

Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів

О.І. ГОРДІЄНКО, Є.О. ГОРДІЄНКО, Т.П. ЛІННІК, А.М. КОМПАНІЄЦЬ
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Mechanisms of Cryoprotectant Permeation via Erythrocytes Membranes

GORDIENKO O.I., GORDIENKO E.A., LINNIK T.P., KOMPANIETS A.M.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

У роботі представлено експериментальні дані щодо коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для низки кріопротекторів. Показано, що на коефіцієнти проникності впливають як фізико-хімічні, так і геометричні параметри молекул. З отриманих результатів випливає, що при перевищенні діаметром молекул величини 4\AA коефіцієнт проникності зменшується, очевидно, за рахунок зменшення потоку крізь водні білкові пори сталого розміру. Коефіцієнти проникності для порівняно гідрофобних молекул є майже прямо пропорційними коефіцієнтам розподілу між гідрофобною та гідрофільною фазами, що вказує на ліпідний шлях проникання цих молекул крізь мембрани еритроцитів.

В работе представлены экспериментальные данные о коэффициентах проницаемости мембран эритроцитов человека для ряда криопротекторов. Показано, что на коэффициенты проницаемости влияют как физико-химические, так и геометрические параметры молекул. Из полученных результатов следует, что при превышении диаметром молекул величины 4\AA коэффициент проницаемости уменьшается, очевидно, за счет уменьшения потока через водные белковые поры постоянного размера. Коэффициенты проницаемости для сравнительно гидрофобных молекул почти прямо пропорциональны коэффициентам распределения между гидрофобной и гидрофильной фазами, что указывает на липидный путь проникновения этих молекул через мембраны эритроцитов.

The experimental data on permeability coefficients of human erythrocyte membranes for the series of cryoprotectants are presented. It is shown, that permeability coefficients are affected by both geometrical and physical and chemical parameters of molecules. The obtained results propose that when exceeding the molecules' diameter over the value of 4\AA , the permeability coefficient reduces, perhaps, due to the decreasing of flow through the aqueous protein pores of a constant size. Permeability coefficients for comparatively hydrophobic molecules are almost directly proportional to the coefficients of partition between hydrophobic and hydrophilic phases, by pointing to a lipid way of permeation of these molecules through erythrocyte membranes.

Велику роль у кріоконсервуванні біологічних об'єктів відіграють кріопротектори. Механізми їх захисної дії розповсюджуються на весь спектр пошкоджуючих чинників, пов'язаних з кріоконсервуванням – від впливу на максимальні концентрації електролітів, що досягаються при замерзанні, та ступінь обезводнення клітин до впливу на поза- та внутрішньоклітинну кристалізацію. Однією з перших класифікацій кріопротекторів був розподіл їх на ендо- та екзоцелюлярні [11], тобто фактично на проникаючі та непроникаючі речовини. Кріопротекторну активність пов'язували в першу чергу зі здатністю проникати в клітини і тканини. Хоча синтезовано багато високомолекулярних, не проникаючих крізь клітинні мембрани сполук, які виявляють кріопротекторні властивості, питання проникності тих чи інших кріопротекторів крізь клітинні мембрани залишається актуальним. Зокрема, встановлено, що при повільних швидкостях охолодження для забезпечення захисту біологічного об'єкта проникнення кріопротектора в клітини є обов'язковим [1]. Важливою є швидкість проникання кріопротектора на етапі еквілібрації з ним до заморожування та на етапі перенесення клітин в ізоосмотичне середовище після розморожування. Не менш актуальне питання механізмів проникності,

Cryoprotectants play an important role in cryopreservation of biological systems. Mechanisms of protective action expands the whole spectrum of damaging agents, associated with cryopreservation: starting from influence on electrolytes' maximum concentration during freezing and stage of dehydration of cells and up to the effect on extra- and intracellular crystallisation. One of the first classifications of cryoprotectants was their division to endo- and exocellular ones [11], i.e. actually to permeable and non-permeable substances. Cryoprotective activity was associated with an ability to permeate into cells and tissues. Although there were synthesised a lot of polymolecular substances, which did not permeate via cell membrane and revealed the cryoprotective properties; the task of cryoprotectants' permeability via cell membranes remains vital. In addition, it has been found that at low cooling rates the permeation of cryoprotectant is obligatory to maintain the protection of biological object [1]. An important index is the cryoprotectant permeability rate at the stage of equilibration before freezing and at the stage of cell transfer to isotonic medium after thawing. Not less vital is the question of permeability mechanisms, since it can be directly associated with cytotoxicity of cryoprotectant substance.

