Probl Cryobiol Cryomed 2017; 27(1): 19–28
https://doi.org/10.15407/cryo27.01.019
оригінальне дослідження research article

УДК 57.043:577.352

О.І. Гордієнко*, І.Ф. Коваленко

Вплив температури та іонної сили середовища на поверхневий потенціал еритроцитів людини

UDC 57.043:577.352

O.I. Gordiyenko*, I.F. Kovalenko

Influence of Temperature and Ionic Strength of Medium on Surface Potential of Human Erythrocytes

Реферат: Одним із наслідків впливу іонної сили позаклітинного середовища, а, отже, і внутрішньоклітинного, при заморожуванні клітинних суспензій є зміна мембранного потенціалу клітин, які знаходяться в цьому середовищі. В роботі розраховані температурні та концентраційні залежності поверхневого потенціалу еритроцитів людини в процесі заморожування клітинної суспензії в точках, які відповідають значенням температури та концентрації 1:1-електроліту згідно з фазовою діаграмою бінарної системи вода-NaCl. Визначено концентрації іонів натрію на поверхні еритроцитів залежно від концентрації об'ємного розчину та температури. Показано, що концентрація іонів натрію на поверхні клітин в 1,5 рази перевищує таку в об'ємному розчині. Особливу увагу привертає перегин температурної залежності поверхневого потенціалу еритроцитів людини для концентрацій 1:1-електроліту 0,15 та 0,3 М за температур 8…12°С. Така особливість температурної залежності поверхневого потенціалу, розрахованого для зарядженої поверхні з певною щільністю поверхневих зарядів із суто фізичних міркувань без врахування структури та складових цієї поверхні, може бути однією з причин перебудов у мембрані за цих температур. Порушення балансу електростатичних взаємодій на поверхні зовнішнього моношару мембрани через збільшення концентрації протиіонів на поверхні клітин і відповідно зменшення поверхневого потенціалу може бути «пусковим механізмом» перебудов і зміни взаємодій між білковими і ліпідними компонентами мембрани.

Ключові слова: еритроцити, охолодження, поверхневий потенціал, поверхнева концентрація іонів.

Реферат: Одним из следствий влияния ионной силы внеклеточной среды, а, следовательно, и внутриклеточной при замораживании клеточных суспензий является изменение мембранного потенциала клеток, находящихся в этой среде. В работе рассчитаны температурные и концентрационные зависимости поверхностного потенциала эритроцитов человека в процессе замораживания клеточной суспензии в точках, соответствующих значениям температуры и концентрации 1:1-электролита согласно фазовой диаграмме бинарной системы вода-NaCl. Определены концентрации ионов натрия на поверхности эритроцитов в зависимости от концентрации объемного раствора и температуры. Показано, что концентрация ионов натрия на поверхности клеток в 1,5 раза превышает таковую в объемном растворе. Обращает на себя особое внимание перегиб температурной зависимости поверхностного потенциала эритроцитов человека для концентраций 1:1-электролита 0,15 и 0,3 М в диапазоне температур 8…12°С. Такая особенность температурной зависимости поверхностного потенциала, рассчитанного для заряженной поверхности с определенной плотностью поверхностных зарядов из чисто физических соображений без учета структуры и состава этой поверхности, может быть одной из причин перестроек в мембране при этих температурах. Нарушение баланса электростатических взаимодействий на поверхности внешнего монослоя мембраны вследствие увеличения концентрации противоионов на поверхности клеток и соответственно уменьшения поверхностного потенциала может быть «пусковым механизмом» перестроек и изменений взаимодействий между белковыми и липидными компонентами мембраны.

Ключевые слова: эритроциты, охлаждение, поверхностный потенциал, поверхностная концентрация ионов.

Abstract: During freezing of cell suspensions the ionic strength of extracellular and, subsequently, intracellular media is responsible for the changes in membrane potential of cells. In this research we revealed the temperature and concentration dependencies of the surface potential of human erythrocytes during freezing of the cell suspension at the points corresponding to the values of temperature and 1:1 concentration of the electrolyte according to the phase diagram of a water-NaCl binary system. The concentrations of sodium ions on the surface of erythrocytes depending on concentration and temperature of the bulk solution were determined. It has been shown that the concentration of sodium ions on the surface of cells was 1.5 times higher than that in the bulk solution. The kink of surface potential temperature dependence for human erythrocytes for 0.15 and 0.3 M concentrations of 1:1 electrolyte within 8...12°C temperature range was of special interest. This temperature dependence feature of the surface potential calculated for the charged surface with a particular surface charge density from the purely physical considerations without taking into account the structure and composition of the surface could be one of the causes of rearrangements in membrane at these temperatures. Misbalance of electrostatic interactions on the surface of membrane outer monolayer appeared as a result of an increased concentration of counterions on the surface of cells and correspondingly the reduced surface potential might trigger the rearrangements and changes in relationships between membrane protein and lipid components.

Key words: erythrocytes, cooling, surface potential, surface concentration of ions.

Відділ низькотемпературного консервування, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла 20.12.2016
Прийнята до друку 10.01.2017

Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.:+380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Received December, 20, 2016
Accepted January, 10, 2017

© 2017 O.I. Gordiyenko et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Наразі загальноприйнятим є уявлення про те, що найбільш суттєві чинники кріопошкодження клітин безпосередньо або опосередковано пов'язані з утворенням і ростом кристалів льоду у клітинній суспензії, що заморожується. Існування оптимальної швидкості охолодження пояснюється двохфакторною теорією кріопошкодження Мейзура [11], згідно з якою на збереженість клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи кріопошкоджень. Перший виникає при кристалізації позаклітинного середовища і спричинюється зневодненням клітин, підвищенням концентрації та іонної сили поза- та внутрішньоклітинних розчинів за рахунок перетворення частини води у лід. Другий тип кріопошкодження клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, яке викликає ті ж самі ефекти і крім того призводить до механічного руйнування мембранних структур. Пошкоджуючий вплив гіпертонічного середовища має багатофакторний характер. Це може бути безпосередній вплив гіпертонічних розчинів на мембрани клітин (ліотропна дія) або пошкодження, пов'язані з осмотичними чинниками, зокрема, це критичне зменшення клітинного об'єму.

