

Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов

UDC 57.043:612.111:547.42

G.V. KOVALENKO*, I.F. KOVALENKO, T.P. LINNIK

Membrane Permeability of Rat's and Rabbit's Erythrocytes for Cryoprotectants of Amide and Diol Series

В результате проведенных исследований выявлено, что проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для изученных веществ зависит от химической структуры, геометрических параметров молекул и физико-химических свойств этих соединений, в частности гидрофильно-гидрофобного баланса их молекул. Установлено, что проницаемость веществ через мембрану эритроцитов крысы выше, чем через мембрану эритроцитов кролика, что обусловлено видовой специфичностью этих клеток.

Ключевые слова: криопротекторы, проницаемость мембран, геометрические параметры молекул, гомологический ряд, липидный бислой, белковые каналы.

У результаті проведених досліджень виявлено, що проникність вивчених речовин крізь мембрани еритроцитів щура та кролика залежить від хімічної структури, геометричних параметрів молекул і фізико-хімічних властивостей цих сполук, зокрема гідрофільно-гідрофобного балансу їх молекул. Встановлено, що проникність речовин крізь мембрану еритроцитів щура вища, ніж крізь мембрану еритроцитів кролика, що обумовлено видовою специфічністю цих клітин.

Ключові слова: криопротектори, проникність мембран, геометричні параметри молекул, гомологічний ряд, ліпідний бішар, білкові канали.

As a result of the performed experiments the permeability of rat and rabbit erythrocyte membranes for substances was revealed as dependent on a chemical structure, geometric parameters of molecules, physical and chemical properties of these compounds, in particular hydrophilic and hydrophobic balance of their molecules. The permeability of substances through rat erythrocyte membrane was established as higher than the rabbit one, that was stipulated by the species-specificity of these cells.

Key-words: cryoprotectants, membrane permeability, molecule geometric parameters, homologous series, lipid bilayer, protein channels.

Определение коэффициентов проницаемости мембран клеток, в частности эритроцитов, для молекул криопротекторов как одного из важнейших биофизических параметров необходимо для научно обоснованного подхода к разработке эффективных методов криоконсервирования биологических объектов.

Способность веществ проникать через мембраны клеток, с одной стороны, зависит от химической структуры и геометрических параметров молекул, с другой – от состава и физико-химических свойств мембран клеток, отличающихся по видовой принадлежности и структурно-функциональным характеристикам [9, 12].

Одним из перспективных подходов для выяснения механизма транспорта криопротекторов внутрь клеток является изучение зависимости проницаемости мембран для молекул от их физико-химических свойств в гомологических рядах соединений с постепенно усложняющейся структурой на различных клетках растительного и животного происхождения. В связи с этим интересно было исследовать скорость проницаемости

Determining the permeability coefficient for cell membranes, erythrocytes in particular, for cryoprotectant molecules as one of the most important biophysical parameters is necessary for scientifically substantiated approach in designing efficient methods for biological object cryopreservation.

The capability of substances to penetrate through cell membranes depends on one hand on chemical structure and molecule geometric parameters and on another hand on the composition, physical and chemical properties of cell membranes, differing by species-specificity and structural-functional characteristics [9, 12].

One of the perspective ways in revealing the mechanism of cryoprotectant transport inside cells is to study the dependency of membrane permeability for molecules on their physical and chemical properties in homologous series of compounds with a gradually complicating structure in different cells of plant and animal origins. Due to this fact of interest was to investigate the rate of cryoprotectant permeability of two compound series (amides, diols) through erythrocyte membranes of different animals. Selection of com-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

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

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

крио-протекторов двух рядов соединений (амиды, диолы) через мембраны эритроцитов разных животных. Выбор соединений обусловлен их широким использованием в криобиологической практике [1].

Цель работы – определить коэффициенты проницаемости плазматических мембран эритроцитов крысы и кролика при температурах 37 и 25°C для 7 соединений ряда диолов и 4-х веществ ряда амидов.

Материалы и методы

Способ измерения коэффициентов проницаемости эритроцитов для криопротекторов основан на физико-математической модели гипотонического гемолиза эритроцитов человека [2]. В работе получены соотношения, которые описывают кинетику гемолиза эритроцитов в гипертоническом водном растворе вещества, проникающего в клетку. Количественные результаты модели лежат в основе алгоритма расчета коэффициента проницаемости молекул криопротекторов через мембрану эритроцитов человека по зависимости интенсивности рассеянного суспензией эритроцитов света от времени в процессе гипотонического гемолиза [4]. Физико-математическая модель связывает время $t_{1/2}$, за которое из эритроцита выходит 50% гемоглобина от его начального количества, с коэффициентом проницаемости клеточной мембраны к растворенному во внеклеточном растворе криопротектору.

Время 50%-го гемолиза ($t_{1/2}$) измеряли экспериментально на приборе, изготовленном фирмой «Криокон» (Харьков, Украина). Интенсивность рассеянного света с длиной волны ~ 1 мкм под углом 9° в направлении падающего пучка измеряли на приборе, в состав которого входят кюветная камера с системой первичного преобразования сигнала, устройство для поддержания температуры кюветной камеры на заданном уровне и система регистрации результатов измерения. Устройство имеет колимированный источник света (арсенид-галиевый диод АЛ107Б) с диапазоном спектральной характеристики от 950 до 1100 нм и фотоприемник (фотодиод ФД-25К с интегральной чувствительностью 8×10^{-3} мА/лк).

