

... КРІОБІОЛОГІЯ ... CRYOBIOLOGY ...

УДК: 577.352.4

Влияние температуры и блокатора белковых каналов на коэффициенты проницаемости мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для воды и криопротекторов**Е.В.Давыдова, И.Ф.Коваленко, О.И.Гордиенко***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)*

Определены коэффициенты проницаемости мембран клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида и коэффициенты фильтрации в средах с этими криопротекторами при температурах 25 и 10°C. Рассчитаны значения энергии активации переноса молекул воды и криопротекторов через плазматические мембраны. Эти же характеристики определены после обработки дрожжевых клеток сульфгидрильным реагентом рСМБС. Показано, что проникновение молекул воды, глицерина и 1,2-пропандиола осуществляется по белковым каналам. Проникновение более гидрофобных молекул диметилсульфоксида обеспечивается также липидным путем. Обработка клеток блокатором белковых каналов приводит к угнетению потока молекул воды через водные каналы (аквапорины).

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, проницаемость, энергия активации, криопротекторы.

Вплив температури і блокатора білкових каналів на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води та криопротекторів**О.В.Давидова, І.Ф.Коваленко, О.І.Гордієнко**

Визначені коефіцієнти проникності мембран клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для глицерину, 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду і коефіцієнти фільтрації в середовищах з цими криопротекторами при температурах 25 і 10°C. Розраховані значення енергії активації переносу молекул води і криопротекторів крізь плазматичні мембрани. Ці ж характеристики визначені після обробки дріжджових клітин сульфгідрильним реагентом рСМБС. Показано, що проникання більш гідрофобних молекул води, глицерину та 1,2-пропандіолу здійснюється білковими каналами. Проникання більш гідрофобних молекул диметилсульфоксиду забезпечується також ліпідним шляхом. Обробка клітин блокатором білкових каналів приводить до пригнічення потоку молекул води крізь водні канали (аквапорины).

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, проникність, енергія активації, криопротектори.

Influence of temperature and protein-channel blocker on *Saccharomyces cerevisiae* yeast membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants**O.V.Davydova, I.F.Kovalenko, O.I.Gordiyenko**

The permeability coefficients of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell membranes for glycerol, 1,2-propanediol, dimethyl sulfoxide cryoprotectants and filtration coefficients in the cryoprotectant containing media were determined at the temperatures of 25 and 10°C. The activation energy of water and cryoprotectant molecule transmembrane fluxes was calculated. The same parameters after yeast cell treating with рСМБС were determined. It was shown, that water, glycerol and 1,2-propanediol molecules permeated through protein channels. The penetration of more hydrophobic dimethyl sulfoxide molecules is provided as well by lipid way. Cell treating by protein-channel blocker results in inhibition of water molecule flux through water channels – aquaporins.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, permeability, activation energy, cryoprotectants.

Введение

При всем многообразии строения и физико-химических свойств мембран различных клеток и молекул проникающих веществ существует два пути пассивного проникновения этих молекул через клеточную мембрану: 1) за счет растворения проникающих веществ в липидах клеточных мембран; 2) через гидрофильные каналы клеточной мембраны. Существенный прогресс в изучении путей проницаемости был связан с использованием веществ, ингибирующих проницаемость клеточных мембран для воды и малых неэлектролитов. Первые экспериментальные доказательства существования каналов воды в клеточных мембранах были получены для эритроцитов (Macey, Farmer, 1970; Macey et al., 1972; Paganelli, Solomon, 1957; Vieira et al., 1970) и почечного эпителия (Verkman, 1992). Они были основаны на измеренной высокой осмотической проницаемости для воды, ингибируемой ртутными реагентами, и низкой энергии активации для транспорта воды. В работах (Macey, Farmer, 1970; Macey, 1979) было показано, что при обработке эритроцитов рСМБС (p-chloromercuribenzenesulfonate) в насыщающих дозах (≥ 2 мМ) большинство признаков существования каналов исчезает.

