

## Зависимость проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул этиленгликоля и 1,2-бутандиола от температуры

UDC 57.043:579.2:57.086.8

N.A. CHERNOBAY, I.F. KOVALENKO, S.V. KOSCHIY, L.F. ROZANOV\*

## Dependence of Permeability of SPEV Cell Membranes for Molecules of Ethylene Glycol and 1,2-Butane Diol on Temperature

С использованием метода волюмометрии определены коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-бутандиола (1,2-БД) при температурах 35, 18 и 7°C. Рассчитанные в диапазоне температур 35–7°C значения энергий активации проницаемости для молекул ЭГ и 1,2-БД составляют 45,07 и 55,35 кДж/моль соответственно. Различия в проницаемости мембран для молекул ЭГ и 1,2-БД наиболее выражены при 35°C и отсутствуют при 7°C.

**Ключевые слова:** коэффициенты проницаемости, энергии активации, клетки СПЭВ, волюмометрия, этиленгликоль, 1,2-бутандиол.

З використанням методу волюмометрії визначені коефіцієнти проникності мембран клітин СПЕВ для молекул етиленгліколю (ЕГ) і 1,2-бутандіолу (1,2-БД) при температурах 35, 18 та 7°C. Розраховані в діапазоні температур 35–7°C значення енергій активації проникності для молекул ЕГ та 1,2-БД складають 45,07 та 55,35 кДж/моль відповідно. Відмінності в проникності молекул ЕГ та 1,2-БД найбільш виражені при 35°C та відсутні при 7°C.

**Ключові слова:** коефіцієнти проникності, енергії активації, клітини СПЕВ, волюмометрія, етиленгліколь, 1,2-бутандіол.

Using the method of volumometry the permeability coefficients for SPEV cell membranes of ethylene glycol (EG) and 1,2-butane diol (1,2-BD) at temperatures of 35, 18 and 7°C have been determined. The calculated within the range of temperatures of 35–7°C values of permeability activation energy for molecules of EG and 1,2-BD make 45.07 and 55.35 kJ/mol, correspondingly. The differences in membrane permeability for EG and 1,2-BD molecules are the most manifested at 35°C and are absent at 7°C.

**Key-words:** permeability coefficients, activation energies, SPEV cells, volumometry, ethylene glycol, 1,2-butane diol.

Проницаемость плазматических мембран для молекул воды и криопротекторов – важнейшая криобиологическая характеристика клеток, определяющая их осмотическое поведение в процессе криоконсервирования, а в итоге: выживаемость после отогрева и переноса в изотоническую среду. Поэтому определение коэффициентов проницаемости мембран различных клеток для криопротекторов и веществ, криозащитные свойства которых изучаются, – необходимый этап криобиологических исследований.

Перевиваемые клеточные культуры часто используют как модель для решения многих проблем общебиологического значения. Вместе с тем в процессе длительного культивирования клетки теряют свои исходные свойства [3], что определяет необходимость разработки эффективных и надежных методов их криоконсервирования и долгосрочного хранения. Таким образом, клетки СПЭВ являются не только удобной моделью для сравнительной оценки действия различных криопротекторов на клетки в плане изучения механизмов криоповреждения и криозащиты, но и объектом разработки новых методов криоконсервирования [8].

Permeability of plasma membranes for molecules of water and cryoprotectants is an important cryobiological feature of cells, determining their osmotic behavior during cryopreservation, and finally specifying the survival after thawing and transfer into isotonic medium. Therefore the determination of the permeability coefficients for membranes of various cells to cryoprotectants and substances, cryoprotective properties of those are under study is the essential stage of cryobiological investigations.

Inoculated cell cultures are frequently used as the model for solving many tasks of general biological value. Moreover during lasting culturing the cells lose their initial properties [3], that determines the need in designing the effective and reliable methods of their cryopreservation and long-term storage. Thus, SPEV cells are not only the proper model for comparative estimation of the effect of different cryoprotectants on cells in studying the mechanisms of cryodamage and cryoprotection, but also the object of development of novel cryopreservation methods [8].

