

Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини

UDC577.352.4:611.018.51

O.I. GORDIYENKO*, S.YE. KOVALENKO, I.F. KOVALENKO

Mechanisms of Glycerol Permeability through the Membrane of Human Erythrocytes

Отримано коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для гліцерину в широкому температурному діапазоні (37...4°C) з інтервалом 2–3 градуси. За ареніусовими залежностями розраховані величини енергії активації проникання молекул гліцерину в еритроцити. Показано, що в діапазоні температур 12...15°C спостерігається розрив графіка Ареніуса з вірогідним збільшенням енергії активації в зоні низьких температур. Отримані величини енергії активації 76 ± 13 (37...15°C) та $159 \pm 15,6$ кДж/моль⁻¹ (12...4°C) свідчать про, принаймні, часткове проникання молекул гліцерину крізь ліпідний бішар. Обговорюються дані літератури щодо коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для молекул гліцерину, визначені різними методами.

Ключевые слова: еритроцити, гліцерин, проникність, енергія активації, методи визначення коефіцієнтів проникності.

Получены коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов человека для глицерина в широком температурном диапазоне (37...4°C) с интервалом 2–3 градуса. По аррениусовым зависимостям рассчитаны величины энергии активации проникновения молекул глицерина в эритроциты. Показано, что в диапазоне температур 12...15°C наблюдается разрыв графика Аррениуса с достоверным увеличением энергии активации в области низких температур. Полученные величины энергии активации 76 ± 13 (37...15°C) и $159 \pm 15,6$ кДж/моль⁻¹ (12...4°C) свидетельствуют, по крайней мере, о частичном проникновении молекул глицерина через липидный бислой. Обсуждаются данные литературы о коэффициентах проницаемости мембран эритроцитов человека для молекул глицерина, определенные различными методами.

Ключові слова: еритроцити, гліцерин, проницаемость, енергія активації, методи определения коэффициентов проницаемости.

The performed study provided the permeability coefficients of human erythrocyte membranes for glycerol in wide temperature interval (37...4°C) with step of 2–3 degrees. Using the Arrhenius dependencies the activation energies of glycerol molecules penetration into erythrocytes were calculated. The temperature range of 12...15°C was characterized with a break in Arrhenius dependence with a significant rise in activation energy in low temperature area. The obtained values of activation energy, 76 ± 13 (37...15°C) and 159 ± 15.6 kJ/mol⁻¹ (12...4°C) testify to at least partial penetration of glycerol molecules through lipid bilayer. The paper discusses the literature data on coefficients of permeability for glycerol molecules, assessed with various methods.

Key words: erythrocytes, glycerol, permeability, activation energy, methods for assessment of permeability coefficients.

Енергія активації є важливою характеристикою транспортних процесів. Одним з аргументів на користь проникання молекул крізь плазматичні мембрани за тим чи іншим механізмом є величина видимої енергії активації цього процесу. Проникання молекул води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани певними структурно обумовленими шляхами характеризуються відповідними значеннями видимої енергії активації. Прониканню речовин за каналним механізмом відповідають, як правило, значення енергії активації в діапазоні 15–25 кДж/моль, які узгоджуються зі значеннями енергії активації дифузії в об'ємному розчині. При прониканні молекул шляхом розчинення і дифузії в ліпідному матриксі значення енергії активації становлять 30–85 кДж/моль і більше [14, 17, 22]. Так, для дифузії молекул води в еритроцити людини

The activation energy is an important characteristic of transport processes. One of arguments in favor of penetration of molecules through the plasma membrane by one or another mechanism is the value of the apparent activation energy of this process. Penetration of molecules of water and solutes through artificial and natural membranes of certain structure-conditioned ways is characterized by the corresponding values of the apparent activation energy. Penetration of substances under the the channel mechanism is characterized usually by the activation energies in the range of 15–25 kJ/mol, consistent with the values of the activation energy of diffusion in the bulk solution. If the molecules penetrate through dissolution and diffusion in the lipid matrix the activation energies make 30–85 kJ/mol and more [14, 17, 22]. For example in the case of diffusion of water molecules in human erythrocytes

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: (+380 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84, електронна пошта: go_olga1787@yandex.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: go_olga1787@yandex.ua

енергія активації виявилась рівною 25 кДж/моль. Ця величина є трохи більшою, ніж для дифузії молекул води в об'ємному розчині (19 кДж/моль), але меншою за таку для ліпідних бішарів (45–60 кДж/моль) [26]. Раніше [5] було показано, що енергія активації проникання таких кріопротекторів, як 1,2-пропандіол (1,2-ПД) і диметилсульфоксид (ДМСО) в еритроцити людини знаходиться в межах (в залежності від температурного діапазону) 40–97 та 34–90 кДж/моль відповідно. Було зроблено висновок, що проникання цих речовин відбувається двома паралельними шляхами – білковим і ліпідним. Співвідношення потоків цими шляхами для різних речовин залежить як від розмірів молекул, так і від їх гідрофільно-гідрофобних властивостей [11].