оскільки це може бути безпосередньо пов'язано з цитотоксичністю кріопротекторної сполуки.

Було показано, що коефіцієнт проникності для різних речовин залежить від ліпофільних властивостей молекул [4], які характеризуються коефіцієнтами розподілу речовин у двофазній системі, що складається з води та гідрофобної фази. Для багатьох речовин між величинами проникності та коефіцієнтами розподілу існує залежність, близька до прямої пропорційності. Вважають, що такі речовини проникають в клітини шляхом простої дифузії крізь ліпідний бішар плазматичної мембрани. У той же час відомо, що такі малі нейтральні гідрофільні молекули, як мочеви́на, етиленгліколь і насамперед вода, легко проникають крізь мембрани окремих клітин. На підставі аналізу експериментальних даних були створені моделі проникності, які пояснювали проникання гідрофільних молекул крізь біологічні мембрани. Один з варіантів таких моделей базується на уявленні про флуктуаційне утворення пор у ліпідному бішарі внаслідок теплового руху молекул. Теоретичний аналіз процесу флуктуаційного утворення гідрофільних пор у ліпідних бішарах [6] показав, що найбільш імовірним є утворення пор з діаметром 5-6Å, а найбільший діаметр таких пор може досягати 10Å. Інша модифікація гіпотези ліпофільного сита зводиться до припущення наявності в мембранах постійно існуючих гідрофільних пор, утворених білковими структурами. Дослідження проникності для води та малих неелектролітів ліпідних бішарів, модифікованих такими антибіотиками, як нистатин та амфотерицин В, показали, що ці речовини утворюють у ліпідних бішарах пори з характеристиками, аналогічними до характеристик пор у мембранах еритроцитів. Наразі відомо, що амфотерицин В формує в ліпідних бішарах порожнину діаметром 8Å, яка перетинає всю товщу мембрани і має гідрофільну внутрішню поверхню. Вважають, що в мембранах еритроцитів прикладом трансмембранного білка, який формує наскрізні трансмембранні пори, є аніонообмінний білок смуги 3, який здійснює обмін зовнішнього Cl⁻ на внутрішній HCO₃⁻ [12].

У роботі вивчено проникність мембран еритроцитів людини для неелектролітів низок діолів і амідів, а також для гліцерину. Напрямок наших досліджень був обумовлений можливістю порівняння фізико-хімічних властивостей молекул у гомологічних рядах і серед структурних ізомерів, з'ясування впливу цих властивостей на їх проникання крізь біологічні мембрани. З практичної точки зору такий вибір був визначений широким використанням цих сполук у кріобіологічній практиці.

Дослідження проводили на еритроцитах донорської крові людини, консервованої на розчині

