

## Диффузия многоатомных спиртов и их метоксипроизводных через мембраны эритроцитов крысы и кролика

UDC 547.42/43:612.111.:577.352

G.V. KOVALENKO\*, I.F. KOVALENKO, T.P. LINNIK, S.V. KOSHCHYIY

## Diffusion of Poly-Atom Alcohols and Their Methoxyderivatives via Rat and Rabbit Erythrocyte Membranes

Определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для молекул глицерина, этиленгликоля (ЭГ), их метоксипроизводных при температурах 25 и 37°C, а также эритроцитов, инкубированных с ртутным сульфгидрильным реагентом (pCMBS) – блокатором белка полосы 3 при 25°C. Рассчитана энергия активации процесса переноса молекул криопротекторов через мембраны эритроцитов при 25 и 37°C и после инкубации с pCMBS. Показано, что скорость диффузии веществ в эритроциты крысы выше, чем в эритроциты кролика. Например, коэффициент проницаемости ЭГ в эритроциты крысы при 37°C равен  $13,95 \times 10^{-6}$  м/с, в эритроциты кролика –  $5,21 \times 10^{-6}$  м/с. Скорость трансмембранной диффузии метоксипроизводных ЭГ и глицерина в 50–80 раз выше по сравнению с ЭГ и глицерином. Предложен и детально обоснован механизм транспорта изученных веществ через мембраны эритроцитов крысы и кролика.

**Ключевые слова:** криопротекторы, метоксипроизводные спиртов, проницаемость мембран, белковые каналы, эритроциты животных.

Визначено коефіцієнти проникності мембран нативних еритроцитів щура та кролика для молекул гліцерину, етиленгліколю (ЕГ), їх метоксипохідних при температурах 25 і 37°C, а також еритроцитів, інкубованих із ртутним сульфгидрильним реагентом (pCMBS) – блокатором білка смуги 3 при 25°C. Розраховано енергію активації процесу переносу молекул криопротекторів через мембрани еритроцитів при 25 і 37°C і після інкубації з pCMBS. Показано, що швидкість дифузії речовин в еритроцити щура вища, ніж в еритроцити кролика. Наприклад, коефіцієнт проникності ЕГ в еритроцити щура при 37°C дорівнює  $13,95 \times 10^{-6}$  м/с, в еритроцити кролика –  $5,21 \times 10^{-6}$  м/с. Швидкість трансмембранної дифузії метоксипохідних ЕГ і гліцерину у 50–80 разів вища в порівнянні з ЕГ і глицерином. Запропоновано і детально обговорено механізм транспорту вивчених речовин через мембрани еритроцитів щура та кролика.

**Ключові слова:** криопротектори, метоксипохідні спиртів, проникність мембран, білкові канали, еритроцити тварин.

There were determined the coefficients for membrane permeability of rat and rabbit native erythrocytes for glycerol, ethylene glycol molecules, their methoxyderivatives at 25 and 37°C, as well as erythrocytes, incubated with mercury sulfhydryl reagent (pCMBS): the band 3 protein blocker at 25°C. The activation energy of the process of cryoprotectant molecule transfer through erythrocyte membranes at 25 and 37°C and after incubation with pCMBS was calculated. The rate of substance diffusion into rat erythrocytes was shown to be higher, than in rabbit ones. As an example the coefficient of EG permeability into rat and rabbit erythrocytes at 37°C is equal to  $13.95 \times 10^{-6}$  and  $5.21 \times 10^{-6}$  m/sec, correspondingly. The rate of transmembrane diffusion of EG and glycerol methoxyderivatives is 50–80 times higher, compared to EG and glycerol. There was proposed and discussed in details the transport mechanism of studied substances through rat and rabbit erythrocyte membranes.

**Key words:** cryoprotectants, methoxyderivatives of alcohols, membrane permeability, protein channels, animal erythrocytes.

Глицерин и этиленгликоль (ЭГ) широко используются как криопротекторы при криоконсервировании различных биологических объектов [1]. Однако они не являются идеальными криозащитными агентами, так как в цикле замораживания-оттаивания повреждают значительную часть клеток. Это происходит, в основном, в результате действия осмотического шока на состояние мембран. Причиной этого является низкая проницаемость мембран для криопротекторов, особенно для глицерина [3].

Известно [11], что модификация химической структуры вещества приводит к изменению его

Glycerol and ethylene glycol (EG) are widely used as cryoprotectants for cryopreservation of different biological objects [1]. However they are not the perfect cryoprotective agents, because in freeze-thawing cycle they damage a significant part of cells. This mostly occurs as a result of osmotic shock effect on membrane state. This results from a low membrane permeability for cryoprotectants, especially for glycerol [3].

The modification of chemical structure of substance is known as resulting in a change of its capability to penetrate inside cells. As a perspective way of such a modification we may consider the replacement of one hydroxyl group (OH–) in glycerol molecule or EG to

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

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

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

способности проникать внутрь клеток. Перспективным путем такой модификации можно считать замену одной гидроксильной группы (ОН–) в молекуле глицерина или ЭГ на метоксигруппу (СН<sub>3</sub>О–), которая существенно изменяет их физико-химические свойства (вязкость, дипольный момент, энергию связи с Н<sub>2</sub>О), следовательно, влияет на их скорость и механизм транспорта через мембраны клеток.