Гліцерин є найбільш гідрофільним з відомих кріопротекторів. Коефіцієнт його розподілу між гідрофобною фазою (n-октанол) і водою становить 0,005, що на порядок менше, ніж для етиленгліколю (ЕГ) ($K = 0,04$) і 1,2-ПД ($K = 0,076$) [11]. Тому його проникання крізь ліпідний бішар вкрай утруднено. Проте, було показано [3], що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом pCMBS, що є блокаторм білкових каналів еритроцитів людини [19], не впливає на їх проникність для гліцерину при 20°C. При цьому коефіцієнт проникності для гліцерину ($0,038 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$) на 2 порядки менше таких для швидко проникаючих гідрофільних неелектролітів – ЕГ ($1,98 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$) або 1,2-ПД ($1,6 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$), і на порядок менше, ніж коефіцієнти проникності для них pCMBS-оброблених еритроцитів ($0,526 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$ і $0,664 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$ відповідно) [11]. Таке співвідношення коефіцієнтів проникності корелює зі співвідношенням коефіцієнтів розподілу цих речовин між гідрофобною фазою і водою. Було зроблено висновок, що гліцерин проникає в ці клітини ліпідним шляхом [3]. Цей висновок також узгоджується з даними щодо розмірів молекули гліцерину і білкових каналів еритроцитів. Діаметр молекули гліцерину становить 4,7 Å (для порівняння, діаметр молекули ЕГ становить 2,6 Å, 1,2-ПД – 3,7 Å). До того ж виключно висока гідрофільність молекул гліцерину означає достатньо сильний зв'язок з гідратною оболонкою, що може збільшити їх ефективний розмір, який і без того перевищує критичний для проходження через гідрофільні канали мембран еритроцитів людини [3, 11]. Є цікавим також той факт, що на відміну від еритроцитів людини гліцерин набагато повільніше проникає в еритроцити вівці та бика і набагато швидше – в еритроцити щурів [12, 15]. Як відомо, пасивна проникність ліпідних бішарів тісно пов'язана з їх текучістю, а отже із вмістом ненасичених жирних кислот. Індекс подвійних зв'язків для ліпідів еритроцитів вівці, бика, людини і щура становить 0,7; 0,8; 1,4 і 1,7 відповідно.

the activation energy was found to be 25 kJ/mol. This value was a little higher than the diffusion of water molecules in the bulk solution (19 kJ/mol), but less than the value for the lipid bilayer (45–60 kJ/mol) [26]. It was shown previously [5], that the activation energy of penetrating cryoprotectants such as 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) in human erythrocytes was within (depending on the temperature range) 40–97 and 34–90 kJ/mol, respectively. It was concluded that the penetration of these substances occurred through two parallel pathways of protein and lipid nature. Proportions of the flows through these pathways for different substances depends on the size of molecules and their hydrophilic-hydrophobic properties [11].

Glycerol is the most hydrophilic substance among the known cryoprotectants. The coefficient of its distribution between the hydrophobic phase (n-octanol) and water is 0.005, which is by one order less than for ethylene glycol (EG) ($C_d = 0.04$) and 1,2-PD ($C_d = 0.076$) [11]. Therefore, its penetration through the lipid bilayer is extremely impeded. However, it was shown [3] that treatment of erythrocytes with sulfhydryl reagent pCMBS, which is a blocker of protein channels of human erythrocytes [19], does not affect their permeability for glycerol at 20°C. The coefficient of permeability for glycerol ($0.038 \times 10^{-6} \text{ mxs}^{-1}$) is 2 orders of magnitude less than those for fast penetrating hydrophilic non-electrolytes: EG ($1.98 \times 10^{-6} \text{ mxs}^{-1}$) or 1,2-PD ($1.6 \times 10^{-6} \text{ mxs}^{-1}$), and an order of magnitude less than the permeability coefficients for these substances of pCMBS-treated erythrocytes ($0.526 \times 10^{-6} \text{ mxs}^{-1}$ and $0.664 \times 10^{-6} \text{ mxs}^{-1}$, respectively) [11]. Such a proportion between permeability coefficients correlates with the ratio between the distribution coefficients for these substances between the hydrophobic phase and water. It was concluded that glycerol penetrates in these cells through the lipids [3]. This conclusion is also consistent with data on the size of the molecule of glycerol and protein channels of erythrocytes. The diameter of glycerol molecule is 4.7 Å (for comparison, the diameter of the molecule of EG is 2.6 Å, and of 1,2-PD is 3.7 Å). In addition, the extremely high hydrophilicity of glycerol molecules means a strong enough relationship with hydrate shell, that may increase their effective size, which already exceeds the critical value to pass through the hydrophilic channels of human erythrocyte membranes [3, 11]. There is also an interesting fact that in contrast to human erythrocytes the glycerol penetrates more slowly into sheep and bovine erythrocytes and much faster into rat erythrocytes [12, 15]. Passive permeability of the lipid bilayer is known to be closely related to their fluidity, and therefore to their content of unsaturated fatty acids. Index of double bonds for sheep, bovine, human and rat erythrocyte lipids equals 0.7, 0.8, 1.4 and 1.7, respectively. This

Це визначається ліпідним складом мембран еритроцитів. Так, мембрани еритроцитів бика містять набагато більший відсоток (46,2%) сфінгомеліну (індекс подвійних зв'язків 0,33) у порівнянні з еритроцитами людини (25,8%) за рахунок фосфатидилхоліну (індекс подвійних зв'язків 0,96) [7]. Таким чином, версія проникання гліцерину саме через ліпідний бішар узгоджується з даними про ліпідний склад мембран еритроцитів різних ссавців.

З іншого боку, N. Roudier та співавтори [21] вважають, що в мембранах еритроцитів людини є гліцеринові канали і гліцерин проникає в ці клітини специфічними каналами, утвореними каналним білком. Методом Вестерн-блотінгу автори засвідчили існування в мембранах еритроцитів людини аквагліцеропорину AQP3. Також було показано, що AQP3 визначається в мембранах еритроцитів людини, тоді як в мембранах еритроцитів бика імунофлуоресцентний аналіз підтвердив відсутність експресії AQP3 [8].

З метою встановлення можливих механізмів проникання гліцерину в еритроцити людини нами були отримані величини енергії активації цього процесу в діапазоні температур 37...4°C. Для цього були визначені коефіцієнти проникності мембран еритроцитів у вказаному температурному діапазоні.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на еритроцитах донорської крові людини, яку отримували на консерванті «Глюгіцир».

Коефіцієнти проникності визначали шляхом вимірювання швидкості лізису еритроцитів у водному розчині проникаючої речовини, у даному випадку гліцерину. Теоретичне підґрунтя методу подано раніше [10]. Часові залежності гемолізу фіксували методом малокутового розсіяння світла [4]. Отриману експериментальну криву суміщали з теоретичною, розрахованою на підставі фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу у водному розчині проникаючої речовини за відповідних значень коефіцієнта проникності [10].

