

УДК 577.352.4:611.018.51

## МЕХАНІЗМИ ПРОНИКАННЯ НЕЕЛЕКТРОЛІТІВ НИЗКИ ДІОЛІВ КРИЗЬ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ

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 8 липня 2002 р.

Методом, розробленим на підставі фізико-математичного моделювання процесу гіпотонічного гемолізу, визначені коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини до речовин низки діолів. Також вимірені коефіцієнти проникності мембран еритроцитів, модифікованих інкубацією з ртутним сульфгідрильним реагентом (pCMBS), що використовується для блокування білкових водних каналів. Показано, що проникність обумовлюється як гідрофільними (гідрофобними) властивостями молекул, так і їх геометричними параметрами.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** мембрани еритроцитів, проникність, діоли.

Плазматична мембрана клітини є ключовою структурою, за допомогою якої клітина відмежовується від зовнішнього середовища та взаємодіє з ним. Маючи селективну проникність до різних речовин, а також систему механізмів активного транспорту, вона забезпечує постійність складу внутрішньоклітинного середовища (гомеостаз), а також захищає клітину від дії негативних чинників зовнішнього середовища. Структурна організація та функціональні властивості біомембран в значній мірі визначаються властивостями окремих компонентів, що входять до їх складу, а також системою взаємодій між ними (ліпід-ліпідних, ліпід-білкових, білок-білкових, гідрофобних, електростатичних та ін.). Текучість ліпідного бішару залежить від вмісту ненасичених жирних кислот, що мають подвійні зв'язки, а також від вмісту в ньому холестерину. З текучістю мембран тісно пов'язана як активність багатьох мембранних ферментів, так і їх пасивна проникність [1].

Різними біохімічними та біофізичними методами встановлено, що велика кількість мембранних білків має олігомерну структуру. Олігомерність в будові мембранних білків має функціональне значення. Так, для транспорту йонів крізь мембрану необхідно утворення гідрофільного шляху (пори). Енергетично є найбільш вигідним утворення такого шляху за допомогою трансмембранних одиниць, поєднаних в олігомери. Прикладом такого трансмембранного білка в еритроцитах може бути білок полоси 3, який здійснює обмін зовнішнього  $\text{Cl}^-$  на внутрішній  $\text{HCO}_3^-$ . В нативній формі цей білок існує у вигляді димера, утвореного за допомогою дисульфідних зв'язків. Деякі автори вважають, що в мембрані він може бути в тетрамерній формі і перетинає мембрану п'ять або навіть дев'ять разів [2]. Відомо, що саме з цим білком зв'язуються органічні ртутні сульфгідрильні реагенти такі, як пара-хлормеркурійбензоат натрію (pCMB), або його сульфатний похідний (pCMBS) [3,4]. Була також висловлена думка [5], що інкубація еритроцитів з такими реагентами призводить до блокування білкових водних шляхів, залишаючи лише ліпідні шляхи проникання води крізь мембрани еритроцитів. Цей висновок автори зробили, порівнявши енергії активації переносу води крізь мембрани еритроцитів до і після інкубації з pCMBS. Енергія активації проникання води після обробки еритроцитів цим сульфгідрильним реагентом була такою ж, як і для ліпідних везикул [5,6]. В роботі [3] показано, що pCMBS пригнічує транспорт води та мочевины через зв'язування з білком полоси 3. Автори роблять висновок, що утворені білками йонні канали є також одним із шляхів для проникання молекул води та малих неелектролітів.