The search for optimal methodical solutions when developing the cryopreservation methods is expedient to be implemented with experimental-theoretical

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-31-45, 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 3145, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Поиск оптимальных методических решений при разработке методов криоконсервирования целесообразно осуществлять на основе экспериментально-теоретического подхода, использующего модифицированную физико-математическую модель Кедем-Качальского [1]. Такой подход направлен на оптимизацию процессов массообмена в системе “клетка-окружающая среда” при криоконсервировании и требует конкретизации данных о составе вне- и внутриклеточной среды, морфометрических параметрах клеток, проницаемости и ее температурной зависимости.

Цель работы – определение параметров проницаемости (коэффициентов проницаемости и энергий активации) мембран клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ для молекул хорошо зарекомендовавшего себя в различных схемах криозащиты этиленгликоля [9] и быстро проникающего в эритроциты человека и экспериментальных животных 1,2-бутандиола [2,4].

### Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки перевиваемой клеточной культуры СПЭВ (эмбриональная почка свиньи).

Перевиваемая клеточная линия СПЭВ была выращена при 37°C в культуральных матрасах в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 ед/мл канамицина [6].

Исследования проводили на инвертированном микроскопе МБИ-13 (“ЛОМО”, Россия). Для изучения динамики осмотической реакции клеток СПЭВ на добавление (в соотношении 10:1) 1М растворов этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-бутандиола (1,2-БД) при температурах 35, 18 и 7°C суспензию клеток фотографировали через определенные промежутки времени. Полученные данные представляли в виде зависимостей относительных объемов отдельных клеток от времени экспозиции в исследуемых растворах. Заданную температуру экспозиции клеток в растворах диолов обеспечивали при помощи приставки к микроскопу, охлаждаемой или нагреваемой циркулирующей через нее жидкостью.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток СПЭВ для молекул диолов ( $K_1$ ) определяли, сопоставляя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени  $y(t)$  с решениями уравнений теоретической модели для заданных экспериментальных условий [5]. Энергии активации ( $E_A$ ) процессов переноса веществ через мембраны клеток СПЭВ рассчитывали из зависимостей  $\ln K_1(1/T)$ , наклон которых согласно уравнению Аррениуса равен  $E_A/R$ , где  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

approach, using the modified physical-mathematical model of Kedem-Katchalsky [1]. This approach is directed to optimize the processes of mass exchange in the “cell-environment” system during cryopreservation and requires the specifying of the data about composition of extra- and intracellular medium, morphometric parameters of cells, permeability and its temperature dependence.

The research aim is to determine the permeability parameters (permeability coefficients and activation energies) of cell membranes for inoculated SPEV cell line for molecules of ethylene glycol, proving itself well in different cryoprotection protocols [9] and 1,2-butane diol, rapidly penetrating into human experimental animals' erythrocytes [2, 4].

### Materials and methods

The cells of inoculated SPEV (embryonic porcine kidney) cell culture served as the research object.

Inoculated SPEV cell line was grown at 37°C in cultural flasks with medium 199 adding 10% fetal calf serum and 100 units/ml kanamycin [6].

