

## Зависимость проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для молекул ряда криопротекторов от температуры

UDC 577.352.4:612.111.085:547.42

N.A. CHERNOBAI, A.V. PAKHOMOV, I.F. KOVALENKO, G.A. BOZHOK, S.YE. KOVALENKO, L.F. ROZANOV\*

## Temperature Dependence of Testes Intersticium Cell Membrane Permeability for Cryoprotectant Molecules

Изучали осмотическое поведение клеток интерстиция тестисов крыс в растворах криопротекторов – веществ, относящихся к классам спиртов (этиленгликоль (ЭГ), глицерин и 1,2-бутандиол (1,2-БД)), оксидов (диметилсульфоксид (ДМСО)) и амидов (диметилформамид (ДМФА)). С использованием метода волюмометрии и модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток тестисов для этих криопротекторов при температурах 35, 20 и 5°C. Рассчитанные значения энергии активации проницаемости для молекул ЭГ, глицерина, 1,2-БД, ДМСО и ДМФА составляют 53,28; 46,92 и 36,33, 58,89 и 62,99 кДж/моль соответственно. Установлено, что мембраны клеток тестисов одинаково хорошо проницаемы для молекул ЭГ, ДМСО, 1,2-БД и глицерина, а их проницаемость для молекул ДМФА при 35°C сравнима с проницаемостью молекул воды.

**Ключевые слова:** коэффициенты проницаемости, энергия активации, клетки интерстиция тестисов, волюмометрия, криопротекторы.

Вивчали осмотичну поведінку клітин інтерстицію тестисів щурів у розчинах криопротекторів – речовин, які відносяться до класів спиртів (етиленгліколь (ЕГ), гліцерин і 1,2-бутандіол (1,2-БД)), оксидів (диметилсульфоксид (ДМСО)) та амідів (диметилформамід (ДМФА)). При використанні методу волюметрії і модифікованої фізико-математичної моделі Кедем-Качальського визначені коефіцієнти проникності плазматичних мембран клітин тестисів для цих криопротекторів при температурах 35, 20 і 5°C. Розраховані значення енергії активації проникності для молекул ЕГ, гліцерину, 1,2-БД ДМСО і ДМФА складають 53,28; 46,92; 36,33; 58,89 і 62,99 кДж/моль відповідно. Встановлено, що мембрани клітин тестисів мають однакову добру проникність для молекул ЕГ, ДМСО, 1,2-БД і гліцерину, а їх проникність для молекул ДМФА при 35°C можна порівняти з проникністю молекул води.

**Ключові слова:** коефіцієнти проникності, енергія активації, клітини інтерстицію тестисів, волюмометрія, криопротектори.

Osmotic behavior of the rat testis intersticium cells in cryoprotectants solutions – substances belonging to alcohols (ethylene glycol (EG), glycerol and 1,2-butane diol (1,2-BD)), oxides (dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO)) and amides (dimethyl formamide (DMFA)) was studied. Permeability coefficients of testis cells for these cryoprotectants were determined at 35, 20 and 5°C by volumetric analysis and the Kedem-Kachalsky modified physico-mathematical model. The calculated values of the activation energies for EG, glycerol, 1,2-BD, Me<sub>2</sub>SO and DMFA molecules are 53.28, 46.92, 36.33, 58.89, 62.99 kJ/mol, respectively. Testis cell membranes were established to be equally well permeable for EG, glycerol, 1,2-BD and Me<sub>2</sub>SO, and their permeability for DMFA at 35°C was comparable with that for water molecules.