Новый толчок исследования проницаемости для воды и неэлектролитов получили после разработки методов тиражирования белков-аквапоринов (AQP), выделенных из тех или иных мембран, а также их экспрессии в мембранах других клеток. В 1992 году был открыт белок с массой 28 кДа (Preston et al., 1992), так называемый CHIP28 (channel-forming integral membrane protein), выделенный из мембран эритроцитов. Было показано (Agre et al., 1993; Zeidel et al., 1994; Shi et al., 1994), что этот белок играет роль водотранспортных каналов в мембране эритроцита. Этот протеин сейчас известен как аквапорин 1 (Aqp1). В работе (Ishibashi et al., 1994) сообщалось о выделении из почки крысы и клонировании еще одного белка-аквапорина, который авторы назвали аквапорин 3 (AQP3). При введении в ооциты *Xenopus* он увеличивал осмотическую проницаемость (P_f) этих ооцитов для воды в 10 раз. Эта проницаемость обратимо угнеталась под действием 0,3 мМ $HgCl_2$, что указывает на привлечение к транспорту воды SH-групп. Выделенный транспортный белок AQP3 повышал проницаемость для глицерина в 4 раза по сравнению с известным к этому времени GlpF (glycerol facilitator), который повышает проницаемость ооцитов *Xenopus* в 5 раз. Энергия активации проникновения глицерина в случае AQP3 в диапазоне температур 4–24°C составляет 25 кДж/моль. Эта величина превышает значение энергии активации для свободной диффузии, но меньше таковой для диффузии через липидные бислои (40–80 кДж/моль). Для GlpF, встроенного в *E. coli*, она составила 21 кДж/моль. Полученные результаты подтвердили, что AQP3 образует в мембранах клеток каналы, через которые могут транспортироваться молекулы как воды, так и малых неэлектролитов (таких как мочевины и глицерин), но не молекулы большего размера.

Клетки *S. cerevisiae* содержат четыре гена, кодирующих белки семейства MIP (Park, Saier, 1996): осморегулирующий переносчик глицерина Fps1 (Luyten et al., 1995; Tamas et al., 1999) и его гомолог Yfi054c, генетически близкие к акваглицеропоринам с предполагаемой функцией транспорта глицерина, и два аквапорина – водные каналы Aqp1 и Aqp2. Оба аквапорина дрожжей локализованы в плазматической мембране (Meuryal et al., 2001). При введении в ооциты *Xenopus laevis* показано, что Aqp1 является посредником транспорта воды (Bonhivers et al., 1998). Однако отдельные попытки измерить активность водного канала для Aqp2-1p в ооцитах были неудачными (Laize et al., 2000). Функция аквапорина дрожжей Aqp1-2p большинства лабораторных штаммов также не могла быть продемонстрирована при введении в ооциты *Xenopus laevis* из-за слабой экспрессии в мембране ооцита (Bonhivers et al., 1998; Laize et al., 1999). В работе (Meuryal et al., 2001) эксперименты были выполнены непосредственно на клетках *S. cerevisiae*. Данная работа предоставила важные данные об экспрессии AQP1 и AQP2 в штамме S1278b и в классическом лабораторном штамме W303-1A. Кроме того, это первая демонстрация локализации и функции Aqp2-1p в *S. cerevisiae*.

Скорость охлаждения – параметр, существенно влияющий на поведение клеток при холодном термическом стрессе. Зависимость жизнеспособности *S. cerevisiae* от скорости охлаждения является темой многочисленных публикаций (Mazur, Schmidt, 1968; Albrecht et al., 1973; Mazur, 1966; Beney et al., 2000; Schwartz, Diller, 1983; Dumont et al., 2003). Критическая скорость охлаждения, при которой формируются внутриклеточные кристаллы льда, определяется типом, проницаемостью для воды и поверхностно-объемным отношением клетки: большие, сферические клетки и клетки, менее проницаемые для воды, имеют более низкие значения критической скорости охлаждения. В работе (Tanghe et al., 2002) был проведен широкий экспрессивный анализ генома мутантного штамма дрожжей *S. cerevisiae* AT25 и его исходного штамма S47, который находится в промышленном использовании во всем мире (Teunissen et al., 2003), а также некоторых резистентных и

чувствительных к замораживанию производных AT25 и S47, соответственно. Это привело к идентификации аквапоринов, детерминирующих устойчивость к замораживанию. В работе показано, что при модификации экспрессии аквапоринов изменяется устойчивость клеток к замораживанию. Были также получены данные об использовании сверхэкспрессии аквапорина для улучшения резистентности к замораживанию других клеток. В частности, показано, что искусственная экспрессия аквапорина повышает выживаемость ооцитов мыши (Cho et al., 2003; Edashige et al., 2003) и эмбрионов рыб (Hagedorn et al., 2002) после криоконсервирования. Сверхэкспрессия человеческого гена аквапорина hAQP1 также увеличивала устойчивость к замораживанию клеток дрожжей (Tanghe et al., 2002).