Вимірювання були проведені на еритроцитах п'яти дорослих донорів в діапазоні температур 37...4°C з інтервалом 2–3 градуси (по 3 вимірювання в кожній температурній точці для кожного донора). Величину енергії активації (E_a) визначали з нахилу графіка $\ln k$ від $1/T$ згідно з рівнянням Ареніуса $\ln k = E_a/RT$, де k – константа швидкості процесу; R – газова константа; T – абсолютна температура.

Статистичну обробку результатів здійснювали у програмі Microsoft Excel 2010. Дані подані у вигляді $M \pm SE$, вірогідність різниці оцінювали за критерієм Стьюдента.

value is determined by lipid composition of erythrocyte membranes. More specifically, bovine erythrocyte membranes contain much more (46.2%), sphingomyelin (double bond index 0.33) than human erythrocytes (25.8%) at the expense of phosphatidylcholine (index of double bonds of 0.96) [7]. Thus, the hypothesized penetration of glycerol through lipid bilayer is consistent with data on the lipid composition of erythrocyte membranes of various mammals.

On the other hand, Roudier N. *et al.* [21] believed that human erythrocyte membranes possess glycerol channels and glycerol penetrates into these cells by specific channels formed by a channel protein. Using Western blotting the authors confirmed the existence in human erythrocyte membranes of aquaglyceroporine AQP3. It was also shown that though the AQP3 was found in the membranes of human erythrocytes, the immunofluorescence analysis confirmed the absence of AQP3 expression in bovine erythrocyte membranes [8].

In order to establish the possible mechanisms of glycerol penetration into human erythrocytes we would find the values of activation energy of this process in the temperature range of 37...4°C. Thereto we would determine the permeability coefficients of erythrocyte membranes in the specified temperature range.

Materials and methods

The experiments were conducted in erythrocytes of human blood supplemented with preservative solution Glugitsir.

Permeability coefficients were determined by measuring the rate of erythrocytes lysis in aqueous solution of penetrating substances, glycerol in our case. The theoretical basis of the method was described earlier [10]. Time dependences of hemolysis were recorded using small-angle light scattering [4]. The resulting experimental curve was fitted by matching the permeability values with the theoretical dependence, calculated on the basis of physical and mathematical models of hypotonic hemolysis in aqueous solution of penetrating substance [10].

Measurements were performed in erythrocytes of five adult donors in the temperature range of 37...4°C with step of 2–3 degrees (3 measurements at each temperature point for each donor). The value of activation energy (E_a) was determined from the slope of the plot in the coordinates $\ln k$ vs. $1/T$ according to the Arrhenius' equation $\ln k = E_a/RT$, where k was the constant of the process rate, R denoted the universal gas constant, and T was the absolute temperature.

Statistical processing of the results was performed with Microsoft Excel 2010. Data were presented as $M \pm SE$, the probability of the differences was estimated by Student's test.

Результати та обговорення

Отримані значення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини до молекул гліцерину для низки температур подані в табл. 1. Для розрахунку енергії активації процесу проникання молекул гліцерину крізь мембрани еритроцитів одержані температурні залежності подані в координатах Ареніуса (рис. 1, А–Е). Тангенс кута нахилу графіка Ареніуса становить E_a/R , де E_a – енергія активації процесу (у даному випадку процесу проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів); R – газова постійна, що становить 8,3144 кДж/моль×К. У результаті апроксимації експериментальних точок в ареніусових координатах були отримані величини енергії активації проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини для окремих донорів і для усереднених по всім донорам значеннях проникності (табл. 2), які відповідають величинам, характерним для проникання речовин ліпідним шляхом.

З поданих графіків і табл. 2 видно, що в діапазоні температур 12...15°C спостерігається розрив графіка Ареніуса з вірогідною зміною енергії активації,

Таблиця 1. Коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для гліцерину (усереднені дані, $n = 15$)

Table 1. Permeability coefficients of human erythrocyte membranes for glycerol (average data, $n = 15$)

Температура, °C Temperature, °C	Коефіцієнт проникності K , м/с, $\times 10^8$ Permeability coefficient K , m/s, $\times 10^8$
4	0,1 ± 0,0001
6	0,23 ± 0,009
10	0,5 ± 0,046
12	0,72 ± 0,076
15	0,84 ± 0,11
18	0,98 ± 0,15
20	1,12 ± 0,27
22	1,4 ± 0,32
24	2,03 ± 0,35
26	2,43 ± 0,31
28	2,89 ± 0,28
30	3,95 ± 0,58
33	4,88 ± 0,21
37	7,63 ± 1,56

Results and discussion

The obtained coefficients of membrane permeability of human erythrocytes for glycerol molecules under several temperatures are given in Table 1. To calculate the activation energy of glycerol molecules penetration through erythrocyte membranes the obtained temperature dependences were plotted in Arrhenius' coordinates (Fig. 1A–E). The slope of Arrhenius' graph equals to E_a/R , where E_a is activation energy of the process (in this case of the process of penetration of glycerol through the membrane of red blood cells), R is universal gas constant, equal to 8.3144 kJ/mol×K. Approximation of experimental points in Arrhenius' coordinates gave the values of activation energy for glycerol penetration through the membrane of human erythrocytes for individual donors as well as for permeability values averaged across all donors (Table 2), which corresponded to the characteristic values for the penetration of substances through the lipid pathway.