Одним із наслідків впливу іонної сили позаклітинного середовища, а, отже, і внутрішньоклітинного, є зміна мембранного потенціалу клітин, які знаходяться в цьому середовищі. Статичні електричні поля в мембранах клітин характеризуються поверхневим (φ_s), дипольним (φ_d) і трансмембранним (φ_t) потенціалами [7], які відрізняються походженням і локалізацією. Поверхневий потенціал генерується зарядженими групами голівок фосфоліпідів і адсорбованими іонами на поверхні розділу мембрана-вода. Він вимірюється між мембранною поверхнею і об'ємною водою та тісно пов'язаний з pH на межі поділу. Дипольний потенціал походить від упорядкованих диполів ліпідів (ефірних груп і біполярних груп голівок) та упорядкованих водних молекул. Він локалізується між мембранною поверхнею і центральною гідрофобною частиною подвійного шару. Трансмембранний потенціал генерується різницею концентрацій іонів із двох сторін бішару і вимірюється через усю його довжину [8].

Мета роботи – розрахунок поверхневого потенціалу еритроцитів та концентрації іонів Na^+ біля їх поверхні у шарі Штерна-Гельмгольца залежно від температури середовища та концентрації 1:1-електроліта в об'ємному розчині.

Фізико-математична модель

Розглянемо вплив концентрації позаклітинного розчину на поверхневий потенціал клітин на прикладі еритроцитів людини. Рівняння Пуассона-Больцмана визначає електростатичний потенціал

Nowadays there is a generally accepted conception that cell cryodamage is a direct or indirect result of the formation and growth of ice crystals in freezing cell suspension. The existence of optimal cooling rate is explained by the two-factor theory of cryodamage by P. Mazur [10], whereby the cell survival following crystallization of cell suspension is affected by two types of cryoinjuries. First one acts during crystallization of extracellular medium and is caused by dehydration of cells, an increase in concentration and ionic strength of extra- and intracellular solutions through the transformation of water into ice. The second type of cryoinjury of cells is stipulated by the formation of intracellular ice crystals, which causes the same effects and moreover leads to mechanical destruction of membrane structures. Damaging effect of hypertonic medium is of a multifactor nature. This may be either a direct effect of hypertonic solutions on cell membranes (lyotropic action) or a damage caused by osmotic factors, including the critical reduction of cell volume.

One of the consequences of ionic strength extracellular medium effect and, consequently, intracellular one, is a change in membrane potential of cells being in this environment. Static electric fields in cell membranes are characterized by surface (φ_s), dipole (φ_d) and transmembrane (φ_t) potentials [1], which differ in origin and localization. The surface potential is generated by charged groups of phospholipid heads and adsorbed ions at the membrane-water interface. It is measured between the membrane surface and bulk water and is closely related with the pH at the interface. The dipole potential is originated from ordered dipoles of lipids (ether groups and bipolar groups of heads) and ordered water molecules. It is localized between the membrane surface and central hydrophobic part of bilayer. Transmembrane potential is generated by the difference in concentrations of ions on both sides of bilayer and is measured across its entire length [4].

The research purpose was to calculate the surface potential of erythrocytes and concentration of Na^+ ions near their surface in the Stern-Helmholtz layer depending on the medium temperature and concentration of 1:1 electrolyte in bulk solution.

Physical-mathematical model

Let's consider the effect of concentration of extracellular solution on cell surface potential taking human erythrocytes as an example. Poisson-Boltzmann equation determines the electrostatic potential φ, the electric field $E = \frac{\partial \varphi}{\partial x}$ and the concentration of counterions ρ_i at any distance x from the surface [8]:

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{ze\rho_i}{\varepsilon\varepsilon_0} = -\left(\frac{ze\rho_0}{\varepsilon\varepsilon_0}\right)e^{-\frac{ze\varphi}{kT}}, \qquad (1)$$

φ, електричне поле $E = \frac{\partial \varphi}{\partial x}$ і концентрацію протиіонів ρ_i на будь-якій відстані x від поверхні [10]:

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{ze\rho_i}{\varepsilon\varepsilon_0} = -\left(\frac{ze\rho_0}{\varepsilon\varepsilon_0}\right)e^{-\frac{ze\varphi}{kT}}, \qquad (1)$$

де ρ – числова щільність іонів із валентністю z у точці x; ε_0 – діелектрична проникність вакууму; ε – відносна діелектрична проникність середовища; k – стала Больцмана; T – абсолютна температура.

Щільність протиіонів на поверхні визначається за формулою [10]:

$$\rho_0 = \rho_\infty + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}, \qquad (2)$$

де ρ_∞ – щільність протиіонів в об'ємному розчині.

З формули (2) видно, що концентрація протиіонів на поверхні залежить тільки від поверхневої щільності заряду σ і концентрації протиіонів в об'ємному розчині. Отже, для ізольованої поверхні величина ρ_0 ніколи не може бути меншою за $\frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}$.

Розглянемо розподіл іонів поблизу ізольованої поверхні в контакті з розчином електроліту. Якщо записати повну щільність заряду в будь-якій точці x як $\sum_i z_i e\rho_{xi}$, а повну концентрацію іонів (числову щільність) – як $\sum_i \rho_{xi}$, то розподіл Больцмана для іонів i в точці x буде мати вигляд

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{-\frac{z_i e\varphi_x}{kT}}, \qquad (3)$$

а на поверхні (при $x = 0$) значення щільності ρ і потенціалу φ зв'язані відношенням

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{-\frac{z_i e\varphi_0}{kT}}, \qquad (4)$$

де $\rho_{\infty i}$ – концентрація i-x іонів в об'ємі розчину (при $x = \infty$), де $\varphi_\infty = 0$.

Наприклад, для розчину Na^+Cl^- можна записати

$$[Na^+]_0 = [Na^+]_\infty e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}}; [Cl^-]_0 = [Cl^-]_\infty e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}}, \qquad (5)$$

де $[Na^+]_0$, $[Cl^-]_0$ – концентрація іонів натрію/хлору на поверхні еритроцитів; $[Na^+]_\infty$, $[Cl^-]_\infty$ – концентрація іонів в об'ємному розчині. Величини у квадратних дужках, наприклад $[Na^+]$, виражені в деяких зручних одиницях концентрації, наприклад в М (1 М = 1моль/л), і відповідають $\rho = 6{,}022\times10^{26}$ м$^{-3}$, де $6{,}022\times10^{23}$ – число Авогадро, а множник 10^3 – для переходу від кубічних метрів до літрів.

where ρ is the numerical density of ions with the valence z at point x; ε_0 denotes dielectric permeability of vacuum; ε is the relative dielectric constant of medium; k is Boltzmann constant; T is an absolute temperature.

