

УДК: 577.352.4:612.111.085:547.42

**Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда диолов при температурах 25°C, 37°C и после инкубации в рСМБС
Г.В.Коваленко, И.Ф.Коваленко, Т.П.Линник**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для диолов при температурах 25°C и 37°C, а также после инкубации с ртутным сульфгидрильным реагентом (p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt рСМБС) – блокатором белковых водных каналов. Рассчитаны энергии активации переноса молекул диолов через мембраны нативных эритроцитов при разных температурах и через мембраны эритроцитов, проинкубированных с рСМБС. Установлено, что проницаемость диолов через мембрану эритроцитов крысы выше, чем через мембрану эритроцитов кролика, что обусловлено более высокой текучестью мембран эритроцитов крысы. Доказано, что диффузия диолов через мембраны эритроцитов крысы и кролика осуществляется двумя путями: через гидрофильные водные каналы и непосредственно через липидный бислой (зависимость от коэффициента распределения «вода – n-октанол»).

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

Введение

Проникающие внутрь клеток криопротекторы, в частности диолы, получили широкое распространение для криоконсервирования биологических объектов разного уровня организации. Они считаются более эффективными по сравнению с непроникающими. Но до сих пор для новых объектов приходится эмпирически подбирать криопротекторы, состав криозащитных сред, а также оптимальные режимы охлаждения и замораживания. Для научно-обоснованного подхода к разработке методов криоконсервирования биологических объектов необходимо знание целого ряда биофизических параметров клеток, таких, например, как объем, площадь поверхности клеток, количество осмотически активной воды и, наконец, проницаемость мембран клеток для криопротекторов.

Установлено (Пирузян, 1974; Гордієнко, Ліннік, 2003), что транспорт веществ в клетку, в первую очередь, зависит от их физико-химических свойств и геометрических параметров, немаловажное значение имеет конформация молекул, в частности цис-транс-изомерия. С другой стороны, скорость диффузии веществ через эритроцитарную мембрану зависит от ее структурной организации, состава, параметров отдельных компонентов и интегральных свойств, например, таких как текучесть (Черницкий, Воробей, 1981). Естественно, физико-химические и функциональные свойства биологических мембран обусловлены видовой специфичностью клеток.

В данной работе изучена проницаемость мембран нативных и проинкубированных с ртутным сульфгидрильным реагентом эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда диолов в зависимости от их структурной изомерии и температуры.

Материалы и методы

Для исследований были использованы 7 диолов: этиленгликоль (ЭГ), 2 изомера пропандиола – 1,2-пропандиол (1,2-ПД), 1,3-пропандиол (1,3-ПД), 4 изомера бутандиола – 1,2-бутандиол (1,2-БД), 1,3-бутандиол (1,3-БД), 1,4-бутандиол (1,4-БД), 2,3-бутандиол (2,3-БД). Все вещества марки «х.ч.» дополнительно очищали (Протива, 1966) и проверяли чистоту общепринятыми методами.

Коэффициент распределения диолов (K_p) определяли в системе «вода – n-октанол» при 25°C по методу (Кейл, 1966). Геометрические параметры молекул рассчитывали для транс-изомеров на основе моделей Стьюарта-Бриглеба (Физер, Физер, 1970) по компьютерной программе "Nupreg Snet Pro v. 5.1".

Кровь исследуемых животных, заготовленную на консерванте «Глюгидир», получали у крысы путем пункции хвостовой вены, у кролика – путем надреза или прокола краевой вены уха (Западнюк и др., 1974).

Коэффициенты проницаемости определяли по методу (Гордиенко и др., 1998), который основан на физико-математической модели гемолиза в водных растворах проникающего криопротектора (Гордієнко та ін., 1998) при температурах 25°C и 37°C.

Кинетику гемолиза регистрировали методом малоуглового рассеивания света с длиной волны 1000 нм. Интенсивность рассеянного суспензией эритроцитов света измеряли под углом 9° в направлении падающего пучка. Прибор снабжен устройством для поддержания необходимой температуры в кюветной камере.