**Key words:** permeability coefficients, activation energy, testis intersticium cells, volumetry, cryoprotectants.

Вопрос о том, какими свойствами должен обладать эффективный криопротектор, до сих пор не имеет исчерпывающего ответа [1]. Первым, признанным в качестве криопротектора веществом, был глицерин. Впоследствии было показано, что диметилсульфоксид (ДМСО) в подавляющем числе криобиологических ситуаций более эффективен, чем глицерин, что можно было объяснить лучшей проникающей способностью его молекул через клеточные мембраны. В последние годы в качестве перспективного криопротектора для ооцитов и эмбрионов млекопитающих и меристем растений интенсивно изучается этиленгликоль (ЭГ)

The question of what properties an efficient cryoprotectant is to have has no irrefragable answer so far [1]. The first substance recognized as a cryoprotectant was glycerol. Afterwards it was shown that dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO) was more efficient than glycerol in most cases, which can be explained by its better permeating ability through cellular membranes. Ethylene glycol (EG) has been investigated intensively as a promising cryoprotectant for mammal oocytes and embryos and plant meristems lately [8–10]. Dimethyl formamide (DMFA) proved to have significant advantages over other cryoprotectants for cryopreservation of the fowl spermatozoa [4–6]. It was demon-

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. Переяславская, 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,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373  
3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

[8–10]. Установлено, что диметилформамид (ДМФА) имеет существенные преимущества перед другими криопротекторами при криоконсервировании спермиев петуха [4–6]. Показано, что 1,2-бутандиол (1,2-БД) несмотря на относительно большие размеры молекул хорошо проникает через мембраны эритроцитов [2, 3] и клеток СПЭВ [11].

Проницаемость плазматических мембран для молекул воды и криопротекторов является важнейшей криобиологической характеристикой клеток, определяющей их осмотическое поведение в процессе криоконсервирования и выживаемость после отогрева и возвращения в изотоническую среду. Криоконсервирование фрагментов ткани и клеток тестисов с целью создания запасов материала, пригодного для трансплантации, – необходимое условие в разработке новых схем лечения андроген-дефицитных состояний. В связи с вышесказанным особое значение приобретает определение коэффициентов проницаемости мембран клеток тестисов для различных криопротекторов.

Поиск оптимальных методических решений при разработке методов криоконсервирования целесообразно осуществлять на основе экспериментально-теоретического подхода с использованием модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского [1]. Такой подход направлен на оптимизацию процессов массообмена в системе "клетка – окружающая среда" в цикле криоконсервирования и требует конкретизации данных о составе вне- и внутриклеточной среды, морфометрических параметрах клеток, проницаемости и ее температурной зависимости.

Цель работы – определение параметров проницаемости (коэффициентов проницаемости и энергии активации) мембран клеток тестисов для молекул ЭГ, 1,2-БД, глицерина, ДМСО и ДМФА.

### Материалы и методы

Для решения поставленных задач применялись методы микроскопии и физико-математического моделирования криобиологических процессов.

Объектом исследований служили клетки, полученные из ткани семенников ферментативным методом [7]. Суспензия этих клеток включала клетки с диаметром от 4,5 до 21 мкм. Наиболее многочисленной была популяция клеток размером 11–16 мкм, на которых и проводили исследования.

В работе использовали одномолярные растворы 1,2-БД, глицерина, ЭГ, ДМСО и ДМФА, приготовленные на 0,15М NaCl.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток интерстиция тестисов для молекул проникающих криопротекторов  $K_1$  определяли,

strated that 1,2-butane diol (1,2-BD) despite its relatively large molecules permeated well through erythrocyte [2, 3] and SPEV cell membranes [11].

Permeability of plasmatic membranes for water and cryoprotectants molecules is the most important cryobiological characteristic of cells determining their osmotic behavior in the process of cryopreservation and survivability after thawing and placing back into isotonic medium. Cryopreservation of testes tissue fragments and cells for creation of material store available for transplantation is an indispensable condition in the development of new schemes of treatment of androgen-deficient diseases. In this respect the determination of testes cell membrane permeability coefficients for different cryoprotectants takes on special significance.

It is expedient to search for optimal methodical solutions during the elaboration of cryopreservation techniques on the basis of the experimentally-theoretical approach with the usage of the Kedem-Kachalsky modified physico-mathematical model [1]. Such approach is directed to optimization of mass transfer processes in the system "cell-environment" in cryopreservation cycle and requires refining data on compositions of extra- and intracellular media, cell morphometric parameters, permeability and its temperature dependence.