Counterions density on the surface is determined by the next formula [8]:

$$\rho_0 = \rho_\infty + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}, \qquad (2)$$

where ρ_∞ is density of counterions in the bulk solution.

The formula (2) shows that the concentration of counterions on the surface depends only on the surface charge density σ and concentration of counterions in the bulk solution. Thus, for the isolated surface the ρ_0 value never may be less than $\frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}$.

Let's consider the distribution of ions near the isolated surface in contact with the electrolyte solution. If we record the full charge density in any point x as $\sum_i z_i e\rho_{xi}$ and full concentration of ions (numerical density) as $\sum_i \rho_{xi}$, the Boltzmann distribution for ions i at point x will look as:

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{-\frac{z_i e\varphi_x}{kT}}, \qquad (3)$$

and on the surface (at $x = 0$) the density value ρ and potential φ will be associated via the ratio

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{-\frac{z_i e\varphi_0}{kT}}, \qquad (4)$$

where $\rho_{\infty i}$ is the concentration of i-th ions in the bulk solution (at $x = \infty$), where $\varphi_\infty = 0$.

For example, for the case of Na^+Cl^- solution we can write

$$[Na^+]_0 = [Na^+]_\infty e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}}; [Cl^-]_0 = [Cl^-]_\infty e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}}, \qquad (5)$$

where $[Na^+]_0$, and $[Cl^-]_0$ are concentrations of sodium/chloride ions on the surface of erythrocytes; $[Na^+]_\infty$, $[Cl^-]_\infty$ are the concentrations of ions in the bulk solution. Values in square brackets, such as $[Na^+]$, are expressed in some proper concentration units, such as M (1 M = 1 mol/L), and correspond to the concentration of $\rho = 6.022\times10^{26}$ m^{-3}, where $6.022\times\times10^{23}$ denotes Avogadro's number, and 10^3 multiplier is used for the transition from cubic meters to liters.

Full concentration of ions near isolated surface with charge density σ according to the formula (2) equals to

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}, \qquad (6)$$

Повна концентрація іонів біля ізольованої поверхні зі щільністю заряду σ за формулою (2)

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}\ , \qquad (6)$$

звідки можна отримати співвідношення між щільністю поверхневого заряду σ і поверхневим потенціалом φ_0:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i}\right). \qquad (7)$$

Для еритроцитів щільність поверхневого заряду $\sigma = -1{,}31\times10^{-2}$ Кл/м^2 [12]. Або $1{,}31\times10^{-2}$ Кл$\times$ $\times$м$^{-2}$/$1{,}602\times10^{-19}$ Кл $= 0{,}82\times10^{17}$ зарядів/м^2 $= 0{,}082$ зарядів/нм^2, тобто один елементарний заряд на 12,2 нм^2. Враховуючи те, що площа поверхні еритроцита дорівнює $\sim 140\times10^{-12}$м^2 (або 14×10^7 нм^2), маємо $\sim10^7$ зарядів на поверхні еритроцитів.

Співвідношення між щільністю поверхневого заряду σ і поверхневим потенціалом φ_0 для розчину *NaCl* отримуємо, підставляючи рівняння (4) у (6):

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times\left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i}\right) = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times$$
$$\times\left\{\left[Na^+\right]_\infty e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + \left[Cl^-\right]_\infty e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - \left[Na^+\right]_\infty - \left[Cl^-\right]_\infty\right\} =$$
$$= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times\left\{\left[Na^+\right]_\infty\left(e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2\right)\right\} =$$
$$= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times\left\{[NaCl]\times\left(e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}}\right) - 2\times[NaCl]\right\}. \quad (8)$$

Підставляючи значення щільності поверхневого заряду для еритроцитів людини $\sigma = -1{,}31\times10^{-2}$ [12], маємо залежність поверхневого потенціалу від температури T та концентрації хлористого натрію у середовищі [*NaCl*]:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\left[Na^+\right]_\infty\left(e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2\right) =$$
$$= (1{,}31\times10^{-2})^2 = 1{,}7161\times10^{-4}. \qquad (9)$$

Позначивши постійну величину $2\varepsilon\varepsilon_0 k(N_A\times10^3) =$ $= 117{,}8132\times10^{-7} = a$ (множник $N_A\times10^3$ з'являється для переходу вираження концентрації у моль/л), а величину $10^3\times k/e = 0{,}0862 = b$ (множник 10^3 з'являється, оскільки φ виражаємо у мілівольтах), отримуємо

$$\sigma^2 = 1{,}7161\times10^{-4} = (aT)\times[NaCl]\times\left(e^{-\frac{\varphi_0}{bT}} + e^{+\frac{\varphi_0}{bT}} - 2\right) =$$
$$= aT\times[NaCl]\times\left(e^{-\frac{\varphi_0}{bT}} + e^{+\frac{\varphi_0}{bT}}\right) - 2aT\times[NaCl]. \quad (10)$$

where from one can get the ratio between surface charge density σ and surface potential φ_0:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i}\right). \qquad (7)$$

For erythrocyte the surface charge density makes $\sigma = -1.31\times10^{-2}$ C/m^2 [11]. Or 1.31×10^{-2} C$\times$m^{-2}/ 1.602×10^{-19} C $= 0.82\times10^{17}$ charges/m^2 $= 0.082$ charges/ nm^2, *i. e.* one elementary charge per 12.2 nm^2. Taking into account that the erythrocyte surface area makes $\sim140\times10^{-12}$m^2 (or 14×10^7 nm^2) we have $\sim10^7$ charges on the surface of erythrocytes.