В нашій роботі ми вивчали проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низки діолів. Напрямок наших досліджень був обумовлений, по перше, можливістю порівняння фізико-хімічних властивостей молекул в гомологічних рядах та серед структурних ізомерів і з'ясування впливу цих властивостей на їх проникність крізь біологічні мембрани. З практичної точки зору такий вибір був визначений широким застосуванням окремих діолів в кріобіологічній практиці.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для дослідження було обрано низку полярних неелектролітів: етандіол (етиленгліколь), два структурні ізомери пропандіолу (1,2-пропандіол та 1,3-пропандіол), чотири структурних ізомера бутандіолу (1,2-, 1,3-,

2,3- та 1,4-бутандіол) і ді- та триетиленгліколь. Всі перелічені препарати були марки "хч" або "ч.д.а.", додатково очищені, а їх якість контролювалась загальноприйнятими методами [7]. Геометричні параметри молекул розраховували на основі моделей Стьюарта [8] за комп'ютерною програмою "Nurel Chem Pro v.5.1"

Коефіцієнти проникності визначали розробленим нами методом [9], який ґрунтується на фізико-математичній моделі гемолізу в водних розчинах проникаючої речовини [10]. Кінетику гемолізу реєстрували методом малокутового розсіювання світла з довжиною хвилі 1000 нм. Інтенсивність розсіяного суспензією еритроцитів світла вимірювали під кутом 9° до напрямку падаючого пучка.

В якості блокатора водних каналів використовували р-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt фірми SIGMA (надалі позначатимемо рCMBS). Обробку еритроцитів блокатором проводили за рекомендаціями, наданими в роботі [6], тобто інкубацією з 2 мМ рCMBS впродовж 1 години при 22 °С. Після інкубації еритроцити відмивали фосфатним буфером рН 7,4. Вимірювання коефіцієнтів проникності здійснювали при температурі 20 °С

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень були отримані коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для перелічених речовин в нативному стані та після інкубації клітин з сульфгідрильним реагентом (рCMBS). Результати експериментів, структурні формули та розраховані геометричні параметри молекул подані в табл.1. В таблиці також представлені отримані нами раніше дані щодо коефіцієнту розподілу досліджуваних речовин в системі "октанол-вода" ( $K_p$ ), котрий є показником гідрофобності (гідрофільності) молекул цих речовин [11].

Табл.1. Вплив коефіцієнту розподілу та геометричних параметрів молекул діолів 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 рCMBS		D, Å	L, Å	V, Å <sup>3</sup>
Етиленгліколь (етандіол)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	1,98±0,48	0,526±0,092	0,04	2,6	5,2	27,6
Діетиленгліколь	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	0,421±0,045	0,271±0,037	-	4,3	7,2	95,0
Триетиленгліколь	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	0,162±0,044	0,14 ±0,002	-	4,4	10,4	158
1,2-пропандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	1,6 ±0,24	0,664±0,18	0,076	3,7	5,0	53,7
1,3-пропандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	0,897±0,3	0,572±0,057	0,064	4,1	5,7	75,2
1,4-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	0,979±0,292	0,646±0,141	0,137	4,0	7,4	92,9
1,3-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	1,89 ±0,18	1,01 ±0,27	0,182	3,6	6,0	61,0
2,3-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	2,64 ±0,22	1,69 ±0,22	0,227	3,9	5,8	69,2
1,2-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	2,89 ±0,11	2,67 ±0,3	0,308	4,3	6,1	88,5

Примітка: Вірогідність різниці між коефіцієнтами проникності нативних еритроцитів та еритроцитів, проінкубованих з рCMBS, для всіх речовин, крім триетиленгліколю, >0,999; для триетиленгліколю різниця не вірогідна.