Проницаемость мембран для криопротекторов зависит не только от их структуры, но и от физико-химических и функциональных свойств мембран, обусловленных видовой специфичностью клеток.

Коэффициент проницаемости мембран для криопротекторов относится к одному из основных биофизических параметров клеток, необходимых для научно обоснованной оптимизации методов криоконсервирования биологических объектов.

Цель исследования – изучение скорости и механизма диффузии глицерина и ЭГ и их метокси-производных через мембраны эритроцитов крысы и кролика в зависимости от температуры и присутствия ртутного сульфгидрильного реагента – блокатора водного канала (белка полосы 3).

### Материалы и методы

Для исследований были использованы глицерин, ЭГ, метоксиэтанол (МЭ). Все вещества марки “х. ч.” дополнительно очищали [9]. Первичный монометилловый эфир глицерина (ММЭГ) синтезировали по реакции Вильямсона [6], основанной на взаимодействии α-моноклоргидрина глицерина с алкоholesом натрия в абсолютном метиловом спирте, далее выделяли из реакционной смеси, очищали и идентифицировали [6, 9].

Коэффициент распределения ( $K_p$ ) веществ определяли в системе “вода – n-октанол” при 25°C по методу [5]. Геометрические параметры молекул рассчитывали для трансизомеров на основе моделей Стюарта-Бриглеба [9] по компьютерной программе “Hyper Cnem Pro v. 5.1”.

Кровь исследуемых животных, заготовленную на консерванте “Глюгицир”, получали у крысы путем пункции хвостовой вены, у кролика – прокола краевой вены уха [4].

Эксперименты проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (2004, Киев, Украина).

Коэффициенты проницаемости определяли по методу [2], основанному на физико-математической модели гемолиза эритроцитов в водных растворах проникающих криопротекторов при температурах 25 и 37°C.

Кинетику гемолиза регистрировали методом малоуглового рассеивания света на приборе, изготовленном фирмой “Криокон” (Украина). Длина

methoxy-group (СН<sub>3</sub>О–), considerably changing their physical and chemical properties (viscosity, dipole moment, bond energy with Н<sub>2</sub>О), consequently affecting their rate and transport mechanism through cell membranes.

Membrane permeability for cryoprotectants depends not only on the structure, but physical-chemical and functional properties of membranes, stipulated by species-specificity of cells.

Coefficient of membrane permeability for cryoprotectants refers to one of the main biophysical cell parameters, necessary for scientifically substantiated optimisation of cryopreservation methods for biological objects.

The research aim is to study the rate and mechanism of diffusion for glycerol, EG and their methoxyderivatives through membranes of rat and rabbit erythrocytes depending on temperature and presence of mercury sulfhydryl reagent: aqueous channel blocker (band 3 protein).

### Materials and methods

Glycerol, EG and methoxyethanol (ME) were used for the research. All substances of “chemically pure” grade were additionally purified [9]. Primary monomethyl ether of glycerol (MMEG) was synthesised by the Williamson reaction [6], based on the interaction of glycerol α-monochlorohydrine with sodium alcoholate in the absolute methyl alcohol, then isolated from reaction mixture, purified and identified [6, 9].

Coefficient of distribution ( $C_d$ ) for substances was determined in the “water – n-octanol” system at 25°C according to the methods [5]. Geometric parameters of molecules were calculated for transisomers, based on the Stewart-Brigleb models [9] with Hyper Cnem Pro v. 5.1 Software.

Blood of the studied animals, procured with “Glygicir” preservative, was obtained from rat and rabbit by puncture of caudal vein and ear marginal vein, correspondingly [4].

Experiments were done according to the “General ethical principles of experiments in animals”, approved by the 2<sup>nd</sup> National Congress on Bioethics (2004, Kiev, Ukraine).

Permeability coefficients were determined according to the method [2], based on the physical and mathematical model of erythrocyte hemolysis in aqueous solutions of penetrative cryoprotectants at 25 and 37°C.

Hemolysis kinetics was recorded using the method of small-angle light scattering with the device, designed by Cryocon company (Ukraine). Wavelength of light source was 1000 nm. Light intensity, scattered by erythrocyte suspension was measured at an angle of 9° in the direction of incoming beam. The equipment is supplied with the device for maintaining a necessary temperature in cell chamber. The activation energy of

волны источника света – 1000 нм. Интенсивность рассеянного суспензией эритроцитов света измеряли под углом 9° в направлении падающего пучка. Прибор снабжен устройством для поддержания необходимой температуры в кюветной камере. Энергию активации процесса переноса молекул веществ через мембраны эритроцитов животных рассчитывали в интервале температур 25–37°C.