The ratio between the surface charge density σ and surface potential φ_0 for NaCl solution could be obtained after substituting equation (4) to (6):

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times\left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i}\right) = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times$$
$$\times\left\{\left[Na^+\right]_\infty e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + \left[Cl^-\right]_\infty e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - \left[Na^+\right]_\infty - \left[Cl^-\right]_\infty\right\} =$$
$$= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times\left\{\left[Na^+\right]_\infty\left(e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2\right)\right\} =$$
$$= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\times\left\{[NaCl]\times\left(e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}}\right) - 2\times[NaCl]\right\}. \quad (8)$$

Considering the density of surface charge for human erythrocytes as $\sigma = -131\times10^{-2}$ [11] a dependence of surface potential on temperature T and the concentration of sodium chloride in the medium [*NaCl*] became as follows:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT\left[Na^+\right]_\infty\left(e^{-\frac{e\varphi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\varphi_0}{kT}} - 2\right) =$$
$$= (1.31\times10^{-2})^2 = 1.7161\times10^{-4}. \qquad (9)$$

By marking a constant $2\varepsilon\varepsilon_0 k\times(N_A\times10^3) =$ $= 117{,}8132\times10^{-7} = a$ (a multiplier $N_A\times10^3$ appears to transit to concentration in mol/L), and the value $10^3\times$ $\times k/e = 0{,}0862 = b$ (10^3 multiplier appears as we express φ in millivolts), we get

$$\sigma^2 = 1{,}7161\times10^{-4} = (aT)\times[NaCl]\times\left(e^{-\frac{\varphi_0}{bT}} + e^{+\frac{\varphi_0}{bT}} - 2\right) =$$
$$= aT\times[NaCl]\times\left(e^{-\frac{\varphi_0}{bT}} + e^{+\frac{\varphi_0}{bT}}\right) - 2aT\times[NaCl]. \quad (10)$$

Thus we have

$$\sigma^2 = 1{,}7161\times10^{-4} = 2aT[NaCl]\times$$
$$\times\cosh(\varphi_0/bT) - 2aT[NaCl] \qquad (11)$$

or

$$(\sigma^2 + 2aT[NaCl])/2aT[NaCl] = \cosh(\varphi_0/bT), \quad (12)$$

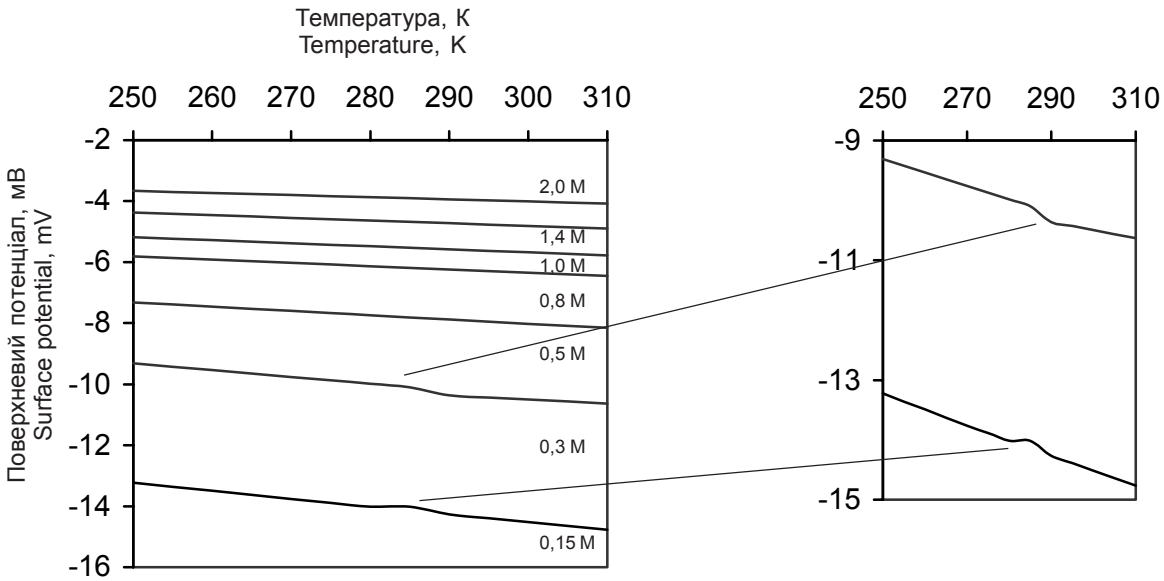

Рис. 1. Температурна залежність поверхневого потенціалу еритроцитів у розчинах із різною концентрацією NaCl.
Fig. 1. Temperature dependence of erythrocyte surface potential in solutions of various NaCl concentrations.

Звідки маємо

$$\sigma^2 = 1{,}7161\times10^{-4} = 2aT[NaCl] \times \times \cosh(\varphi_0/bT) - 2aT[NaCl] \quad (11)$$

або

$$(\sigma^2 + 2aT[NaCl])/2aT[NaCl] = \cosh(\varphi_0/bT), \quad (12)$$

де одиниці вимірювання концентрації [*NaCl*] – молі, а температури – градуси Кельвіна.

where the units to measure concentration [*NaCl*] are moles and kelvins are for temperature.

Results and discussion

Based on the formula (12) we performed computer calculations and obtained the erythrocyte surface potentials at different temperatures and concentrations of NaCl in extracellular solution (Fig. 1). To determine the change in surface potential of erythrocytes during freezing of cell suspension in physiological saline we

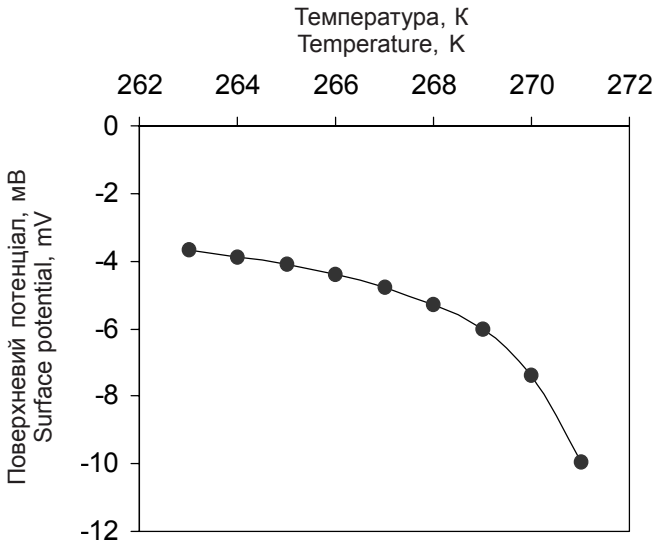

Рис. 2. Температурна залежність поверхневого потенціалу еритроцитів за концентрацій NaCl у точках фазового переходу.

Fig. 2. Temperature dependence of erythrocyte surface potential *vs*. NaCl concentration in phase transition points.