Для блокирования водных каналов использовали *p*-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt (pCMBS) фирмы "Sigma". Инкубацию эритроцитов крысы и кролика с блокатором проводили по методу (Conlon, Outhred, 1978) с 2 мМ pCMBS в течение экспериментально определенного времени 30 мин. при 25°C . После инкубации эритроциты отмывали фосфатным буферным раствором при pH 7,4.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований определены коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для вышеуказанных диолов в нативном состоянии при температурах 25°C и 37°C и после инкубации с pCMBS при 25°C . Результаты экспериментов и рассчитанная энергия активации переноса молекул диолов через мембрану эритроцитов (Гордиенко, Пушкар, 1994) для двух температур и после обработки клеток блокатором белковых водных каналов pCMBS приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1.

Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов крысы для диолов и энергия активации транспорта молекул

Вещество	Коэффициент проницаемости $K_1 \times 10^6$, м/с			Энергия активации, E_a , кДж/моль, $25-37^\circ\text{C}$	Энергия активации с pCMBS, E_a , кДж/моль, 25°C
	нативные эритроциты		с pCMBS		
	37°C	25°C			
ЭГ	$13,95 \pm 1,36$	$6,81 \pm 1,15$	$3,77 \pm 0,71$	46,24	80,46
1,3-ПД	$13,54 \pm 1,78$	$5,88 \pm 0,61$	$3,51 \pm 0,18$	53,48	83,02
1,2-ПД	$17,07 \pm 0,92$	$11,13 \pm 2,09$	$4,91 \pm 1,32$	27,58	76,63
1,4-БД	$13,39 \pm 1,87$	$6,89 \pm 0,78$	$3,23 \pm 0,67$	42,84	87,45
1,3-БД	$14,38 \pm 1,88$	$10,54 \pm 1,68$	$6,22 \pm 0,91$	20,03	51,44
2,3-БД	$16,45 \pm 2,72$	$12,14 \pm 1,04$	$7,19 \pm 0,64$	19,59	50,9
1,2-БД	$18,48 \pm 1,45$	$13,54 \pm 1,77$	$11,34 \pm 1,79$	20,06	30,03

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

Таблица 2.

Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов кролика для диолов и энергия активации транспорта молекул

Вещество	Коэффициент проницаемости $K_1 \times 10^6$, м/с			Энергия активации, E_a , кДж/моль, $25-37^\circ\text{C}$	Энергия активации с pCMBS, E_a , кДж/моль, 25°C
	нативные эритроциты		с pCMBS		
	37°C	25°C			
ЭГ	$5,21 \pm 0,27$	$2,64 \pm 0,17$	$2,04 \pm 0,19$	43,83	57,66
1,3-ПД	$8,42 \pm 0,54$	$4,27 \pm 0,50$	$2,79 \pm 0,12$	43,78	67,93
1,2-ПД	$12,73 \pm 1,04$	$6,95 \pm 1,32$	$3,54 \pm 0,21$	39,02	78,71
1,4-БД	$9,03 \pm 0,70$	$5,51 \pm 0,52$	$2,42 \pm 0,14$	31,85	80,98
1,3-БД	$14,71 \pm 1,94$	$8,34 \pm 1,38$	$4,09 \pm 1,88$	36,59	78,71
2,3-БД	$15,87 \pm 1,55$	$8,53 \pm 1,11$	$4,93 \pm 1,28$	40,03	71,90
1,2-БД	$18,90 \pm 1,43$	$9,42 \pm 1,32$	$7,75 \pm 1,04$	44,89	52,13

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

Из представленных данных видно, что проницаемость изученных диолов через мембрану эритроцитов крысы при 25°C достоверно выше, чем через эритроцитарные мембраны кролика

(табл. 1 и 2). При 37°C соблюдается такая же закономерность, за исключением 3-х изомеров бутандиола – 1,3-БД, 1,2-БД и 2,3-БД. Для этих веществ разница между коэффициентами проницаемости мембраны эритроцитов крысы и кролика при 37°C недостоверна. Вероятно, это обусловлено очень высокой скоростью диффузии этих веществ через мембраны при данной температуре, что позволяет предположить возможность их транспорта непосредственно через липидный бислой. Последнее может быть связано как с повышением тепловых флуктуаций липидов в мембране, так и с увеличением силы гидрофобных взаимодействий при увеличении температуры. Кроме того, повышение температуры приводит к снижению энергии межмолекулярных и внутримолекулярных водородных связей, следовательно, молекулы диолов легче теряют гидратную оболочку, гидроксильные (ОН-) и алкильные (СН₃-; С₂Н₅-) радикалы быстрее осуществляют вращательные движения вокруг связи С–С. Это вызывает появление и одновременное сосуществование транс- и цис-изомеров, размеры молекул которых отличаются (диаметр и объем цис-изомеров несколько меньше). Значит, также увеличивается скорость пассивной диффузии веществ через белковые водные каналы, их диаметр, как известно (Гордієнко, Ліннік, 2003; Черницький, Воробей, 1981), ограничен.