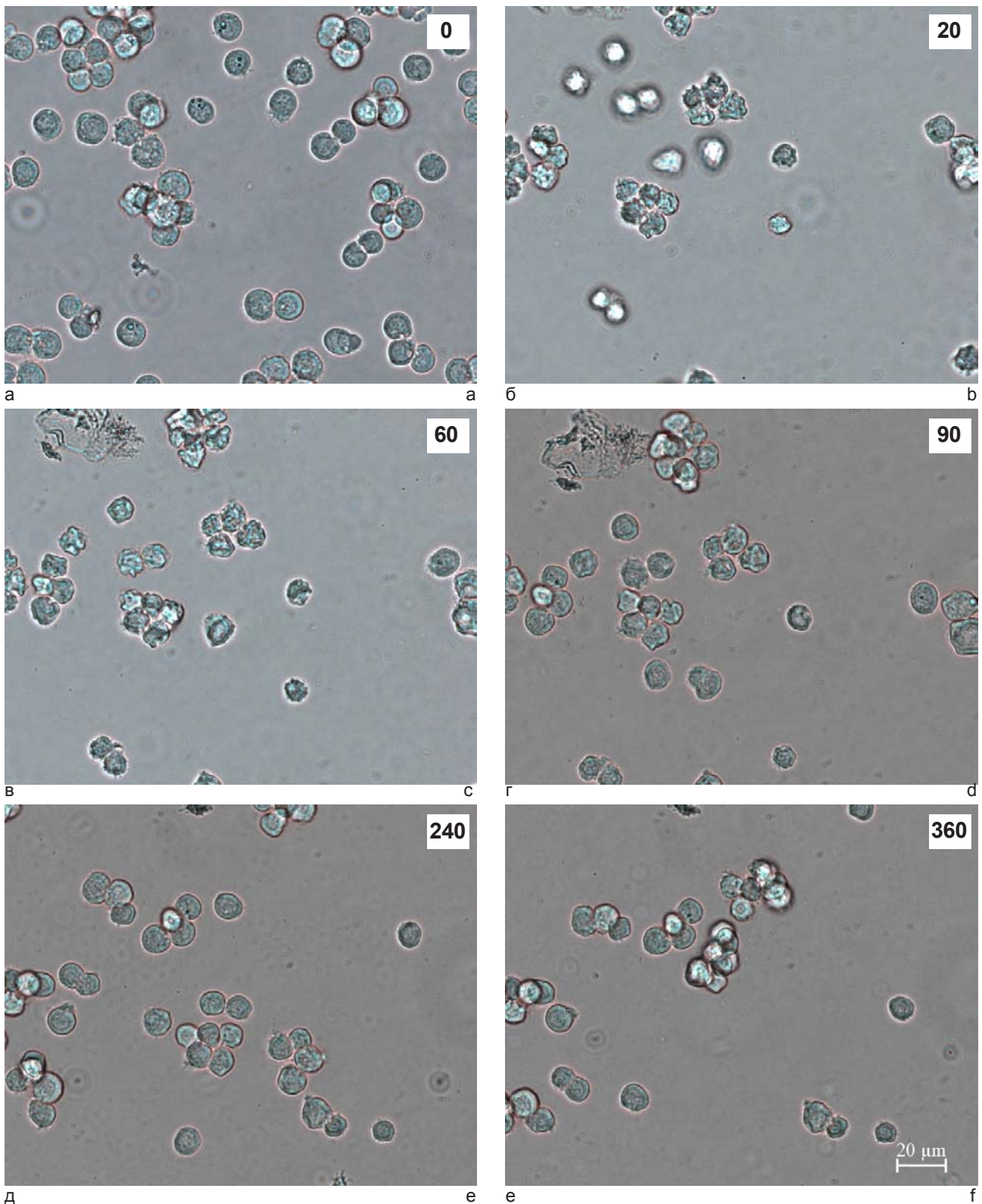
The studies were performed with inverted microscope MBI-13 (“LOMO”, Russia). To investigate the dynamics of osmotic response of SPEV cells on adding (in 10:1 ratio) of 1M ethylene glycol (EG) solution and 1,2-butane diol (1,2-BD) at temperatures of 35, 18 and 7°C the cell suspension was photographed in a certain time periods. The obtained data were presented as the dependencies of relative volumes of some cells on exposure time in the studied solutions. The set exposure temperature for cells in diols' solutions was provided by means of adjustment to microscope, cooled and warmed with a circulating through it liquid.