Для блокирования водных каналов использовали ртутный сульфидрильный реагент – моносодиевую соль р-хлормеркурийбензол-сульфоновой кислоты (от англ. p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt – pCMBS) фирмы “Sigma” (США). Инкубацию эритроцитов крысы и кролика с pCMBS (2 mM) проводили в течение 30 мин при 25°C по методу [11]. Эритроциты отмывали физиологическим раствором, приготовленным на фосфатном буфере, рН 7,4.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

Определены коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для ЭГ, глицерина, ММЭГ и МЭ в нативном состоянии при 25 и 37°C и инкубированных с pCMBS при 25°C, рассчитана энергия активации переноса молекул через мембрану (табл. 1).

Видно, что все криопротекторы проникают через мембрану эритроцитов крысы быстрее, чем кролика при 25 и 37°C и после обработки клеток блокатором pCMBS за исключением ММЭГ при 37°C и МЭ с pCMBS при 25°C. Вероятно, это обусловлено слишком высокой скоростью диффузии этих веществ через мембраны эритроцитов крысы.

Подобная закономерность выявлена для диолов и амидов и объясняется, по нашему мнению, разной текучестью (величиной обратной вязкости) мембран эритроцитов крысы и кролика [7]. Индексы двойных связей суммарных липидов для мембран эритроцитов крысы и кролика равны 1,7 и 1,2, содержание холестерина – 26,1 и

transfer process of sub-stance molecules through membranes of animal erythrocytes was calculated within 25–37°C range.

In order to block the aqueous channels we used a mercury sulfhydryl reagent: monosodium salt of p-chloromercuribenzenesulfonic acid (Sigma). Rat and rabbit erythrocytes were incubated with pCMBS (2 mM) within 30 min at 25°C by the method [11]. The erythrocytes were washed out using physiological solution, prepared with phosphate buffer, pH 7.4.

Experimental results were statistically processed using the Student-Fisher method.

### Results and discussion

There were determined the permeability coefficients for rat and rabbit erythrocyte membranes for EG, glycerol, MMEG and ME in native state at 25 and 37°C and pCMBS-incubated at 25°C, the activation energy of molecule transfer through membrane was calculated (Table 1).

**Таблица 1.** Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов и энергия активации транспорта молекул  
**Table 1.** Permeability coefficients of rat and rabbit erythrocyte membranes for cryoprotectants and activation energy of molecule transport

Вещество Substance	Коэффициент проницаемости $K_p \times 10^6, \text{m/s}$ Permeability coefficient $K_p \times 10^6, \text{m/s}$			Энергия активации $E_a$ , (25–37°C), кДж/моль Activation energy $E_a$ (25–37°C), KJ/mol	Энергия активации с pCMBS $E_a$ , (25°C), кДж/моль Activation energy $E_a$ in pCMBS presence (25°C), KJ/mol
	Нативные эритроциты Native erythrocytes		В присутствии pCMBS In pCMBS presence		
	37°C	25°C			
Крыса Rat					
Глицерин Glycerol	0,335 ± 0,012	0,160 ± 0,017	0,133 ± 0,021	47,27	59,09
ЭГ EG	13,95 ± 1,36	6,81 ± 1,15	3,77 ± 0,71	45,87	83,70
ММЭГ MMEG	17,97 ± 2,28	13,21 ± 2,08	5,15 ± 0,36	19,68	79,95
МЭ ME	66,84 ± 16,95	38,21 ± 6,60	30,92 ± 5,86	35,77	49,32
Кролик Rabbit					
Глицерин Glycerol	0,209 ± 0,008	0,111 ± 0,014	0,109 ± 0,011	40,48	41,65
ЭГ EG	5,21 ± 0,27	2,64 ± 0,17	2,04 ± 0,19	43,48	59,98
ММЭГ MMEG	15,70 ± 0,92	7,64 ± 1,2	4,74 ± 0,13	46,07	76,62
МЭ ME	47,33 ± 2,78	25,24 ± 2,39	24,73 ± 2,40	40,22	41,53

**Примечание:** разница между коэффициентами проницаемости эритроцитов при 25 и 37°C, а также нативных и проинкубированных с pCMBS для всех веществ достоверна при  $p < 0,05$ .

**Notes:** difference between erythrocyte permeability coefficients at 25 and 37°C, as well as for native and incubated with pCMBS ones for all substances is statistically significant at  $p < 0.05$ .

29,9%, отношение фосфатидилхолина к сфингомиелину (ФХ:СМ) – 3,91 и 1,78 соответственно [10]. Эти показатели определяют текучесть мембран, т. е. величину, обратную вязкости, при этом, чем выше индекс двойной связи, отношение ФХ:СМ, и ниже содержание холестерина, тем значительней повышается текучесть мембраны. Из приведенных данных видно, что текучесть выше в эритроцитах крысы, поэтому скорость диффузии веществ через их мембрану более высокая.

Выявленная температурная зависимость проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для изученных криопротекторов согласуется с теоретическими представлениями [10] и полученными нами данными [7].