Во время эксперимента получали данные об зависимости интенсивности рассеянного света исследуемой суспензии от времени и время ($t_{1/2}$), которое соответствует 50%-му гемолизу эритроцитов. Коэффициент проницаемости мембраны эритроцита для криопротекторов рассчитывали по экспериментально определенному времени полу-гемолиза и литературным данным поверхностно-объемного отношения клеток по формуле [4]:

$$t_{1/2} = [\gamma_0 \times K_1]^{-1}, \quad (1)$$

pounds is stipulated by their wide usage in cryobiological practice [1].

Research was aimed to determine the permeability coefficients of plasmatic membranes of rat and rabbit erythrocytes at 37 and 25°C for 7 and 4 substances of diol and amide series, correspondingly.

Materials and methods

The way for measuring the erythrocyte permeability coefficients for cryoprotectants is based on physical and mathematical model of human erythrocyte hypotonic hemolysis [2]. The ratios, describing kinetics of erythrocyte hemolysis in hypertonic aqueous solution of the substance, penetrating into a cell were obtained in the research. The model quantitative results are in the base of calculation algorithm for permeability coefficient of cryoprotectant molecules through human erythrocyte membrane depending on the light intensity, scattered by erythrocyte suspension on time during hypotonic hemolysis [4]. Physical and mathematical model binds the time $t_{1/2}$, when 50 % of hemoglobin leave erythrocyte of its initial amount, with the permeability coefficient of cell membrane to the cryoprotectant, solved in an extracellular solution.

Time of 50% hemolysis ($t_{1/2}$) was experimentally measured with the device, designed by the “Criokon” Company (Kharkov, Ukraine). The intensity of scattered light with $\sim 1 \mu\text{m}$ wavelength on the 9° angle towards incident beam was measured with the device, consisting of cuvette chamber with the system of initial signal transformation, the device for maintaining temperature in cuvette chamber at a fixed level and the measurement result recording system. The device has a collimated light source (AL107B gallium-arsenide diode) with the range of spectral characteristics from 950 to 1100 nm and imaging device (PD-25K photodiode with integral sensitivity of 8×10^{-3} mA/lx).

The dependency of scattering light intensity in the studied suspension on time and the time ($t_{1/2}$), corresponding to 50% erythrocyte hemolysis were displayed during experiment. The coefficient of erythrocyte membrane permeability for cryoprotectants was calculated by the experimentally determined time of semi-hemolysis and literature data about surface-volume cell ratio by the formula [4]:

$$t_{1/2} = [\gamma_0 \times C_1]^{-1}, \quad (1)$$

where γ_0 is a surface-volume ratio of erythrocyte membrane; C_1 is the permeability coefficient of erythrocyte membrane for cryoprotectant molecules.

The activation energy of transfer process through erythrocyte membrane of studied cryoprotectant molecules was calculated as reported in the paper [3].

The rat blood, prepared with “Glycicir” preservative was the investigation object. All the animals were

где γ_0 – поверхностно-объемное отношение мембраны эритроцита; K_1 – коэффициент проницаемости мембраны эритроцита для молекул криопротектора.

Энергию активации процесса переноса через мембрану эритроцита молекул исследуемых криопротекторов рассчитывали по [3].

Объектом исследования была кровь крысы, заготовленная на консерванте “Глюгицир”. Все животные были здоровыми, половозрелыми самцами (6-7 месяцев), иммунизированными. Кровь крысы (беспородная белая) получали пункцией хвостовой вены, кровь кролика «Шиншилла» – надрезом или проколом краевой вены уха [5]. Эритроциты из цельной крови животных выделяли центрифугированием.

В работе были использованы следующие криопротекторы: этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), 1,3-пропандиол (1,3-ПД), 1,2-бутандиол (1,2-БД), 1,3-бутандиол (1,3-БД), 1,4-бутандиол (1,4-БД) (все «х.ч.» или «ч.д.а.», «Реакхим»), 2,3-бутандиол (2,3-БД), («х.ч.», «Sigma»), формамид (ФА), ацетамид (АА), диметилформамид (ДМФА), диметилацетамид (ДМАЦ) (все амиды «х.ч.» или «ч.д.а.», «Реакхим»). Вещества дополнительно очищали 2-кратной вакуумной перегонкой после предварительной адсорбции примесей окисью алюминия или активированным углем марки “А” [10].

Проницаемость мембран эритроцитов определяли для 1М растворов криопротекторов при температурах 25 и 37°C.

Коэффициент распределения веществ (K_p) в системе «вода – n-октанол» определяли при 25°C по методу [7].

Геометрические параметры молекул рассчитывали на основе моделей Стюарта-Бриглеба [11] по компьютерной программе “Hyper Chem Pro v. 5.1”

Статистическую обработку выполняли непараметрическим методом.

Полученные результаты представлены в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения.