The aim of the work is to determine permeability parameters (permeability coefficients and activation energies) of testis membrane cells for EG, glycerol, 1,2-BD, Me<sub>2</sub>SO and DMFA molecules.

### Materials and methods

Microscopy and physico-mathematical modeling of cryobiological processes were used to solve the problems formulated.

Cells obtained from testes tissue by the enzyme method served as the subject of inquiry [7]. Suspension of these cells comprised cells with the diameter of 4.5–21 μm. The population of cells with the size of 11–16 μm was the most numerous, and the experiments were carried out on them.

1 molar solutions of 1,2-BD, glycerol, EG, Me<sub>2</sub>SO and DMFA prepared with 0.15 NaCl solution were used in the work.

The permeability coefficients  $K_1$  of testis interstitium cell plasmatic membranes for the penetrating cryoprotectants molecules were determined by fitting the experimental dependences of relative cell volumes vs. time,  $y(t)$  with the solutions of the theoretical model equations for the preset experimental conditions [11]. The activation energies  $E_A$  of the substances transfer processes through testes interstitium cell membranes were calculated from the dependences  $\ln K_1(1/T)$ , the obliquity of which is  $E_A/R$  according to the Arrhenius equation, where  $R$  is the universal gas constant.

сопоставляя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени  $y(t)$  с решениями уравнений теоретической модели для заданных экспериментальных условий [11]. Энергии активации ( $E_a$ ) процессов переноса веществ через мембраны клеток интерстиция тестисов рассчитывали из зависимостей  $\ln K_1(1/T)$ , наклон которых согласно уравнению Аррениуса равен  $E_a/R$ , где  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Микроскопические исследования проводили на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с термостатируемым столиком при температурах 35, 20 и 5°C.

Осмотические реакции клеток интерстиция тестисов изучали, фотографируя их с регистрацией времени контакта с исследуемыми растворами. Для определения геометрических параметров клеток использовали данные морфометрии.

Для клеток, форма которых близка к сферической, относительный объем клетки ( $y$ ) и ее поверхностно-объемные отношения  $\gamma$  связаны с ее диаметром  $d$  соотношениями  $y = \pi d^3/6$  и  $\gamma = 6/d$ .

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

На рисунке представлены примеры определения коэффициентов проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для молекул криопротекторов в одномолярных растворах ЭГ, 1,2-БД, глицерина, ДМСО и ДМФА при температурах 5, 20 и 35°C путем совмещения с экспериментальными данными теоретической зависимости изменения относительного объема клеток во времени.

Из представленных данных видно, что с понижением температуры увеличивается время регидратации клеток после фазы обезвоживания. Осмотическое поведение клеток тестисов в растворах ЭГ, 1,2-БД, глицерина и ДМСО при одинаковых температурах отличается незначительно. Время восстановления 95% исходного объема при 5°C составляет примерно 10 мин, а при 35°C – около 3 мин. Проницаемость мембран клеток интерстиция тестисов для молекул ДМФА значительно выше, чем для молекул других изученных веществ. При температуре 5°C исходный объем клеток в 1М ДМФА восстанавливается до 95% менее чем за 3 мин, а при температурах 35°C значимых изменений объема клеток не зафиксировано, что может свидетельствовать о том, что проницаемость мембран клеток интерстиция тестисов при этой температуре для молекул ДМФА сравнима с проницаемостью молекул воды.

Microscopic assay was performed on a microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) with a thermostated stage at 35, 20 and 5°C.

Osmotic reactions of testis intersticium cells were studied by imaging and registering the duration of contact with the solutions investigated. To determine cell geometric parameters we used the morphometric data.

For sphere-like cells the relative cell volume  $y$  and its surface/volume ratio  $\gamma$  are linked with its diameter by the formulae:  $y = \pi d^3/6$  and  $\gamma = 6/d$ .

The results were statistically processed by the Student-Fisher test.