It was shown that permeability coefficient for various substances depended on the molecules' lipophilic properties [4]. Lipophilic properties of this or that substance are determined by comparing the so-called coefficients of substances' partition in two-phase system, consisted of water and hydrophobic phase. For the majority of substances there is a dependence between permeability value and partition coefficient, that is close to a direct proportionality. There is an opinion that these substances permeate to cells by the simple diffusion via lipid bilayer of plasma membrane. At the same time it is known, that such small neutral hydrophilic molecules as urea, ethylene glycol and, first of all, water easily permeate via membranes of individual cells. Basing on the analysis of experimental data the models of permeability were created, which explained the permeation of hydrophilic molecules via biological membranes. One of variants of these models is based on representation of fluctual formation of pores in lipid bilayer in consequence of molecules' heat movement. Theoretical analysis of process of fluctual formation of hydrophilic pores in lipid bilayer [6] showed that the most probable was the formation of pores with diameter of 5-6Å, and the largest diameter of these pores could achieve 10Å. Another modification of "lipophilic sieve" hypothesis comes to an admission for presence in membranes of permanently existing hydrophilic pores, formed by protein structures. Investigation of permeability for water and small non-electrolytes via lipid bilayers, modified by such antibiotics as nystatin and amphotericin B, showed that these substances created in lipid bilayers the pores with characteristics, similar to those for pores in erythrocytes membranes. It has been proved, that amphotericin B forms in lipid bilayers a cavity with diameter of 8Å, which crosses the whole membrane width and has a hydrophilic inner surface. There is an opinion, that the example for such transmembrane protein in erythrocyte membrane, which forms the transmembrane pores, is the band 3 anion-exchange protein, which exchanges an external Cl⁻ for internal HCO₃⁻ [12].

In this work we have studied the permeability of human erythrocyte membrane for non-electrolytes from diols and amides series, and for glycerol. The direction of our investigations was motivated by an opportunity to compare the physical and chemical peculiarities of molecules in homologous series and among structural isomers, and to determine the effect of these peculiarities on their permeation via biological membranes. From the practical point of view this choice was preconditioned by a wide application of these substances in cryobiological practice.

глюцир. Еритроцити відмивали при кімнатній температурі центрифугуванням 5 хв при 800g з рівним об'ємом ізотонічного фосфатного буфера, рН 7,4.

Для дослідження були обрані полярні неелектроліти: етандіол (етиленгліколь), 2 структурні ізомери пропандіолу (1,2- і 1,3-пропандіол), 4 структурних ізомери бутандіолу (1,2-, 1,3-, 2,3- і 1,4-бутандіол), ді- та триетиленгліколь, пропантріол (гліцерин) і 4 аміди (ацетамід, метилацетамід, диметилформамід і диметилацетамід). Препарати були марки “хч” або “чда”, додатково очищені, а їх якість контролювалась загальноприйнятими методами [3].

Геометричні параметри молекул розраховували на основі моделей Стьюарта [8] за комп'ютерною програмою “Нурег Chem Pro v.5.1”. Коефіцієнти проникності визначали розробленим нами методом [10], який ґрунтується на фізико-математичній моделі гемолізу в водних розчинах проникаючої речовини [2].

У результаті проведених досліджень були отримані коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для зазначених речовин (таблиця). У таблиці також представлено отримані нами раніше дані щодо коефіцієнта розподілу досліджуваних речовин у системі “n-октанол - вода” [5].

Як видно, немає прямої залежності коефіцієнтів проникності від одного з параметрів (геометричного або фізико-хімічного). Так, залежність коефіцієнта проникності Р мембран еритроцитів людини для речовин низки діолів від коефіцієнта

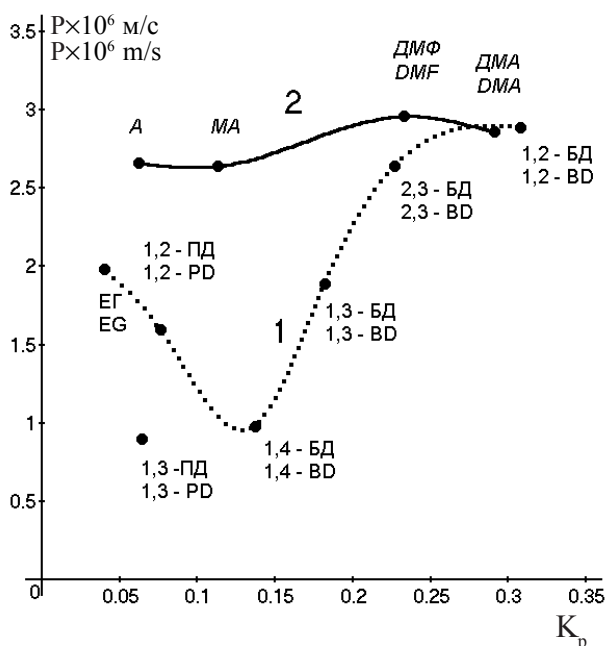
Investigation was performed in erythrocytes from human blood, preserved with Glugicyr solution. Erythrocytes were washed at room temperature by centrifugation at 800g during 5 min with an equal volume of isotonic phosphate buffer, pH 7.4.

