

УДК 577.352.4:611.018.51

ПРОНИКНІСТЬ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ДО НЕЕЛЕКТРОЛІТІВ НИЗКИ АМІДІВ

О.І. Гордієнко, Т.П. Лінник

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, Харків, вул. Переяславська, 23,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла до редакції 30 вересня 2002 р.

В роботі визначені коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для низки амідів. Показано, що при перевищенні діаметром молекул величини 4 Å суттєво зменшується їх проникання крізь водні пори. Коефіцієнти проникності еритроцитів, проінкубованих з ртутним сульфгідрильним реагентом рСМБС, який блокує білкові канали, зростають слідом за збільшенням коефіцієнту розподілу в представленій низці амідів між гідрофобною та гідрофільною фазами з коефіцієнтом кореляції 0,94. Отримані результати свідчать про те, що проникнення досліджених речовин відбувається двома альтернативними шляхами: водними білковими каналами та безпосередньо крізь ліпідну фазу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мембрани еритроцитів, проникність, амід.

Проникність плазматичних мембран є важливим параметром, що визначає можливість життєдіяльності клітин. Проникання метаболітів крізь мембрану забезпечується, зазвичай, спеціальними системами активного транспорту. Пасивна ж проникність клітинної мембрани визначається її загальною структурою. Таким чином, вивчення проникності мембран до різних речовин надає додаткову інформацію щодо її будови та властивостей в тих чи інших умовах. Ще в 1957 році, досліджуючи дифузії води крізь мембрани еритроцитів людини, автори роботи [1] зробили висновок, що вони пронизуються "еквівалентними порами" радіусом 3,5 Å. Розміри пор оцінювали, виходячи із співвідношення осмотичної та дифузійної проникності мембран еритроцитів для води. Подальші дослідження проникності мембран еритроцитів для малих гідрофільних речовин та води [2-4] надали підстави вважати, що радіус "еквівалентних пор" становить 4,2-4,6 Å, і що вони є також шляхами проникання малих гідрофільних неелектролітів. В своїй пізнішій роботі [5] автори оцінюють радіус "еквівалентних пор" у 6,5 Å.

Дослідження проникності для води та малих неелектролітів ліпідних бішарів, модифікованих антибіотиками, такими як ністатин та амфотерицин В [6], показали, що ці речовини утворюють в ліпідних бішарах пори з характеристиками, аналогічними до пор в мембранах еритроцитів. Стеричні обмеження, якими характеризуються ці пори, добре описані і не відрізняються від таких для еритроцитів [7]. Показано [8], що амфотерицин В формує в ліпідних бішарах циліндричну порожнину діаметром 8 Å, яка перетинає всю товщу мембрани. Внутрішня поверхня цих пор, на яку виходять гідроксильні групи амфотерицину В, є гідрофільною, що забезпечує гідрофільне оточення для молекул води і неелектролітів, які прямують крізь пори. Ця модель узгоджується з характеристиками, отриманими для мембран еритроцитів. Це не означає, що водні канали в мембранах еритроцитів є правильними циліндрами з діаметром 8 Å, але пори еритроцитів мають властивості еквівалентні властивостям такого циліндру [9].

В роботі [10] було показано, що сульфгідрильний реагент *p*-Chloromercuribenzenesulphonate (рСМБС) пригнічує проникання води крізь водні канали. Були також проведені порівняльні дослідження впливу багатьох сульфгідрильних реагентів на транспорт води [11-13]. Показано [11,14], що ці реагенти зв'язуються в основному з білком смуги 3. Білок смуги 3 є інтегральним мембранним білком з масою приблизно 95 кДа, який перетинає мембрану, існуючи в мембрані у вигляді димерів у кількості біля $5,5 \cdot 10^5$ [15]. Він складає 25% мембранних білків і містить принаймні 5 цистеїнових залишків [16]. Соломон [9] оцінив кількість пор, яка необхідна для забезпечення коефіцієнту проникності для води $4,7 \cdot 10^{-5}$ м·сек⁻¹ [3], вважаючи, що радіус пор становить 4,5 Å і отримав величину $2,7 \cdot 10^5$ пор, що цілком задовільно узгоджується з кількістю молекул білка смуги 3, беручи до уваги приблизний характер розрахунків. Вважають, що вплив сульфгідрильних реагентів, таких як рСМБС, на проникність крізь гідрофільні канали води та малих неелектролітів пов'язана з конформаційними змінами білка смуги 3 [9].