Разница в скорости проницаемости диолов через мембрану эритроцитов крысы и кролика объясняется их видовой специфичностью, а именно различием состава и интегральных свойств их мембран. Так, индексы двойных связей суммарных липидов для мембран эритроцитов крысы и кролика равны 1,7 и 1,2 соответственно. Содержание холестерина в % от общих липидов в мембранах эритроцитов крысы составляет 26,1, кролика – 29,9 (Черницький, Воробей, 1981). Отношение фосфатидилхолина к сфингомиелину (ФХ:СМ) в мембранах эритроцитов крысы равно 3,91, кролика – 1,78. Перечисленные показатели определяют текучесть мембраны, т.е. величину обратную вязкости, при этом, чем выше индекс двойной связи, отношение ФХ:СМ и ниже содержание холестерина, тем значительно повышается текучесть мембраны. Из приведенных данных видно, что текучесть выше в эритроцитах крысы, поэтому и скорость диффузии веществ через их мембрану более высокая. Выявленная температурная зависимость проницаемости диолов через мембрану эритроцитов крысы и кролика согласуется с теоретическими представлениями и известными литературными данными для других клеток (Пирузян, 1974; Гордієнко, Ліннік, 2003; Черницький, Воробей, 1981).

Ранее (Gordiyenko et al., 2004) была изучена проницаемость эритроцитов человека для ряда диолов. Учитывая, что индекс двойных связей суммарных липидов в мембранах эритроцитов человека равен 1,4, содержание холестерина 30%, соотношение ФХ:СМ 1,09, текучесть мембран ниже, чем у эритроцитов крысы и кролика. И, как следствие, меньше значения коэффициентов проницаемости диолов через мембраны эритроцитов человека. Проницаемость мембран эритроцитов человека для диолов была изучена при 20°C (Gordiyenko et al., 2004). Исходя из полученных нами данных (см. табл. 1 и 2), коэффициент проницаемости повышается на 20% при увеличении температуры на каждые 5°C. Простой пересчет все равно дает более низкие значения скорости транспорта диолов через мембрану эритроцитов человека при 25°C и 37°C.

Как видно из табл. 1 и 2, значения энергии активации переноса молекул диолов через мембрану эритроцитов крысы и кролика при изменении температуры от 25°C до 37°C лежат в диапазоне от 20 до 50 кДж/моль. Многие авторы (Черницький, Воробей, 1981; Conlon, Outhred, 1978; Ojcius, Solomon, 1988) считают, что если энергия активации не превышает значений указанного выше диапазона, то наиболее вероятным путем транспорта низкомолекулярных гидрофильных неэлектролитов через мембрану являются белковые водные каналы. При этом допускается, что молекула может проникать с гидратной оболочкой в зависимости от размера гидрофильных пор мембраны или обменивать ее с молекулами воды внутри поры.

В табл. 3 представлены структурные формулы, геометрические параметры и коэффициенты распределения изученного ряда веществ в системе «вода – n-октанол». Следует отметить, что только ЭГ и 2 изомера пропандиола – 1,3-ПД и 1,2-ПД можно считать действительно гидрофильными, изомеры бутандиола 1,4-БД, 1,3-БД и 2,3-БД относятся к дифильным веществам. С одной стороны, они проявляют выраженные гидрофильные свойства, обусловленные наличием в молекуле двух гидроксильных групп, с другой – за счет метильных (1,3-БД, 2,3-БД) и метиленовых (1,4-БД, 1,3-БД) радикалов (см. табл. 3) до определенной степени являются липофильными. Их коэффициенты распределения в системе «вода – неполярная фаза» равны 0,137, 0,182 и 0,227 соответственно, что указывает на способность к гидрофобным взаимодействиям. Четвертый изомер 1,2-БД, имеющий в структуре этильную (С₂Н₅-) группу и коэффициент распределения, равный 0,308 (табл. 3), трудно назвать гидрофильным или дифильным, несмотря на наличие в молекуле двух гидроксильных радикалов, он является уже гидрофобным в этом ряду соединений.

