою

Таблиця 2

Режимні параметри швидкого багатоступінчастого режиму заморожування суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*, використані при розрахунку даних про пересичення внутрішньоклітинного розчину дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisia* від часу при їх заморожуванні в розчині «диметилсульфоксид (10об.%) - 0,135M NaCl-вода» за багатоступінчастою програмою, поданою на рис. 1

Діапазон швидкої ($15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) зміни температури	Температура зупинки	Тривалість сходушки
$-4,5^{\circ}\text{C} \rightarrow -15^{\circ}\text{C}$	-10°C	3 мин
$-15^{\circ}\text{C} \rightarrow -25^{\circ}\text{C}$	-25°C	6 мин
$-25^{\circ}\text{C} \rightarrow -35^{\circ}\text{C}$	-35°C	18 мин
$-30^{\circ}\text{C} \rightarrow -62,5^{\circ}\text{C}$	-	-

На стадії багатоступінчастого режиму охолодження FQ (рис.1), незважаючи на досягнення великих пересичень, внутрішньоклітинні кристали не зароджуються і не ростуть через надзвичайно високу в'язкість розчину кріопротектора при температурах $T \leq T_E$ і при високих концентраціях міжкристалічного розчину, які досягаються в області близьких до евтектичних температур, оскільки указане підвищення в'язкості значно утруднює приєднання молекул води до кристалу льоду із оточуючого цей кристал водного розчину диметилсульфоксиду. На користь цього висновку свідчить той факт, що при заморожуванні навіть з порівняно невеликими швидкостями розчини кріопротекторів близької до евтектичної концентрації, зазвичай, склюються.

Таким чином, проведений нами теоретичний аналіз процесу заморожування суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisia* на стадії її кристалізації показує, що поряд з оптимальним з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження лінійним режимом охолодження існує не менш ефективний багатоступінчастий режим охолодження, який також забезпечує високу збереженість клітин.

Звичайно, поданий на рис. 1 режим багатоступінчастого охолодження практично реалізувати важко. Проте, можна помітити, що в граничному випадку великої кількості сходинок режим багатоступінчастого охолодження OABCDEFQ переходить у режим охолодження OP, котрий, як показано на рис.3, проходить через середини усіх сходинок. Такий режим охолодження технічно реалізувати значно простіше, ніж лінійний режим охолодження. Практично його можна здійснити, занурюючи контейнер з клітинною суспензією у наперед охолоджену до певної температури рідину.

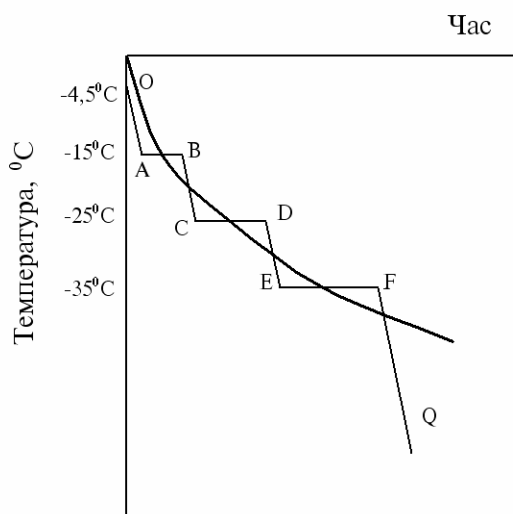


Рис. 3 Експоненціальний режим охолодження OP як граничний випадок ідеалізованого багатоступінчастого режиму охолодження при безкінечно великій кількості сходинок

Розглянемо детальніше згаданий граничний перехід від багатоступінчастого режиму охолодження до відповідного йому безперервного нелінійного режиму охолодження. Для того, щоб визначити конкретний вигляд цього режиму охолодження, розглянемо дві сусідні температурні сходинки, висота котрих є малою і рівною ΔT (рис.4). Довжина кожної температурної сходинки дорівнює характерному часу τ_W , необхідному для вирівнювання концентрацій розчинених поза- та всередині клітини речовин, тобто, як відмічалось раніше, часу, за який при температурі сходинки пересичення внутрішньоклітинного розчину падає практично до нуля.

З простих геометричних міркувань витікає, що швидкість охолодження $\frac{dT}{dt} = -\beta$ при температурі $T + \frac{1}{2}\Delta T$ дорівнює $\beta\left(T + \frac{1}{2}\Delta T\right) = \frac{\Delta T}{\frac{\tau_w(T+\Delta T)}{2} + \frac{\tau_w(T)}{2} + \frac{\Delta T}{s}}$, де S -

постійна швидкість охолодження на ділянках OA, BC, DE та FG між сходинками (рис.