Як видно з представлених даних немає, прямої залежності коефіцієнтів проникності від одного з параметрів (геометричного або фізико-хімічного). Так, залежність коефіцієнта проникності ( $P$ ) від коефіцієнта розподілу між водою та гідрофобною фазою ( $K_p$ ) має вигляд, представлений на рис.1. Якщо умовно поділити досліджені речовини на дві групи: групу гідрофільних речовин та групу відносно гідрофобних речовин, то звертає на себе увагу права гілка кривої, котра містить дані для структурних ізомерів бутандіолу. Цікаво, що аналогічні коефіцієнти проникності для бутандіолів (крім 1,2-бутандіола) були отримані в роботі [12]. Автори цієї роботи розглядають отримані ними дані у світлі моделі водної пори. При цьому характеристики, одержані для одного з ізомерів (2,3-бутандіолу), руйнують струнку картину приведених авторами міркувань. Вони називають їх аномальними, оскільки коефіцієнт тертя між мембраною та речовиною, розрахований ними з експериментальних даних, є меншим, ніж для 1,2-пропандіолу, а коефіцієнт проникності - більшим, всупереч очікуваному авторами в зв'язку з додаванням групи  $-CH_3$ . Але якщо вважати, що проникання бутандіолів здійснюється крізь ліпідну фазу (на підставі отриманих нами даних щодо коефіцієнтів розподілу в системі "октанол-вода"), то протиріччя зникають. Маємо для ізомерів бутандіолу чітку залежність між коефіцієнтом проникності крізь мембрани еритроцитів та коефіцієнтом розподілу між гідрофобним та гідрофільним середовищем. Коефіцієнт кореляції для наших даних становить 0,927. Аналогічно високим він є і для коефіцієнтів проникності, отриманих Соломоном ( $r=0,84$ ), які досить задовільно збігаються з нашими величинами. Якщо ж додати, що коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності до ізомерів бутандіолу, отриманих нами для еритроцитів, проінкубованих з рСМБС, і коефіцієнтами розподілу становить 0,996 (графік 2 на рис.1), то версія проникання бутандіолів крізь ліпідну фазу видається вкрай імовірною. З другого боку, той факт, що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом приводить до достатньо значного пригнічення проникання бутандіолів, свідчить про те, що білкові водні шляхи є також доступними для них.

Якщо звернутись до даних щодо розмірів молекул бутандіолів, то їх вплив на коефіцієнти проникності є не таким прозорим. Немає кореляції між коефіцієнтами проникності нативних клітин та діаметрами молекул бутандіолів ( $r=0,36$ ). Коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності клітин, оброблених рСМБС та діаметрами молекул є також не дуже великим ( $r=0,68$ ). Очевидно, що для низки ізомерів бутандіолу більш впливовим чинником щодо коефіцієнтів проникності є коефіцієнт розподілу між водою та гідрофобною фазою. Але, якщо оцінити кореляцію між відсотком пригнічення проникності після обробки сульфгідрильним реагентом та діаметром молекул ( $r=-0,957$ ), то отриманий коефіцієнт кореляції однозначно підтверджує припущення про існування двох альтернативних шляхів проникання.

Аналіз даних для групи гідрофільних речовин (етиленгліколь, 1,2-пропандіол, 1,3-пропандіол) (ліва гілка кривої 1 та табл.1), показує, що проникність етиленгліколю та пропандіолів визначається як їх гідрофільністю, так і розмірами. Коефіцієнт кореляції між проникністю цих речовин та діаметром і об'ємом молекул становить 0,9 та 0,97 відповідно. Очевидно, що в зв'язку з високою гідрофільністю цих неелектролітів проходження їх крізь водні пори є більш прийнятним, і тому зрозумілим стає така сильна залежність від розмірів молекули. Цікавим є той факт, що незважаючи на майже однакові коефіцієнти розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазою ізомерів пропандіолу, коефіцієнт проникності для 1,2-пропандіолу більше ніж в два рази перевищує коефіцієнт проникності для 1,3-пропандіолу, а після інкубації з рСМБС вони відрізняються лише