For investigation we have chosen the following polar non-electrolytes: ethane diol (ethylene glycol), two structural isomers of propane diol (1,2- and 1,3-propane diol), four structural isomers of butane diol (1,2-, 1,3-, 2,3-, 1,4-buthane diol), di- and triethylene glycol, propane triol (glycerol) and four amides (acetamide, methyl acetamide, dimethyl

Вплив фізико-хімічних і геометричних параметрів молекул на їх проникність крізь мембрани еритроцитів людини

Influence of physico-chemical and geometrical parameters of molecules on their permeability through human erythrocyte membrane

Речовина Substance	Структурні формули Structural formulae	Коефіцієнти проникності, $P \times 10^6$ м/с Permeability coefficients $P \times 10^6$ m/s	Коефіцієнти розподілу K_p Distribution coefficients K_p	Геометричні параметри молекул Geometrical parameters of molecules		
				D, Å	L, Å	V, Å ³
Етиленгліколь (етандіол) Ethylene glycol (ethane diol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	1,98±0,48	0,04	2,6	5,2	27,6
Діетиленгліколь Diethylene glycol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	0,421±0,045	-	4,1	7,2	95,0
Триетиленгліколь Triethylene glycol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	0,162±0,044	-	4,4	10,4	158
1,2-пропандіол 1,2-propane diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	1,6±0,24	0,076	3,7	5,0	53,7
1,3-пропандіол 1,3-propane diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	0,897±0,3	0,064	4,1	5,7	75,2
Гліцерин (пропантріол) Glycerol (propane triol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	0,038±0,03	0,005	4,7	5,2	90,2
1,4-бутандіол 1,4-buthane diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	0,979±0,292	0,137	4,0	7,4	92,9
1,3-бутандіол 1,3-buthane diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	1,89±0,18	0,182	3,6	6,0	61,0
2,3-бутандіол 2,3-buthane diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	2,64±0,22	0,227	3,9	5,8	69,2
1,2-бутандіол 1,2-buthane diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	2,89±0,11	0,308	4,3	6,1	88,5
Ацетамід Acetamide	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2,66±0,18	0,062	3,2	3,8	30,5
Метилацетамід Methyl acetamide	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_3 \end{array}$	2,64±0,2	0,113	3,3	4,9	42,4
Диметилформамід Dimethyl formamide	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	2,96±0,1	0,233	3,9	4,1	44,0
Диметилацетамід Dimethyl acetamide	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	2,86±0,14	0,291	4,2	5,1	70,6



Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул амідів (крива 1) і діолів (крива 2) від коефіцієнта розподілу цих речовин в системі "октанол-вода".

Dependence of human erythrocyte membrane permeability for molecules of amides (curve 1) and diols (curve 2) on distribution coefficient of these substances in octanol-water system.

розподілу між водою та гідрофобною фазою K_p має вигляд, представлений на рисунку (крива 1). Якщо умовно поділити діоли на дві групи: гідрофільні речовини та відносно гідрофобні речовини, то звертає на себе увагу права гілка кривої, яка містить дані для структурних ізомерів бутандіолу. Маємо чітку залежність, близьку до прямої пропорційності, між коефіцієнтами проникності крізь мембрани еритроцитів і коефіцієнтами розподілу. Коефіцієнт кореляції становить 0,927. Це означає, що проникання бутандіолів здійснюється, принаймні частково, шляхом розчинення в ліпідній фазі.