В нашій попередній роботі [17] представлені дані щодо проникності еритроцитів людини до речовин низки діолів. Показано, що проникання досліджених речовин крізь мембрани еритроцитів відбувається двома альтернативними шляхами. Коротколанцюгові гідрофільні молекули діаметром до

4Å вільно проникають по водних каналах, утворених білковими структурами. При перевищенні діаметром цієї величини молекули зазнають стеричних обмежень при проходженні крізь гідрофільні пори. При зростанні ліпофільних властивостей молекул збільшується ймовірність їх проникання шляхом безпосереднього розчинення в ліпідній фазі. Так, в низці структурних ізомерів бутандіолу коефіцієнт кореляції між коефіцієнтом проникності та коефіцієнтом розподілу в системі "п-октанол – вода" становить 0.927, а після інкубації еритроцитів з ртутним сульфгідрильним реагентом, який, як вважається, блокує водні канали еритроцитів, він зростає до 0.996.

В продовження цієї роботи нами була досліджена проникність мембран еритроцитів людини до речовин низки амідів, які також відрізняються між собою розмірами молекул та коефіцієнтами розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами внаслідок зміни кількості та розташування метильних груп.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для дослідження було обрано низку амідів: ацетамід, метилацетамід, диметилформамід та диметилацетамід. Всі препарати були марки "хч", додатково очищені. Геометричні параметри молекул розраховували на основі моделей Стьюарта за комп'ютерною програмою "Hyper Chem Pro v.5.1". В якості блокатора водних каналів використовували р-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt фірми SIGMA (надалі позначатимемо рCMBS). Обробку еритроцитів блокатором проводили інкубацією з 2 мМ рCMBS впродовж 1 години при 22°C. Після інкубації еритроцити відмивали фосфатним буфером рН 7.4 [10]. Вимірювання коефіцієнтів проникності здійснювали при температурі 20°C. Коефіцієнти проникності визначали за розробленим нами методом [18], який ґрунтується на фізико-математичній моделі гіпотетичного гемолізу в розчині проникаючої речовини [19]. Передбачена в цій моделі теорія гемолізу враховує не тільки час досягнення еритроцитом сферичної форми, що визначається виразом:

$$t_s = \frac{(\sigma_s n)^2 (v_s - \alpha)^2 - (1 - \alpha)^2}{2\gamma K (1 - \alpha) \sigma_s n}$$

(σ_s – коефіцієнт відбиття мембрани для проникаючої крізь неї речовини, n – відношення концентрації позаклітинного розчину проникаючої крізь мембрану речовини до початкового значення концентрації внутрішньоклітинного розчину, v_s – відносний об'єм сфероцита у відсутності ізотропного розтягу мембрани, α – об'ємна фракція осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин у початковому стані, γ – поверхнево-об'ємне співвідношення еритроцита, K – коефіцієнт проникності мембрани еритроцита для проникаючої речовини), але i час флуктуаційного утворення пори в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита:

$$t_p = \frac{(kT)^2}{D\gamma_0 2\pi R_s^2 \sqrt{s}} \exp\left[\frac{\pi\gamma_0^2}{kTs}\right]$$

(γ_0 – коефіцієнт лінійного натягу границі мембранної пори, R_s – радіус сфероцита в недеформованому стані, D – коефіцієнт дифузії у просторі розмірів пори, s – ізотропний натяг мембрани, k – постійна Больцмана, T – абсолютна температура).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Як і в попередній роботі, для виявлення шляхів проникання молекул амідів визначали коефіцієнти проникності мембран нативних еритроцитів та еритроцитів, оброблених ртутним сульфгідрильним реагентом. Коефіцієнти проникності для досліджених речовин, їх структурні формули та розраховані геометричні параметри, а також коефіцієнти розподілу цих речовин в системі "п-октанол – вода" [20] подані в табл.1. Як видно з представлених даних, коефіцієнти проникності нативних еритроцитів для досліджених речовин низки амідів мало відрізняються між собою, хоча проникність для диметилформаміду вірогідно зростає порівняно з ацетамідом та метилацетамідом ($P=0.999$). Аналогічно слід було чекати подальшого зростання коефіцієнту проникності при переході до диметилацетаміду внаслідок збільшення коефіцієнту розподілу. Але коефіцієнт проникності для диметилацетаміду є навіть меншим, ніж для диметилформаміду ($P=0.95$) (рис.1, крива 1). Якщо ж звернутись до шостої шпальти таблиці, в якій подані діаметри молекул, то, як і у випадку діолів [17], бачимо, що перевищення діаметром величини 4 Å приводить до зменшення коефіцієнту проникності, очевидно, за рахунок зменшення внеску проникності крізь водні пори в загальну проникність для цієї речовини. Це підтверджується даними четвертої шпальти таблиці 1.