The permeability coefficients of plasma membranes of SPEV cells for molecules of diols ( $K_1$ ) were determined by comparing the experimental dependencies of relative cell volumes on time  $y(t)$  with the solutions of equations of theoretical model for the set experimental conditions [5]. The activation energies ( $E_A$ ) of the processes of substances' transfer through the membranes of SPEV cells were calculated from the dependencies of  $\ln K_1(1/T)$ , the slope of those according to Arrhenius equation is equal to  $E_A/R$ , where  $R$  is universal gas constant.

The results of experiments were statistically processed by the Student-Fisher method.

### Results and discussion

The series of photos show the kinetics of characteristic changes of SPEV cells under exposure (18°C) in 1M EG solution (Fig. 1) One can see that osmotic cell response (rapid dehydration and following relatively slow rehydration) completely terminates to the 5<sup>th</sup> min of exposure and is not accompanied with marked disorders in cell structure. In 1 M solution of 1,2-BD the similar changes in cells were found.



**Рис. 1.** Осмотическая реакция клеток СПЭВ при экспозиции в 1М раствора ЭГ (цифры – время экспозиции в секундах).  
**Fig. 1.** Osmotic reaction of SPEV cells at exposure in 1 M EGDG solution (numbers show the exposition time in seconds).

### Результаты и обсуждение

На серии микрофотографий представлена кинетика характерных изменений клеток СПЭВ при экспозиции (18°C) в 1М растворе ЭГ (рис. 1). Можно видеть, что осмотическая реакция клеток (быст-

Fig. 2, 3 demonstrate the features of experimental dependence of SPEV cell volumes on contact time with 1M EGDG and 1,2-BD, as well as theoretical curves, extrapolating osmotic cell behavior. In the solutions of 1,2-BD there was noted less manifested dehydration



рая дегидратация и последующая относительно медленная регидратация) полностью завершается к 5-й минуте экспозиции и не сопровождается заметными нарушениями клеточной структуры. В 1М растворе 1,2-БД наблюдались аналогичные изменения клеток.

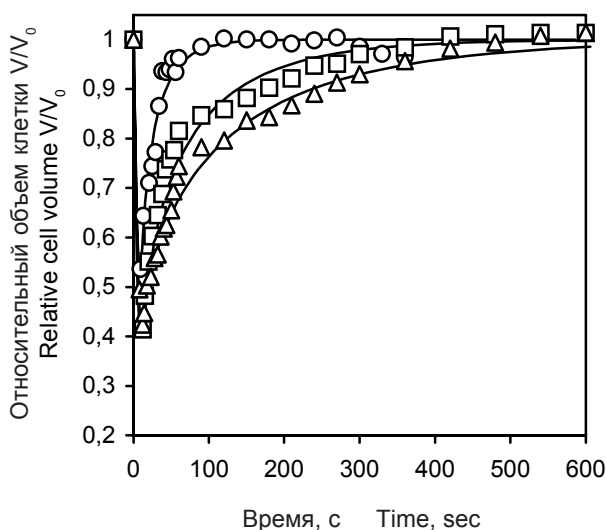
На рис. 2, 3 приведены характерные экспериментальные зависимости объемов клеток СПЭВ от времени контакта с 1 М растворами ЭГ и 1,2-БД, а также экстраполирующие осмотическое поведение клеток теоретические кривые. В растворах 1,2-БД отмечена менее выраженная дегидратация клеток, чем в растворах ЭГ; снижение скорости регидратации клеток при понижении температуры характерно для осмотической реакции в обоих растворах. Полученные данные свидетельствуют о снижении скорости проникновения ЭГ и 1,2-БД в клетки при понижении температуры и более быстром проникновении в клетки 1,2-БД, чем ЭГ.

Коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул ЭГ и 1,2-БД, рассчитанные на основе теоретических зависимостей, которые экстраполируют экспериментальные данные, приведены в таблице. Из представленных результатов исследований следует, что проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул 1,2-БД при 35°C достоверно выше, чем для молекул ЭГ. При понижении температуры различие в проницаемости для молекул исследуемых веществ исчезает. Более высокая проницаемость 1,2-БД по сравнению с ЭГ

of cells than in the solutions of EG; reduced rehydration rate of cells under the decrease of temperature is characteristic for osmotic response in both solutions. The findings testify to a reduced rate of penetration of EG and 1,2-BD into cells under temperature fall and more rapid penetration of 1,2-BD into cells comparing to EG.

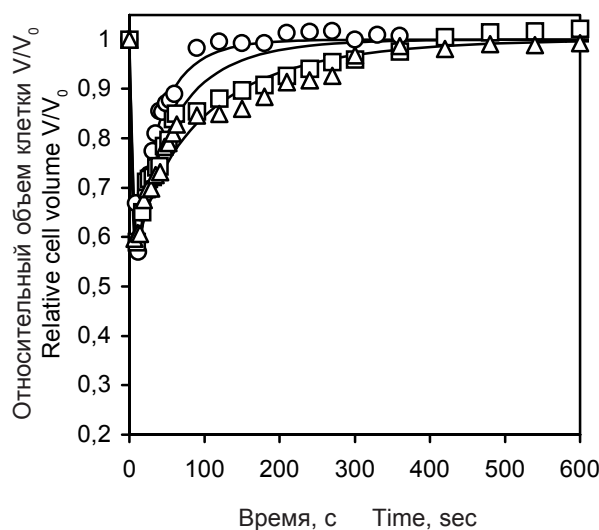
The permeability coefficients of SPEV cell membranes to molecules of EG and 1,2-BD, calculated by means of theoretical dependencies, extrapolating the experimental data are presented in the Table. The presented research results demonstrate that permeability of SPEV cell membranes to molecules of 1,2-BD at 35°C is significantly higher than for EG molecules. During the decrease of temperature the difference in permeability for molecules of the studied substances disappears. Higher permeability of 1,2-BD if compared with EG correlates with higher value of the partition coefficient ( $K_d$ ) of 1,2-BD in the "water-octanol" system, that supposes the penetration of 1,2-BD into cells via lipid bilayer [2]. This supposition may explain why the big size molecules penetrate into cells quicker than those of smaller size.

In Fig. 4 the Arrhenius coordinates show the penetration coefficients of SPEV cell membranes for EG and 1,2-BD molecules at 35, 18 and 7°C, as well as the linear dependences  $\ln k(1/T)$ , extrapolating experimental data. Activation energies ( $E_a$ ), calculated from these dependencies are equal to 45.07 kJ/mol for EG and 55.35 kJ/mol for 1,2-BD.



**Рис. 2.** Экспериментальные зависимости относительных объемов клеток СПЭВ от времени контакта с 1М раствором ЭГ и экстраполирующие осмотическое поведение клеток теоретические кривые при разных температурах: ○ – 35°C; □ – 18°C; △ – 7°C.

**Fig. 2.** Experimental dependences of relative volumes of SPEV cells on contact time with 1 M EG solution and extrapolating the osmotic cell behavior theoretical curves at different temperatures: ○ – 35°C; □ – 18°C; △ – 7°C.



**Рис. 3.** Экспериментальные зависимости относительных объемов клеток СПЭВ от времени контакта с 1М раствором 1,2-БД и экстраполирующие осмотическое поведение клеток теоретические кривые при разных температурах: ○ – 35°C; □ – 18°C; △ – 7°C.

**Fig. 3.** Experimental dependences of relative volumes of SPEV cells on contact time with 1 M 1,2-BD solution and extrapolating the osmotic cell behavior theoretical curves at different temperatures: ○ – 35°C; □ – 18°C; △ – 7°C.

Коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул ЭГ и 1,2-БД, измеренные при разных температурах, и некоторые физико-химические характеристики ЭГ и 1,2-БД  
Permeability coefficients of SPEV cell membranes to EG and 1,2-BD molecules at different temperatures and some physical and chemical characteristics of EG and 1,2-BD

Криопротектор Cryoprotectant	Структурная формула Structural formula	Диаметр молекулы D, Å Molecule diameter D, Å	Коэффициент распределения $K_p$ Distribution coefficient $K_d$	Температура, °C Temperature, °C	Коэффициент проницаемости $K_p \times 10^7$ , м/с Permeability coefficient, $K_p \times 10^7$ , m/s
ЭГ EG	HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	2,6	0,040	35 18 7	4,15±1,31 1,37±0,53 0,72±0,23
1,2-БД 1,2-BD	HO-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	4,3	0,308	35 18 7	6,64±1,11 2,69±0,54 0,77±0,17

**Примечание:** различия между значениями коэффициента проницаемости при различной температуре статистически достоверны ( $p < 0,05$ );  $K_p$  – коэффициент распределения в системе «вода-н-октанол» [7].

**Notes:** Differences between values of permeability coefficient at different temperatures are statistically significant ( $p < 0.05$ );  $K_d$  – partition coefficient in “water-n-octanol” system [7].

коррелирует с более высоким значением коэффициента распределения ( $K_p$ ) 1,2-БД в системе “вода-н-октанол”, что предполагает проникновение 1,2-БД в клетки через липидный бислой [2]. Такое предположение может объяснить, почему молекулы большего размера проникают в клетки быстрее, чем молекулы меньшего размера.

На рис. 4 в координатах Аррениуса приведены коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул ЭГ и 1,2-БД при температурах 35, 18 и 7°C и экстраполирующие экспериментальные данные линейные зависимости  $\ln k(1/T)$ . Энергии активации ( $E_a$ ), рассчитанные из этих зависимостей, равны: для ЭГ – 45,07 кДж/моль; 1,2-БД – 55,35 кДж/моль.

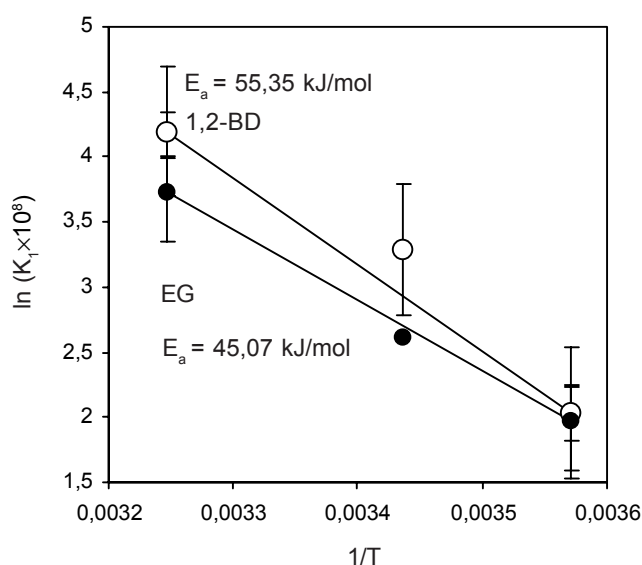
Полученные в работе данные о параметрах проницаемости клеток СПЭВ для ЭГ и 1,2-БД указывают на необходимость при сравнительной оценке проницаемости различных криопротекторов учитывать и температурную зависимость коэффициентов проницаемости.

## Выводы

1. С использованием метода волюмометрии и уравнений термодинамики необратимых процессов измерены коэффициенты проницаемости клеток СПЭВ для молекул ЭГ и 1,2-БД при температурах 35, 18 и 7°C.

2. При температуре 35°C проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул 1,2-БД достоверно выше, чем для молекул ЭГ, при 7°C достоверных различий в проницаемости этих диолов не выявлено.