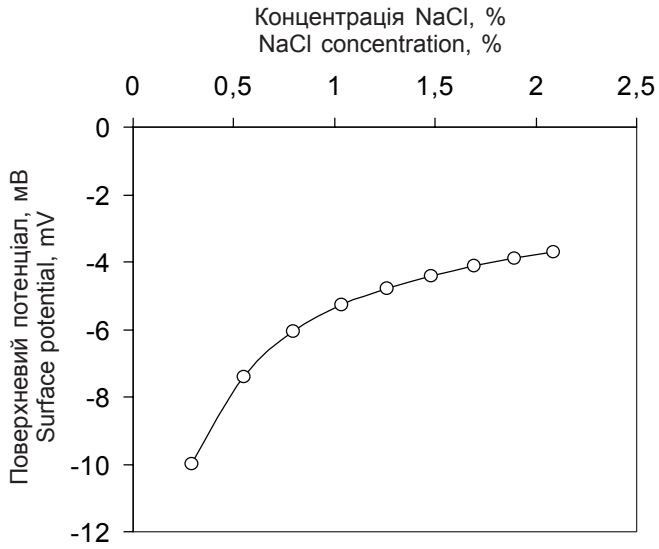

Рис. 3. Залежність поверхневого потенціалу еритроцитів від концентрації NaCl при температурах фазового переходу.

Fig. 3. Temperature dependence of erythrocyte surface potential *vs*. NaCl concentration at temperatures of phase transition.

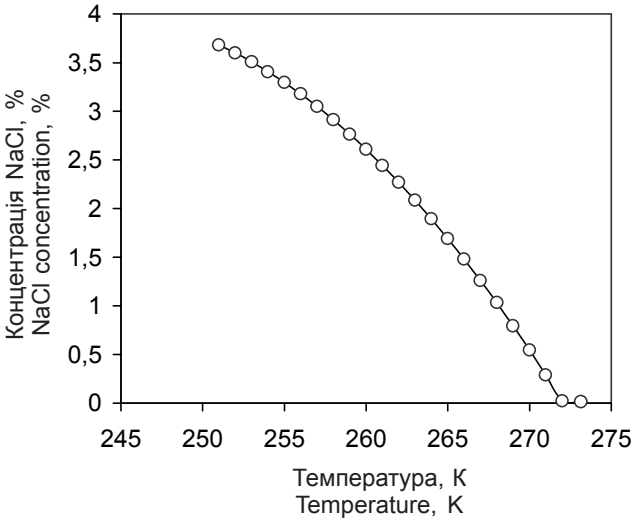

Рис. 4. Фазова діаграма водного розчину NaCl у діапазоні температур 273...253 К (0...20°С).

Fig. 4. Phase diagram of NaCl aqueous solution within temperature range of 273…253 K (0…20°C).

Результати та обговорення

На підставі формули (12) були проведені комп'ютерні обчислення та отримані поверхневі потенціали еритроцитів за різних температур та концентрацій NaCl у позаклітинному розчині (рис. 1). Для визначення зміни поверхневого потенціалу еритроцитів у процесі заморожування клітинної суспензії у фізіологічному розчині ми побудували графік залежності поверхневого потенціалу від температури (рис. 2) або концентрації (рис. 3) за точками, що відповідають значенням цих величин згідно з фазовою діаграмою бінарної системи вода-NaCl (рис. 4).

Концентрації ρ_{0i} індивідуальних іонів на поверхні можна обчислити за формулою (5), підставляючи розраховані значення поверхневого потенціалу для досліджуваних розчинів. Очевидно, що концентрація іонів натрію $[Na^+]$ на поверхні еритроцитів буде більшою, ніж в об'ємному розчині, а концентрація іонів хлору $[Cl^-]$ – меншою. Залежність поверхневої концентрації іонів Na^+ від концентрації в об'ємному розчині розрахована за формулою (5) для двох температур (275 та 255 К), подана на рис. 5, з якого видно, що температура практично не впливає на поверхневу концентрацію протиіонів. Саме ж значення концентрації натрію на поверхні еритроцитів значно перевищує його в об'ємному розчині. Так, при концентрації розчину 1 М поверхнева концентрація становить 1,5 М, а за концентрації 2 М вона збільшується до 3 М.

При вивченні температурної залежності поверхневого потенціалу еритроцитів людини особ-

constructed a graph of the surface potential dependence *vs*. temperature (Fig. 2) or concentration (Fig. 3) using the points corresponding to these values according to the phase diagram of a water-NaCl binary system (Fig. 4).

The concentrations ρ_{0i} of individual ions on a surface can be calculated using the formula (5), substituting the calculated values of surface potential for the studied solutions. Obviously, the concentration of sodium $[Na^+]$ ions on the surface of erythrocytes will be higher than in the bulk solution, and the concentration of chloride ions $[Cl^-]$ will be lower. Dependence of surface concentration of Na^+ ions *vs*. the concentration in the bulk solution calculated using the formula (5) for two temperatures (275 and 255 K) is presented in Fig. 5, showing that the temperature did not virtually affect the surface concentration of counterions. The value of sodium concentration on the surface of erythrocytes *per se* greatly exceeded the value in the bulk solution. In particular, at 1 M concentration of solution the

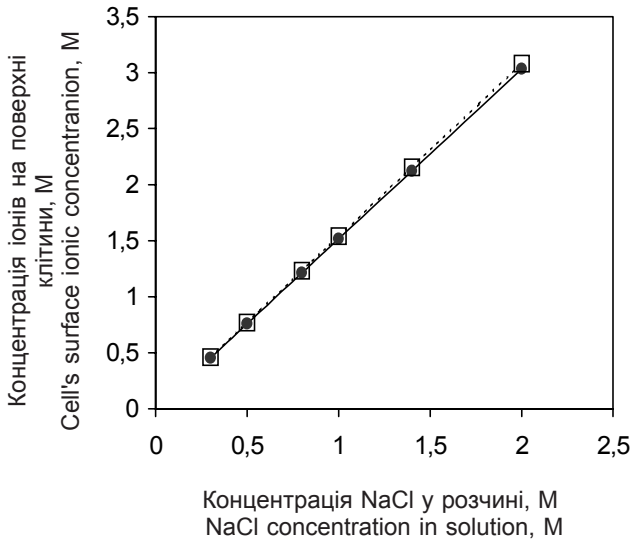

Рис. 5. Концентрація іонів Na^+ на поверхні еритроцитів залежно від концентрації об'ємного розчину: —●— – 275 К; -·□·- – 250 К.

Fig. 5. Concentration of Na^+ ions on surface of erythrocytes depending on concentration of bulk solution: —●— – 275 K; -·□·- – 250 K.

surface concentration made 1.5 M, and at 2 M concentration it increased up to 3 M.