Как видно из табл. 1, наиболее медленно проникает внутрь эритроцитов крысы и кролика глицерин. Модификация глицерина и ЭГ путем замены одной гидроксильной группы (ОН–) на метоксигруппу (СН<sub>3</sub>О–) привела к значительному изменению скорости диффузии метоксипроизводных через мембрану эритроцитов крысы и кролика. Значения коэффициентов проницаемости ММЭГ в эритроциты крысы и кролика по сравнению с глицерином существенно увеличились независимо от условий эксперимента. Изменения величины коэффициента проницаемости МЭ в эритроциты крысы и кролика по сравнению с ЭГ незначительны (табл. 1).

Физико-химические свойства ММЭГ и МЭ существенно отличаются от свойств глицерина и ЭГ. Например, вязкость глицерина при 25°C равна  $945 \times 10^{-3}$  Па·с, ММЭГ –  $34,9 \times 10^{-3}$  Па·с, при 37°C вязкость глицерина и ММЭГ равна  $284 \times 10^{-3}$  и  $14,2 \times 10^{-3}$  Па·с соответственно.

Из табл. 2 видно, что введение в молекулу глицерина и ЭГ метоксигрупп приводит к повышению гидрофобности метоксипроизводных по сравнению с исходными соединениями. Коэффициент распределения у глицерина и ММЭГ равен 0,005 и 0,071, у ЭГ и МЭ – 0,040 и 0,121 соответственно (табл. 2). Изменение физико-химических свойств метоксипроизводных глицерина и ЭГ естественно повлияло на способность этих веществ проникать внутрь клеток и привело к значительному повышению скорости диффузии через мембрану эритроцитов крысы и кролика (см. табл. 1).

Значения энергии активации переноса молекул криопротекторов через мембрану эритроцитов крысы при изменении температуры от 25 и 37°C находятся в диапазоне от 20 до 50 кДж/моль, через мембрану эритроцитов кролика – от 40 до 50 кДж/моль (см. табл. 1). Такие значения энергии активации позволяют предполагать гидрофильный путь транспорта веществ в эритроциты. Глицерин является полностью гидрофильным веществом, поэтому сложно допустить для него липидный путь

It is seen, that all cryoprotectants penetrate through the membrane of rat erythrocytes more rapidly, than rabbit one at 25 and 37°C and after cell treatment with pCMBS blocker, excluding MMEG at 37°C and ME with pCMBS at 25°C. It is probably stipulated by quite a high diffusion rate of these substances through rat erythrocyte membranes.

The same regularity was revealed for diols and amides and we believe it is explained by different fluidity (the value of inverse viscosity) of rat and rabbit erythrocyte membranes [7]. The indices of double bonds of total lipids for rat and rabbit erythrocyte membranes are equal to 1.7 and 1.2, the cholesterol content is 26.1 and 29.9%, the ratio of phosphatidyl choline to sphingomyelin (PC:SM) is 3.91 and 1.78, correspondingly [10]. These indices determine the membrane fluidity, *i. e.* the value, being inverse to the viscosity, herewith the higher index of double bond, PC:SM ratio and lower cholesterol content are, the significantly increased membrane fluidity is. As the data presented show, the fluidity is higher in rat erythrocytes, therefore the rate of substance diffusion through their membrane is higher.

The revealed temperature dependency of membrane permeability of rat and rabbit erythrocytes for studied cryoprotectants conforms with theoretical notions [10] and our findings [7].

The Table 1 shows glycerol as penetrating in the slowest way into rat and rabbit erythrocytes. Glycerol and EG modification by means of replacement of one hydroxyl group (ОН–) for methoxy group (СН<sub>3</sub>О–) resulted in a significant change of diffusion rate of methoxyderivatives through the membrane of rat and rabbit erythrocytes. The values of permeability coefficients of MMEG into rat and rabbit erythrocytes, compared to glycerol, significantly augmented independently on experiment conditions. The changes in coefficient value of ME permeability into rat and rabbit erythrocytes, compared to EG, are insignificant (Table 1).

Physical and chemical properties of MMEG and ME significantly differ from glycerol and EG ones. For example, glycerol viscosity at 25°C equals  $945 \times 10^{-3}$  Pa·sec, MMEG is  $34.9 \times 10^{-3}$  Pa·sec, at 37°C glycerol and MMEG viscosity is  $284 \times 10^{-3}$  and  $14.2 \times 10^{-3}$  Pa·sec, correspondingly.

Table 2 shows the introduction of methoxygroups into glycerol and EG molecule as resulting in an increase of hydrophobicity of methoxyderivatives, compared to initial compounds. Distribution coefficient in glycerol and MMEG equals 0.005 and 0.071, in EG and ME it makes 0.040 and 0.121, correspondingly (Table 2). Change in physical and chemical properties of glycerol and EG methoxyderivatives affected naturally the capability of these substances to penetrate into cell and resulted in a significant increase of diffu-



транспорта через мембрану, даже через липидные “поры”, возникающие из-за дефектов в упаковке бислоя мембран [8]. Однако значение коэффициента проницаемости глицерина через мембрану эритроцитов кролика после инкубации с pCMBS при 25°C уменьшилось всего на 2%, через мембрану эритроцитов крысы – на 17%. Учитывая, что pCMBS блокирует белок полосы 3, можно предположить, что не более 2–17 % глицерина проникает через мембрану эритроцитов крысы и кролика этим путем. Остальная часть глицерина проникает внутрь эритроцитов крысы и особенно кролика другим путем, вероятно, через аквапорины. Предполагается [12], что бло-

каторами транспорта воды и низкомолекулярных веществ через аквапорины являются ртутные сульфгидрильные вещества, которые не относятся к цистеин-связывающим реагентам в отличие от pCMBS. Если допустить, что диффузия глицерина осуществляется через аквапорины, то понятно, почему его транспорт через мембрану практически не блокируется pCMBS.

