

# Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду

О.І. ГОРДІЄНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Temperature Effect on Human Erythrocyte Membrane Permeability for 1,2-Propane Diol and Dimethylsulfoxide

GORDIENKO O.I.

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

Представлено результати визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилсульфоксиду (ДМСО) в діапазоні температур 3-37°C. Показано, що Ареніусові залежності коефіцієнтів проникності для досліджених речовин зазнають зламів у температурних інтервалах 8-12, 18-20 і 28-30°C, відомих як критичні для низки функціональних показників біологічних мембран, з різкою зміною значень енергії активації ( $E_A$ ). Розглядалися можливі механізми термоіндукованих змін параметрів проникання неелектролітів крізь мембрани еритроцитів.

**Ключові слова:** еритроцити, проникність, 1,2-пропандіол, ДМСО, Ареніусові залежності.

Представлены результаты измерений коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов человека для 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида в диапазоне температур 3-37°C. Показано, что Аррениусовы зависимости коэффициентов проницаемости для исследованных веществ претерпевают ряд изломов в интервалах температур 8-12, 18-20 и 28-30°C, известных как критические для ряда функциональных показателей биологических мембран, с резким изменением значений энергии активации. Рассматривались возможные механизмы термоиндуцированных изменений параметров проникновения неэлектролитов через мембраны эритроцитов.

**Ключевые слова:** эритроциты, проницаемость, 1,2-пропандиол, ДМСО, Аррениусовы зависимости.

The paper presents the results of study of human erythrocyte membrane permeability for 1,2-propane diol (1,2-PD) and dimethylsulfoxide (DMSO) within temperature limits of 3-37°C. Arrhenius dependencies of permeability coefficients for the studied substances were shown to be underwent the series of breaks within the following temperature limits: 8-12, 18-20 and 28-30°C (being known as the critical ones for some functional indices of biological membranes) with sharp changes in activation energy ( $E_A$ ). Some possible mechanisms of thermoinduced changes in parameters of non-electrolytes permeation via erythrocyte membrane are discussed.

**Key words:** erythrocytes, permeability, 1,2-propane diol, dimethylsulfoxide, Arrhenius dependencies.

Проникність клітинних мембран визначається як властивостями самої мембрани, так і параметрами проникних молекул. У роботі [5] було досліджено проникність мембран еритроцитів людини до низки біфільних неелектролітів і показано, що важливими параметрами молекул, які визначають їх проникання крізь плазматичну мембрану, є як їх геометричні розміри (діаметр, довжина, об'єм), так і такі фізико-хімічні властивості, як гідрофобність та гідрофільність, які кількісно характеризуються коефіцієнтом розподілу між гідрофобною та гідрофільною фазами. Цей факт тісно пов'язаний з властивостями мембрани, а саме з існуванням двох альтернативних шляхів проникання цих молекул крізь мембрани еритроцитів. Хоча параметри обох типів впливають на проникання молекул тим чи іншим шляхом, проте геометричні параметри є більш критичними для проникання водними білковими порами сталого розміру, тоді як гідрофобні властивості в першу чергу визначають можливість

Cell membrane permeability is determined by both peculiarities of membrane itself and parameters of permeating molecules. In our previous paper [5] we studied the human erythrocyte membrane permeability for series of biphilic non-electrolytes and showed that the important molecules parameters, determining its permeation via plasma membrane were both their geometrical parameters (diameter, length, volume), and such physical and chemical peculiarities as hydrophobic and hydrophilic properties, being characterised by the coefficient of partition between hydrophilic and hydrophobic phases. This fact is tightly associated with membrane peculiarities, namely with existence of two alternative permeation ways of these molecules via erythrocyte membrane. Although these two parameters influence the molecules permeation by one or another way, the geometrical parameters are more critical for permeation via aqueous protein pores, whereas the hydrophobic parameters determine, first of all, the possibility of permeation via lipid bilayer. Existence of these alternative ways is determined by

**Адреса для кореспонденції:** Гордієнко О.І., Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 7728871, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Gordienko O.I., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7728871, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

проникання крізь ліпідний бішар. Існування цих альтернативних шляхів визначається структурою мембрани, тобто її ліпідним складом, а також білками, що можуть утворювати наскрізні водні пори певного розміру.