The presented Figure and Table 2 allow to see that in the temperature range of 12...15°C the break in Arrhenius' dependence with statistically significant changes in the activation energy is similar to those obtained for permeability of erythrocyte membranes for water molecules [2]. In this temperature range we observed not only the break in Arrhenius' dependence but significant instability of measured values too. In our case there was also considerable dispersion in the results obtained at temperatures of 12...15°C, that indicated the instability of the membrane in this temperature range. The results were also consistent with the data of our previous investigation [5], where the sharp increase in the activation energy of penetration of 1,2-PD and DMSO molecules was revealed at the same temperatures. It has been suggested that the sharp increase in the activation energy of penetration of water and cryoprotectants molecules at the temperatures below 12°C might be caused by blocked protein pathway of these substances diffusion as a result of conformational transition in erythrocyte cytoskeleton actin-spectrin complex and the associated anion exchange band 3 protein [1, 2]. Role of band 3 protein in erythrocyte membrane permeability for molecules of water and small non-electrolytes was reported by many authors [9, 22, 24, 25]. However, our recent study [5] of the temperature dependence of permeability in pCMBS-treated erythrocytes showed that treatment of erythrocytes by sulfhydryl reagent did not eliminate the break in Arrhenius dependence in the temperature range of 15...12°C both in case of 1,2-PD and DMSO. It was concluded that the increase in the activation energy under cooling below 12°C was associated with the state of the lipid matrix (viscosity, presence of hydrophilic pore defects). Obviously, the structural transition of cytoskeletal proteins contribute significantly to the disturbing of membrane ensemble in this temperature range, however, the increase in the activation energy

аналогічний отриманому для проникності еритроцитів до молекул води [2]. У цьому діапазоні температур наявний не тільки розрив графіка Ареніуса, але й суттєва нестабільність вимірюваних величин. У нашому випадку також спостерігається значний розкид результатів, отриманих за температур 12...15°C, що свідчить про нестабільність стану мембрани в цьому температурному діапазоні. Одержані результати також узгоджуються з нашими попередніми даними [5] про різке збільшення енергії активації проникання молекул 1,2-ПД і ДМСО за тих же температур. Було висунуто припущення, що різке збільшення енергії активації проникання молекул води і кріопротекторів за температур нижче 12°C може бути спричинене блокуванням білкового шляху дифузії молекул цих речовин внаслідок конформаційного переходу в актин-спектриновому комплексі цитоскелета еритроцитів і пов'язаному з ним аніонообмінному білку смуги 3 [1, 2]. Роль білка смуги 3 в проникності мембран еритроцитів для молекул води і малих неелектролітів була відзначена багатьма авторами [9, 22, 24, 25]. Проте проведене дослідження температурної залежності проникності рСМBS-оброблених еритроцитів показало [5], що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом не усуває зламу ареніусової залежності в діапазоні температур 15..12°C як для 1,2-ПД, так і для ДМСО. Було зроблено висновок, що збільшення енергії активації при охолодженні нижче 12°C пов'язано зі станом ліпідного матриксу (в'язкістю, наявністю дефектних гідрофільних пор). Очевидно, структурний перехід білків цитоскелета відіграє суттєву роль у порушенні мембранного ансамблю в цьому діапазоні температур, проте збільшення енергії активації обумовлено станом ліпідного бішару, а не закриттям білкових каналів.

Одержані нами значення коефіцієнтів проникності для гліцерину не узгоджуються з даними, отриманими методом розсіяння світла суспензією еритроцитів у зупиненому потоці [24]. Наведена в цій роботі величина $0,35 \times 10^{-6} \text{ м} \times \text{с}^{-1}$ на порядок перевищує наші дані. При визначенні проникності для гліцерину методом 50%-го гемолізу одержано коефіцієнт проникності при 20°C, що дорівнює $0,015 \times 10^{-6} \text{ м} \times \text{с}^{-1}$ [16]. Ця величина узгоджується з нашими значеннями за тієї ж температури ($0,011 \times 10^{-6} \text{ м} \times \text{с}^{-1}$). N. Roudier та співавт. [21] методом, аналогічним застосованому M.R. Toon та A.K. Solomon [24], отримали видиму часову константу проникнення гліцерину при 26°C – $0,12 \text{ с}^{-1}$. Однак автори не уточнюють, якому коефіцієнту проникності відповідають ці часові характеристики (очевидно, через неузгодженість з величинами коефіцієнтів, одержаними іншим методом). У цій же роботі [21] коефіцієнт проникності мембран еритроцитів людини

Таблиця 2. Розраховані значення енергії активації проникання молекул гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини

Table 2. Calculated values of activation energy for penetration of glycerol molecules through human erythrocyte membranes

Діапазон температур, °C Temperature range, °C	Донор Donor Nr.	Енергія активації, кДж/моль Activation energy, kJ/mol	Середнє значення енергії активації, кДж/моль Average activation energy, kJ/mol
4...12	1	173,68	159 ± 15,6* 155**
	4	168,9	
	5	167	
	6	148,15	
	7	137,17	
15...37	1	78,6	76 ± 13* 78,7**
	4	68,98	
	5	97,74	
	6	67,6	
	7	67,02	

Примітки: * – величини, отримані усередненням величин енергії активації окремих донорів (рис. 1), $P > 0,99$; ** – величини, отримані за усередненими по всім донорам коефіцієнтам проникності (рис. 2).

Notes: * – values, resulted from averaging the values of activation energy of individual donors (Fig. 1), $P > 0,99$; ** – values, obtained from permeability coefficients, averaged through all donors (Fig. 2).

was due to the state of the lipid bilayer, rather than blocked protein channels.