Проницаемость мембран эритроцитов для МЭ подобно глицерину также практически не блокируется после инкубации клеток с pCMBS (см. табл. 1). Значения коэффициентов проницаемости МЭ в инкубированные с pCMBS эритроциты крысы уменьшились на 19%, в эритроциты кролика практически не изменились. Энергия активации переноса молекул МЭ через мембраны крысы и кролика составляет 49,32 и 41,53 кДж/моль соответственно, т. е. вполне вероятен гидрофильный путь трансмембранной диффузии этого вещества. Но, учитывая его “сверхбыструю” скорость транспорта в эритроциты кролика и крысы и достаточно высокое значение коэффициента распределения МЭ в системе “вода – n-октанол” ( $K_p = 0,125$ ), можно утверждать, что основной путь транспорта МЭ внутрь клеток проходит непосредственно через липидный бислой. Таким образом, глицерин имеет самые низкие значения коэффициента проницаемости через мембрану крысы и кролика, а МЭ самые высокие. При этом пути транспорта этих веществ отличаются. Глицерин преимущественно проникает внутрь эритроцитов по гидрофильному пути, вероятно, диффундирует через аквапорины [12] и только не более 2–17 % – через белок

**Таблица 2.** Структурные формулы, геометрические параметры и коэффициент распределения криопротекторов  
**Table 2.** Structural formulae, geometric parameters and coefficient of cryoprotectant distribution

Вещество Substance	Структурная формула Structural formula	M	Геометрические параметры молекул Geometrical parameters of molecules		$K_p$ $C_p$
			D, Å	V, Å <sup>3</sup>	
Глицерин Glycerol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	92,1	4,7	90,2	0,005
ЭГ EG	HO – CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> – OH	62,1	2,6	27,6	0,040
ММЭГ MMEG	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OCH}_3 \end{array}$	106,1	4,7	107,5	0,071
МЭ ME	HO – CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> – OCH <sub>3</sub>	76,1	2,3	22,6	0,121

**Примечание:** M – молекулярная масса; D – диаметр молекул; V – объем молекул;  $K_p$  – коэффициент распределения в системе “вода – n-октанол”.

**Notes:** M is molecular mass; D is molecule diameter; V is molecule volume;  $C_d$  is distribution coefficient in water – n-octanol system.

сion rate through the rat and rabbit erythrocyte membrane (see Table 1).

The values of activation energy of cryoprotectant molecule transfer through the rat erythrocyte membrane when changing temperature from 25 and 37°C are within the range from 20 to 50 kJ/mol and from 40 to 50 kJ/mol for rabbit erythrocyte one (see Table 1). These values of activation energy enable to suppose a hydrophilic way of substance transport into erythrocytes. Glycerol is completely hydrophilic substance, therefore it is complicated to admit for it a lipid transport way through a membrane, even via lipid “pores”, occurring due to the defects in the package of membrane bilayer [8]. However the coefficient value of glycerol permeability through the membrane of rabbit and rat erythrocytes after incubation with pCMBS at 25°C reduced only by 2 and 17%, correspondingly. Taking into account the fact, that pCMBS blocks the band 3 protein we may assume, that not more than 2–17% of glycerol penetrate through the membrane of rat and rabbit erythrocytes by this way. The rest part of glycerol penetrates into erythrocytes of rat and especially rabbit by another way, probably through the aquaporins. One assumes [12], that the blockers of water transport and low molecular substances through aquaporins are the mercury sulfhydryl substances, not referring to cysteine-binding reagents in contrast to pCMBS. If admitting glycerol diffusion as being realised via aquaporins, it is clear why its transport through membrane is not practically blocked by pCMBS.

The erythrocyte membrane permeability for ME similar to glycerol is not practically blocked after cell