Скорость пассивной диффузии воды через мембраны вообще относительно велика (по сравнению с таковой для других малых гидрофильных молекул), и из-за высокого поверхностно-объемного отношения клеток микроорганизмов проницаемость для воды плазматической мембраны не является ограничивающим фактором при положительных температурах. Однако следует отметить, что более высокие уровни аквапоринов в плазматической мембране способствуют более быстрому выходу воды (Hohmann et al., 2000), особенно при температуре замерзания, при которой диффузия воды через фосфолипидный бислой мембраны намного меньше, чем при более высоких температурах.

Таким образом, определение биофизических характеристик клеточных мембран, таких как проницаемость для воды и криопротекторов, и величины энергии активации процессов массопереноса этих веществ является информативным как с точки зрения выяснения механизмов проницаемости тех или иных клеток, так и в криобиологическом аспекте. Целью настоящей работы является определение коэффициентов проницаемости плазматических мембран клеток *Saccharomyces cerevisiae* для воды и криопротекторов при температурах 25 и 10°C, а также энергии активации их переноса для нативных и pCMBS-обработанных клеток.

Материалы и методы

Клетки дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* (паса 608, СП ПО РНИИХП, Санкт-Петербург) выращивали на скошенной сусло-агаровой среде при 22°C в течение 48 часов. Культура дрожжей на этом этапе находится в стационарной фазе роста. Клетки смывали с агаровой подложки физиологическим раствором и использовали в эксперименте.

Для определения коэффициентов фильтрации и коэффициентов проницаемости для криопротекторов мембран дрожжей клетки помещали в раствор (0,15 М NaCl ÷ 1 М криопротектор), объем которого на порядок превышал начальный объем клеточной суспензии, на стекло термостатированной камеры, находящейся над объективом микроскопа Axio Observer Z1 (масляно-иммерсионный объективx63). Фиксировали кинетику изменения размеров клеток во времени в растворах трех криопротекторов (глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО)) при температурах 25 и 10°C. Объем клеток аппроксимировали объемом растянутого эллипсоида вращения. Линейные размеры клеток (длину большой и малой оси эллипсоида) определяли при помощи программы AxioVision Rel. 4.6. Экспериментально определенные временные зависимости объема клеток при их контакте с гипертоническими растворами криопротекторов аппроксимировали численными решениями системы нелинейных уравнений, которые описывают эти зависимости в приближении линейной термодинамики необратимых процессов (Kedem, Katchalsky, 1958; Гордієнко та ін., 2008).

Величины энергии активации процессов переноса молекул воды и криопротекторов определяли из наклона графиков $\ln k$ от $1/T$ (график Аррениуса), где k – константа скорости процесса (в нашем случае K – коэффициент проницаемости, или L_p – коэффициент фильтрации).

Для блокирования белковых каналов использовали сульфгидрильный реагент p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt фирмы SIGMA (pCMBS). В литературе нам не удалось найти сообщений и рекомендаций по обработке клеток дрожжей pCMBS или аналогичными блокаторами белковых каналов. Обработку клеток блокатором осуществляли аналогично обработке эритроцитов согласно рекомендациям работы (Masey, Farmer, 1970), то есть инкубацией с 2 мМ pCMBS в течение 1 часа при 22°C. После инкубации клетки отмывали физиологическим раствором.

Результаты

В результате проведенных исследований были получены значения коэффициентов проницаемости для воды и криопротекторов нативных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и

после их обработки сульфгидрильным реагентом (табл. 1, 2). Значения коэффициентов фильтрации (табл. 1), полученные для нативных клеток, удовлетворительно согласуются с имеющимися в литературе данными (Levin et al., 1979; Soveral et al., 2006). Результаты показали, что коэффициенты фильтрации, определенные в средах с глицерином и ДМСО, не различаются между собой при обеих исследованных температурах. В среде с 1,2-ПД коэффициент фильтрации выше, особенно при температуре 10°C. Таким образом, энергия активации процесса трансмембранного переноса молекул воды также совпадает в средах с глицерином и ДМСО, тогда как в среде с 1,2-ПД ее величина в 2 раза ниже. Это подтверждает выдвинутое нами в предыдущей работе (Сакун та ін., 2009) предположение о негативном действии 1,2-ПД на мембраны дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, которое отмечалось и другими авторами для ооцитов мыши (Huang et al., 2006).