Аналіз даних для групи гідрофільних діолів (ліва гілка кривої 1 на рисунку, таблиця) показує, що більш впливовим чинником для коефіцієнтів проникності цих речовин є геометричний. Коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності та діаметром і об'ємом молекул становить 0,9 та 0,97 відповідно. Очевидно, що в зв'язку з високою гідрофільністю цих неелектролітів проходження їх крізь водні білкові пори є більш прийнятним, тому зрозумілою стає така сильна залежність від розмірів молекул. Цікавим є той факт, що, незважаючи на майже однакові коефіцієнти розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами ізомерів пропандіолу, коефіцієнт проникності для 1,2-пропандіолу більше ніж в два рази перевищує коефіцієнт проникності для

formamide and dimethyl acetamide). Substances were of "chemical pure" and "pure for analysis" standards and additionally purified, and their quality was assessed by standard methods [3].

Geometrical parameters of molecules were estimated basing on Stewart models [8] using the Hyper Chem Pro v.5.1 software. Permeability coefficients were determined with elaborated by us method [10], which is based on physical and chemical model of hemolysis in aqueous solutions of permeating substance [2].

As a result of the conducted experiments we obtained the permeability coefficients of human erythrocyte membranes for specified substances (Table). Previously obtained by us partition coefficients for studied substances in the n-octanol-water system [5] are included in the Table.

As it is shown there is no direct dependence of permeability coefficients from the one of parameters (geometrical or physico-chemical). So the dependence of the P , permeability coefficient, of human erythrocyte membrane for substances of diol series from the K_p , coefficient of partition between water and hydrophobic phase, is presented in the Figure (curve 2). When the diols are conventionally divided in two groups: the hydrophilic substances and the hydrophobic ones, then the most interest is paid to the curve's right branch, containing the data for butane diol structural isomers. There is a distinct dependence between the coefficients of permeability via erythrocyte membrane and partition coefficients, which are close to direct proportionality. Correlation coefficient made 0.927. It means, that butane diol permeation accomplishes, at least partially, by the dilution in lipid phase.

Analysis of data for groups of hydrophilic diols (the left branch of the curve 2 in Figure, Table) shows, that the geometrical index has the greater influence on permeability coefficients. Correlation coefficient between permeability coefficient and molecules' diameter and volume made 0.9 and 0.97, correspondingly. It is evident that because of high hydrophilic properties of these non-electrolytes their passing via aqueous protein pores is more probable and such a strong dependence from molecules' sizes becomes clear. It is interesting that in spite of almost identical coefficients of partition between hydrophilic and hydrophobic phases of propane diol's isomers, the permeability coefficient for 1,2-propane diol is more than twice higher than that for 1,3-propane diol. Thus, the transfer from diameter of 3.7Å for 1,2-propane diol to diameter of 4.1Å for 1,3-propane diol is critical for passing the pore. This conclusion is supported by the data on butane diol isomers. Deviation of the dependence of permeability and the partition coefficient from the direct proportionality

1,3-пропандіолу. Таким чином, перехід від діаметра 3,7Å для 1,2-пропандіолу до діаметра 4,1Å для 1,3-пропандіолу є критичним для проходження крізь пору. Цей висновок підтверджується даними для ізомерів бутандіолу. Відхилення залежності проникності від коефіцієнта розподілу від прямої пропорційності при переході від 2,3- до 1,2-бутандіолу корелює зі збільшенням діаметра молекули до 4,3Å. Цей факт свідчить про те, що бутандіоли також частково проникають крізь водні пори, що мають певний розмір.

Порівняння коефіцієнтів проникності в низці "етиленгліколь – діетиленгліколь – триетиленгліколь" приводить до тих же висновків. Коефіцієнт проникності різко зменшується для діетиленгліколю ($D=4,1\text{Å}$) порівняно з етиленгліколем ($D=2,6\text{Å}$). Проникність триетиленгліколю більш ніж на порядок менша, чим етиленгліколю. Беручи до уваги розміри молекул триетиленгліколю ($D=4,4\text{Å}$), можна припустити, що він не проникає крізь білкові пори.