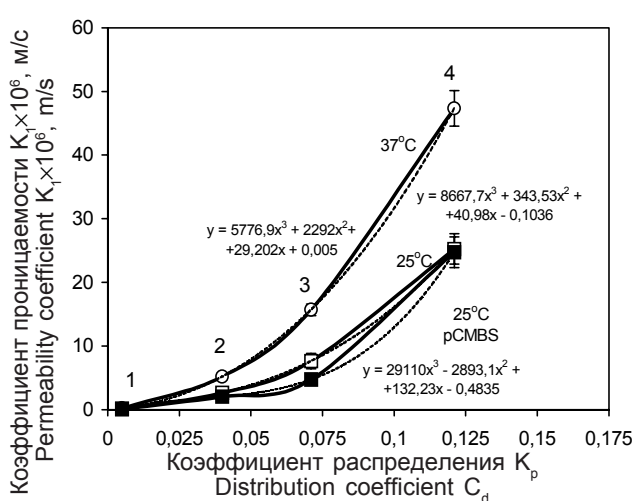
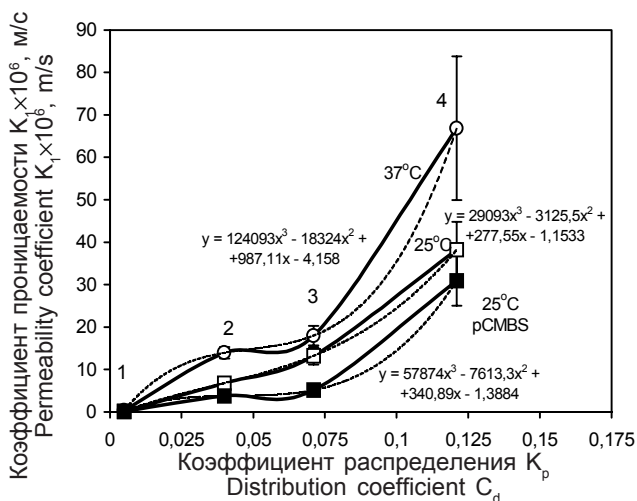
полосы 3. Транспорт МЭ через мембраны эритроцитов крысы и кролика напротив преимущественно осуществляется по липидному пути. И только 20% вещества в эритроциты крысы проникают по белковому водному каналу.

На рисунке представлены зависимости коэффициентов проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика при 25 и 37°C и проинкубированных с pCMBS при 25°C для ЭГ, глицерина, ММЭГ и МЭ от их коэффициента распределения. Наблюдается очень высокая корреляция между указанными показателями. Коэффициенты корреляции для нативных эритроцитов крысы при 37°C равны 0,945, при 25°C – 0,968, после инкубации с pCMBS – 0,907, для нативных эритроцитов кролика при 37°C – 0,959, при 25°C – 0,952, после инкубации с pCMBS – 0,916. Для получения количественной зависимости между указанными показателями все кривые аппроксимировали, и, как видно на рисунке, при  $R^2 = 1$  кривые хорошо описываются полиномом 3-й степени. Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что глицерин проникает преимущественно по гидрофильному пути, а МЭ диффундирует в основном через липидный матрикс.

Из табл. 1 и рисунка следует, что ЭГ и ММЭГ не имеют столь однозначного механизма транспорта через мембрану эритроцитов крысы и кролика, как глицерин и МЭ. Во-первых, наблюдается повышение энергии активации переноса молекул этих криопротекторов через мембраны эритроцитов, инкубированных с pCMBS при 25°C, до уровня 80–84 (эритроциты крысы) и до уровня 60–77 кДж/моль (эритроциты кролика). Во-вторых, снижение ско-

incubation with pCMBS as well (see Table 1). Coefficient values of ME permeability into pCMBS-incubated rat erythrocytes reduced by 19% and remained practically unchanged into rabbit ones. The activation energy of ME molecule transfer through rat and rabbit membranes makes 49.32 and 41.53 kJ/mol, correspondingly. Hydrophilic way of transmembrane diffusion of this substance seems to be probable. However, taking into account its “ultrarapid” transport rate into rabbit and rat erythrocytes and quite a high value of ME distribution coefficient in “water – n-octanol” system ( $C_d = 0.125$ ), we may confirm, that the main way for ME transport into cells occurs directly through lipid bilayer. Thus, glycerol and ME have the lowest and highest values of permeability coefficient through rat and rabbit membrane, correspondingly. At the same time the transport pathways of these substances are different. Glycerol mostly penetrates into erythrocytes by hydrophilic way, probably diffuses through aquaporins [12] and only no more than 2–17% do through the band 3 protein. Alternatively, the ME transport through membranes of rat and rabbit erythrocytes is mostly realised by a lipid way. Only 20% of substances penetrate into rat erythrocytes by a protein aqueous channel.

The Figure shows the dependencies of permeability coefficients of rat and rabbit native erythrocyte membranes at 25 and 37°C and pCMBS-incubated ones at 25°C for EG, glycerol, MMEG and ME on their distribution coefficient. There is observed a very high correlation between the mentioned indices. The correlation coefficients for native rat erythrocytes at 37 and 25°C make 0.945 and 0.968, correspondingly, it is 0.907 after incubation with pCMBS, for native rabbit



а б  
Зависимость коэффициентов проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы (а) и кролика (б) при 37 (○) и 25°C (□) и проинкубированных с pCMBS при 25°C (■) от коэффициента распределения в системе “вода – n-октанол” для: 1 – глицерина; 2 – ЭГ; 3 – ММЭГ; 4 – МЭ; — — — экспериментальные данные; - - - - кривая аппроксимации.