Таблица 1.
Коэффициенты фильтрации мембран нативных и рСМБС-обработанных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и энергия активации процесса переноса воды в средах с различными криопротекторами

Состав среды	$L_p \times 10^{14}, \text{ м}^3/\text{н}\cdot\text{с}$				$E_A, \text{ кДж/моль}$	
	10°C		25°C		Нативные клетки	рСМБС-обработанные клетки
	Нативные клетки	рСМБС-обработанные клетки	Нативные клетки	рСМБС-обработанные клетки		
Глицерин - NaCl - вода	0,53±0,11 ⁺	0,35±0,033 ⁺	0,9±0,12 ^x	0,59±0,09 ^x	24,6	24,4
1,2-ПД - NaCl - вода	0,79±0,1 [*]	0,43±0,038 [*]	1,03±0,14 [#]	0,68±0,077 [#]	12,4	21,4
ДМСО - NaCl - вода	0,54±0,08 ^α	0,42±0,028 ^α	0,92±0,2 [@]	0,72±0,12 [@]	24,5	25,2

Примечание: +, x, *, # – достоверность различия $p < 0,001$; α – достоверность различия $p < 0,02$, @ – достоверность различия $p < 0,05$.

После обработки клеток сульфгидрильным реагентом проницаемость плазматических мембран для молекул воды достоверно уменьшается при обеих температурах. В среде с глицерином она становится достоверно меньшей, чем в присутствии двух других криопротекторов. Энергия активации процесса трансмембранного переноса молекул воды при этом практически не изменяется для сред с глицерином и ДМСО и остается на уровне величин, характерных для канального механизма проникновения. Энергия активации проникновения воды в среде с 1,2-ПД остается меньшей, чем в средах с глицерином и ДМСО, однако не столь существенно, как у нативных клеток.

Коэффициенты проницаемости нативных клеток для всех исследованных криопротекторов достоверно не отличаются (табл. 2). Достаточно большой разброс при определении коэффициентов связан с естественной гетерогенностью клеток по размерам. Клетки разных размеров могут отличаться как по величине осмотически неактивного объема, так и непосредственно проницаемостью. Тем не менее, проницаемость клеток для ДМСО немного ниже таковой для глицерина и 1,2-ПД при низкой температуре (10°C) и выше при комнатной температуре (25°C). Это приводит к более высокому расчетному значению видимой энергии активации проникновения ДМСО через плазматическую мембрану клеток дрожжей.

Обработка клеток рСМБС приводит к достоверному увеличению коэффициентов проницаемости для 1,2-ПД и ДМСО при обеих температурах. Особенно существенное увеличение проницаемости наблюдается при 10°C (47,5% и 69% соответственно). При температуре 25°C также более существенное увеличение проницаемости наблюдается для ДМСО (49% по сравнению с 27% для 1,2-ПД). Для глицерина проницаемость достоверно уменьшается при температуре 10°C и не

изменяется при 25°C. Таким образом, энергия активации проникновения глицерина через плазматическую мембрану дрожжевых клеток существенно увеличивается.

Таблица 2.

Коефициенты проницаемости для криопротекторов и энергия активации процесса их переноса через плазматические мембраны нативных и рСМBS-обработанных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Вещество	К $\times 10^8$, м/с				E _A , кДж/моль	
	10°C		25°C		Нативные клетки	рСМBS-обработанные клетки
	Нативные клетки	рСМBS-обработанные клетки	Нативные клетки	рСМBS-обработанные клетки		
Глицерин	0,42 \pm 0,1 ⁺	0,38 \pm 0,03 ⁺	0,74 \pm 0,12 ^x	0,77 \pm 0,14 ^x	26,23	33,0
1,2-ПД	0,4 \pm 0,13 [*]	0,59 \pm 0,055 [*]	0,7 \pm 0,2 [#]	0,89 \pm 0,066 [#]	25,75	19,2
ДМСО	0,39 \pm 0,07 ^α	0,66 \pm 0,07 ^α	0,88 \pm 0,4 [@]	1,31 \pm 0,18 [@]	37,7	32,0

Примечание: + – достоверность различия $p < 0,2$, x – различия недостоверны, *, # – достоверность различия $p < 0,003$, α – достоверность различия $p < 0,001$, @ – достоверность различия $p < 0,05$.