Табл.1. Вплив коефіцієнту розподілу та геометричних параметрів молекул амідів на їх проникність крізь мембрани еритроцитів.

Речовина	Структурна формула	Коефіцієнти проникності, $P \cdot 10^6$ м/сек		Коефіцієнт розподілу, K_p	Геометричні параметри молекул		
		Нативні еритроцити	Еритроцити, проінкубовані з рСМБС		D, Å	L, Å	V, Å ³
Ацетамід	<chem>CC(=O)N</chem>	2,66±0,18	0,528±0,07	0,062	3,2	3,8	30,5
Метилацетамід	<chem>CC(=O)NC</chem>	2,64±0,2	1,37±0,23	0,113	3,3	4,9	42,4
Диметилформамід	<chem>CN(C)C=O</chem>	2,96±0,1	1,96 ±0,13	0,233	3,9	4,1	44,0
Диметилацетамід	<chem>CC(=O)N(C)C</chem>	2,86±0,14	2,04±0,22	0,291	4,2	5,1	70,6

Примітка: Вірогідність різниці між коефіцієнтами проникності нативних еритроцитів та еритроцитів, проінкубованих з рСМБС, для всіх речовин >0,999

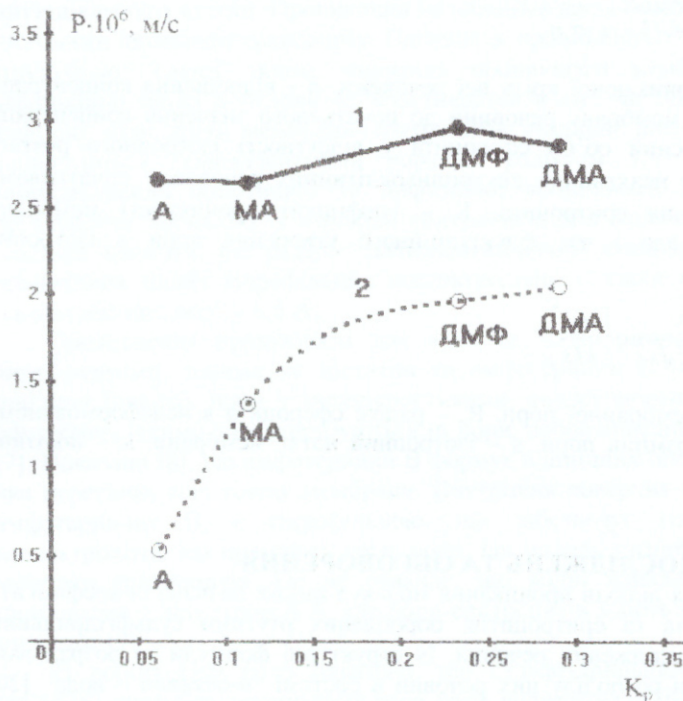


Рис. 1. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул амідів від коефіцієнту розподілу цих речовин в системі "октанол-вода"

● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з рСМБС

кореляції між відсотком пригнічення проникності амідів та діаметром їх молекул становить $-0,87$. Слід зазначити, що коефіцієнт проникності проінкубованих з рСМБС еритроцитів для ацетаміду та стиленгіколю [17], які мають близькі геометричні параметри та коефіцієнти розподілу, практично співпадають ($0,528 \cdot 10^{-6}$ та $0,526 \cdot 10^{-6}$ відповідно).

В своїй роботі [21] Соломон припускає, що механізм проникання амідів крізь водну пору відрізняється від такого для діолів. Він вважає, що діоли проникають в пору разом з гідратною оболонкою, тоді як аміди, начебто внаслідок більшої енергії водневих зв'язків з водою, при входженні в

Отримані нами коефіцієнти проникності еритроцитів, оброблених рСМБС, ще раз підтверджують висунуте нами припущення про альтернативний (ліпідний) шлях проникання досліджуваних речовин крізь мембрани еритроцитів. Очевидно, що коефіцієнти проникності еритроцитів, проінкубованих з сульфгідрильним реагентом, зростають слідом за збільшенням коефіцієнту розподілу в представленій низці амідів (рис.1. крива 2). коефіцієнт кореляції становить 0,94. Ці результати добре узгоджуються з результатами для ізомерів бутандіолу [17], де коефіцієнт кореляції для аналогічних параметрів становив 0,996. Більш високе значення коефіцієнту кореляції для бутандіолів може бути пов'язане з тим, що в цьому випадку низка речовин складається із структурних ізомерів, тоді як розглянуті нами аміди більше відрізняються між собою за будовою молекул.