### Results and discussion

The examples of the permeability coefficients of testes intersticium cell membranes for the cryoprotectants molecules in 1M solutions of EG, 1,2-BD, glycerol, Me<sub>2</sub>SO and DMFA at 35, 20 and 5°C determined by fitting the theoretical dependence of relative cell volume changes through time with the experimental data are presented in Figure.

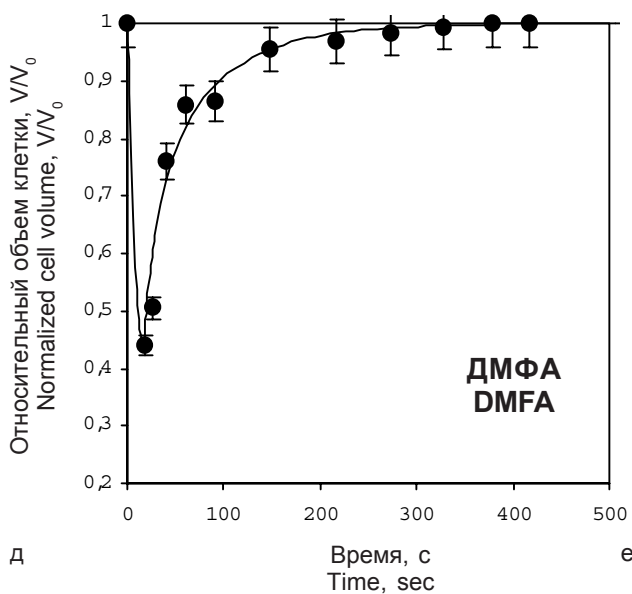
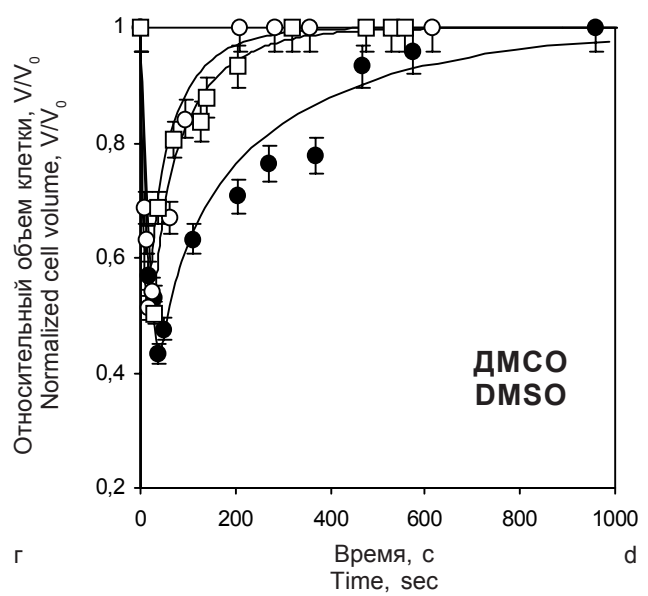
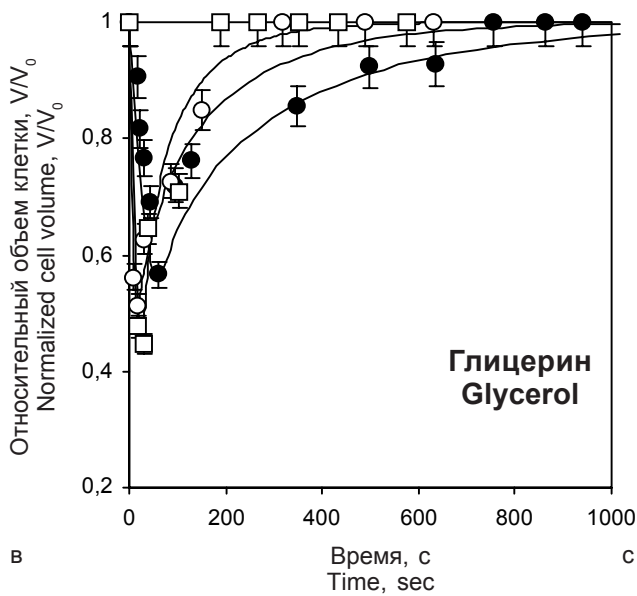
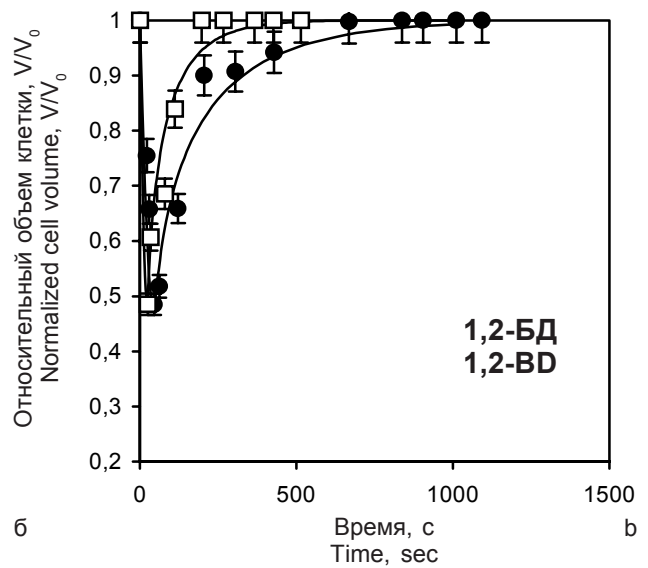
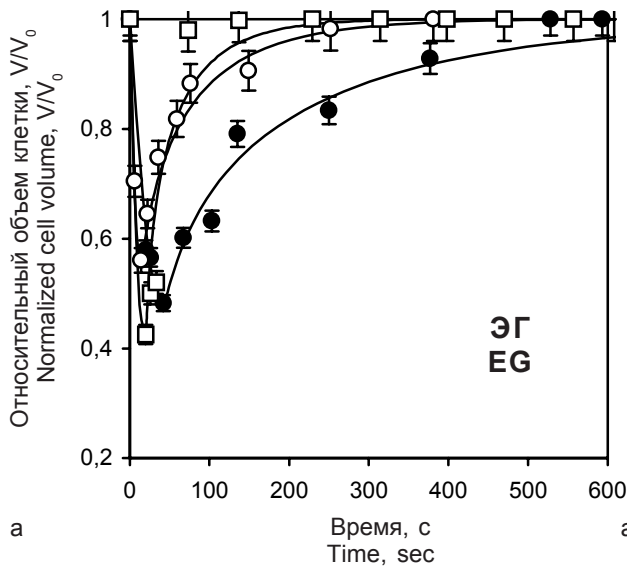
From the data presented one can see that as temperature declines, the period of cell rehydration after dehydration phase increases. Osmotic behavior of testes cells differs insignificantly in EG, 1,2-BD, glycerol and Me<sub>2</sub>SO solutions at the same temperatures. The periods of recovery of 95% of the initial volume are approximately 10 min at 5°C and 3 min at 35°C. The testes intersticium cell membrane permeability for DMFA is much higher than that for the other substances investigated. At 5°C the initial cell volume recovers up to 95% for less than 3 min, and at 35°C no significant changes in the cell volume were noted, which can attest to the fact that at this temperature testes intersticium cell membrane permeability for DMFA molecules is comparable with that for water molecules.