3. Определенные из температурных зависимостей проницаемости энергии активации для ЭГ и 1,2-БД составляют 45,07 и 55,35 кДж/моль соответственно.



**Рис. 4.** Зависимости Аррениуса проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул криопротекторов в интервале температур 35–7°C: ○ – 1,2-БД и ● – ЭГ.

**Fig. 4.** Arrhenius permeability dependences of SPEV cell membranes for molecules of cryoprotectants within temperature range of 35–7°C: ○ – 1,2-BD and ● – EG.

The obtained in the research data about the permeability parameters of SPEV cells to EG and 1,2-BD point to the necessity at a comparative evaluation of permeability of different cryoprotectants to take into account temperature dependence of permeability coefficients as well.

## Conclusions

1. Using the method of volumetry and thermodynamics equations of irreversible processes there were measured the permeability coefficients of SPEV cells to EG and 1,2-BD molecules at temperatures of 35, 18 and 7°C.

## Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев:Наук. думка, 1994.– 142с.
2. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів // Біофіз. вісник, Вісн. Харків. ун-ту.– 2002.– Вип.2, №568.– С. 43–47.
3. Захаров А.Ф. Поздняя редупликация хромосом в культивируемых клетках китайского хомячка // Цитология.– 1966.– Т. 8, №2.– С.201–207.
4. Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов// Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 365–373.
5. Коваленко И.Ф., Кошый С.В., Тимофеева Е.В. и др. Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул воды и диметилсульфоксида // Пробл. криобиологии.– 2009.– Т. 19, №1.– С. 25–31.
6. Криобиология и криотехнология / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
7. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. 1. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 72–79.
8. Розанов Л.Ф., Высеканцев И.П., Петренко Т.Ф. и др. Чувствительность клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и грибов *Candida albicans* к процессам вне- и внутриклеточной кристаллизации // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 18–25.
9. Смольянинова Е.И., Погорелов А.Г., Лисина Е.Г. и др. Влияние среды замораживания на жизнеспособность и катионный состав ранних эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 310.

Поступила 15.01.2008  
Рецензент А.В. Зинченко

2. At temperature of 35°C the permeability of SPEV cell membranes to molecules of 1,2-BD was significantly higher than to the molecules of EG, at 7°C no significant differences in permeability of these diols were found.

3. Found from temperature dependences the permeability of activation energy for EG and 1,2-BD made 45.07 and 55.35 kJ/mol, correspondingly.

## References

1. Gordiyenko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 142 p.
2. Gordiyenko O.I., Linnik T.P. Penetration mechanisms of non-electrolytes of diols' series via erythrocyte membranes // Biophysical Bulletin. – 2002.– Issue 2.– P. 43–47.
3. Zakharov A.F. Late reduplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster // Tsitologiya.– 1966.– Vol. 8, N 2.– P. 201–207.
4. Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P. Membrane permeability of rat's and rabbit's erythrocytes to cryoprotectants of amides and diols series // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 365–373.
5. Kovalenko I.F., Koschiy S.V., Timofeyeva E.V. et al. Permeability of SPEV cell membranes to molecules of water and dimethyl sulfoxide // Problems of Cryobiology.– 2009.–Vol. 19, N1.– 25–31.
6. *Cryobiology and cryotechnology* / Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova dumka, 1987. – 216 p.
7. Linnik T.P., Bizikina O.V. Fowl sperm cryopreservation. 1. Cytotoxicity of diols and amides // Problems of Cryobiology.– 2001.– N 2.– P. 72–79.
8. Rozanov L.F., Vysekantsev I.P., Petrenko T.F. et al. Sensitivity of cells of inoculated cells line of SPEV and *Candida albicans* fungi to processes of extra- and intracellular crystallization // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 18–25.
9. Smolyaninova E.I., Pogorelov A.G., Lisina E.G. et al. Effect of freezing medium on viability and cation composition of murine early embryos // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 310.

Accepted in 15.01.2008