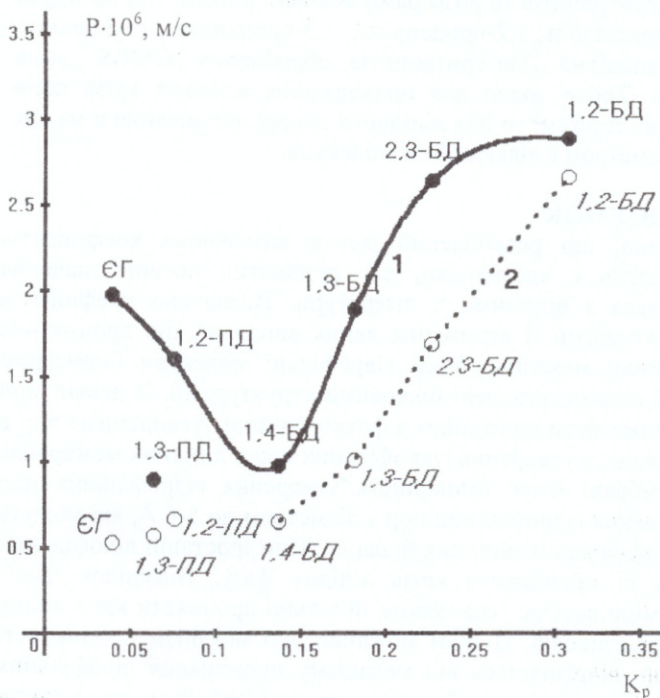


Рис. 1. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул діолів від коефіцієнту розподілу цих речовин в системі "октанол-вода"

● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з рСМБС

в 1,3 рази. Інкубація еритроцитів з сульфгідрильним реагентом пригнічує проникність 1,2-пропандіолу на 58%, а 1,3-пропандіолу лише на 36,3%. Це означає, що різниця в розмірах молекул цих ізомерів приводить до значного зменшення проникності 1,3-пропандіолу по водних каналах, а висока гідрофільність перешкоджає проходженню крізь ліпідну фазу. Таким чином, перехід від діаметру 3,7 Å для 1,2-пропандіолу до діаметра 4,1 Å для 1,3-пропандіолу є критичним для проходження крізь пору. Цей висновок підтверджується також даними для ізомерів бутандіолу. Відсоток пригнічення проникності після обробки сульфгідрильним реагентом різко зменшується для 1,2-бутандіолу (діаметр молекули 4,3 Å) і становить лише 7,6% в порівнянні з іншими ізомерами бутандіолу, для яких він становить 34-47% (діаметри молекул є 3,6 Å, 3,9 Å та 4,0 Å для 1,3-, 2,3- та 1,4-бутандіолу відповідно). Це проявляється також в значному зменшенні нахилу кривої 1 при переході від 2,3-бутандіолу до 1,2-бутандіолу (рис.1). Якщо взяти до уваги оцінку розмірів пори, утвореної білком полоси 3, яку дає Соломон (радіус еквівалентної пори 6,5 Å), і те, що молекула може проникати крізь пору разом з гідратною оболонкою, що збільшує розмір молекули приблизно вдвічі [12], можна вважати, що наша оцінка розміру пори цілком задовільно збігається з даними Соломона.

Порівняння коефіцієнтів проникності в низці: етиленгліколь-діетиленгліколь-триетиленгліколь приводить до тих же висновків. Так, коефіцієнт проникності різко зменшується від етиленгліколю ( $D=2,6$  Å) до діетиленгліколю ( $D=4,1$  Å). Обробка еритроцитів рСМБС різко зменшує проникність для етиленгліколю (на 77%), яка в нормі є порівняно високою. Таким чином можна сказати, що етиленгліколь проникає крізь мембрану еритроциту в основному крізь водні пори. Для діетиленгліколю, діаметр молекули якого співпадає з діаметром 1,3-пропандіолу (4,1 Å) пригнічення проникності становить лише 35,6 %, тобто є таким же, як для 1,3-пропандіолу (36,3%). Коефіцієнти проникності діетиленгліколю як для нативних еритроцитів, так і для проінкубованих з сульфгідрильним реагентом є меншим за коефіцієнти проникності 1,3-пропандіолу в 2,1 рази. Можливо це пояснюється тим, що при співпадінні діаметрів цих молекул довжина і об'єм діетиленгліколю суттєво перевищують ці параметри для 1,3-пропандіолу. Що ж до триетиленгліколю, то він має коефіцієнт проникності більш ніж на порядок нижчий, ніж етиленгліколь, а обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом не впливає на його величину. Тобто можна з впевненістю сказати, що молекули триетиленгліколю не проникають крізь водні пори. Коефіцієнти кореляції між коефіцієнтом проникності нативних еритроцитів та розмірами молекул в низці гідрофільних речовин (етиленгліколь, діетиленгліколь, триетиленгліколь, 1,2-пропандіол, 1,3-пропандіол) становлять -0,89 та -0,926 для діаметра та об'єма молекул відповідно. Для еритроцитів, оброблених рСМБС, вони становлять -0,5 для діаметра і -0,927 для об'єма. Тобто, якщо для проходження молекул крізь пори значущими параметрами є як діаметр молекули, так і її об'єм, то для ліпідного шляху проникання в межах досліджених величин значущим геометричним параметром є тільки об'єм молекули.