The permeability coefficients of testis intersticium cell plasmatic membranes for the cryoprotectants at 35, 20 and 5°C calculated from the volumetric data and the corresponding activation energies are presented in the Table.

It follows from the Table that at 5°C the cryoprotectants according to their penetrating ability through testis intersticium cell membranes are ranked in the following way: DMFA > 1,2-BD > EG = glycerol > Me<sub>2</sub>SO. At 35°C this sequence takes the form: DMFA > EG = Me<sub>2</sub>SO > 1,2-BD = glycerol. 1,2-BD has the lowest value of activation energy, and DMFA – the highest one.

### Conclusions

1. The reduction in the testis intersticium cell membrane permeability for the cryoprotectants molecules



Характерные экспериментальные (●, ○, □) и теоретические (сплошная линия) зависимости относительного объема клеток тестисов от времени экспозиции в растворах 1М ЭГ (а), 1,2-БД (б), глицерина (в), ДМСО (г), ДМФА (д) при температурах 5 (●), 20 (○) и 35°C (□).

Typical experimental (●, ○, □) and theoretical (solid line) dependences of the testis cell relative volume on exposure time in 1M EG (a); 1,2-BD (b); glycerol (c); DMSO (d); DMFA (e) solution at 5 (●), 20 (○) and 35°C (□).

В таблице приведены рассчитанные из данных волюмометрии коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток интерстиция тестисов для исследованных криопротекторов при температурах 5, 20 и 35°C и соответствующие энергии активации.

Из данных таблицы следует, что при 5°C криопротекторы по проникающей способности через мембраны клеток интерстиция тестисов образуют ряд: ДМФА > 1,2-БД > ЭГ = глицерин > ДМСО. При 35°C этот ряд имеет вид: ДМФА > ЭГ = ДМСО > 1,2-БД = глицерин. Наименьшим значением энергии активации характеризуется 1,2-БД, а наибольшим – ДМФА.

### Выводы

1. Снижение проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для молекул исследованного ряда криопротекторов в диапазоне температур 35–5°C характеризуется энергией активации в пределах 35–63 кДж/моль.

2. Различия коэффициентов проницаемости ЭГ, 1,2-БД, глицерина и ДМСО наиболее выражены при 5°C, однако при этом их средние значения отличаются не более чем в 2,5 раза.

3. В изученном ряду криопротекторов особо высокой проникающей способностью обладает ДМФА. Проницаемость мембран клеток интерстиция тестисов для молекул ДМФА при 35°C сравнима с проницаемостью молекул воды, о чем свидетельствует отсутствие выраженной осмотической реакции клеток на добавление ДМФА даже при 20°C.

### Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 142 с.
2. Гордиенко О.И., Линник Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів // Вісник Харків. ун-ту. Біофіз. вісник.– 2002.– Вип. 2.– С. 43–47.
3. Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов // Проблемы криобиологии.– 2007.– Т.17, №4.– С.365–373.
4. Линник Т.П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. I. Физико-химические свойства соединений ряда амидов // Проблемы криобиологии.– 1998.– №3.– С. 21–28.
5. Линник Т.П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. II. Криозащитные свойства соеди-

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток интерстиция тестисов для исследованных криопротекторов при температурах 5, 20 и 35°C и соответствующая энергия активации  
The permeability coefficients of testis intersticium cell plasmatic membranes for the cryoprotectants at 35, 20 and 5°C and the corresponding activation energies

Криопротектор Cryoprotectant	Коэффициент проницаемости $K_p \times 10^7$ , м/с Permeability coefficient, $K_p \times 10^7$ , m/s			Энергия активации $E_{A'}$ кДж/моль Activation energy $E_{A'}$ KJ/mol
	5°C	20°C	35°C	
ЭГ EG	0,50 ± 0,07	1,99 ± 0,70	9,03 ± 1,76	53,28
1,2-БД 1,2-BD	1,05 ± 0,70	4,27 ± 0,48	7,51 ± 1,64	36,23
Глицерин Glycerol	0,53 ± 0,13	2,22 ± 0,11	6,75 ± 2,02	46,92
ДМСО DMSO	0,38 ± 0,19	2,67 ± 0,87	9,32 ± 1,40	58,89
ДМФА DMFA	4,41 ± 0,04	24,45 ± 2,89		62,99*

Примечание: \* – диапазон температур 5–20°C.

Note: \* – temperature range of 5–20°C.

studied over the temperature range 35–5°C is characterized by the activation energies within limits of 35–63 kJ/mole.