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004 г.) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Результаты и обсуждение

Определены коэффициенты проницаемости диолов и амидов через мембраны эритроцитов

immunised healthy mature males (6-7 months' old). The rat (breedless white) and Chinchilla rabbit blood was procured by caudal vein puncture and either limbic auricular vein incision or pin, correspondingly [5]. Erythrocytes from the whole animal blood were isolated by centrifugation.

The following cryoprotectants were used in the research: ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD), 1,3-propane diol (1,3-PD), 1,2-butane diol (1,2-BD), 1,3-butane diol (1,3-BD), 1,4-butane diol (1,4-BD) (all ‘chemically pure’ or ‘pure for analysis’ grades, “Reakhim”), 2,3-butane diol (2,3-BD) (‘chemically pure’ grade, “Sigma”), formamide (FA), acetamide (AA), dimethyl formamide (DMFA), dimethyl acetamide (DMAC) (all amides of ‘chemically pure’ or ‘pure for analysis’ grades, “Reakhim”). Substances were additionally purified with a two-fold vacuum distillation after preliminary admixture adsorption with aluminium oxide or “A” graded activated carbon [10].

The erythrocyte membranes permeability was determined for 1M cryoprotectant solutions at 25 and 37°C.

The substance distribution coefficient (C_d) in the “water – n-octanol” system was determined at 25°C according to the method reported in the paper [7].

Molecule geometric parameters were calculated basing on the Stewart-Brigleb models [11] by the “Hyper Chem Pro v.5.1” Software.

Statistical processing was done using a non-parametric method.

The results obtained are presented as a mean with mentioning standard deviation.

The experiments were performed according to the “General ethical principles of experiments in animals”, approved by the 2nd National Congress on Bioethics (Kiev, 2004) and agreed with the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Results and discussion

The permeability coefficients for diols and amides through the rat and rabbit erythrocyte membranes at 25 and 37°C have been determined. The activation energy (E_A) for the molecule transfer process of the studied substances through the rat and rabbit erythrocyte membranes has been calculated. Both the obtained results, geometric parameters and the substance distribution coefficient (C_d) in the “water-n-octanol” system are shown in the Tables 1 and 2.

The Table 1 demonstrates the diol permeability through the rat erythrocyte membranes as statistically and significantly higher than the rabbit ones, excluding 1,3-BD. There is the similar picture for amide series (Table 2), but a statistically significant difference was

крысы и кролика при температурах 25 и 37°C. Рассчитана энергия активации (E_A) процесса переноса молекул исследуемых веществ через мембраны эритроцитов крысы и кролика. Полученные результаты, а также геометрические параметры и коэффициент распределения веществ (K_p) в системе «вода-н-октанол» приведены в табл. 1 и 2.

Из табл. 1 видно, что проницаемость диолов через мембраны эритроцитов крысы достоверно выше, чем кролика, исключая 1,3-БД. В ряду амидов наблюдается такая же картина (табл. 2), но достоверная разница выявлена только у ДМАЦ. Для остальных амидов просматривается только тенденция к более высокой способности проникать внутрь эритроцитов крысы по сравнению с эритроцитами кролика. Естественно предположить, что наблюдаемая разница между проницаемостью мембран эритроцитов крысы и кролика для изучаемых веществ обусловлена тем, что состав и физико-химические свойства

их мембран значительно отличаются. Например, индексы двойных связей суммарных липидов мембран эритроцитов крысы и кролика равны 1,7 и 1,2 соответственно [12]. Содержание холестерина в эритроцитарных мембранах крысы составляет 26,1, кролика – 29,9% [12]. Вероятно, вязкость липидной фазы мембран эритроцитов крысы ниже, чем кролика. Это может быть причиной более высокой скорости проникновения диолов и амидов внутрь эритроцитов крысы. Хотя высказывается мнение [12], что этот показатель не оказывает существенного влияния на проницаемость мембран, если основной вид транспорта веществ – белковые водные каналы. Данный физико-хими-

Таблица 1. Влияние коэффициентов распределения K_p и геометрических параметров диолов на их проницаемость через мембраны эритроцитов крыс и кроликов

Table 1. Effect of distribution coefficient C_d and geometric parameters of diols on their permeability through rat and rabbit erythrocyte membranes (n=5)