When studying the temperature dependence of the surface potential of human erythrocytes of special attention is the appearing bend of its curve for the concentrations of 0.15 and 0.3 M within the temperature range of 8...12°C (see Fig. 1). To understand the cause of this bend let's analyze the equation (12), namely its left member. It contains a description of the

ливу увагу привертає перегин її ходу для концентрацій 0,15 та 0,3 М у діапазоні температур 8…12°С (див. рис. 1). Для того, щоб зрозуміти причину цього перегину, проаналізуємо рівняння (12), а саме його лівий член. Він містить характеристику поверхні, властивості якої аналізуються, – щільність поверхневого заряду еритроцитів

$$(\sigma^2 + 2aT[NaCl])/2aT[NaCl] \qquad (13)$$

або для 0,15 М розчину хлористого натрію та щільності поверхневого заряду еритроцитів людини

$$(1{,}7161 \times 10^{-4} + 0{,}035344 \times \\ \times 10^{-4} \times T)/0{,}035344 \times 10^{-4} \times T. \qquad (14)$$

Розрахунок температурної залежності виразу (13) за концентрації хлористого натрію у середовищі 0,15 моль/л поданий на рис. 6. Видно, що ця температурна залежність має відхилення від лінійності при досягненні температури 12°С. Значення температури очевидно залежить від характеристики мембрани, а саме щільності поверхневого заряду. При збільшенні концентрації хлористого натрію в середовищі перегин ходу температурної залежності зникає.

Аналіз даних наукової літератури показує, що існує декілька температурних діапазонів, в яких спостерігаються аномалії температурних залежностей процесів, пов'язаних із мембранами еритроцитів: 8…12, 18…20, 28…30 та > 40°С. Чіткі механізми структурних змін за цих температур досі не визначені через складність і анізотропію мембран. У наших дослідженнях температурної залежності часу обміну молекул води еритроцитами [2] було показано, що в діапазоні 8…12°С графіки Ареніуса для еритроцитів зазнають розриву із суттєвим збільшенням енергії активації процесу при значеннях температури нижче 8°С. У проникності еритроцитів людини для кріопротекторів 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) і диметилсульфоксиду (ДМСО) також було показано існування зламів ареніусових залежностей за температур 8…12°С зі збільшенням енергії активації проникання цих речовин в зоні субнульових значень температури [1, 3]. Було висунуто припущення, що різка зміна енергії активації проникності за температури 8…12°С пов'язана зі зменшенням проникності білкових каналів внаслідок структурного переходу в мембранах еритроцитів. T. Forte та співавт. [9] показали, що цитоскелет-мембранний комплекс, який включає білок смуг 3 та 4.1, відповідає за термотропний перехід у мембранах еритроцитів за температур, близьких до 8°С. Результати нашого попереднього дослідження температурної залежності проник-

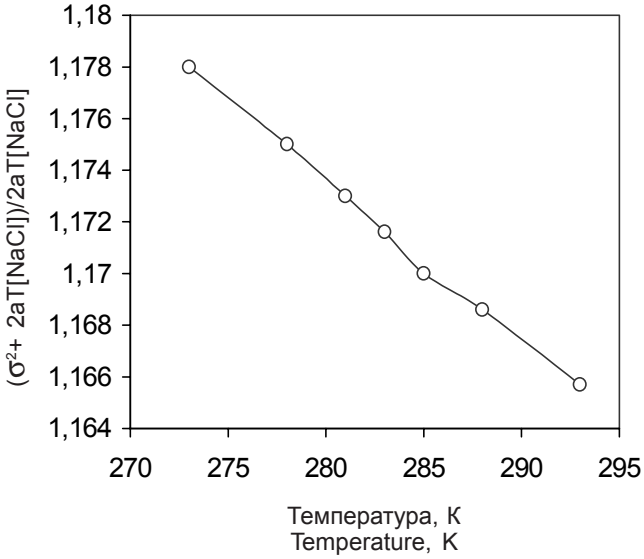

Рис. 6. Температурна залежність чисельного значення лівого члену рівняння (12) за концентрації NaCl 0,15 моль/л та щільності поверхневого заряду, характерного для еритроцитів людини.

Fig. 6. Temperature dependence of numerical value of the left member of equation (12) on 0.15 mol/L NaCl concentration and surface charge density for human erythrocytes.

surface properties under analysis, erythrocyte surface charge density

$$(\sigma^2 + 2aT[NaCl])/2aT[NaCl] \qquad (13)$$

or for 0.15 M sodium chloride solution and surface charge density of human erythrocytes

$$(1.7161 \times 10^{-4} + 0.035344 \times \\ \times 10^{-4} \times T)/0.035344 \times 10^{-4} \times T. \qquad (14)$$

The calculation of the temperature dependence of expression (13) at the 0.15 mol/L concentration of sodium chloride in the medium is presented in Fig. 6. The figure shows that the temperature dependence has a deviation from linearity at a temperature of 12°C. The temperature values obviously depend on the characteristics of membrane, such as surface charge density. With increasing the concentration of sodium chloride in the medium the bend of the temperature dependence course disappears.

Analysis of the publications demonstrates that several temperature ranges exist with certain abnormalities in the temperature dependences describing the processes in the erythrocyte membranes, these are 8...12; 18…20; 28...30 and > 40°C. Distinct mechanisms of structural changes at these temperatures are not identified to date because of the complexity and anisotropy of membranes. Our studies of the temperature dependence of the duration of water

ності еритроцитів показали, що обробка клітин блокатором білкових каналів не усуває зламу ареніусової залежності в зоні температур нижче 12°С як для гідрофільного кріопротектора 1,2-ПД, так і для гідрофобного ДМСО [3]. Тому було зроблено висновок, що збільшення енергії активації при охолодженні нижче 12°С обумовлено найімовірніше станом ліпідного матриксу (в'язкість, наявність дефектних гідрофільних пор), а не закриттям білкових каналів.