The obtained by us coefficients of permeability for glycerol are not consistent with data obtained by light scattering by erythrocyte suspension in the stopped flow [24]. The reported by the authors value of $0.35 \times 10^{-6} \text{ м} \times \text{с}^{-1}$ are by order of magnitude higher than our data. When determining the permeability to glycerol by method of 50% of hemolysis the obtained permeability coefficient at 20°C was equal to $0.015 \times 10^{-6} \text{ м} \times \text{с}^{-1}$ [16]. This value is consistent with our values at the same temperature ($0.011 \times 10^{-6} \text{ м} \times \text{с}^{-1}$). N. Roudier *et al.* [21] used the method, similar to the one used by M.R. Toon та A.K. Solomon [24], and obtained the apparent time constant of glycerol penetration at 26°C equal to 0.12 с^{-1} . However, the authors do not specify which permeability coefficients corresponded to these time characteristics (apparently due to inconsistency with the values of the coefficients obtained by another method). In the same report [21] the coefficient of permeability of human erythrocyte membranes to glycerol was also measured using radiolabeled glycerol

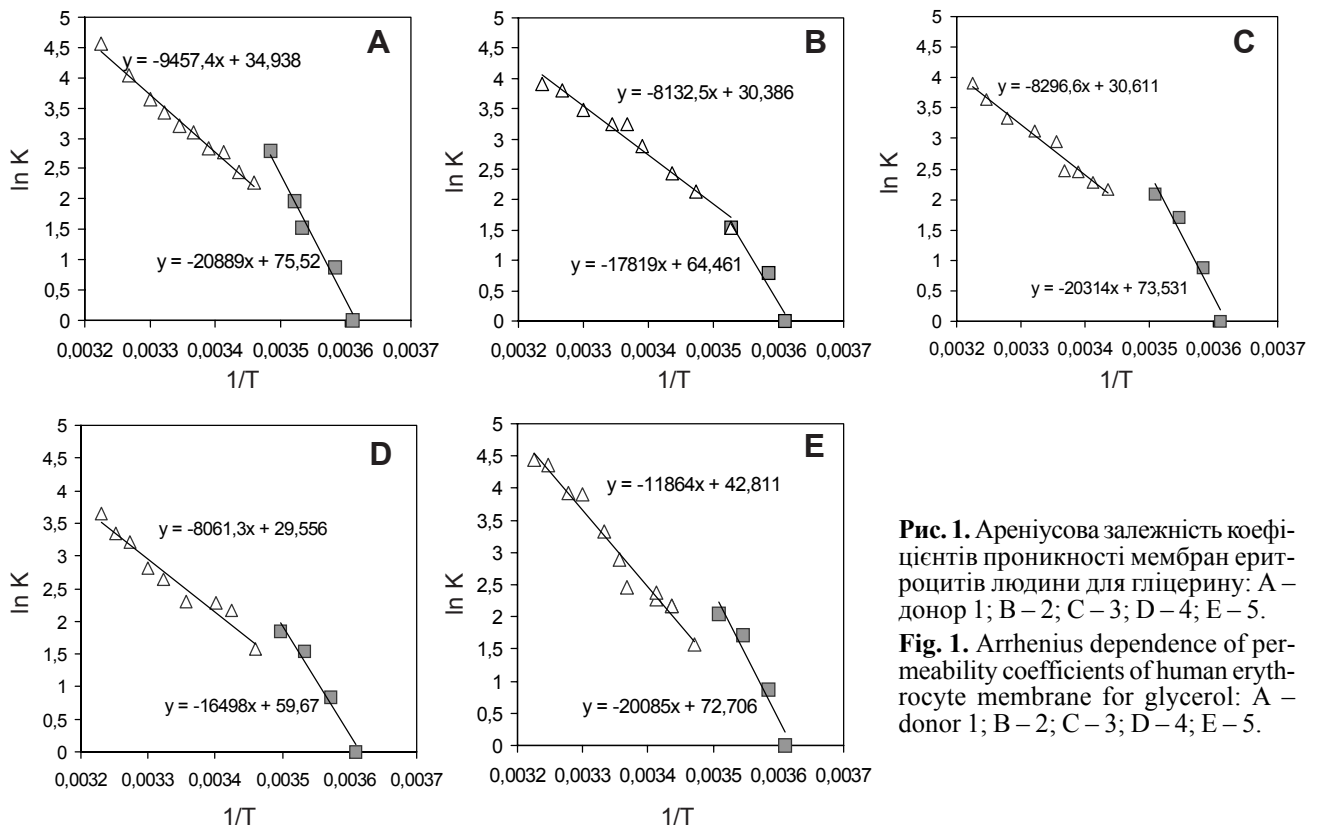


Рис. 1. Ареніусова залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для гліцерину: А – донор 1; В – 2; С – 3; D – 4; Е – 5.

Fig. 1. Arrhenius dependence of permeability coefficients of human erythrocyte membrane for glycerol: А – donor 1; В – 2; С – 3; D – 4; Е – 5.

для гліцерину був виміряний також з використанням радіоактивно мічених молекул гліцерину (^{14}C -гліцерин) $0,014 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$, що цілком відповідає нашим даним. E. Campos та співавт. [8] для еритроцитів людини з використанням метода зупиненого потоку (як і в двох роботах, згаданих вище [21, 24]) одержали значення проникності для гліцерину при 23°C $-0,137 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$, тоді як для еритроцитів бика методом лізису у водному розчині гліцерину – на три порядки менше значення $0,0582 \times 10^{-8} \text{ мкс}^{-1}$. Величини енергії активації для проникання гліцерину в еритроцити людини та бика в діапазоні температур $10(15) \dots 37^\circ\text{C}$ за даними E. Campos та співавт. [8] становлять $35,7$ і $80,1 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$ відповідно. За думкою авторів, ці відмінності узгоджуються зі знайденими відмінностями в проникності еритроцитів людини та бика і свідчать про те, що проникання відбувається різними шляхами: якщо в еритроцитах людини AQP3 відіграє важливу роль, проникання гліцерину в еритроцити бика відбувається крізь ліпідний бішар без внеску білкових каналів. Проте слід зазначити, що навіть занижені у порівнянні з нашими даними значення енергії активації ($35,7 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$) перевищують величини, характерні для каналного механізму проникання, і не дають підстав для твердження про виключно каналний механізм проникання гліцерину в еритроцити людини. Крім того, необхідно відмітити важливість вибору температурних точок для