Криопротектор Cryoprotectant	D, Å	V, Å ³	K_p C_d	Животное Animal	$K_1 \times 10^6, \text{м/с}$ $C_1 \times 10^6, \text{м/сек}$		E_A кДж/МОЛЬ E_A kJ/mol
					25°C	37°C	
ЭГ EG	2,6	27,6	0,040	Крыса Rat	6,81 ± 1,15*	13,95 ± 1,36*	46,24
				Кролик Rabbit	2,64 ± 0,17*	5,21 ± 0,27*	43,83
1,2-ПД 1,2-PD	3,7	53,7	0,076	Крыса Rat	11,13 ± 2,09*	17,07 ± 0,92*	27,58
				Кролик Rabbit	6,95 ± 1,32*	12,73 ± 1,04*	39,02
1,3-ПД 1,3-PD	4,1	75,2	0,064	Крыса Rat	5,88 ± 0,61*	13,54 ± 1,78*	53,48
				Кролик Rabbit	4,27 ± 0,50*	8,42 ± 0,54*	43,78
1,2-БД 1,2-BD	4,3	88,5	0,308	Крыса Rat	13,54 ± 1,77*	18,48 ± 1,45*	20,06
				Кролик Rabbit	9,42 ± 1,32*	18,90 ± 1,43*	44,89
1,3-БД 1,3-BD	3,6	61,0	0,182	Крыса Rat	10,54 ± 1,68	14,38 ± 1,88	20,03
				Кролик Rabbit	8,34 ± 1,38	14,71 ± 1,94	36,59
1,4-БД 1,4-BD	4,0	92,9	0,137	Крыса Rat	6,89 ± 0,78*	13,39 ± 1,87*	42,84
				Кролик Rabbit	5,51 ± 0,52*	9,03 ± 0,70*	31,85
2,3-БД 2,3-BD	3,9	69,2	0,227	Крыса Rat	12,14 ± 1,04*	16,45 ± 2,72*	19,59
				Кролик Rabbit	8,53 ± 1,11*	15,87 ± 1,55*	40,03

Примечания: D – диаметр молекул; V – объем молекул; K_p – коэффициент распределения в системе «вода-н-октанол»; K_1 – коэффициент проницаемости; E_A – энергия активации; * – разница между коэффициентами проницаемости при 25 и 37°C достоверна при $p < 0,05$.

Notes: D is molecule diameter; V is molecule volume; C_d is the distribution coefficient in “water-n-octanol” system; C_1 is permeability coefficient; E_A is activation energy; * – difference between permeability coefficients at 25 and 37°C is statistically significant at $p < 0.05$.

revealed only in DMAC. For the rest amides only the tendency to higher ability of penetration inside the rat erythrocytes compared to the rabbit ones is traced. The observed difference between the rat and rabbit erythrocyte membrane permeability for the studied substances may be naturally assumed as stipulated by a huge difference in composition, physical and chemical properties of their membranes. For example, the indices of double links of summary lipids of rat and rabbit erythrocyte membranes are equal to 1.7 and 1.2, correspondingly [12]. Cholesterol content in rat and rabbit erythrocyte membranes is 26.1 and 29.9%, correspondingly [12]. Probably, the lipid phase viscosity of rat erythrocyte membrane is lower than in a rabbit