Следовательно, эти вещества могут частично диффундировать через мембрану, непосредственно через липидный бислой либо за счет гидрофобных взаимодействий с липидным

матриком. Альтернативный путь – через липидные поры, возникающие в результате тепловых флуктуаций, высланные внутри полярными головками липидов (Маркин, Козлов, 1985). При этом молекулы, по крайней мере, в первом случае, должны терять гидратную оболочку на границе раздела внеклеточная среда – мембрана.

Таблица 3.

Структурные формулы, геометрические параметры и коэффициент распределения веществ ряда диолов

Вещество	Структурная формула	М.м.	Геометрические параметры молекул		K _p
			D, Å	V, Å ³	
ЭГ	HO – CH ₂ – CH ₂ – OH	62,1	2,6	27,6	0,040
1,3-ПД	HO – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – OH	76,1	4,1	75,2	0,064
1,2-ПД	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	76,1	3,7	53,7	0,076
1,4-БД	HO – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – OH	90,1	4,0	92,9	0,137
1,3-БД	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	90,1	3,6	61,0	0,182
2,3-БД	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	90,1	3,9	69,2	0,227
1,2-БД	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	90,1	4,3	88,5	0,308

Примечание: М.м. – молекулярная масса вещества; D – диаметр молекулы; V – объем молекулы; K_p – коэффициент распределения в системе «вода – n-октанол».

В пользу альтернативного пути транспорта диолов в эритроциты крысы и кролика непосредственно через липидный бислой свидетельствуют, во-первых, зависимость полученных при разных условиях коэффициентов проницаемости диолов от их коэффициента распределения в системе «вода – неполярная фаза» (рис. 1) и, во вторых, результаты после инкубирования эритроцитов с rCMBS (см. табл. 1 и 2). Известно (Ojcius, Solomon, 1988), что органические ртутные сульфгидрильные реагенты и их сульфатные производные, такие как rCMBS, блокируют белок полосы 3, при этом ингибируя транспорт воды и мочевины, а также диффузию малых неэлектролитных молекул (Гордієнко, Ліннік, 2003; Gordiyenko et al., 2004; Goodman, 2002), для которых доступен данный путь транспорта.

На рис. 1 представлены зависимости коэффициентов проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика при 37°C и 25°C и проинкубированных с rCMBS при 25°C для диолов от их коэффициента распределения в системе «вода – n-октанол». Изученные вещества распределили на две группы: в 1-ой группе рассмотрены гидрофильные диолы ЭГ; 1,2-ПД; 1,3-ПД; во второй – дифильные изомеры бутандиола 1,3-БД; 1,4-БД; 2,3-БД и гидрофобный 1,2-БД. При этом корреляция между указанными показателями в 1-ой группе веществ на эритроцитах крысы невысокая: 0,682 при 37°C, 0,637 при 25°C и с rCMBS 0,630, в то время как во второй группе коэффициент корреляции достигает 0,992 при 37°C, 0,932 при 25°C и 0,989 с rCMBS. На эритроцитах кролика корреляция между указанными показателями выше и составляет в первой группе веществ: 0,963 при 37°C, 0,946 при 25°C, 0,982 с rCMBS; во второй группе – 0,911 при 37°C, 0,867 при 25°C и 0,995 с rCMBS. Столь значительная зависимость проницаемости диолов от их коэффициента распределения в системе «вода – неполярная фаза», т.е. их липофильности, дает возможность предполагать липидный путь транспорта в эритроциты, исключая только гидрофильные диолы ЭГ и 1,3-ПД (табл. 3).