Той факт, що одним з найважливіших параметрів, який визначає проникання молекул крізь мембранні структури, є їх гідрофобність або гідрофільність, підкреслює ведучу роль водного середовища у перебігу біологічних процесів і в самому існуванні та функціонуванні таких складних біологічних структур, як високомолекулярні активні білки та надмолекулярні біологічні структури, в першу чергу мембрани. Температура є невід'ємним чинником зовнішнього середовища, що впливає на структуру та взаємодію біологічних молекул і води. Вивчення температурних залежностей проникності мембран для різних речовин є інформативним методом дослідження структури мембран і механізмів цієї проникності.

### Результати та обговорення

У роботі подано результати дослідження впливу температури на коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини, що вимірювались розробленим нами методом [13], для кріопротекторів ДМСО та 1,2-ПД. Молекули цих кріопротекторів відрізняються в першу чергу своїми фізико-хімічними властивостями. Молекули ДМСО більш гідрофобні порівняно з молекулами 1,2-ПД: коефіцієнти розподілу цих речовин в системі "n-октанол - вода" – 0,247 та 0,076 відповідно [7].

Дослідження коефіцієнтів проникності в діапазоні температур 3-37°C показало, що коефіцієнти проникності мембран еритроцитів для ДМСО та 1,2-ПД при температурі 37°C достовірно не відрізняються і становлять  $(2,66 \pm 0,16) \times 10^{-6}$  та  $(2,82 \pm 0,11) \times 10^{-6}$  м/с відповідно. При температурі 3°C різниця між коефіцієнтами проникності зростає і стає вірогідною. При цій температурі вони становлять  $(0,096 \pm 0,015) \times 10^{-6}$  м/с для ДМСО та  $(0,135 \pm 0,019) \times 10^{-6}$  м/с для 1,2-ПД. Середні  $E_a$  при апроксимації по всьому температурному діапазону для трьох донорів: 71,34±2,65 і 67,24±5,5 кДж/моль для ДМСО та 1,2-ПД відповідно. Оскільки такі усереднені величини є не дуже інформативними внаслідок того, що індивідуальні властивості еритроцитів різних донорів суттєво впливають на результати визначення характеристик цих клітин [3,17], а розкид параметрів може маскувати ефекти температури, ми проаналізували температурні залежності коефіцієнтів проникності досліджуваних речовин для кожного донора окремо.

Температурні залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для ДМСО (рис.1) та 1,2-ПД (рис.2) представлені в Ареніусо-

membrane structure, i.e. by its lipid composition, as well as by proteins, being able to form the trans-membrane aqueous pores of certain size.