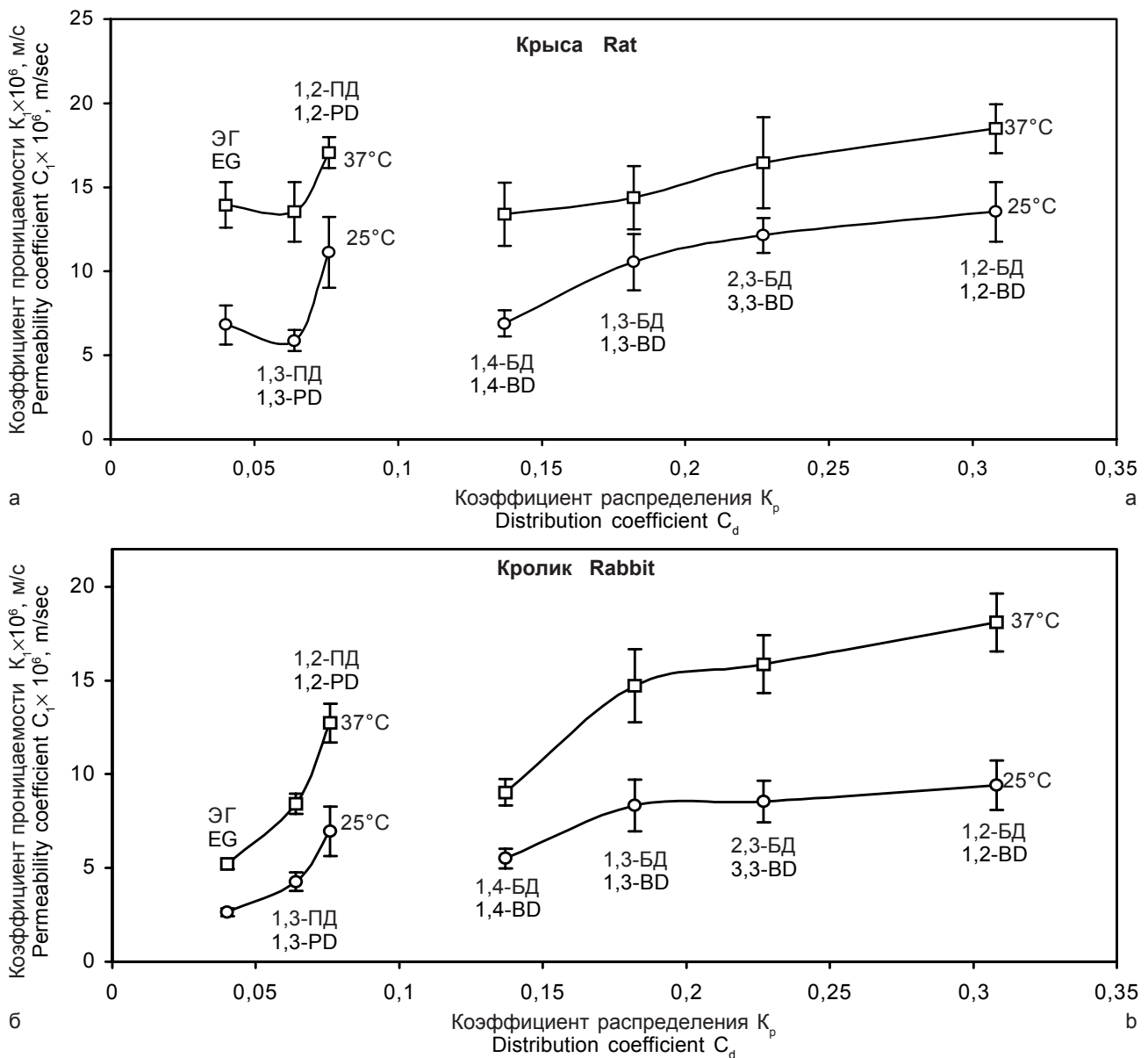


Рис. 1. Зависимость коэффициента проницаемости мембран эритроцитов крысы (а) и кролика (б) при разных температурах для веществ ряда диолов от их коэффициента распределения в системе «вода – н-октанол».

Fig. 1. Dependency of permeability coefficient of rat (a) and rabbit (b) erythrocyte membranes at different temperatures for substances of diol series on their distribution coefficient in “water – n-octanol” system.

ческий показатель мембран может иметь существенное значение, если вещества проникают внутрь клетки альтернативным путем непосредственно через липидный бислой. Известно [9, 12], что способность веществ проникать через мембрану липидным путем зависит от гидрофобности криопротекторов, т.е. от коэффициента распределения веществ в системе вода – неполярная фаза.

На рис.1 представлена зависимость коэффициента проницаемости K_1 мембран эритроцитов крысы и кролика при разных температурах для веществ ряда диолов от коэффициента их распределения в системе «вода – н-октанол» K_p . Обнаружена высокая корреляция между коэффи-

one. This may be a reason for higher rate of diol and amide penetration into rat erythrocytes. Although this index is suggested as not significantly affecting the membrane permeability, if the main type of substance transport is the protein aqueous channels [12]. This physical and chemical membrane index may be essential if the substances penetrate alternatively inside a cell, directly through a lipid bilayer. The ability of substances in penetrating through the membrane by a lipid way is known as dependent on hydrophobic property of cryoprotectants [9, 12], i.e. on the coefficient of substance distribution in the water-non-polar phase system.

The Fig. 1 shows the dependency of permeability coefficient C_1 of rat and rabbit erythrocyte membranes

циентом проницаемости веществ в эритроциты этих животных и их коэффициентом распределения между водной и неполярной фазой. Коэффициент корреляции между K_1 и K_p при температуре 37°C для бутандиолов составляет 0,99 и 0,91, а пропандиолов – 0,68 и 0,96 для крысы и кролика соответственно ($p < 0,05$). Не выявлена зависимость проницаемости этих веществ через эритроцитарные мембраны от диаметра и объема молекул диолов (см. табл.1). Это может свидетельствовать, что преимущественным путем диффузии некоторых диолов, а именно 1,4-БД, 1,3-БД, 2,3-БД и 1,2-БД, внутрь эритроцитов является липидный бислой мембран. Можно предположить, что при проникновении веществ через липидный бислой размеры их молекул не имеют важного значения, в большей степени на проницаемость влияет способность веществ взаимодействовать с гидрофобной фазой мембраны.

Однако следует отметить, что не исключена возможность для диолов проникать внутрь эритроцитов через белковые каналы мембран, так как значения энергии активации E_A варьируют от 27 до 53 кДж/моль (см. табл. 1). Известно [12], что значения энергии активации эритроцитарных мембран для молекул, диффундирующих внутрь клетки по водным каналам, находятся в этом диапазоне.

Более того, можно предполагать, что для ЭГ, 1,2-ПД и, вероятно 1,3-ПД, основным путем транспорта внутрь эритроцитов является диффузия через водные белковые каналы мембран. Эти вещества имеют низкие значения коэффициента

at different temperatures for substances of diol series on the C_d coefficient of their distribution in “water – n-octanol” system. A high correlation between the permeability coefficient of substances into erythrocytes of these animals and their distribution coefficient between aqueous and non-polar phase was observed. The correlation coefficient between C_1 and C_R at 37°C for butane diols makes 0.99 and 0.91, but 0.68 and 0.96 for propane diols in rat and rabbit, correspondingly ($p < 0.05$). No dependency of these substances permeability through erythrocyte membranes on the diameter and volume of diol molecules (see Table 1) was revealed. This may testify to the fact that the preferable diffusion way for some diols, namely 1,4-BD, 1,3-BD, 2,3-BD and 1,2-BD inside erythrocytes is the membrane lipid bilayer. It may be assumed that under substances penetration through a lipid bilayer, the sizes of their molecules have no importance, but this is the capability of substances to interact with the membrane hydrophobic phase, that mostly affects the permeability.