molecules (^{14}C -glycerol) and was equal to $0.014 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$, which is consistent with our data. E. Campos *et al.* [8] used stopped flow method for human erythrocytes (as in two above mentioned reports [21, 24]) and obtained the values for glycerol permeability at 23°C of $137 \times 10^{-6} \text{ мкс}^{-1}$, whereas in the case of bovine erythrocytes the method of lysis in glycerol aqueous solution gave the value by three orders of magnitude less, $0.0582 \times 10^{-8} \text{ мкс}^{-1}$. The values of the activation energy for glycerol permeability in human and bovine erythrocytes in the temperature range of $10(15) \dots 37^\circ\text{C}$ according to E. Campos *et al.* [8] were 35.7 and $80.1 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$, respectively. The authors believed these differences as consistent with found differences between the permeabilities of human and bovine erythrocytes and suggested that penetration occurs by different pathways: in human erythrocytes AQP3 plays an important role in the penetration of glycerol and in bovine erythrocytes this occurs through the lipid bilayer without the contribution of protein channels. However, it should be noted that the values of activation energy ($35.7 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$) which are lower comparing to our data, exceed the values characteristic for the channel penetration mechanism and do not allow to claim only channel mechanism for glycerol permeability in human erythrocytes. In addition, it should be noted the importance of the choice of temperature points for assessing the activation energy. If the activation energy is determined only by two points, as by E. Campos *et al.* [8],

визначення енергії активації. Якщо енергія активації визначається лише за двома точками, як в роботі E. Campos та співавт. [8], важливо, щоб ці точки не попали в область розриву (або зламу) ареніусової залежності, а також щоб вони знаходились в діапазоні температур з однаковою енергією активації (саме ці вимоги порушені в роботі E. Campos та співавт. [8]). У протилежному випадку одержане значення енергії активації може не відображати реального стану речей.

На відміну від еритроцитів, величина енергії активації проникання гліцерину, наприклад у дріжджові клітини *Saccharomyces cerevisiae* (26,2 кДж/моль) [6], характерна для каналного механізму проникання, хоча б часткового. Відомо, що гліцерин є суб'єктом метаболізму дріжджових клітин і їх мембрани мають спеціалізовані канали транспорту гліцерину. Клітини *S. cerevisiae* містять чотири гени, що кодують членів MIP-сім'ї [20]: осморегулюючого переносника гліцерину Fps1 та його гомолога Yfl054c [13,23], генетично близьких до аквагліцеропоринів, як передбачається з функцією транспорту гліцерину, і двох аквапоринів – водних каналів Aqp1 і Aqp2 [18]. Незважаючи на те, що гідрофільно-гідрофобні властивості та геометричні розміри молекул досліджених криопротекторів (гліцерин, 1,2-ПД і ДМСО) суттєво різняться, виявилось, що на відміну від еритроцитів коефіцієнти проникності дріжджових клітин *S. cerevisiae* для них вірогідно не відрізняються [6]. Геометричні параметри молекули гліцерину перевищують такі для молекул 1,2-ПД та ДМСО. Менші розміри молекул останніх у порівнянні з розмірами молекул гліцерину, а також більша їх гідрофобність, особливо молекул ДМСО ($K_p = 0,25$), очевидно, дозволяють їм проникати як крізь гліцеринові канали, так і крізь ліпідний бішар. При цьому енергія активації проникання крізь плазматичні мембрани дріжджових клітин *S. cerevisiae* для більш гідрофільних молекул гліцерину і 1,2-ПД практично збігаються (26,2 і 25,75 кДж/моль відповідно). Для більш гідрофобних молекул ДМСО енергія активації є трохи більшою (37,7 кДж/моль), що найімовірніше пов'язано з більшою часткою потоку цієї речовини крізь ліпідний бішар. Ці дані ще раз підтверджують, що при наявності каналного механізму проникання гліцерину крізь плазматичні мембрани клітин енергія активації знаходиться в межах, указаних в багатьох класичних роботах з цього питання.

Висновки

Коефіцієнти проникності еритроцитів людини для гліцерину, визначені методом розсіяння світла суспензією еритроцитів у зупиненому потоці [8, 21, 24], суттєво (на порядок величини) відрізняються від таких, отриманих методом лізису у водному розчині гліцерину [3, 16, дана робота] та методом швидкої

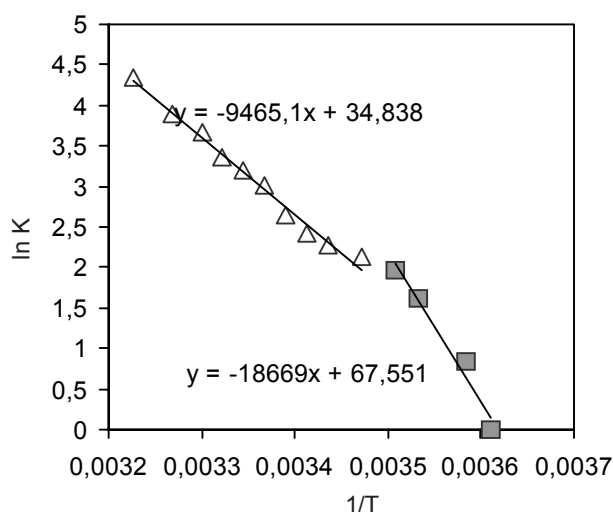


Рис. 2. Ареніусова залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для гліцерину (усереднені дані).

Fig. 2. Arrhenius dependence of permeability coefficients of human erythrocyte membrane for glycerol (average data).

it is important for these points not to get into the break (or kink) in Arrhenius' dependence and be in the temperature range with the same activation energy (namely these requirements were violated by E. Campos *et al.* [8]). Otherwise, the obtained value of the activation energy may not reflect the real situation.