### ПІДСУМОК

В результаті проведених досліджень показано, що розроблений метод визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до неелектролітів є адекватним, дає прийнятні, достовірні значення коефіцієнтів проникності, які задовільно збігаються з відомими з літератури. Визначено коефіцієнти проникності для низки полярних біфільних неелектролітів. З отриманих даних випливає, що проникання речовин крізь мембрану еритроцитів має подвійний механізм. Малі гідрофільні молекули (діаметром приблизно до 4 Å) вільно проникають крізь водні канали, утворені білковими структурами. В деякій мірі вони проникають також і крізь ліпідну фазу. Це може бути пов'язаним з флуктуаційним утворенням пор в ліпідних бішарах. В роботі [13] проведено аналіз процесу утворення гідрофільних пор в ліпідних мембранах і показано, що в двокомпонентній ліпідній мембрані існує ймовірність утворення гідрофільних пор діаметром до 10 Å. Але найбільш імовірним є існування гідрофільних пор з діаметром до 5-6 Å, які можуть бути відповідальними за водну проникність немодифікованих ліпідних бішарів. При зростанні ліпофільних властивостей молекул збільшується ймовірність їх проникання крізь ліпідну фазу. Внаслідок цього проникність такої молекули, як 1,2-бутандіол, розміри якої не дозволяють їй вільно проникати крізь водну білкову пору, навіть перевищує проникність етиленгліколю. Цілком можливо, що механізм проникності малих гідрофільних молекул крізь ліпідний бішар, відрізняється від механізму проникання ліпофільних молекул шляхом розчинення безпосередньо в ліпідній фазі. Але в обох цих випадках розмір молекули також може впливати на коефіцієнт проникності. В першому випадку через обмеження розмірів флуктуаційних гідрофільних пор, в другому - внаслідок залежності енергії переходу з однієї фази в іншу від площі поверхні молекули. Для біфільних молекул важливу роль тут можуть відігравати енергії внутрішньо- та міжмолекулярних водневих зв'язків.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кравцов А.В., Алексенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. - Киев: Наукова думка, 1990.-176 с.
2. Гелетюк В.И., Казаченко В.И. Кластерная организация ионных каналов. - М.: Наука, 1990.-224 с.
3. 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/
4. Ralston G.B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane// BBA.-1981.-V.649.- P.98-104.
5. Macey R.I., Farmer R.E.L. Inhibition of water and solute permeability in human red cells// BBA.-1970.-V.211.-P.104-107/
6. Conlon T., Outhred R. The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability// BBA.-1978.-V.511.-P.408-418/
7. Карапетян Ю.А., Эйчис В.И. Физико-химические свойства электролитных неводных растворов. - М: Химия, 1989.-252 с.
8. Физер Л., Физер М. Органическая химия. т.1.-М:Химия.-1970.-688с.
9. Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов//Вісник ХДУ, 1988.-408.-Біофіз.вісник, вип.2.-С.59-63.
10. Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф.,Панина Ю.Е. Фізико-математична модель та експериментальне вивчення явища гіпотонічного гемолізу//Доповіді НАН Укр.,1998.-11.-С.173-176.
11. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы карпов.1.Цитотоксичность диолов и амидов// Пробл.криобиол.-2001.-2.-С.72-79.
12. 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.
13. Маркин В.С., Козлов М.М. Статистика пор в бислоиных липидных мембранах//Биол.мембр.-1985.-2,12.-С.205-223.