Обсуждение

Полученные нами значения энергии активации переноса молекул воды через плазматические мембраны *S. cerevisiae* (раса 608, СП ПО РНИИХП, Санкт-Петербург) свидетельствуют об участии канального механизма их проникновения в исследованные клетки. Обработка дрожжевых клеток блокатором рСМBS привела к достоверному уменьшению коэффициентов фильтрации во всех исследованных средах. Причем, угнетение было одинаковым для обеих использованных температур в средах с глицерином и ДМСО и составило 34% и 22% соответственно. Наибольшее уменьшение коэффициента фильтрации после обработки сульфгидрильным реагентом наблюдалось в среде с 1,2-ПД при 10°C, где оно составило 45%. При 25°C степень угнетения проницаемости совпадает с таковой в среде с глицерином (34%). Значение энергии активации проникновения молекул воды при этом соответственно не изменилось в средах с первыми двумя криопротекторами и осталось характерным для существования канального механизма проницаемости. В среде с 1,2-ПД энергия активации переноса воды в нативных дрожжевых клетках была в 2 раза меньше за счет существенно большего значения коэффициента фильтрации при 10°C. В предыдущей работе (Сакун та ін., 2009) мы высказали предположение, что это может быть связано с негативным влиянием 1,2-ПД на мембрану клеток, приводящим к сенсibiliзации мембранных структур к охлаждению. Проведенное в настоящей работе исследование показало, что обработка клеток рСМBS приводит к более существенному уменьшению коэффициента фильтрации в среде с 1,2-ПД, особенно при температуре 10°C. Коэффициенты фильтрации рСМBS-обработанных клеток приближаются к таковым в среде с ДМСО. Значение энергии активации переноса молекул воды в среде с 1,2-ПД при этом становится близким к значениям энергии активации в средах с глицерином и ДМСО. По-видимому, конформационные изменения в белках после рСМBS-обработки делают клеточную мембрану менее чувствительной к негативному влиянию 1,2-ПД, которое, несомненно, является менее агрессивным по отношению к мембране по сравнению с сульфгидрильным реагентом.

Интересно, что при достоверно меньшем значении коэффициента фильтрации рСМBS-обработанных клеток во всех исследованных средах значения энергии активации переноса молекул воды остаются характерными для участия канального механизма проницаемости.

В отличие от результатов, полученных для коэффициента фильтрации, коэффициент проницаемости после рСМBS-обработки увеличивается для 1,2-ПД и ДМСО при обеих исследованных температурах и достоверно уменьшается для глицерина при температуре 10°C. Этот результат был несколько неожиданным. Однако, учитывая наличие отдельных каналов для транспорта глицерина и воды (Meyrial et al., 2001; Soveral et al., 2006), он может быть объяснен

различным действием рСМБС на аквапорины и глицириновый канал. В работе (Meuryal et al., 2001), при проведении исследований методом остановленного потока, для определения свойства избирательности Aqy2-1p осмотические градиенты устанавливались при помощи мочевины, этиленгликоля, глицерина, сорбитола или сахарозы. Для всех пяти растворов никакого различия в проницаемости не было обнаружено между везикулами с функциональным Aqy2-1p и негативным контролем, что показывает, что Aqy2-1p не облегчает транспорт этих растворенных веществ. Полученные значения энергии активации потока воды через везикулы, содержащие функциональный Aqy2-1p, указывают на то, что вода перемещается водными путями через мембрану везикул. Таким образом, данные результаты показали, что Aqy2-1p являются водными каналами, которые исключают глицерин или другие малые неэлектролиты.