Dependency of permeability coefficients of rat (a) and rabbit (b) native erythrocyte membranes at 37 (○) and 25°C (□) and pCMBS-incubated ones at 25°C (■) on distribution coefficient in “water – n-octanol” system for: 1 – glycerol; 2 – EG; 3 – MMEG; 4 – ME; - - - - solid curve represents experimental data; dashed curve is approximation curve.

рости диффузии этих веществ через мембраны эритроцитов крысы и кролика после инкубации с рСМБС значительно больше по сравнению с глицерином и МЭ. Значения коэффициентов проницаемости мембран после обработки рСМБС эритроцитов крысы для ЭГ и ММЭГ уменьшаются на 45–50%, эритроцитов кролика – на 25–40%. Вышесказанное позволяет предположить наличие 2-х альтернативных путей транспорта веществ через мембраны клеток. Допустимо утверждать, что около 60% ММЭГ проникает в эритроциты непосредственно через липидный матрикс. Снижение значения коэффициента проницаемости ММЭГ после инкубации с рСМБС (блокатор белка полосы 3) указывает на существование альтернативного пути транспорта, т. е. по белковым водным каналам. У ЭГ как и у ММЭГ после инкубации эритроцитов крысы и кролика с рСМБС повышается энергия активации переноса его молекул через мембрану и уменьшается значение коэффициента проницаемости (см. табл. 1).

Следовательно, можно утверждать существование альтернативных путей транспорта через мембрану клеток. Но предположить диффузию ЭГ через мембрану по липидному пути вряд ли возможно. Этиленгликоль относится к гидрофильным веществам. Отсюда следует, что около 20–40% вещества проникает по белковому водному каналу (блокирование рСМБС белка полосы 3), остальная часть ЭГ, как и глицерин, вероятно, диффундирует через мембраны эритроцитов по аквапоринам или через липидные поры, возникающие в результате тепловых флуктуаций или при образовании структурных дефектов в мембране [8].

## Выводы

Определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для глицерина, ЭГ, ММЭГ и МЭ при температурах 25 и 37°C, а также эритроцитов, инкубированных с рСМБС – блокатором белка полосы 3 при 25°C. Рассчитаны энергии активации переноса молекул криопротекторов через мембраны нативных эритроцитов крысы и кролика в диапазоне температур 25 и 37°C и после инкубации с рСМБС при 25°C.

Установлено, что проницаемость веществ через мембрану эритроцитов крысы выше, чем через мембрану эритроцитов кролика, что обусловлено более высокой текучестью мембран эритроцитов крысы.

Показано, что скорость трансмембранной диффузии в эритроциты крысы и кролика модифицированных спиртов в 50–80 раз выше по сравнению с исходными (глицерина и ЭГ).

erythrocytes at 37 and 25°C it makes 0.959 and 0.952, correspondingly, and 0.916 after pСМБС incubation. In order to obtain a quantitative dependency between the mentioned indices all the curves were approximated and the Figure showed at  $R^2 = 1$  the curves to be well described with polynomial of degree 3. After analysing the data obtained, we may conclude about the fact, that glycerol penetrates mostly by a hydrophilic way, but ME diffuses mainly through a lipid matrix.

As proceeded from the Table 1 and Figure, the EG and MMEG do not have such a uniform transport mechanism through the rat and rabbit erythrocyte membrane as glycerol and ME. Firstly, there is observed an increase in activation energy of molecule transfer of these cryoprotectants through the pСМБС-incubated erythrocyte membranes at 25°C up to the level of 80–84% (rat erythrocytes) and to 60–77 kJ/mol (rabbit ones). Secondly, a decrease in diffusion rate of these substances through membranes of rat and rabbit erythrocytes after incubation with pСМБС is significantly greater, compared to glycerol and ME. Coefficient values of membrane permeability after pСМБС treatment of rat and rabbit erythrocytes for EG and MMEG reduce by 45–50 and 25–40%, correspondingly. The mentioned above enables assuming the presence of two alternative ways for substance transport through cell membranes. It is logical to confirm, that about 60% MMEG penetrate into erythrocytes directly via lipid matrix. The value decrease of MMEG permeability coefficient after incubation with pСМБС (band 3 protein blocker) indicates to the existence of an alternative transport pathway, *i. e.* via protein aqueous channels. In both EG and MMEG after rat and rabbit erythrocyte incubation with pСМБС there is an increase in activation energy of its molecule transfer through membrane and a decrease in permeability coefficient value (see Table 1).

Consequently, we may confirm about the existence of alternative transport pathways through cell membrane. However it is unlikely possible to suppose the EG diffusion through membrane by a lipid way. Ethylene glycol is related to hydrophilic substances. It follows, that about 20–40% substances penetrate by a protein aqueous channel (pСМБС blocking of band 3 protein), the rest of both EG and glycerol probably diffuses through erythrocyte membranes by aquaporins or through lipid pores, occurring as a result of heat fluctuations or during formation of structural defects in a membrane [8].