2. The differences between the permeability coefficients for 1,2-BD, EG, glycerol and Me<sub>2</sub>SO are the most conspicuous at 5°C, however their average values differ not more than 2.5-fold.

3. Among the cryoprotectants studied DMFA has a particularly high penetrating ability. The testis intersticium cell membrane permeability for DMFA molecules at 5°C are comparable with that for water molecules, which is confirmed by absence of any conspicuous osmotic response of cells to addition of DMFA even at 20°C.

### References

1. Gordiyenko Ye.A., Pushkar N.S. Physical principles of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 142 p.
2. Gordiyenko O.I., Linnik T.P. Penetration mechanisms of non-electrolytes of diol nature through erythrocyte membranes // Biophysical Bulletin.– 2002.– Issue 2.– P. 43–47.
3. Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P. Membrane permeability of rat's and rabbit's erythrocytes for cryoprotectants of amide and diol series // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 365–373.
4. Linnik T.P. Amides of aliphatic acids are effective cryoprotectants. I. Physical-chemical properties of the compounds out of the amide series // Problems of Cryobiology.– 1998.– N3.– P. 21–28.
5. Linnik T.P. Amides of aliphatic acids are efficient cryoprotectants. II. Cryoprotective properties of compounds of amide series // Problems of Cryobiology.– 1999.– N2.– P. 22–32.
6. Linnik T.P. Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of fowl spermatozoa in cycle of low

- нений ряда амидов // Проблемы криобиологии.– 1999.– №2.– С. 22–32.
6. *Лінник Т.П.* Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.– Харків, 2003.– 36 с.
  7. *Пахомов А.В., Божок Г.А., Боровой И.А. и др.* Использование флуоресцентной диагностики для характеристики клеток стероидогенных тканей // Проблемы эндокринной патологии.– 2007.– №4.– С.78–83.
  8. *Пишко О.В., Коваленко И.Ф., Коваленко С.Е. и др.* Прогнозирование осмотического поведения эмбрионов мыши на основных этапах криоконсервирования // Проблемы криобиологии.– 2004.– №3.– С. 3–8.
  9. *Смольянинова Е.И., Погорелов А.Г., Лисина Е.Г. и др.* Влияние среды замораживания на жизнеспособность и катионный состав ранних эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т.15, №3.– С. 310.
  10. *Стрибуль Т.Ф., Шевченко Н.А., Розанов Л.Ф.* Оптимизация метода витрификации меристем картофеля // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т. 15, №4.– С. 657–664.
  11. *Чернобай Н.А., Коваленко И.Ф., Кощий С.В., Розанов Л.Ф.* Зависимость проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул этиленгликоля и 1,2-бутандиола от температуры // Проблемы криобиологии.– 2009.– Т. 19, №2.– С.137–142.
- temperature preservation: Author's abstract of the thesis of Doctor of Biological Sciences.– Kharkiv, 2003.– 36 p.
7. *Pakhomov A.V., Bozhok G.A., Borovoy I.A. et al.* Use of fluorescence diagnostics for cell characteristics of steroidogenic tissues // Problemy Endokrinnoy Patologii.– 2007.– N4.– P. 78–83.
  8. *Pishko O.V., Kovalenko I.F., Kovalenko S.Ye. et al.* Forecasting of murine embryo osmotic behaviour at main stages of cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 3–8.
  9. *Smolyaninova Ye.I., Pogorelov A.G., Lisina Ye.G. et al.* Freezing medium influence on viability and cation composition of early murine embryos // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 310.
  10. *Stribul T.F., Shevchenko N.A., Rozanov L.F.* Optimizing method for potato meristem vitrification // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N4.– P. 657–654.
  11. *Chernobay N.A., Kovalenko I.F., Koschiy S.V., Rozanov L.F.* Dependence of permeability of SPEV cell membranes for molecules of ethylene glycol and 1,2-butane diol on temperature // Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N2.– P. 137–142.

*Accepted in 09.02.2010*

*Поступила 09.02.2010  
Рецензент Т.П. Линник*