

Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини

О.І. ГОРДІЄНКО, С.Є. КОВАЛЕНКО, І.Ф. КОВАЛЕНКО

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Mechanisms of Glycerol Penetration Through Membranes of Human Erythrocytes

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

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

Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини є наразі дискусійним питанням. Гліцерин – найбільш гідрофільний з відомих криопротекторів. Коефіцієнт його розподілу між гідрофобною фазою та водою становить 0,005, що на порядок менше, ніж 1,2-пропандіолу (0,076). Тому його проникання крізь ліпідний бішар вкрай утруднено. Але було показано, що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом pCMBS, що є блокатором білкових каналів, не впливає на їх проникність до гліцерину, і зроблено висновок, що гліцерин проникає в еритроцити ліпідним шляхом. В той же час в інших роботах показано, що в мембранах еритроцитів людини існують гліцеринові канали, утворені каналоутворюючим білком AQP3, і гліцерин, який на думку авторів, проникає в ці клітини по специфічним каналам.

Енергія активації – одна з найважливіших характеристик транспортних процесів. Аргументом на користь проникання молекул крізь плазматичні мембрани за тим чи іншим механізмом є значення видимої енергії активації цього процесу. На практиці чисельну величину енергії активації (E_a) визначають з нахилу графіка $\ln k$ від $1/T$ згідно з рівнянням Ареніуса. Прониканню речовин за каналним механізмом відповідає значення енергії активації в діапазоні 15–25 кДж/моль, яке узгоджується зі значеннями енергії активації дифузії в об'ємному розчині. При прониканні молекул шляхом розчинення і дифузії в ліпідному матриксі енергія активації має значення 30–85 кДж/моль і більше.

Для визначення механізмів проникання гліцерину в еритроцити людини нами була досліджена температурна залежність проникності мембран еритроцитів для молекул цієї речовини в діапазоні температур 37...4°C. Коефіцієнти проникності визначали з часових залежностей гемолізу еритроцитів у водних розчинах гліцерину, отриманих методом малокутового розсіювання світла.

У результаті апроксимації експериментальних точок в координатах Ареніуса були отримані значення енергії активації проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини: 76 ± 13 кДж/моль в діапазоні температур 37...16°C та $159 \pm 15,6$ кДж/моль в діапазоні 12...4°C. Отримані у нашому дослідженні значення енергії активації характерні для ліпідного шляху. В той же час вони практично співпадають з такими при використанні 1,2-пропандіолу для оброблених блокатором білкових каналів еритроцитів (тобто для проникання 1,2-пропандіолу крізь ліпідний бішар), хоча для такої надзвичайно гідрофільної речовини, як гліцерин, можна було б очікувати ще більших значень енергії активації.

Таким чином, питання про механізми проникання гліцерину в еритроцити людини потребує подальшого вивчення.

Nowadays the question about mechanisms of glycerol penetration through the membranes of human erythrocytes is debatable. Glycerol is the most hydrophilic known cryoprotectant. Its distribution coefficient between the hydrophobic phase and water is 0.005, which is far less than 1,2-propanediol coefficient (0.076). Therefore, its penetration through the lipid bilayer is extremely difficult. But there was shown that treatment of erythrocyte sulfhydryl reagent pCMBS, being a blocker of protein channels, did not affect their permeability to glycerol and concluded that glycerol penetrated into erythrocytes with lipids. At the same time, other researches show that in human erythrocyte membranes there are glycerol channels formed by channel-forming protein AQP3, and glycerol penetrates into these cells through specific channels.

Activation energy is one of the most important characteristics of transport processes. The value of visible activation energy of this process is an argument in favor of molecules penetration through the plasmatic membranes with one or another mechanism. In practice, the numerical value of activation energy (E_a) is determined by curve slope $\ln k$ from $1/T$ according to Arrhenius equation. Penetration of substances with channel mechanism corresponds the activation energy value within the range of 15–25 kJ/mol, agreed with activation energy values of diffusion in bulk solution. Activation energy during penetration of molecules by dissolution and diffusion has a value 30–85 kJ/mol or higher in lipid matrix.

To establish the mechanisms of glycerol penetration in human erythrocytes we investigated the temperature dependence of erythrocyte membrane permeability for molecules of this substance within the temperature range of 37...4°C. Permeability coefficients were established with time-dependent hemolysis of erythrocytes in glycerol aqueous solutions, obtained by small-angle light scattering.

As a result of approximation of experimental points in Arrhenius coordinates there were obtained activation energy values of glycerol penetration through the membranes of human erythrocytes. It was 76 ± 13 kJ/mol within the range 37...16°C and 159 ± 15.6 kJ/mol in 12–4°C. The activation energy values obtained in our study are characteristic for lipids. At the same time, they practically coincide with those using 1,2-propanediol for channel blocker of erythrocytes treated with protein (*i. e.* for penetration of 1,2-propanediol through the lipid bilayer), although we would expect higher values of activation energy of an extremely hydrophilic substance as glycerol.

Thus, the question about the mechanisms of glycerol penetration into human erythrocytes requires the further study.