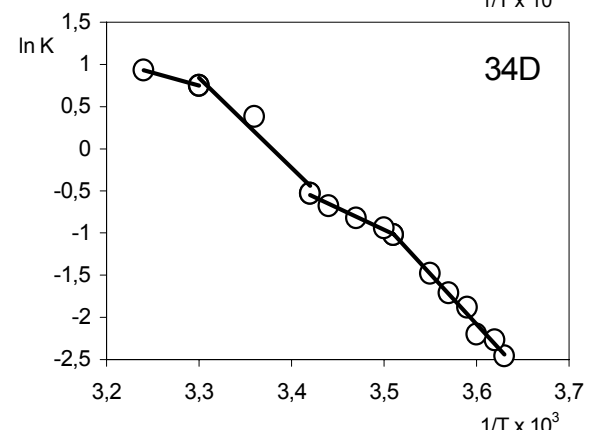
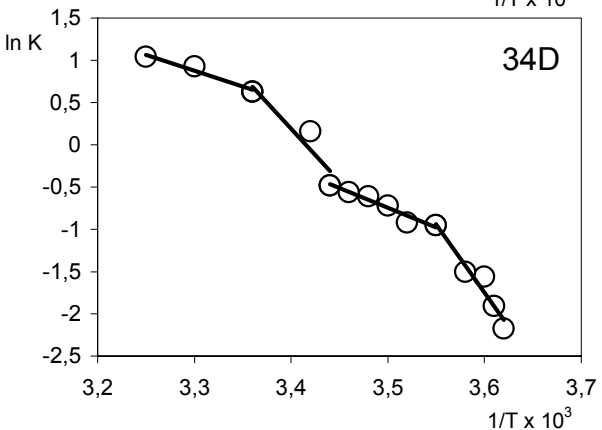
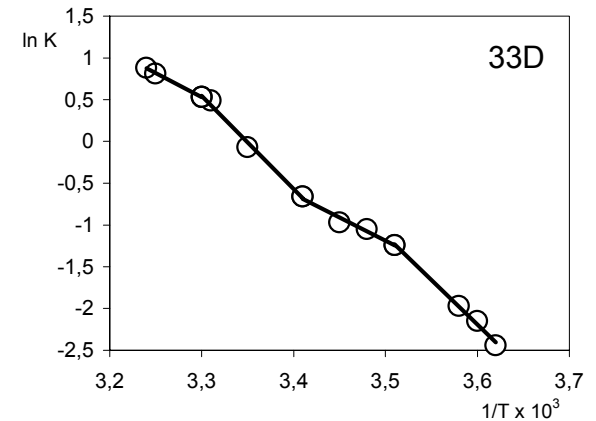
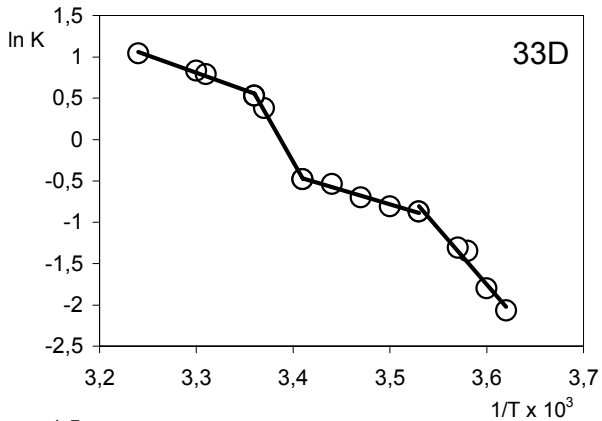
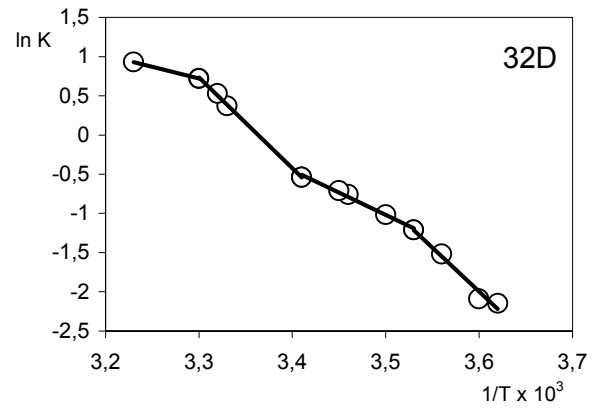
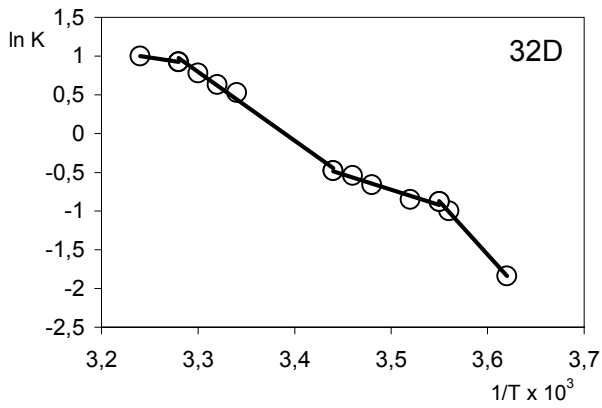
The fact that the most important parameters, determining permeation of molecules via membrane structures, are the hydrophobic or hydrophilic properties, accentuates the leading role of hydraulic environment in biological processes and in existence and functioning of such complex biological structures as highly molecular active proteins and supramolecular biological structures, first of all, membranes. Temperature is an integral index of external environment, which influences the structure and interaction of biological molecules and water. Studying the temperature dependencies of membrane permeability for various substances is an informative method of investigation of membrane structure and mechanisms of this permeability.