Коефіцієнти проникності еритроцитів для речовин низки амідів мало відрізняються між собою (крива 2 на рисунку), хоча проникність для диметилформаміду вірогідно зростає порівняно з ацетамідом і метилацетамідом (рівень вірогідності 0,999). Аналогічно слід було чекати подальшого зростання коефіцієнта проникності для диметил-ацетаміду внаслідок збільшення коефіцієнта розподілу. Але коефіцієнт проникності для диметилацетаміду є навіть меншим, ніж для диметилформаміду (рівень вірогідності 0,95). Якщо звернутись до розмірів молекул, то як і у випадку з діолами, бачимо, що перевищення діаметром величини 4Å приводить до зменшення коефіцієнта проникності, очевидно, за рахунок зменшення внеску проникності крізь водні білкові пори в загальну проникність для цієї речовини.

З таблиці видно, що коефіцієнт розподілу гліцерину на порядок, а коефіцієнт проникності в 50 разів менший, ніж етиленгліколю. Беручи до уваги розмір молекули гліцерину (діаметр 4,7Å), можна з впевненістю сказати, що гліцерин не проникає крізь білкові пори через стеричні обмеження. Низький коефіцієнт розподілу між гідрофобною та гідрофільною фазами визначає малу проникність крізь ліпідний бішар. Такий висновок підтверджується даними, що, на відміну від еритроцитів людини, гліцерин майже не проникає в еритроцити бика, а швидкість його проникання в еритроцити шурів в 242 рази більша, ніж в еритроцити вівці [7]. Відомо також, що пасивна проникність ліпідних бішарів тісно пов'язана з їх текучістю, а відтак і вмістом ненасичених жирних кислот. У той же час індекс подвійних зв'язків для ліпідів еритроцитів вівці,

for 1,2-propane diol correlates with an increase of molecule diameter up to 4.3Å. This fact testifies to the partial permeation of butane diols through aqueous pores with a certain size.

Comparison of permeability coefficients in the series "ethylene glycol – diethylene glycol – triethylene glycol" leads to the same conclusions. Permeability coefficient sharply decreases for diethylene glycol (diameter of 4.1Å) comparing to ethylene glycol (diameter of 2.6Å). Permeability of triethylene glycol is more than ten times higher comparing to that for ethylene glycol. Taking into account the sizes of triethylene glycol molecules (diameter of 4.4Å) we can suppose that it does not permeate through protein pores.

Permeability coefficients of erythrocyte membranes for substances of amide row slightly differ when comparing to each other (curve 2 in Figure), although the permeability for dimethyl formamide statistically significant increases comparing to acetamide and methyl acetamide (probability level is 0.999). Similarly a further increasing of permeability coefficient for dimethyl acetamide as a result of rise in partition coefficient could be expected, but it is even lower than for dimethyl formamide (probability level is 0.95). As for the molecules' sizes, we can see as it was in the case of diols, that the increase of molecule's diameter over than 4Å leads to the decrease of permeability coefficient, apparently, on the account of decreasing in contribution of permeability through aqueous protein pores in total permeability for this substance.

As for the glycerol, it can be seen from the table, that its partition coefficient is in 10 times lower, and permeability coefficient is in 50 times lower than for ethylene glycol. Taking into account the size of glycerol molecule (diameter of 4.7Å) we can conclude, that glycerol does not permeate through protein pores because of steric restrictions. Low coefficient of partition between hydrophobic and hydrophilic phases determines the low permeability through lipid bilayer. Such conclusion is supported by the fact, that in contrast to human erythrocytes glycerol hardly permeates into bovine erythrocytes, and its permeability rate for rat erythrocytes is in 242 times higher than that for sheep erythrocytes [7]. It is known also that passive permeability of lipid bilayers is tightly associated with their viscosity, and therefore with the content of non-saturated fatty acids. At the same time, the double bonds index for lipids of sheep, bovine, human and rat erythrocytes makes 0.7, 0.8, 1.4 and 1.7, correspondingly [9]. Thus, the hypothesis of glycerol permeation via lipid bilayer is the most probable. Taking into account the fact, that partition coefficient for glycerol is very low we can conclude that glycerol penetration is

бика, людини та щура становить 0.7, 0.8, 1.4 та 1.7 відповідно [9]. Таким чином, версія проникання гліцерину саме крізь ліпідний бішар найбільш імовірна. Враховуючи те, що коефіцієнт розподілу гліцерину дуже низький, можна припустити: проникання гліцерину здійснюється саме за механізмом флукуаційного утворення пор у ліпідному бішарі.