Дані, отримані методом визначення розподілу еритроцитів за індексом сферичності, також підтвердили існування температурозалежних змін стану мембран еритроцитів, які впливають на їх форму [4]. Суттєві зміни спостерігалися в діапазоні температур 12…8°С. Значно збільшилася кількість клітин із малим індексом сферичності, це призводило до появи субпопуляції, пік якої при температурі 12°С був вищим за основний пік із середнім для стандартного розподілу за 37°С значенням індексу сферичності. Нами також був проведений мікроскопічний аналіз залежності форми еритроцитів від температури [4]. Еритроцити, які знаходилися в плазмі, наносили на скло в термостатованій камері, їх зображення реєстрували в діапазоні температур 37…3°С із кроком 1 градус. Після розведення клітин плазмою спочатку розрізнені еритроцити в процесі спостереження поступово групувалися в «монетні стовпчики», які зберігалися до температури 16°С. При досягненні в камері температури 15°С картина в полі зору мікроскопа різко змінювалася: клітини починали рухатися, «монетні стовпчики» руйнувалися, частина клітин втрачала дискоїдну форму. Проте через деякий час (близько 1 хв) клітини знову складалися в «монетні стовпчики», і за температури 5°С вигляд суспензії практично не відрізнявся від такого за 16°С. Результати мікроскопічного дослідження повністю узгоджуються з даними, отриманими методом визначення розподілу еритроцитів за індексом сферичності. Руйнування «монетних стовпчиків» і утрата дискоїдної форми частиною клітин корелює зі збільшенням кількості клітин, які мають малий індекс сферичності, за температури нижче 15…12°С. Саме в температурній зоні нижче 12°С спостерігалися збільшення енергії активації та великий розкид значень проникності як для кріопротекторів [1, 3], так і для молекул води [2].

Для пояснення процесів, які відбуваються в зоні структурно-фазового переходу при температурі 12…8°С, було зроблено припущення, що у мембрані еритроцита змінюється відношення між площею зовнішнього та внутрішнього моношарів мембрани, наприклад, за рахунок «занурення» білків конічної форми вглиб бішару [13]. При цьому

molecules exchange with erythrocytes [7] have shown that within the range of 8...12°C the Arrhenius dependencies for erythrocytes undergo a rupture with a significant increase in the activation energies below the temperature of 8°C. Human erythrocytes permeability for 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectants also has the kinks in Arrhenius dependencies at the temperature of 8...12°C with increasing activation energy of penetration of these substances at the subzero temperature [2, 6]. It was suggested that a sharp change in the activation energy of permeability at the temperature of 8...12°C was associated with a decrease in permeability of protein channels because of structural transition in erythrocyte membranes. T. Forte *et al.* [5] showed that cytoskeleton-membrane complex, including the protein band 3 and 4.1, was responsible for thermotropic transition in erythrocyte membranes at the temperatures close to 8°C. Our previous study of the temperature dependence in the permeability of erythrocytes demonstrated that treatment of cells with the blocker of protein channels did not eliminate the bend of Arrhenius dependence at the temperatures below 12°C either for hydrophilic cryoprotectant 1,2-PD or hydrophobic DMSO [2]. Therefore, the increase in activation energy appearing during cooling below 12°C was associated by us with the state of lipid matrix (viscosity, presence of effective hydrophilic pores) but not with closing of protein channels.

The data obtained by means of analysis of the erythrocytes distribution by sphericity index also confirmed the existence of temperature dependent changes in the state of erythrocyte membranes which affected their shape [3]. Significant changes were observed in the temperature range of 12...8°C. There was found a significant increase in the number of cells with low sphericity index, that led to the emergence of a subpopulation with the peak at 12°C which was higher than the main peak with an average for the standard distribution at 37°C sphericity index value. We also performed a microscopic analysis of erythrocyte shapes depending on the temperature [3]. Erythrocytes, being in plasma, were layered on glass in a thermostated chamber, the images were recorded within the temperature range of 37...3°C with the 1 degree step. After dilution of the cell suspension with plasma we observed that erythrocytes, which were separated until that moment, started to group gradually into 'roleaux' which were kept down to a temperature of 16°C. When the temperature in the chamber achieved 15°C the microscopical pattern in the observation field drastically changed: cells started to move, the 'rouleaux' were destroyed, some cells lost a discoid shape. However after a while (about 1 min) the cells evolved the 'rouleaux' again and at the temperature of 5°C the suspension appeared almost the same as at 16°C.

відношення площі поверхні зовнішнього моношару до площі поверхні внутрішнього моношару мембрани збільшується. Відповідно до гіпотези бішарової пари [14] це призводить до швидкого утворення стоматоцитів шляхом дзеркального випинання однієї з лунок еритроцита відносно дотичної площини до бокової поверхні еритроцита [6]. «Монетні стовпчики» утворюються за рахунок «містків» між зовнішніми поверхнями сусідніх еритроцитів, які зв'язують мембрани, протидіючи силам електричного відштовхування. Зазор між мембранами еритроцитів у зоні контакту становить близько 25 нм. Сила агрегації, яка обумовлена утворенням «містків», у розрахунку на одиницю площі контактуючих поверхонь складає 10^{-2} Н/м^2, при цьому зв'язок між клітинами легко розривається навіть у невеликих зсувних потоках [5]. Тому можна припустити, що сили відштовхування, які виникають під час миттєвого переходу дискоцит-стоматоцит, достатні для розпаду «монетних стовпчиків».

Визначена особливість залежності поверхневого потенціалу від температури в діапазоні 12…8°С (див. рис. 1), розрахованого для зарядженої поверхні з певною щільністю поверхневих зарядів із суто фізичних міркувань без врахування структури та складових цієї поверхні, імовірно є однією з причин перебудов у мембрані за цих температур. Порушення балансу електростатичних взаємодій на поверхні зовнішнього моношару мембрани через збільшення концентрації протиіонів на поверхні клітин і відповідно зменшення поверхневого потенціалу може бути «пусковим механізмом» перебудов і зміни взаємодій між білковими і ліпідними компонентами мембрани. Це припущення узгоджується з результатами нашого дослідження та висновками роботи [3] про причини збільшення енергії активації проникання молекул води і кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів людини при охолодженні нижче 12°С.

Висновки

1. Визначена зміна поверхневого потенціалу еритроцитів у процесі заморожування клітинної суспензії в точках, що відповідають значенням температури та концентрації 1:1-електроліту згідно з фазовою діаграмою бінарної системи вода–NaCl.

2. Показано, що концентрація іонів натрію у шарі Штерна-Гельмгольца в 1,5 рази перевищує таку в об'ємному розчині.

3. Визначена особливість у ході температурної залежності поверхневого потенціалу зарядженої поверхні з певною щільністю поверхневих зарядів може бути однією з причин перебудов у мембрані еритроцитів людини в діапазоні температур 12…8°С.

The results of microscopic examination were entirely consistent with those obtained by determining the distribution of erythrocyte sphericity index. Destruction of 'rouleaux' and loss of discoid shape by some cells correlated with the number of cells with low sphericity index at a temperature below 15...12°C. Exactly in the temperature zone below 12°C there were observed an increased activation energy and large variations in the permeability for both cryoprotectants [2, 6] and water molecules [7].