Маловіроятно, что эти вещества диффундируют непосредственно через липидный бислой, они практически неспособны к гидрофобным взаимодействиям. Возможно, что они проникают внутрь эритроцитов, не теряя гидратной оболочки, через возникающие липидные поры, размеры которых варьируют в достаточных пределах, достигая иногда 10 Å (Маркин, Козлов, 1985), или через аквапорины, которые не всегда или слабо блокируются рСМБС (Goodman, 2002). Данный вид транспорта ЭГ и 1,3-ПД, вероятно, реализуется в эритроциты кролика (см. табл. 2), так как инкубация с рСМБС приводит к снижению их коэффициента проницаемости всего на 22,7% у ЭГ и на 37,7% у 1,3-ПД.

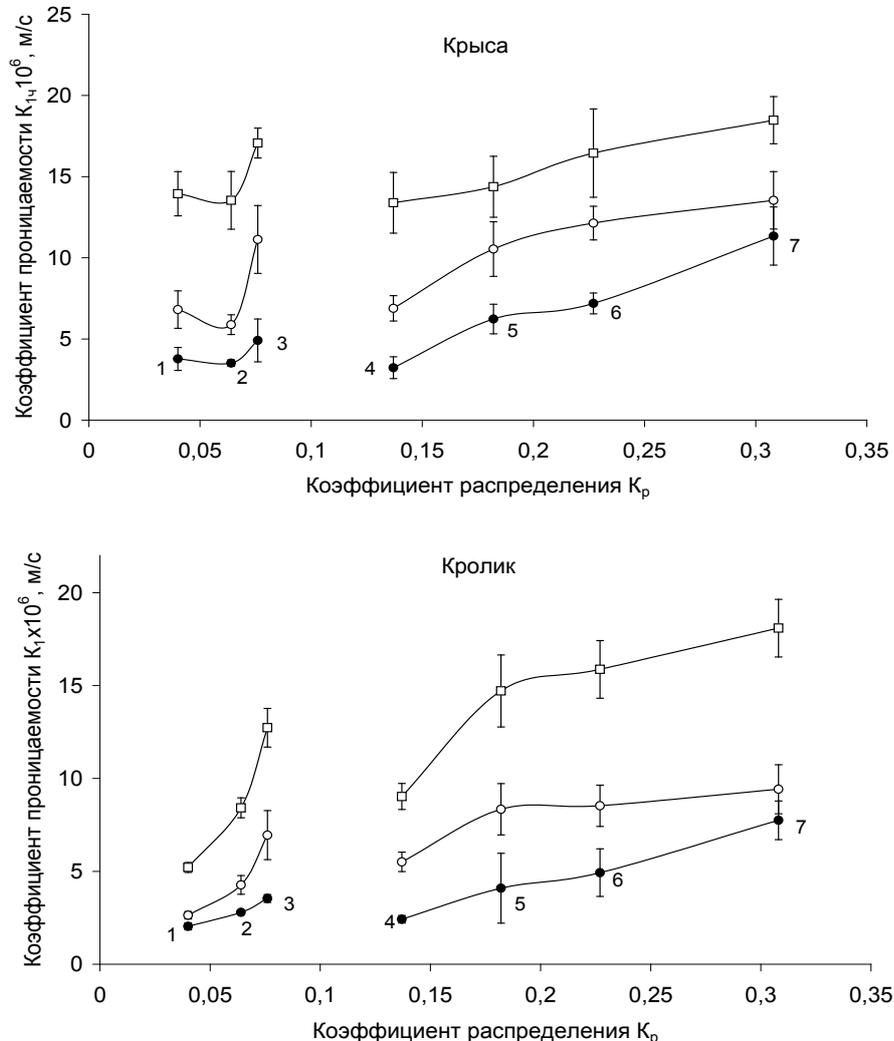


Рис. 1. Зависимости коэффициентов проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика при 37°C (□) и 25°C (○) и проинкубированных с рСМБС при 25°C (●) для диолов от их коэффициента распределения в системе «вода – н-октанол»

Примечание: 1 – ЭГ; 2 – 1,3-ПД; 3 – 1,2-ПД; 4 – 1,4-БД; 5 – 1,3-БД; 6 – 2,3-БД; 7 – 1,2-БД.

Для изомеров бутандиола и 1,2-ПД ингибирование сульфгидрильным реагентом транспорта через мембрану, как в эритроциты кролика, так и в эритроциты крысы значительно выше – от 40 до 56%, исключая только 1,2-БД (см. табл. 1 и 2).