В работе (Meuryal et al., 2001) также показано, что 0,5 мМ HgCl₂ угнетает осмотическую водную проницаемость везикул из сверхэкспрессированного штамма. Температурная зависимость скорости выхода воды из везикул, изолированных из эндоплазматического ретикулума сверхэкспрессированного по Aqy2-1p штамма и из мутантного штамма с разрушенным AQY2-1, была определена между 6,5 и 29°C, и рассчитанная из Аррениусовой зависимости энергия (E_a) активации составила 19,1±3,9 кДж/моль для везикул, имеющих функциональный Aqy2-1p, и 39,5±5,3 кДж/моль для везикул, лишенных Aqy2-1p. Расчет значения E_a для дикого типа и для штаммов с разрушенным AQY2-1, выращенных на обогащенной среде, дало подобные результаты: 20,3 кДж/моль и 40,6 кДж/моль соответственно. Подобные результаты были получены для везикул из плазматической мембраны. В частности, значение E_a, определенное для везикул из плазматической мембраны, изолированных из штамма S1278b, составило 14,4 кДж/моль. Также наблюдалось угнетающее влияние 0,5 мМ HgCl₂. Эти результаты свидетельствуют о том, что молекулы воды проникают в везикулы из плазматической мембраны, экспрессированной по Aqy2-1p, по механизму облегченной диффузии через водные поры. Авторы статьи, к сожалению, не указали степень угнетения осмотической водной проницаемости после обработки HgCl₂, а также ничего не сообщили о влиянии такой обработки на энергию активации трансмембранного осмотического переноса молекул воды. Тем не менее, исходя из наших результатов и данных работы (Meuryal et al., 2001), можно предположить, что после действия сульфгидрильного реагента водные каналы, по-видимому, становятся недоступными для молекул воды. В то же время молекулы воды могут проникать через каналы транспорта глицерина, что обеспечивает относительно низкую энергию активации. При этом они конкурируют с молекулами глицерина за проникновение глицириновым каналом. Это предположение подтверждается тем фактом, что коэффициенты фильтрации рСМБС-обработанных клеток принимают наименьшие значения в среде с глицерином, тогда как для нативных клеток они не отличались от таковых в среде с ДМСО. Авторы работы (Meuryal et al., 2001) отмечают, что средний коэффициент проницаемости для воды только в 2,8 раза выше для везикул со сверхэкспрессированным Aqy2-1p, чем для везикул, лишенных Aqy2-1p, и считают, что несколько гипотез могут объяснить этот результат. Одна из них состоит в том, что поток воды через липидный бислой или другие белки может быть достаточен для нормальной клеточной активности (Fischbarg et al., 1990; Lande et al., 1995).

Геометрические параметры молекулы глицерина превышают таковые не только для молекул воды, но и для молекул 1,2-ПД и ДМСО. Даже небольшие конформационные изменения белка, образующего глицириновый канал в мембранах дрожжевых клеток, могут привести к изменению взаимоотношений между молекулами глицерина и глицириновым каналом, который становится большим энергетическим барьером для проникновения молекул глицерина. Глицерин имеет также исключительно низкий коэффициент распределения (K_p) между гидрофобной фазой и водой (0,005), который на порядок меньше такового для 1,2-ПД (0,076) (Гордієнко, Ліннік, 2002). Поэтому для него липидный путь наименее вероятен среди трех исследованных криопротекторов, особенно при низких температурах. Однако возможно незначительное увеличение проникновения молекул глицерина через липидный бислой при температуре 25°C. Очевидно, комплексом указанных факторов можно объяснить уменьшение коэффициента проницаемости для глицерина при 10°C, отсутствие такового при температуре 25°C и увеличение энергии активации транспорта глицерина после рСМБС-обработки дрожжевых клеток.

Проницаемость для 1,2-ПД и ДМСО, напротив, увеличивается после рСМБС-обработки, а энергия активации их трансмембранного переноса несколько уменьшается. Меньшие размеры молекул этих криопротекторов, по сравнению с размерами молекул глицерина, а также большая их

гидрофобность, особенно молекул ДМСО ($K_p=0,25$), позволяет им проникать как через каналы меньшего радиуса, так и через липидный бислой. Обработка клеток сульфгидрильным реагентом приводит не только к конформационным изменениям канальных белков, но и к ухудшению упаковки липидов мембраны. Так, авторы работы (Solomon et al., 1983) отмечают, что сульфгидрильные реагенты блокируют водные каналы, не закрывая их как пробка бутылку, а вызывая конформационные изменения белка, с которым они связываются химически. Это, в частности, может объяснить повышение утечки катионов при действии рСМБС, поскольку конформационные изменения в интегральных белках приводят к нарушению плотности упаковки прилегающих липидов. Проникновение через липидный бислой может осуществляться как простым растворением в мембранных липидах, так и через дефекты мембранного бислоя, заполненные молекулами воды (Finkelstein, 1976; Poznansky et al., 1976). Увеличение проницаемости существенно больше для гидрофобных молекул ДМСО, чем для молекул 1,2-ПД (69% и 47,5% соответственно при 10°C и 49% и 27% соответственно при 25°C), что говорит в пользу предположения об увеличении проникновения по липидному пути после рСМБС-обработки клеток. В то же время, наблюдается большее увеличение проницаемости при низкой температуре для обоих криопротекторов, когда проникновение липидным путем в нативных клетках наиболее затруднено, и, следовательно, уменьшение видимой энергии активации после действия рСМБС. Это может быть обусловлено увеличением дефектности липидного бислоя и связанным с этим уменьшением энергии активации проникновения молекул липидным путем.