To clear up the processes occurring in the zone of structure-phase transition at 12...8°C it was assumed that erythrocyte membrane aquired a changed ratio between the area of outer and inner membrane monolayers, for example, by an 'immersion' of proteins with conical shape deeply into bilayer [13]. Suchwise, the ratio between external and inner monolayars of membrane increased. According to the bilayer-couple model [14] this leads to a rapid formation of stomatocytes by specular protrusion of one of the erythrocyte depression relative to the tangent plane to lateral surface of erythrocyte [12]. 'Roleaux' are formed by means of the 'bridges' between external surfaces of adjacent erythrocytes, binding membranes and opposing the forces of electrical repulsion. The gap between membranes of erythrocytes in the contact zone makes about 25 nm. The power of aggregation, stipulated by the formation of 'bridges' per unit area of contacting surfaces is 10.2 N/m^2, herewith the bond between the cells is easily broken even after appearance of small shear flows [9]. Therefore, we can assume that the repulsive forces arising at the instant discocyte-to-stomatocyte transition are sufficient to collapse 'roleaux'.

The found feature of surface potential dependence *vs*. temperature within the range of 12...8°C (see Fig. 1) calculated for the charged surface with a certain density of surface charges for purely physical reasons, with no regard to the structure and components of surface is probably one of the causes of alterations in membrane at these temperatures. Appearance of a misbalance in electrostatic interactions on the surface of membrane outer monolayer due to increased concentrations of counterions on the cell surface and therefore the reduced surface potential can trigger rearrangements and changes in interactions between the protein and lipid components of membranes. This assumption is consistent with the results of our research and conclusions [2] about the reasons for increasing the activation energy of penetration of water and cryoprotectants molecules through the membranes of human erythrocytes when cooled below 12°C.

Conclusions

1. There is a change in surface potential of erythrocytes during freezing of cell suspension in points corresponding to the values of temperature and con-

Література

1. Гордієнко О.І. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду // Проблемы криобиологии. – 2003. – №1. – С. 38–45.
2. Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жилякова Т.А., Шейкин В.И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биолог. мембраны. – 1985. – Т. 2, №3. – С. 310–314.
3. Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №3. – С. 164–172.
4. Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на распределение эритроцитов по индексу сферичности // Вісник ХНУ: Біофізичний вісник. – 2009. – Вип. 2, №23. – С. 114–119.
5. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. – М.: Медицина, 1982. – 272 с.
6. Погорелов А.В. Изгибание поверхностей и устойчивость оболочек. – М.: Наука, 1986. – 96 с.
7. Cevc G. Membrane electrostatics // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol. 1031, №3. – P. 311–382.
8. Demchenko A.P., Mely Y., Duportail G., Klymchenko A.S. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes // Biophys. J. – 2009. – Vol. 96, №9. – P. 3461–3470.
9. Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marchesi V.T. Protein 4.1. is involved in structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid // Biochemistry. – 1985. – Vol. 24, №27. – P. 7876–7880.
10. Israelachvili J. Intermolecular and surface forces. – London: Academic Press, 2004. – 450 p.
11. Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H.Y. A two factors hypothesis of freezing injury // Cell Res. – 1972. – Vol. 71, №2. – P. 345–355.
12. Petelska A.D., Janica R., Kotynska J. et al. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells // J. Membrane Biol. – 2012. – Vol. 245, №1. – P. 15–22.
13. Schwarz S., Haest C.W.M., Deuticke B. Extensive electroporation abolishes experimentally induced shape transformations of erythrocyte: a consequence of phospholipid symmetrization? // BBA. – 1999. – Vol. 1421, №2. – P. 361–379.
14. Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as a bilayer couples. A mechanism of drug erythrocyte interaction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1974. – Vol. 71, №14. – P. 4457–4461.

centrations of 1:1 electrolyte on the phase diagram of a water-NaCl binary system.

2. The concentration of sodium ions in the Stern-Helmholtz layer is 1.5 times higher than that in the bulk solution.

3. There is a feature in the temperature dependence of the surface potential of the charged surface with the particular surface charge density and it might be one of the causes of rearrangements in membrane of human erythrocytes within the temperature range of 12...8°C.

References

1. Cevc G. Membrane electrostatics. Biochim Biophys Acta 1990; 1031(3): 311–382.
2. Davydova E.V., Gordiyenko O.I. Temperature effect on erythrocyte membrane permeability for cryoprotectants with different hydrophobicities. Probl Cryobiol 2009; 19(3): 261–272.
3. Davydova E.V., Gordiyenko O.I. Temperature effect on erythrocyte distribution by spherical index. V.N. Karazin KhNU Biophysical Bull 2009; 2(23): 114–119.
4. Demchenko A.P., Mely Y., Duportail G., Klymchenko A.S. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. Biophys J 2009; 96(9): 3461–3470.
5. Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marchesi V.T. Protein 4.1. is involved in structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid. Biochemistry 1985; 24(27): 7876–7880.
6. Gordiyenko O.I. Temperature effect on human erythrocyte membrane permeability for 1,2-propanediol and dimethylsulfoxide. Probl Cryobiol 2003; 13(1): 38–45.
7. Gordiyenko O.I., Yemets B.G., Zhilyakova T.A., Sheykin V.I. Temperature dependence of the water diffusion permeability of erythrocyte membranes in media of various ionic strengths. Biologischeskie Membrany 1985; 2(3): 310–314.
8. Israelachvili J. Intermolecular and surface forces. London: Academic Press; 2004.
9. Levtov V.A., Regirer S.A., Shadrina N.Kh. Blood rheology. Moscow: Meditsina; 1982.
10. Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H.Y. A two factors hypothesis of freezing injury. Cell Res 1972; 71(2): 345–355.
11. Petelska A.D., Janica R., Kotynska J. et al. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells. J Membrane Biol 2012; 245(1): 15–22.
12. Pogorelov A.V. Surfaces bending and membranes stability. Moscow: Nauka; 1986.
13. Schwarz S., Haest C.W.M, Deuticke B. Extensive electroporation abolishes experimentally induced shape transformations of erythrocyte: a consequence of phospholipid symmetrization? BBA 1999; 1421(2): 361–379.
14. Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as a bilayer couples. A mechanism of drug erythrocyte interaction. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71(14): 4457–4461.