Unlike red blood cells, the value of the activation energy for glycerol penetration into *e. g.* *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells (26.2 kJ/mol) [6] is typical for channel penetration mechanism, at least partial. Glycerol is known to be a part of yeast cells metabolism and their membranes possess specialized channels for glycerol transport. *S. cerevisiae* cells contain four genes encoding the members of the MIP family [20]: osmoregulating transporter of glycerol Fps1 and its homologue Yfl054c [13, 23], genetically close to aquaglyceroporines, supposed to conduct the glycerol transport and two aquaporines, water channels Aqp1 and Aqp2 [18]. Despite the fact that the hydrophilic-hydrophobic properties and geometrical dimensions of the molecules of studied cryoprotectants (glycerol, 1,2-PD and DMSO) were significantly different, it appeared that unlike erythrocytes the permeability coefficients of *S. cerevisiae* yeast cells for the mentioned substances did not differ significantly [6]. Geometric parameters of glycerol molecule exceed those of 1,2-PD and DMSO. Smaller size of the molecules of the latter if compared with glycerol molecules, as well as their higher hydrophobicity, especially of DMSO molecules ($C_d = 0.25$) obviously allow them to penetrate through both glycerol channels and the lipid bilayer. Moreover, the activation energy of penetration through the plasma membrane of *S. cerevisiae* yeast cells for more

фільтрації із застосуванням ^{14}C -міченого гліцерину [21]. Значення коефіцієнтів проникності, одержані останніми двома методами, цілком узгоджуються, що дає підстави вважати саме ці результати більш надійними, оскільки вказані методи засновані на зовсім різних підходах і, якщо і дають якісь системні помилки при їх використанні, ці помилки не можуть бути односпрямованими.

Отримана у даній роботі величина енергії активації проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини, а також її різке збільшення в діапазоні температур, нижчих за 12°C , свідчить про проникання молекул гліцерину крізь ліпідний бішар. В той же час ця величина практично співпадає з такою для 1,2-ПД для оброблених блокаторм білкових каналів еритроцитів (тобто для проникання 1,2-ПД крізь ліпідний бішар), хоча для надзвичайно гідрофільного гліцерину можна було б очікувати ще більших значень енергії активації. Таким чином, питання про механізми проникання гліцерину в еритроцити людини потребує подальшого вивчення.

Литература

1. Гордієнко О.І. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду // Проблеми криобіології. – 2003. – №1. – С. 38–45.
2. Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жилиякова Т.А., Шейкин В.И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биол. мембраны. – 1985. – Т. 2, №3. – С. 310–314.
3. Гордієнко О.І., Кошій С.В., Ліннік Т.П. Проницність мембран еритроцитів людини для гліцерину та його ефірних похідних // Фізика живого. – 2003. – Т.11, №2. – С. 29–37.
4. Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Биофиз. вестник. – 1998. – Вып. 2. – С. 59–63.
5. Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности // Проблеми криобіології. – 2009. – Т. 19, №3. – С. 164–172.
6. Давыдова Е.В., Коваленко И.Ф., Гордиенко О.И. Влияние температуры и блокатора белковых каналов на коэффициенты проницаемости дрожжей *S. cerevisiae* для воды и криопротекторов // Вісн. ХНУ. Серія: Біологія. – 2009. – Вып. 878. – С. 82–90.
7. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
8. Campos E., Moura T.F., Oliva A. et al. Lack of aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation // Bioch. Bioph. Res. Com. – 2011. – Vol. 408. – P. 477–481.
9. Garrick R.A., Patel B.C., Chinard F.P. Effects of sulfhydryl and other reagents on the diffusional permeability of dog erythrocytes to small solutes // BBA. – 1983. – Vol. 734. – P. 105–113.
10. Gordienko E.A., Gordienko Yu.E., Gordienko O.I. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // Cryo-Letters. – 2003. – Vol. 24, №4. – P. 229–244.

hydrophilic molecules of glycerol and 1,2-PD are almost the same (26.2 and 25.75 kJ/mol, respectively). For more hydrophobic molecules of DMSO the activation energy is slightly higher (37.7 kJ/mol), that is most likely caused by the greater proportion of the flow of this substance through the lipid bilayer. These data again confirm that in the case of channel mechanism of glycerol penetration through the cell plasma membranes the activation energy is in the ranges mentioned in many classic reports on the issue.

Conclusions

The coefficients of permeability of human erythrocytes to glycerol determined by light scattering by erythrocyte suspension in the stopped flow [8, 21, 24] significantly (by an order of magnitude) differ from those obtained by method of lysis in glycerol aqueous solution [3, 16, and this report] and by the method of rapid filtration using ^{14}C -labeled glycerol [21]. Permeability coefficients obtained by the latter two methods are quite consistent, which suggests that these results are more reliable, because these methods are based on entirely different approaches and, if they even give any systematic errors during the application, these errors can not be unidirectional.

The obtained in this paper value of the activation energy of glycerol penetration through the membrane of human erythrocytes and its dramatic increase in the range of temperatures below 12°C , indicates the penetration of glycerol molecules through the lipid bilayer. At the same time, this value is quite equal to those for 1,2-PD in the case of erythrocyte protein channels treated with a blocker (*i. e.* 1,2-PD penetration through the lipid bilayer), although for extremely hydrophilic glycerol one would expect greater values of activation energy. Thus, the question about the mechanisms of glycerol penetration in human erythrocytes requires further investigation.

References

1. Gordiyenko O.I. Temperature effect on human erythrocyte membrane permeability for 1,2-propane diol and dimethylsulfoxide // Problems of Cryobiology. – 2003. – N1. – P. 38–45.
2. Gordiyenko O.I., Yemets B.G., Zhilyakova T.A., Sheykin V.I. Temperature dependence of aqueous diffusion permeability of erythrocyte membranes in media with different ionic strength // Biol. Membrany. – 1985. – Vol. 2, N3. – P. 310–314.
3. Gordiyenko O.I., Koshchiy S.V., Linnik T.P. Permeability of human erythrocyte membrane for glycerol and its etherized derivatives // Fizika Zhivogo. – 2003. – Vol. 11, N2. – P. 29–37.
4. Gordiyenko O.I., Panina Yu.Ye., Kovalenko I.F. Determining the permeability coefficients of erythrocyte membranes for cryoprotectants // Biophysical Bulletin. – 1998. – Issue 2. – P. 59–63.
5. Davydova E.V., Gordiyenko O.I. Temperature effect on erythrocyte membrane permeability for cryoprotectants with different hydrophobicities // Problems of Cryobiology. – 2009. – Vol. 19, N3. – P. 164–172.