4). Аналогічно, при температурі $T - \frac{1}{2}\Delta T$ маємо

$$\beta\left(T - \frac{1}{2}\Delta T\right) = \frac{\Delta T}{\frac{\tau_w(T-\Delta T)}{2} + \frac{\tau_w(T)}{2} + \frac{\Delta T}{s}}$$

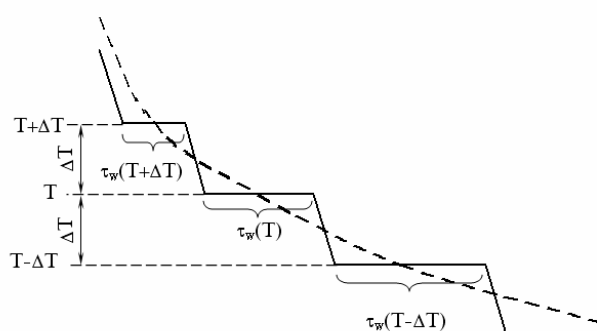


Рис. 4 Нелінійний режим охолодження як граничний випадок багатоступінчастого режиму охолодження з довжиною сходинок, що збільшується у міру зниження температури

Оскільки висота сходинок є малою, наближено маємо

$$\beta(T) + \frac{1}{2} \frac{d\beta}{dT}(T) \Delta T = \frac{\Delta T}{\tau_w(T) + \frac{d\tau_w}{dT}(T) \Delta T + \frac{\Delta T}{s}}$$

і

$$\beta(T) - \frac{1}{2} \frac{d\beta}{dT}(T) \Delta T = \frac{\Delta T}{\tau_w(T) - \frac{d\tau_w}{dT}(T) \Delta T + \frac{\Delta T}{s}}$$

або

$$\frac{d\beta}{dT} = \frac{d\tau_w}{dT} \varphi, \beta = -\left(\tau_w + \frac{\Delta T}{s}\right) \varphi$$

Виключаючи з цих рівностей φ , в граничному випадку $\Delta T \rightarrow 0$ отримуємо рівняння

$$\frac{d \ln \beta}{dT} = -\frac{d \ln \tau_w}{dT}, \text{ інтегруючи яке одержуємо}$$

$$\beta = \frac{\text{const}}{\tau_w} \quad (3)$$

Як видно, при цьому режимі охолодження на відміну від лінійного режиму швидкість охолодження є змінною. Рівність (3) має дуже просте значення. У міру зниження температури суспензії, що кристалізується, необхідно зменшувати швидкість

оохолодження таким чином, щоб при кожному значенні температури клітина перебувала впродовж проміжку часу порядку τ_W , за який пересичення внутрішньоклітинного розчину встигає знизитися до близьких до нуля значень.

З урахуванням співвідношення (3) для шуканого граничного по відношенню до багатоступінчастого режиму оохолодження отримуємо таку залежність між температурою і часом

$$-\frac{T_{k0}}{\beta} \int_1^{\hat{T}} \frac{\exp\left[-\frac{E}{R_0 T_{k0}} \left(1 - \frac{1}{\hat{T}}\right)\right]}{\hat{c}(\hat{T})^2} d\hat{T} = -t \quad (4)$$

Залежність (4) представлена графічно на рис. 5 кривою, позначеною світлими кружками.

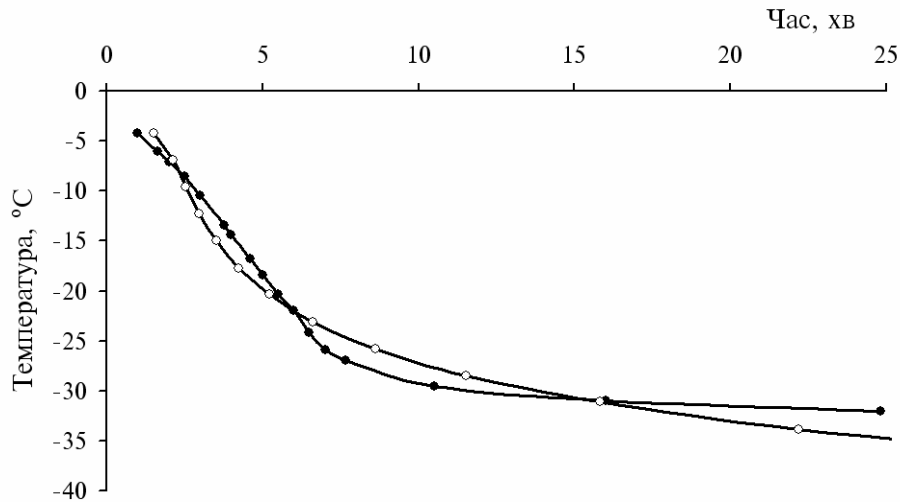


Рис. 5 Розрахований оптимальний нелінійний режим оохолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* (крива, позначена світлими кружками) і близький до нього експериментально підібраний режим двохступінчастого заморожування (крива з чорними кружками)

Температура -31°C на цій кривій у відповідності з діаграмою плавлення позаклітинного розчину відповідає більш ніж чотирьохкратному збільшенню концентрації диметилсульфоксиду у клітинній суспензії, що заморожується. При такій концентрації швидке оохолодження розчину кріопротектора, наприклад, шляхом безпосереднього занурення контейнера з біооб'єктом у скраплений азот, приводить до його склування. Отже, етап оохолодження FQ (рис. 1) не приводить до додаткового у порівнянні з попередніми етапами пошкодження клітин.