## Conclusions

There were determined the permeability coefficients for membranes of rat and rabbit native erythrocytes for glycerol, EG, MMEG and ME at 25 and 37°C, as well as erythrocytes, incubated with pСМБС-blo-

Выявлено, что диффузия ММЭГ в эритроциты крысы и кролика осуществляется двумя альтернативными путями – через гидрофильные водные каналы и непосредственно через липидный бислой. Установлено, что глицерин обладает самой низкой скоростью диффузии в эритроциты крысы и кролика, проникает в клетки по гидрофильному пути, вероятно по аквапоринам; МЭ имеет самую высокую скорость трансмембранной диффузии в эритроциты крысы, проникает в клетки преимущественно через липидный бислой (до 80–98%).

### Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С. Пушкаря и А.М. Белоуса.– Киев: Наук. думка, 1981.– 606 с.
2. *Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф.* Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // *Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.*– 1988.– Вип. 2.– С. 59–63.
3. *Гордієнко О.І., Кошій С.В., Ліннік Т.П.* Проницаемость мембран эритроцитов людини для глицерину та його ефірних похідних // *Фізика живого.*– 2003.– Т. 11, №2.– С. 29–36.
4. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А.* Лабораторные животные.– Киев: Вища школа, 1974.– 303 с.
5. *Кейл Б.* Лабораторная техника органической химии.–М.: Мир, 1966.– 751 с.
6. *Кимсанов Б.Х., Ишанова Х.Х.* Синтез моноалкиловых эфиров глицерина // *Изв. АН Тадж. ССР.*– 1981.– №2.– С. 102–104.
7. *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.
8. *Маркин В.С., Козлов М.М.* Статистика пор в бислоиных липидных мембранах // *Биол. мембраны.*– 1985.– Т. 2, №12.– С. 205–223.
9. *Физер Л., Физер М.* Органическая химия.– М.: Химия, 1970, Т. 1.– 688 с.
10. *Черницький Е.А., Воробей А.В.* Структура и функции эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 216 с.
11. *Conlon T., Outhred R.* The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1978.– Vol. 511, N3.– P. 408–418.
12. *Verkman A. S., Mitra A. K.* Structure and function of aquaporin water channels // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*– 2000.– Vol. 278, N1.– P. 13–28.

*Поступила 08.10.2009  
Рецензент Н.М. Шпакова*

cker of band 3 protein at 25°C. The activation energies of cryoprotectant molecule transfer through membranes of rat and rabbit native erythrocytes within 25 and 37°C range and after incubation with pCMBS at 25°C, were calculated.

Substance permeability through membrane of rat erythrocytes was established to be higher, than rabbit ones, stipulated by higher fluidity of rat erythrocyte membrane.

The rate of transmembrane diffusion of modified alcohols into rat and rabbit erythrocytes was shown to be 50–80 times higher, compared to initial ones (glycerol and EG).

MMEG diffusion into rat and rabbit erythrocytes was revealed as realising via two alternative pathways: through hydrophilic aqueous channels and directly through lipid bilayer. It was established, that glycerol had the lowest diffusion rate into rat and rabbit erythrocytes, penet-rated into cells by hydrophilic way, probably, by aqua-porins; ME had the highest rate of transmembrane diffusion into rat erythrocytes, penetrated into cells mostly via lipid bilayer (up to 80–90%).

### References

1. *Current problems of cryobiology* / Ed. by N.S. Pushkar and A.M. Belous.– Kiev: Naukova dumka, 1981.– 606 p.
2. *Gordienko O.I., Panina Yu.E., Kovalenko I.F.* Determination of permeability coefficients of erythrocyte membranes for cryoprotectants // *Visnyk KhDU. Biophysical Bulletin.*– 1988.– Issue 2.– P. 59–63.
3. *Gordienko O.I., Koschiy S.V., Linnik T.P.* Peremability of human erythrocyte membranes for glycerol and its ether derivatives // *Fizyka Zhivogo.*– 2003.– Vol. 11, N2.– P. 29–36.
4. *Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A.* Laboratory animals.– Kiev: Vyscha shkola, 1974.– 303 p.
5. *Cale B.* Laboratory technique of organic chemistry.– Moscow: Mir, 1966.– 751p.
6. *Kimsanov B.Kh., Ishanova Kh.Kh.* Synthesis of monoalkyl ether of glycerol // *Izvestiya of Academy of Sciences of Tadzjik SSR.*– 1981.– N2.– P. 102–104.
7. *Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P.* Membrane permeability of rat's and rabbit's erythrocytes for cryoprotectants of amid and diol series // *Problems of Cryobiology.*– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 365–373.
8. *Markin V.S., Kozlov M.M.* Statistics of pores in bilayer lipid membranes // *Biol. Membrany.*– 1985.– Vol. 2, N12.– P. 205–223.
9. *Fizer L., Fizer M.* Organic chemistry.– Moscow: Khimiya, 1970.– Vol. 1.– 688 p.
10. *Chernitsky E.A., Vorobej A.V.* Structure and function of erythrocyte membranes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.– 216 p.
11. *Conlon T., Outhred R.* The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1978.– Vol. 511, N3.– P. 408–418.
12. *Verkman A. S., Mitra A. K.* Structure and function of aquaporin water channels // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*– 2000.– Vol. 278, N1.– P. 13–28.

*Accepted in 08.10.2009*