Відсоток пригнічення проникності амідів інкубацією з сульфгідрильним реагентом зменшується відповідно до збільшення розмірів молекул, зокрема діаметру. Для диметилацетаміду, діаметр якого становить 4,2 Å він становить лише 28,5%. Коефіцієнт

канал повинні обмінювати ці зв'язки на водневі зв'язки зі стінками пори. На наш погляд, по-перше, немає підстав вважати, що енергії водневих зв'язків амідів та діолів з водою суттєво відрізняються. Так, для амідів енергія водневих зв'язків з водою становить $17,5-18$ кДж·моль⁻¹ [22]. Для діолів немає точних даних щодо цієї характеристики, але, враховуючи значення енергії водневих зв'язків для одноатомних спиртів, можна очікувати, що середня водневих зв'язків діолів з водою становить $16-17$ кДж·моль⁻¹ [23]. По-друге, якщо енергія водневих зв'язків для амідів і є дещо більшою, то це може бути лише додатковою підставою не розставатися із своєю гідратною оболонкою. Вирішальну роль, на наш погляд, тут відіграватимуть розміри водної пори. До того ж, отримані нами результати свідчать про те, що проникання як діолів, так і амідів, дотримуються однакових закономірностей: (1) проникання крізь водну пору обмежується розмірами молекул, зокрема діаметром: перевищення діаметром значення 4 \AA як для діолів, так і для амідів, значно зменшує пригнічення проникності сульфгідрильним реагентом; (2) проникність еритроцитів, оброблених рСМБС, як в низці діолів, так і в низці амідів, корелює з коефіцієнтами розподілу цих речовин між гідрофільною і гідрофобною фазами.

ПІДСУМОК

За розробленим нами методом [18,19] отримані величини коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини до речовин низки амідів, які задовільно узгоджуються з даними інших авторів. Так, коефіцієнт проникності для ацетаміду $(2,68 \pm 0,18) \cdot 10^{-6}$ практично збігається з даними роботи [21] $(2,76 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$. Такий же збіг спостерігається і для величини коефіцієнту проникності для етиленгліколю $(1,98 \pm 0,48) \cdot 10^{-6}$ (наші дані [17]) порівняно з $(2,07 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$ за даними [5]. В той же час для метилацетаміду отримана нами величина коефіцієнту проникності є суттєво більшою (в 1,5 рази), ніж в роботі [21]. Ці розбіжності можуть бути пов'язаними, по-перше, з розбіжностями для різних донорів, на яких наголошує Соломон. Наш досвід також підтверджує, що індивідуальні властивості донорів дають найбільший внесок в квадратичне відхилення від середнього значення. По-друге, коефіцієнти проникності є концентраційно залежними [5,21], тому не зовсім ясно, чи для даної речовини подані в літературі дані відповідають максимальній величині проникності в діапазоні насичення. Загалом же, порівняльний аналіз наших результатів з даними літератури дає підстави вважати, що узгодження є задовільним.

Виходячи з отриманих результатів, ми зробили висновок, що проникання досліджених нами речовин крізь мембрани еритроцитів відбувається двома альтернативними шляхами: водними порами, утвореними білковими структурами, та безпосереднім розчиненням в ліпідній фазі. Про це свідчать дані кореляційного аналізу між коефіцієнтами проникності нативних та оброблених сульфгідрильним реагентом еритроцитів та коефіцієнтами розподілу досліджених проникаючих речовин між гідрофільною та гідрофобною фазами. Проникання речовин крізь гідрофільні канали обмежується стеричними чинниками, зокрема діаметром молекул.