У результаті проведених досліджень визначено коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для низки кріопротекторів. Отримані величини задовільно узгоджуються з даними інших авторів. Так, визначений нами коефіцієнт проникності для ацетаміду $(2,68 \pm 0,18) \times 10^{-6}$ практично збігається з даними [13] $(2,76 \pm 0,5) \times 10^{-6}$, а для етиленгліколю він становить $(1,98 \pm 0,48) \times 10^{-6}$ (наші дані) і $(2,07 \pm 0,3) \times 10^{-6}$ (дані роботи [14]).

З отриманих даних випливає, що проникання молекул неелектролітів крізь мембрани еритроцитів має подвійний механізм. Малі гідрофільні молекули (діаметром приблизно до 4Å) вільно проникають крізь водні пори сталого розміру. Такі пори, як правило, утворюються інтегральними мембранними білками. У мембранах еритроцитів людини існування водних білкових пор, здатних пропускати електронейтральні молекули такого розміру, пов'язують з аніонобінним білком смуги 3 [12]. При зростанні ліпофільних властивостей молекул збільшується імовірність їх проникання шляхом розчинення в ліпідній фазі. Внаслідок цього проникність такої молекули, як 1,2-бутандіол, розміри якої не дозволяють їй вільно проникати крізь водну білкову пору, навіть перевищує проникність для етиленгліколю. Гідрофільні молекули можуть проникати крізь ліпідну фазу за механізмом флукуаційного утворення пор у ліпідних бішарах. Але в усіх випадках розмір молекул буде впливати на коефіцієнти проникності: або через обмеження розмірів сталих чи флукуаційно утворених пор, або внаслідок залежності енергії переходу з водної фази в ліпідну від площі поверхні молекули.

Література

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С.Пушкаря и А.М.Белоуса.– Киев:Наук.думка, 1981.– 608 с.
2. *Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є.* Фізико-математична модель та експериментальне вивчення явища гіпотонічного гемолізу // Допов. НАН України.– 1998.–11.– С. 173-176.
3. *Карапетян Ю.А., Эйчис В.И.* Физико-химические свойства электролитных неводных растворов.– М.: Химия, 1989.– 252 с.
4. *Котык А., Яначек К.* Мембранный транспорт.– М.: Мир, 1980.– 344 с.
5. *Линник Т.П., Бизикина О.В.* Криоконсервирование спермы петухов. 1. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 72-79.

accomplished by namely the mechanism of fluctual formation of pores in lipid bilayer.

In result of conducted experiments we determined the permeability coefficients of human erythrocytes for series of cryoprotectants. Obtained values are in satisfactory accordance with the data of other authors. So, determined by us permeability coefficient of human erythrocytes for acetamide made $(2.68 \pm 0.18) \times 10^{-6}$ and is practically close to the data in the paper [12], $(2.76 \pm 0.50) \times 10^{-6}$, and that for ethylene glycol they made $(1.98 \pm 0.48) \times 10^{-6}$ (own data) and $(2.07 \pm 0.30) \times 10^{-6}$ (data from the paper [14]).