После инкубации эритроцитов кролика с рСМБС коэффициент проницаемости мембран для 1,2-БД снижается всего на 17,7%, эритроцитов крысы – на 16,2%. Учитывая его гидрофобность ($K_p=0,308$, см. табл. 3), т.е. способность взаимодействовать с липидными компонентами мембраны, можно утверждать, что 1,2-БД проникает преимущественно через липидный бислой. Об этом свидетельствует также его аномально высокая скорость диффузии в эритроциты крысы и кролика (табл. 1, 2, рис. 1) по сравнению с другими диолами. Для остальных изомеров бутандиола (1,3-БД, 1,4-БД и 2,3-БД) доступен также путь через белковые водные каналы, как в эритроциты кролика, так и в эритроциты крысы (табл. 1 и 2, рис. 1). Основная часть 1,3-БД и 2,3-БД (до 60%) проникает внутрь эритроцитов крысы и кролика все же липидным путем. 1,2-ПД и 1,4-БД также способны к диффузии

через липидний матрикс, но в значительно меньшей степени (табл. 1 и 2, рис. 1). Доказательством возможности проникать в эритроциты крысы и кролика перечисленных выше веществ непосредственно через липидный бислой являются высокая энергия активации переноса молекул через мембрану проинкубированных с рСМБС эритроцитов (от 50 до 90 кДж/моль, табл. 1 и 2), а также зависимость между коэффициентами проницаемости проинкубированных с рСМБС эритроцитов крысы и кролика для этих веществ от их липофильности. Значения коэффициента корреляции между указанными показателями возросли от 0,867 до 0,995 (эритроциты кролика) и от 0,932 до 0,989 (эритроциты крысы).

Следует отметить, что совсем неожиданным явилось отсутствие корреляции проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для изученных веществ от их геометрических параметров (см. табл. 1, 2 и 3, рис. 1). Но можно предположить, что низкие значения коэффициентов проницаемости 1,3-ПД и 1,4-БД через мембраны эритроцитов крысы и кролика все же обусловлены большими размерами их молекул (диаметр 4,1 и 4,0 Å, объем 75,2 и 92,9 Å³ соответственно) по сравнению с другими диолами, исключая 1,2-БД. Высокую скорость диффузии гидрофильного 1,2-ПД в эритроциты крысы и кролика также можно было бы объяснить малыми размерами его молекулы (диаметр 3,7 Å, объем 53,7 Å³, табл. 3) и утверждать, что основной путь его транспорта в клетку – белковые водные каналы. Тогда становится совсем непонятным, почему самые малые по размерам молекулы ЭГ (табл. 3) так медленно диффундируют через мембрану эритроцитов крысы и, особенно, кролика по сравнению с другими изученными веществами. Допустить, что для группы гидрофильных диолов (ЭГ, 1,3-ПД и 1,2-ПД) доступен альтернативный путь через липидный бислой, возможно только при условии, что эти вещества проникают в клетку вместе с гидратной оболочкой через липидные поры, достигающие диаметра 10 Å (Маркин, Козлов, 1985).

Выводы

В результате проведенных исследований определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для веществ гомологического ряда диолов при температурах 25°C и 37°C, а также эритроцитов, модифицированных инкубацией с ртутным сульфгидрильным реагентом (рСМБС) – блокатором белковых водных каналов (белок полосы 3) при 25°C. Рассчитаны энергии активации переноса молекул диолов через мембраны нативных эритроцитов крысы и кролика в диапазоне температур 25–37°C и через мембраны эритроцитов, проинкубированных с рСМБС при 25°C.

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

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм проницаемости диолов через мембраны эритроцитов крысы и, особенно, кролика имеет сложный характер. Пассивная диффузия криопротекторов изученного ряда в эритроциты крысы и кролика осуществляется двумя альтернативными путями – через гидрофильные водные каналы (данные ингибирования проницаемости с блокатором рСМБС) и непосредственно через липидный бислой (значимая зависимость коэффициентов проницаемости веществ от их «гидрофобности» (K_p) и высокие значения энергии активации после инкубирования эритроцитов с рСМБС). 1,2-бутандиол – наиболее гидрофобное соединение в изученном ряду – проникает в эритроциты преимущественно через липидный бислой, и только незначительное количество (не более 16–18 %) способно к диффузии через гидрофильные белковые поры. Не выявлена достоверная корреляция проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для изученных диолов от геометрических параметров их молекул.