However of note is the fact that the possibility for diols to penetrate inside erythrocytes through the membrane protein channels is not excluded, because the values of activation energy E_A vary from 27 to 53 kJ/mol (see Table 1). The values of activation energy of erythrocyte membranes for molecules, diffusing inside a cell by aqueous channels are known to be within this range.

Moreover, we may assume, that for EG, 1,2-PD and, probably 1,3-PD the main transport way inside erythrocytes is the diffusion through aqueous protein membrane channels. These substances have low values of C_d distribution coefficient (from 0.040 to 0.076), i.e.

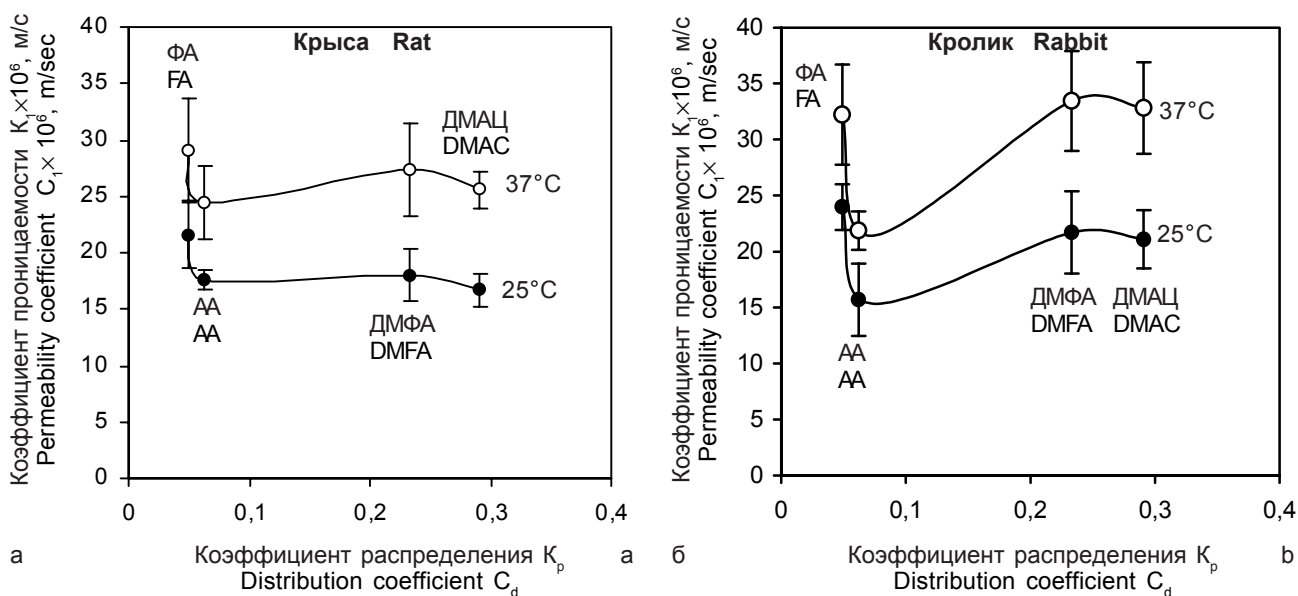


Рис. 2. Зависимость коэффициента проницаемости мембраны эритроцитов крысы (а) и кролика (б) при разных температурах для веществ ряда амидов от их коэффициента распределения в системе «вода – n-октанол».

Fig. 2. Dependency of permeability coefficient of rat (a) and rabbit (b) erythrocyte membranes at different temperatures for substances of amide series on their distribution coefficient in “water – n-octanol” system.

распределения K_p (от 0,040 до 0,076), т.е. они гидрофильны и практически не способны к гидрофобным взаимодействиям, к тому же имеют малые размеры молекул (диаметр от 2,6 до 3,7 Å, объем от 27,6 до 53,7 Å³, см. табл.1).

На рис. 2 приведена зависимость коэффициента проницаемости K_1 мембран эритроцитов крысы и кролика для веществ ряда амидов от их коэффициента распределения в системе «вода – н-октанол» K_p при 37 и 25°C. Видно, что амиды проникают внутрь клеток быстрее по сравнению с диолами (см. рис.1, табл. 2). Полученные результаты позволяют предположить, что пассивная диффузия изученных амидов через мембраны эритроцитов осуществляется двумя альтернативными путями: водными белковыми каналами и непосредственно через липидную фазу. При этом ФА как наиболее гидрофильная и наименьшая по размерам молекула должна проникать преимущественно через водные каналы. Коэффициент проницаемости у АА по сравнению с ФА уменьшается. Вероятно, это связано с размерами белковых пор эритроцитов крысы и кролика [12], а также с увеличением диаметра молекулы АА до 3,2 Å по сравнению с ФА (2,0 Å). Более высокий коэффициент проницаемости ДМФА и ДМАЦ по сравнению с АА обусловлен, вероятно, их гидрофильностью, высокой гидрофильностью и способностью к гидрофобному взаимодействию с липидной фазой мембран: повышается значение коэффициента распределения в системе вода – неполярная фаза (табл. 2). Это дает основание предположить, что ДМФА и ДМАЦ проникают внутрь клеток непосредственно через липидный бислой. Учитывая низкие значения энергии активации (~28 кДж/моль) для этих веществ не исключается возможность их диффузии через водные белковые каналы.