The obtained data show that penetration of non-electrolyte molecules through erythrocyte membrane has a double mechanism. Small hydrophilic molecules (with diameter up to 4Å) freely penetrate via aqueous pores of constant size. These pores are formed usually by integral membrane proteins. In human erythrocyte membranes the existence of aqueous protein pores, being capable to pass the electrically neutral molecules of such a size, is associated with band 3 anion-exchange protein [12]. When increasing the molecules' lipophilic properties the probability of their penetration by solubilisation in lipid phase rises. Therefore the permeability of such molecule as 1,2-buthane diol, which size does not allow the free passing through aqueous protein pore, even exceeds the permeability for ethylene glycol. Hydrophilic molecules can permeate through a lipid phase by a mechanism of fluctuational pore formation in lipid bilayers. However for all the cases the molecules size will influence the permeability coefficient either by limiting the constant pores sizes or those for pores formed by fluctuation, or as the result of dependence of energy of transition from water phase to lipid one on molecule's surface area.

References

1. *Current progress in cryobiology* / Ed. by Pushkar N.S. and Belous A.M.– Kiev: Nauk. dumka, 1981.– 608 p.
2. *Gordienko O.I., Kovalenko I.F., Panina Yu.E.* Physical and mathematical model and experimental investigation of hypotonic hemolysis phenomenon // Dopovidi NAN Ukrayiny.– 1998.– 11.– P. 173-176.
3. *Karapetyan Yu.A., Eychis V.I.* Physical and chemical properties of electrolyte non-aqueous solutions.– Moscow: Khimiya, 1989.– 252 p.
4. *Kotyk A., Janacek K.* Membrane transport.– Moscow: Mir, 1980.– 344 p.
5. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Fowl sperm cryopreservation. 1. Cytotoxicity of diols and amides // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2. – P. 72-79.
6. *Markin V.S., Kozlov M.M.* Statistics of pores in lipid bilayer membranes // Biologich. membrany.– 1985.– Vol.2, N12.– P. 205-223.
7. *Pushkar N.S., Belous A.M.* Introduction to cryobiology.– Kiev: Nauk. dumka, 1975.– 344 p.

6. Маркин В.С., Козлов М.М. Статистика пор в бислойных липидных мембранах // Биологич.мембраны.– 1985.– Т. 2.– №12.– С. 205-223.
7. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию.– Киев: Наук.думка, 1975.– 344 с.
8. Физер Л., Физер М. Органическая химия. Т.1.– М.: Химия, 1970.– 688 с.
9. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 216 с.
10. Пат. 41098А (Україна) МПК⁷ G01N33/49. Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин / Є.О.Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко, І.Ф.Коваленко. Заявлено 09.02.2001. Публ. 15.08.2001, Бюл. N7.
11. Lovelock J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // *Biochem. J.*– 1954.– Vol. 56, N3.– P. 265-270.
12. Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A., et al. The aqueous pore in red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // In: *Biomembranes and cell function.*– Ann. NY Acad. Sci., 1983.– Vol. 414.– P. 97-124.
13. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas // *BBA.*– 1991.– Vol. 1063.– P. 179-190.
14. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interaction of hydrophylic alcohols and their effect on permeation // *BBA.*– 1990.– Vol. 1022.–P. 57-71.
8. Fizer L., Fizer M. Organic chemistry. Vol.1.– Moscow: Khimiya, 1970.– 688 p.
9. Chernitskiy E.A., Vorobey A.V. Structure and functions of erythrocyte membranes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.– 216 p.
10. Patent 41098A (Ukraine) IPC⁷ G01N33/49. Method of determining of erythrocytes permeability coefficient for electrically neutral substances / Gordienko E.A., Gordienko O.I., Gordienko Yu.E., Kovalenko I.F. Filed in 09.02.2001. Publ. 15.08.2001, Bulletin N7.
11. Lovelock J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // *Biochem. J.*– 1954.– Vol. 56, N3.– P. 265-270.
12. Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A., et al. The aqueous pore in red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // In: *Biomembranes and cell function.*– Ann. NY Acad. Sci., 1983.– Vol. 414.– P. 97-124.
13. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas // *BBA.*– 1991.– Vol. 1063.– P. 179-190.
14. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interaction of hydrophylic alcohols and their effect on permeation // *BBA.*– 1990.– Vol. 1022.–P. 57-71.

Accepted in 29.10.2002

Поступила 29.10.2002