Список литературы

- Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 143с.
- Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Вісник ХДУ. – 1998. – №422. – Біофіз. вісник, вип.2. – С. 59–63.
- Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Е. Фізико-математична модель та експериментальне вивчення явища гіпотонічного гемолізу // Доповіді НАН Укр. – 1998. – №11. – С. 173–176.
- Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низки амідів // Вісн. Харк. ун-ту. – 2003. – №593. – Біофіз. вісник, вип.1 (12). – С. 92–96.
- Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. – Киев: Вища школа, 1974. – 303с.
- Кейл Б. Экстракция и противоточное распределение // Лабораторная техника органической химии. – М.: Мир, 1966. – С. 379–441.

- Маркин В.С., Козлов М.М. Статистика пор в бислойных липидных мембранах // Биол. мембраны. – 1985. – Т.2, №12. – С. 205–223.
- Пирузян Л.А. Действие физиологических активных соединений на биологические мембраны. – М.: Наука, 1974. – 387с.
- Протива М. Очистка растворителей // Лабораторная техника органической химии. – М.: Мир, 1966. – С. 591–615.
- Физер Л., Физер М. Органическая химия. Т.1. – М.: Химия, 1970. – 690с.
- Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216с.
- Conlon T., Outhred R. The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability // BBA. – 1978. – Vol.511. – P. 408–418.
- Goodman B.E. Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transporters // Adv. physiol. educ. – 2002. – Vol.26, №3. – P. 146–157.
- Gordiyenko O.I., Linnik T.P., Gordiyenko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series diols // Bioelektrochemistry. – 2004. – №62. – P. 115–118.
- Ojcus D.H., Solomon A.K. Sites of p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of red cell urea and water transport // BBA. – 1988. – Vol.942. – P. 73–82.

Проникність мембран еритроцитів щура і кролика для криопротекторів ряду діолів при температурах 25°C, 37°C, а також після інкубації з pCMBS

Г.В.Коваленко, І.Ф.Коваленко, Т.П.Ліннік

Визначені коефіцієнти проникності мембран нативних еритроцитів щура і кролика для діолів при температурах 25°C і 37°C, а також після інкубації з ртутним сульфгідрильним реагентом (p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt pCMBS) – блокатором білкових водяних каналів. Розраховано енергії активації переносу діолів через мембрани нативних еритроцитів при різних температурах і через мембрани еритроцитів, проінкубованих з pCMBS. Установлено, що проникність вивчених речовин через мембрану еритроцитів щура вище, ніж через мембрану еритроцитів кролика, що обумовлено більш високою плинністю мембран еритроцитів щура. Доведено, що дифузія діолів через мембрани еритроцитів щура і кролика здійснюється двома альтернативними шляхами: через гідрофільні водяні канали і безпосередньо через ліпідний бішар (залежність від коефіцієнта розподілу в системі «вода – неполярна фаза»).

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

Permeability of rat and rabbit erythrocyte membranes for cryoprotectants of diol series at the temperatures of 25°C and 37°C, as well as after effect of pCMBS

G.V.Kovalenko, I.F.Kovalenko, T.P.Linnik

The carried out investigations resulted in determination of membrane permeability coefficients for diols in rat and rabbit erythrocytes at the temperatures of 25°C and 37°C, as well as after effect of sulfhydryl reagent (p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt pCMBS), a blocker of protein aqueous channels. The activation energies of diol molecule transport through both native erythrocyte membrane at various temperatures and pCMBS-treated cell membrane were calculated. Permeability of studied substances through rat erythrocyte membrane was found to be higher than the one for rabbit erythrocyte membrane that is probably caused by higher membrane fluidity in rat cells. It was shown that diols diffusion through rat and rabbit erythrocyte membranes realized by two alternative ways: through hydrophilic protein channels and directly through lipid bilayer (correlation at coefficient partition in "water – non-polar phase" system).

Key words: *cryoprotectants, diols, membrane permeability, protein channels, animal erythrocytes.*

Представлено: Н.С.Красовою
Рекомендовано до друку: В.А.Бондаренком