11. Gordiyenko O.I., Linnik T.P., Gordiyenko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols // *Bioelectrochemistry*.–2004. – Vol. 62, №2. – P. 115–118.
12. Leibo S.P. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures // *Cryobiology*. – 1976. – Vol. 13, №5. – P. 587–598.
13. Luyten K., Albertyn J., Skibbe W. F. et al. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14. – P. 1360–1371.
14. Macey R.I. Transport of water and urea in red blood cells // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 246. – P. 195–203.
15. Mazur P., Leibo S.P., Miller R.H. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hypertonic solutions at various temperatures // *J. Membr. Biol.* – 1974. – Vol. 15. – P. 107–136.
16. Mazur P., Miller R.H. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 and 20°C // *Cryobiology*. – 1976. – Vol.13. – P. 507–522.
17. McElhaney R.N. The effect of membrane lipids on permeability and transport in procarotes // *Structure and properties of cell membranes*. VII. Molecular basis of selected transport systems / Ed. by G. Benga.– CRC Press, 1985. – P. 20–51.
18. Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 334–343.
19. Ojcius D.M., Solomon A.K. Sites of p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of red cell urea and water transport // *BBA*. – 1988. – Vol. 942. – P. 73–82.
20. Park J.H., Saier M.H. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins // *J. Membr. Biol.* – 1996. – Vol. 153. – P. 171–180.
21. Roudier N., Verbavatz J.-M., Maurel C. et al. Evidence for the presence of aquaporine-3 in human red blood cells // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, №14. – P. 8407–8412.
22. Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A. et al. The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 1983.– Vol. 414. – P. 97–124.
23. Tamas M. J., Luyten K., Sutherland F. C. W. et al. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation // *Mol. Microbiol.* – 1999. – Vol. 31. – P. 1087–1104.
24. 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. – Vol. 1022. – P. 57–71.
25. Toon M.R., Solomon A.K. Permeability and reflection coefficients of urea and small amides in human red cell // *J. Membr. Biol.* – 1996. – Vol. 153. – P. 137–146.
26. Viera F.L., Sha'afi R.I., Solomon A.K. The state of water in human and dog red cell membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1970. – Vol. 55. – P. 451–466.
6. Davydova E.V., Kovalenko I.F., Gordiyenko O.I. Effect of temperature and blocker of protein channels on permeability coefficients of *S. cerevisiae* yeasts for water and cryoprotectants // *Visnyk KhNU. Series Biology*. – 2009. – Issue 878. – P. 82–90.
7. Chernitskiy E.A., Vorobey A.V. Structure and function of erythrocyte membranes. – Minsk: Nauka i Tekhnika, 1981.– 216 p.
8. Campos E., Moura T.F., Oliva A. et al. Lack of aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation // *Bioch. Bioph. Res. Com.* – 2011. – Vol. 408. – P. 477–481.
9. Garrick R.A., Patel B.C., Chinard F.P. Effects of sulfhydryl and other reagents on the diffusional permeability of dog erythrocytes to small solutes // *BBA*. – 1983. – Vol. 734. – P. 105–113.
10. Gordienko E.A., Gordienko Yu.E, Gordienko O.I. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *Cryo-Letters*. – 2003. – Vol. 24, N4. – P. 229–244.
11. Gordiyenko O.I., Linnik T.P., Gordiyenko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols // *Bioelectrochemistry*.–2004. – Vol. 62, N2. – P. 115–118.
12. Leibo S.P. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures // *Cryobiology*. – 1976. – Vol. 13, N5. – P. 587–598.
13. Luyten K., Albertyn J., Skibbe W. F. et al. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14. – P. 1360–1371.
14. Macey R.I. Transport of water and urea in red blood cells // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 246. – P. 195–203.
15. Mazur P., Leibo S.P., Miller R.H. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hypertonic solutions at various temperatures // *J. Membr. Biol.* – 1974. – Vol. 15. – P. 107–136.
16. Mazur P., Miller R.H. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 and 20°C // *Cryobiology*. – 1976. – Vol.13. – P. 507–522.
17. McElhaney R.N. The effect of membrane lipids on permeability and transport in procarotes // *Structure and properties of cell membranes*. VII. Molecular basis of selected transport systems / Ed. by G. Benga.– CRC Press, 1985. – P. 20–51.
18. Meyrial V., Laize V., Gobin R. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae* // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 334–343.
19. Ojcius D.M., Solomon A.K. Sites of p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of red cell urea and water transport // *BBA*. – 1988. – Vol. 942. – P. 73–82.
20. Park J.H., Saier M.H. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins // *J. Membr. Biol.* – 1996. – Vol. 153. – P. 171–180.
21. Roudier N., Verbavatz J.-M., Maurel C. et al. Evidence for the presence of aquaporine-3 in human red blood cells // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, N14. – P. 8407–8412.
22. Solomon A.K., Chasan B., Dix J.A. et al. The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 1983.– Vol. 414. – P. 97–124.
23. Tamas M. J., Luyten K., Sutherland F. C. W. et al. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation // *Mol. Microbiol.* – 1999. – Vol. 31. – P. 1087–1104.
24. 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. – Vol. 1022. – P. 57–71.
25. Toon M.R., Solomon A.K. Permeability and reflection coefficients of urea and small amides in human red cell // *J. Membr. Biol.* – 1996. – Vol. 153. – P. 137–146.
26. Viera F.L., Sha'afi R.I., Solomon A.K. The state of water in human and dog red cell membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1970. – Vol. 55. – P. 451–466.

Надійшла 14.07.2012

Accepted 14.07.2012