Выводы

1. Определены коэффициенты фильтрации клеточных мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (раса 608, СП ПО РНИИХП, Санкт-Петербург) в средах с криопротекторами (глицерин, 1,2-ПД, ДМСО) при температурах 10°C и 25°C, рассчитаны значения энергии активации трансмембранного переноса молекул воды в указанном температурном диапазоне. Показано негативное влияние 1,2-ПД на мембраны дрожжей, которое проявляется в увеличении коэффициента фильтрации, особенно при температуре 10°C, и уменьшении энергии активации проникновения молекул воды через плазматические мембраны дрожжей в среде с 1,2-ПД.

2. Показано, что обработка дрожжевых клеток блокатором белковых каналов рСМБС приводит к уменьшению коэффициентов фильтрации во всех исследованных средах. Наименьшие значения коэффициентов фильтрации рСМБС-обработанных клеток получены в среде с глицерином, что, вероятно, связано с закрытием водных каналов и конкуренцией молекул воды и глицерина за проникновение через глицериновые каналы. О канальном механизме проникновения молекул воды через мембраны как нативных, так и рСМБС-обработанных клеток свидетельствуют полученные значения энергии активации.

3. Коэффициент проницаемости мембран дрожжей для глицерина после рСМБС-обработки клеток уменьшается при температуре 10°C и достоверно не изменяется при температуре 25°C. Увеличение видимой энергии активации проникновения глицерина может быть обусловлено изменением свойств глицериновых каналов, которые становятся большим энергетическим барьером для проникновения молекул глицерина, и конкуренцией с молекулами воды за проникновение через этот канал. Также возможно незначительное увеличение проникновения молекул глицерина через липидный бислой при температуре 25°C.

4. Коэффициенты проницаемости для 1,2-ПД и ДМСО достоверно увеличиваются после рСМБС-обработки клеток, причем в большей степени для более гидрофобных молекул ДМСО. Значения энергии активации их проникновения при этом уменьшаются. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении вклада липидного пути в трансмембранный перенос молекул этих криопротекторов и об уменьшении энергии активации их проникновения липидным путем.

Список литературы

Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Марущенко В.В., Сакун О.В. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини // Біофізичний вісник. – 2008. – Вип.21 (2). – С. 75–80.

Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрану еритроцитів // Вісн. Харк. ун-ту. – 2002. – №568. – Біофіз. вісник, вип.2 (11). – С. 43–47.