Висновок про те, що поряд з оптимальним з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження лінійним режимом оохолодження існує оптимальний нелінійний режим оохолодження підтверджується експериментами, в яких занурюючи контейнер з суспензією дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у спиртовий кріостат, попередньо оохолоджений до різних температур на різні проміжки часу, ми добивались збігу термограми оохолодження реального об'єкта з показаним на рис. 5 оптимальним режимом оохолодження. Найкращого узгодження між теоретично розрахованою і реальною термограмою оохолодження (крива, відмічена чорними кружками на рис. 5) досягнуто при зануренні контейнера з біооб'єктом, що заморожується, у спиртовий

кріостат, охолоджений до -35°C на 25 хвилин з наступним зануренням у скраплений азот. При цьому режимі охолодження колонієутворююча здатність заморожених-відігрітих мікроорганізмів досягала максимального у порівнянні з іншими використаними режимами охолодження значення - $82 \pm 8,5$ % від контролю, що свідчить на користь створеної нами кількісної моделі кріопошкодження клітин на етапі кристалізації клітинної суспензії.

Швидкий двохступінчастий режим заморожування має декілька очевидних переваг у порівнянні з режимами, при яких швидкість охолодження не змінюється. По-перше, при двохступінчастому режимі охолодження час контакту клітин з оточуючим їх гіпертонічним розчином є порівняним з характерним часом переносу молекул води крізь плазматичні мембрани клітин і значно меншим за час, необхідний для скільки-небудь суттєвого підвищення внутрішньоклітинного вмісту кріопротектора в процесі заморожування. Таким чином, заморожені за двохступінчастим режимом клітини при розморожуванні і наступному контакті з ізотонічним середовищем у меншій мірі зазнають постгіпертонічного лізису, ніж клітини, заморожені з повільною постійною швидкістю. Процедура реалізації швидкого двохступінчастого заморожування є значно простішою за заморожування з постійною швидкістю, котре здійснюється програмними заморожувачами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kirsop B., Henry J. Development of a miniaturised cryopreservation method for the maintenance of a wide range of yeast//Cryo-Lett.-1984.-5,N3.-P.194-200.
2. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.-К.: Наукова думка, 1994.-144 с. (С.122-128).
3. Терентьев А.Н., Кадетов В.В., Богданова М.И., Цуцаева А.А., Высканцев И.П., Милютин А.В. Влияние низких температур на жизнеспособность бактерий *Y.Pestis* EV76//Криобиология.-1990.-№2.-С.52-53.
4. Mazur P., Schmidt J.J. Interactions of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast//Cryobiology.-1968.-5, N1.-P. 1-17.
5. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells //Cryobiology.-1966.-2.-P.181-192.
6. Mazur P. A two-factor hypothesis to freezing hamster tissue-culture cells/ P.Mazur, S.P.Leibo, E.H. Chu// Experim. Cell Research.- 1972.- V. 71, No 2.- P. 345-355.
7. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing//J. Gen. Physiol.- 1963.-47.-P.347-369.
8. Mazur P. Studies on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry//Biophys. J.-1963.- 3.-P.343-347.
9. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates/P. Mazur// Cryobiology.-1977.-V. 14, №2.-P.251-272.
10. Mazur P. Physical-chemical basis of injury from intracellular freezing in yeasts/Peter Mazur .- Sapporo: Hockaido Univ. Press, 1967.-P. 171-189.
11. Mazur P, Pinn IL, Kleinhans FW. Intracellular ice formation in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling//Cryobiology.- 2007.-V.55, №2.-P.158-166.
12. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications// Am. J. Physiol. Cell Physiol. - 1984. - V.247, №3. - P.125-142.
13. Miller R.H. Survival of frozen thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities/R.H. Miller, P. Mazur//Cryobiology.- 1976.- V/13, N4.- 404 – 414.
14. Mazur P. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions/ P.Mazur, S.P. Leibo, G.E. Seidel, Jr. //Biology of reproduction.- 2008.-V. 78.-.P.2-12.
15. Гордиенко Є.О., Гордиенко О.І., Марущенко В.В., Сакун О.В. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини // Біофізичний Вісник – 2008. – Вип. 21 (2). – С. 75 – 80.