На відміну від нашої інтерпретації, Соломон [9] вважає, що після конформаційних змін білка смуги 3, що утворює пору, викликаних взаємодією з рСМБС, залишкова проникність розчинених речовин та води може бути пов'язана з тими ж каналами, але зростають стеричні обмеження, пов'язані з їх конформаційними перетвореннями. Якби це було так, зокрема для амідів та діолів, тоді меншого пригнічення зазнавали б менші за розмірами молекули. Але за нашими даними найбільшого пригнічення зазнають потоки саме малих гідрофільних неелектролітів, таких як ацетамід, етиленгліколь, 1,2-пропандіол, які у випадку нативних еритроцитів мають достатньо великі коефіцієнти проникності. В той же час менших змін зазнають коефіцієнти проникності тих речовин, молекули яких гірше проникають крізь мембрани нативних еритроцитів саме внаслідок стеричних обмежень (диметилацетамід, 1,3-пропандіол, триетиленгліколь), а також тих речовин, коефіцієнти розподілу яких між гідрофільною та гідрофобною фазами мають порівняно великі значення, (диметилацетамід, диметилформамід, 2,3- та 1,2-бутандіол). До того ж, на користь нашої інтерпретації свідчать дані про проникність штучних ліпідних бішарів до малих неелектролітів. За даними роботи [24] проникність БЛМ із суміші "фосфатидилхолін+холестерин" для ацетаміду і 1,4-бутандіолу становить $0,196 \cdot 10^{-6}$ та $0,2 \cdot 10^{-6}$ відповідно, що цілком задовільно, враховуючи залежність проникності БЛМ від їх ліпідного складу, узгоджується з нашими даними для еритроцитів, проінкубованих з рСМБС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Paganelli C.V., Solomon A.K. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane // J.Gen.Physiol.-1957.-V.41.-P.259-277.
2. Goldstein D.A., Solomon A.K. Determination of equivalent pore radius for human red cells by osmotic pressure measurement // J.Gen.Physiol.-1960.-V.44.-P.1-17.

3. Barton T.C., Brown D.A.J. Water permeability of the fetal erythrocyte // *J.Gen.Physiol.*-1964.-V.47.-P.839-849.
4. Solomon A.K. Characterization of biological membranes by equivalent pores // *J.Gen.Physiol.*-1968.-V.51.-P.335-364.
5. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interaction of hydrophilic alcohols and their effect on permeation // *BBA.*-1990.-V.1022.-P.57-71
6. Holz R., Finkelstein A. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B // *J.Gen.Physiol.*-1970.-V.56.-P.125-145.
7. Solomon A.K., Gary-Bobo C.M. Aqueous pores in lipid bilayers and red cell membranes // *BBA.*-1972.-V.225.-P.1019-1021.
8. DeKruiff B., Demel R.A. Polyene antibiotic sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes // *BBA.*-1974.-V.339.-P.57-70.
9. Solomon A.K. 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.N-Y Acad. Sci.1983.-V.414.-P.97-124.
10. Macey R.I., Farmer R.E.L. Inhibition of water and solute permeability in human red cells // *BBA.*-1970.-V.211.-P.104-106.
11. Brown P.A., Feinstein M.B., Sha'afi R.I. Membrane proteins related to water transport in human erythrocytes // *Nature.*-1975.-254.-P.523-525.
12. Naccache P., Feinstein M.B. Effect of pCMBS on water transfer across biological membranes // *J.Gen.Physiol.*-1974.-V.84.-P.449-456.
13. Sha'afi R.I., Feinstein M.B. Membrane water channels and SH-groups // In: *Advances in experimental medicine and biology.*-1977.-V.84.-P.67-80, Plenum Press, N-Y.
14. Ojcius D.M., Solomon A.K. Sites of p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of red cell urea and water transport // *BBA.*-1988.-V.942.-P.73-82.
15. Knauf P.A. Erythrocyte anion exchange and the band 3 protein: Transport kinetics and molecular structure // In: *Current topics in membrane transport.*-1979.-V.12.-P.249-363. Academic Press, N-Y.
16. Rao A. Disposition of the band 3 polypeptide in the human erythrocyte membrane // *J.Biol.Chem.*-1979.-V.254.-P.3503-3511.
17. Гордієнко О.І., Лінник Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів // *Вісник ХНУ.*2002.-.....-Біофіз.вісник, вип.....-С.
18. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Гордієнко Ю.Є., Коваленко І.Ф. Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин. Декл.патент на винахід N 41098A // *Бюл.*-2001.-7.
19. Gordienko E.A., Gordienko Yu.E., Gordienko O.I. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *Cryo Letters.* 2003 Jul-Aug;24(4):229-44.
20. Лінник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы карпов. I. Цитотоксичность диолов и амидов // *Пробл. криобиол.*-2001.-2.-С.72-79.
21. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in human red cell membrane: solute-membrane interactions of amides and ureas // *BBA.*-1991.-V.1063.-P.179-190.
22. Виноградов С. Структурные аспекты водородной связи в аминокислотах, пептидах, белках и модельных системах // В кн.: *Молекулярные взаимодействия.*-М.: Мир, 1984.-С.184-227.
23. Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов.-Л.: Химия, 1983.-265 с.
24. Finkelstein A. Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes // *J.Gen.Physiol.*-1976.-V.70.-P.127-145.