- Сакун О.В., Марущенко В.В., Коваленко І.Ф. та ін. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, №1. – С. 41–48.
- Agre P., Preston G.M., Smith B.L. et al. Aquaporin Chip: the archetypal molecular water channel // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol.265. – P. 463–476.
- Albrecht R.M., Orndorff G.R., MacKenzie A.P. Survival of certain microorganisms subjected to rapid and very rapid freezing on membrane filters // *Cryobiology.* – 1973. – Vol.10. – P. 233–239.
- Beney L., de Maranon I.M., Marechal P.A., Gervais P. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – Vol.55. – P. 275–279.
- Bonhivers M., Carbrey J.M., Gould S.J., Agre P. Aquaporins in *Saccharomyces* – genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol.273. – P. 27565–27572.
- Cho Y.S., Svelto M., Calamita G. Possible functional implications of aquaporin water channels in reproductive physiology and medically assisted procreation // *Cell. Mol. Biol.* – 2003. – Vol.49. – P. 515–519.
- Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates // *Cryobiology.* – 2003. – Vol.46. – P. 33–42.
- Edashige K., Yamaji Y., Kleinhans F. W., Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation // *Biol. Reprod.* – 2003. – Vol.68. – P. 87–94.
- Finkelstein A. Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1976. – Vol.68. – P. 127–135.
- Fischbarg J., Kuang K.Y., Vera J.C. et al. Glucose transporters serve as water channels // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol.87. – P. 3244–3247.
- Hagedorn M., Lance S.L., Fonseca D.M. et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step towards successful cryopreservation // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol.67. – P. 961–966.
- Hohmann S., Bill R.M., Kayingo G., Prior B.A. Microbial MIP channels // *Trends Microbiol.* – 2000. – Vol.8. – P. 33–38.
- Huang J.Y.J., Chen H.-Y., Tan S.L., Chian R.-C. Effects of osmotic stress and cryoprotectant toxicity on mouse oocyte fertilization and subsequent embryonic development // *Cell Preserv. Technol.* – 2006. – Vol.4, №3. – P. 149–160.
- Ishibashi K., Sasaki S., Fushimi K. et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol.91. – P. 6269–6273.
- Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // *BBA.* – 1958. – Vol.27. – P. 229–246.
- Laize V., Gobin R., Rousselet G. et al. Molecular and functional study of AQY1 from *Saccharomyces cerevisiae*: role of the C-terminal domain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol.257. – P. 139–144.
- Laize V., Tacnet F., Ripoche P., Hohmann S. Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* aquaporins // *Yeast.* – 2000. – Vol.16. – P. 897–903.
- Lande M.B., Donovan J.M., Zeidel M.L. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons // *J. Gen. Physiol.* – 1995. – Vol.106. – P. 67–84.
- Levin R.L., Ushiyama M., Cravalho E.G. Water permeability of yeast cells at subzero temperatures. Volumetric changes in yeast cells during freezing constant cooling rates // *J. Membrane Biol.* – 1979. – Vol.46. – P. 91–124.
- Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F. et al. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress // *EMBO J.* – 1995. – Vol.14. – P. 1360–1371.
- Macey R.L. Permeability of red cells to water and non-electrolytes // *Transport across biological membranes.* Vol.2. – N-Y: Springer-Verlag, 1979. – P. 1–57.
- Macey R.L., Farmer R.E. Inhibition of water and solute permeability in human red cells // *BBA.* – 1970. – Vol.211. – P. 104–106.
- Macey R.L., Karan D.M., Farmer R.E. Properties of water channels in human red cells // *Biomembranes.* – 1972. – Vol.3. – P. 331–340.
- Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells // *Cryobiology.* – 1966. – Vol.2. – P. 181–192.
- Mazur P., Schmidt J.J. Interactions of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast // *Cryobiology.* – 1968. – Vol.5, №1. – P. 1–17.

- Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol.268. – P. 334–343.
- Paganelli C.V., Solomon A.K. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane // J. Gen. Physiol. – 1957. – Vol.41. – P. 259–277.
- Park J.H., Saier M.H. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins // J. Membr. Biol. – 1996. – Vol.153. – P. 171–180.
- Poznansky M., Tang S., White P.C. et al. Non-electrolyte diffusion across lipid bilayer systems // J. Gen. Physiol. – 1976. – Vol.67. – P. 45–52.
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P. Appearance of water channel in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein // Science. – 1992. – Vol.256. – P. 385–387.
- Schwartz G.J., Diller K.R. Osmotic response of individual cells during freezing // Cryobiology. – 1983. – Vol.20. – P. 542–552.
- Shi L., Skach W.R., Verkman A.S. Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol.269. – P. 10417–10422.
- Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A. et al. The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // Biomembranes and cell function. – New York: Ann.N-Y Acad. Sci., 1983. – P. 97–124.
- Soveral G., Veiga A., Loureiro-Dias M.C. et al. Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature // Microbiology. – 2006. – Vol.152. – P. 1515–1521.
- Tamas M.J., Luyten K., Sutherland F.C.W. et al. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol.31. – P. 1087–1104.
- Tanghe A., Van Dijk P., Dumortier F. et al. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains // Appl. Env. Microbiol. – 2002. – Vol.68, №12. – P. 5981–5989.
- Teunissen A., Dumortier F., Gorwa M.-F. et al. Possible functional implications of aquaporin water channels in reproductive physiology and medically assisted procreation // Cell. Mol. Biol. – 2003. – Vol.49. – P. 515–519.
- Verkman A.S. Water channels in cell membranes // Ann. Rev. Physiol. – 1992. – Vol.54. – P. 97–108.
- Vieira F.L., Sha'afi R.I., Solomon A.K. The state of water in human and dog red cell membranes // J. Gen. Physiol. – 1970. – Vol.55. – P. 451–466.
- Zeidel M.L., Neilsen S., Smith B.L. et al. Ultrastructure, pharmacologic inhibition and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes // Biochemistry. – 1994. – Vol.33. – P. 1606–1615.

Представлено: В.Г.Книгавком / Presented by: V.G.Knigavko

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 08.10.2009.

© О.В.Давидова, І.Ф.Коваленко, О.І.Гордієнко, 2009

© O.V.Davydova, I.F.Kovalenko, O.I.Gordiyenko, 2009