Более высокая способность амидов проникать через мембраны внутрь клеток может быть обусловлена также низкими значениями вязкости их водных растворов по сравнению с таковыми у диолов

they are hydrophilic and practically incapable for hydrophobic interactions, in addition their molecules are small-sized (diameter from 2.6 to 3.7 Å, volume from 27.6 to 53.7 Å³, see Table 1).

The Fig. 2 demonstrates the dependency of permeability coefficient C_1 of rat and rabbit erythrocyte membranes for the substances of amide series on their C_R distribution coefficient in the “water – n-octanol” system at 37 and 25°C. The amides are seen as more rapidly penetrating inside cells than diols (see Fig. 1, Table 2). The results obtained enable supposing a passive diffusion of the studied amides through erythrocyte membranes as realised by two alternative ways: aqueous protein channels and directly through a lipid phase. At the same time FA as the most hydrophilic and less by size molecule should penetrate mostly through the water channels. The permeability coefficient in AA compared to FA decreases. This is probably associated to the protein pore sizes of rat and rabbit erythrocytes [12], as well as with an increase in AA molecule diameter to 3.2 Å compared to FA (2.0 Å). A higher coefficient of DMFA and DMAC permeability compared to AA is possibly stipulated by their amphiphilic property, high hydrophilic property and capability for hydrophobic interaction with membrane lipid phase: there is an increase in distribution coefficient

Таблица 2. Влияние коэффициентов распределения K_p и геометрических параметров амидов на их проницаемость через мембраны эритроцитов крысы и кроликов

Table 2. Effect of distribution coefficient C_d and geometric parameters of amides on their permeability through rat and rabbit erythrocyte membranes

Криопротектор Cryoprotectant	D, Å	V, Å ³	K_p C_d	Животное Animal	$K_1 \times 10^6$, м/с $C_1 \times 10^6$, m/sec		E_A , кДж/МОЛЬ E_A , kJ/mol
					25°C	37°C	
ФА FA	2,0	10,4	0,049	Крыса Rat	23,97±2,06*	32,23±4,47*	19,09
				Кролик Rabbit	21,61±3,04*	29,10±4,64*	19,19
АА AA	3,2	30,5	0,062	Крыса Rat	15,68±3,23*	21,86±1,71*	21,42
				Кролик Rabbit	17,59±0,91*	24,39±3,26*	21,07
ДМФА DMFA	3,9	44,0	0,233	Крыса Rat	21,70±3,69*	33,45±4,44*	27,90
				Кролик Rabbit	18,03±2,23*	27,35±4,05*	26,87
ДМАЦ DMAC	4,2	70,6	0,291	Крыса Rat	21,08±2,60*	32,82±4,09*	28,55
				Кролик Rabbit	16,71±1,95*	25,62±1,63*	27,56

Примечания: D – диаметр молекул; V – объем молекул; K_p – коэффициент распределения в системе «вода – н-октанол»; K_1 – коэффициент проницаемости; E_A – энергия активации; * – разница между коэффициентами проницаемости при 25 и 37°C достоверна при $p < 0,05$.

Notes: D is molecule diameter; V is molecule volume; C_d is the distribution coefficient in “water – n-octanol” system; C_1 is permeability coefficient; E_A is activation energy; * – difference between permeability coefficients at 25 and 37°C is statistically significant at $p < 0.05$.

[6]. Динамическая вязкость ДМФА и ДМАЦ, например при 25°C, равна 0,796 и 0,919 мПа·с соответственно, в то время как у диолов она значительно выше: у 1,2-ПД – 44, 1,4-БД – 68,9, 1,3-БД – 93,4 мПа·с [6]. Диффузионные процессы в растворе зависят от этого показателя и обуславливают скорость транспорта вещества из водного раствора к мембране, и времени, через которое наступает с ней контакт.

Температурная зависимость коэффициентов проницаемости изученных веществ через мембраны эритроцитов для двух разных животных не требует обсуждения, поскольку она полностью согласуется с теоретическими представлениями и экспериментальными данными [8, 9, 12], т.е. чем выше температура, тем быстрее скорость транспорта веществ через мембрану внутрь клетки.

Выводы

В результате проведенных исследований выявлено, что скорость проникновения веществ через мембрану эритроцитов крысы выше, чем кролика, что обусловлено различием состава и физико-химических свойств их мембран.

Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для веществ обуславливается их химической структурой, геометрическими параметрами молекул и физико-химическими свойствами, в частности гидрофильно-гидрофобным балансом.

Среди двух классов химических соединений по скорости проницаемости в эритроциты крысы и кролика вещества располагаются таким образом: амиды > диолы.

На основании полученных данных можно предположить, что исследованные химические соединения проникают через плазматические мембраны эритроцитов крысы и кролика двумя альтернативными путями: водными белковыми каналами и непосредственно через липидный бислой.

Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С. Пушкарка и А.М. Белоуса. – Киев: Наук. думка. – 1981. – 606 с.
2. *Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е.* Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. II. Этап гемолиза // Вестн. ХГУ. Биофиз. вестник. – 1998. – №2. – С. 54-58.
3. *Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 143 с.
4. *Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф.* Определение коэффициента проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Вестн. ХГУ. Биофиз. вестник. – 1998. – №2. – С. 59-62.
5. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А.* Лабораторные животные. – Киев: Вища школа. – 1974. – 303 с.

in the water – non-polar phase system (Table 2). This provides the reasons for assuming DMFA and DMAC as penetrating into cells directly through a lipid bilayer. Taking into account low values of activation energy (~28 kJ/mol) for these substances, the diffusion possibility through aqueous protein channels is not excluded.

A higher ability of amides to penetrate through membranes inside cells may be stipulated by the low viscosity values of their aqueous solutions compared to those in diols [6]. Dynamic viscosity of DMFA and DMAC at 25°C, for example, is 0.796 and 0.919 mPa·sec, correspondingly, meanwhile it is significantly higher in diols: 44 in 1,2-PD, 68.9 in 1,4-BD, 93.4 mPa·sec in 1,3-BD [6]. Diffusive processes in the solution depend on this index and stipulate the substance transport rate out of aqueous solution towards membrane and on the time during which their contact occurs.

Temperature dependence of permeability coefficients of studied substances through erythrocyte membranes for two different animals is beyond discussion, since it correlates completely to the theoretical ideas and experimental data [8, 9, 12], i.e. the higher is temperature, the quicker is the substance transport rate through the membrane inside a cell.

Conclusions

As a result of the research performed the rate of substance penetration through the rat erythrocyte membrane was revealed to be higher than in rabbit, that was stipulated by a different composition, physical and chemical properties of their membranes.

The rat and rabbit erythrocyte membrane permeability for substances is stipulated by their chemical structure, molecule geometric parameters, physical and chemical properties, in particular hydrophilic and hydrophobic balance.

Among two classes of chemical compounds by permeability rate into rat and rabbit erythrocytes the substances are placed as follows: amides > diols.

With basing on the data obtained the studied chemical compounds may be assumed as penetrating through plasma membranes of rat and rabbit erythrocytes by the two alternative ways: aqueous protein channels and directly through lipid bilayer.

References

1. *Actual problems of cryobiology* / Ed. by N.S. Pushkar and A.M. Belous. – Kiev: Naukova Dumka. – 1981. – 606 p.
2. *Gordienko E.A., Panina Yu.E.* Physical and mathematical model of hypotonic hemolysis phenomenon in human erythrocytes. II. Hemolysis stage // Vestnik of Kharkov University. Biophysical Bulletin. – 1998. – N2. – P.54-58.

6. *Карпетян Ю.А., Эйчис В.Н.* Физико-химические свойства электролитных неводных растворов.– М.: Химия, 1989.– 252 с.
7. *Кейл Б.* Экстракция и противоточное распределение. Лабораторная техника органической химии.– М.: Мир, 1966.– С. 379-441.
8. *Котык А., Яначек К.* Мембранный транспорт.– М.: Мир, 1980.– 344 с.
9. *Пирузян Л.А.* Действие физиологических активных соединений на биологические мембраны.– М.: Наука, 1974.– 387 с.
10. *Протива М.* Очистка растворителей: Лабораторная техника органической химии.– М.: Мир, 1966.– С. 591-615.
11. *Физер Л., Физер М.* Органическая химия. М.: Химия, 1970.– Т.1.– 688 с.
12. *Черницкий Е.А., Воробей А.В.* Структура и функции эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 216 с.
3. *Gordienko E.A., Pushkar N.S.* Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 143 p.
4. *Gordienko O.I., Panina Yu.E., Kovalenko I.F.* Determination of permeability coefficient of erythrocyte membranes for cryoprotectants // Vestnik of Kharkov University. Biophysical Bulletin.– 1998.– N2.– P. 59-62.
5. *Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A.* Laboratory animals.– Kiev: Vyscha shkola.– 1974.– 303 p.
6. *Karapetyan Yu.A., Eichis V.N.* Physical and chemical properties of electrolyte non-aqueous solutions.– Moscow: Khimiya, 1989.– 252 p.
7. *Kale B.* Extraction and counter-flow distribution // Laboratory technique of organic chemistry.– Moscow: Mir, 1966.– P. 379-441.
8. *Kotyk A., Janacek K.* Membrane transport.– Moscow: Mir, 1980.– 344 p.
9. *Piruzyan L.A.* Effect of physiologically active compounds on biological membranes.– Moscow: Nauka, 1974.– 387 p.
10. *Protiva M.* Purification of solvents: Laboratory technique of organic chemistry.– Moscow: Mir, 1966.– P. 591-615.
11. *Fizer L., Fizer M.* Organic chemistry.- Moscow: Khimiya, 1970.– Vol.1.– 688 p.
12. *Chernitsky E.A., Vorobey A.V.* Structure and functions of erythrocyte membranes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.– 216 p.

Поступила 26.11.2007

Accepted in 26.11.2007