### Results and discussion

This paper represents the results of investigation of temperature effect on human erythrocyte membrane permeability coefficients, measured with the method developed by us [13], for cryoprotectants: DMSO and 1,2-PD. Molecules of these cryoprotectants differ, first of all, by their physical and chemical properties. DMSO molecules are more hydrophobic comparing to those of 1,2-PD: the coefficients of partition in "n-octanol-water" made 0.247 and 0.076, correspondingly [7].

Investigation of permeability coefficients within the temperature limits of 3-37°C showed that erythrocyte membrane permeability coefficients for DMSO and 1,2-PD at 37°C did not significantly differ and made  $(2.66 \pm 0.16) \times 10^{-6}$  and  $(2.82 \pm 0.11) \times 10^{-6}$  m/s, correspondingly. At the temperature of 3°C the difference between permeability coefficients increased and became a statistical significance. At this temperature they made  $(0.096 \pm 0.015) \times 10^{-6}$  m/s for DMSO and  $(0.135 \pm 0.019) \times 10^{-6}$  m/s for 1,2-PD. Average activation energies when approximating within the whole temperature range for three donors made 71.34±2.65 and 67.24±5.5 kJ/mol for DMSO and 1,2-PD, correspondingly. Due to the fact that these average values are not very informative because of considerable influence of individual properties of the erythrocytes derived from various donors on the results of determining the characteristics of these cells [3,17], and the parameters' spreading may mask the temperature effects, we analysed the temperature dependencies of permeability coefficients separately for each donor.

The temperature dependencies of human erythrocyte membrane permeability for DMSO and 1,2-PD are presented as an Arrhenius plot in Fig.1 and 2, correspondingly. Analysis of results and approximation



**Рис.1.** Ареніусові залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для 1,2-ПД.

**Fig.1.** Arrhenius dependencies of human erythrocyte membrane permeability for 1,2-PD.

вих координатах. Аналіз результатів та апроксимація експериментальних точок в окремих температурних діапазонах свідчать про існування термоіндукованих змін  $E_A$  проникності еритроцитарних мембран при температурах 8-12, 18-20°C для обох досліджених речовин, а також при 28-30°C – для ДМСО та більш широкий діапазон при 25-30°C – для 1,2-ПД. Оскільки для всіх трьох донорів такі зміни є аналогічними, маємо підстави вважати, що отримані результати не є випадковими. З представлених Ареніусових залежностей видно, що зміни  $E_A$  для 1,2-ПД більш виражені. Але вірогідність різниці  $E_A$  для всіх пар суміжних діапазонів температур обох речовин становить

**Рис.2.** Ареніусові залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для ДМСО.

**Fig.2.** Arrhenius dependencies of human erythrocyte membrane permeability for DMSO.

of experimental points within separate temperature limits testify to the existence of thermoinduced changes in activation energy of erythrocyte membrane permeability at the temperatures of 8-12, 18-20°C for both studied substances, at 28-30°C for DMSO and within much wider limits (at 25-30°C) for 1,2-PD. Because of similar changes for all three donors we can conclude that obtained results are not casual. The Arrhenius plots show that activation energy changes for 1,2-PD are more expressed. However the probability of difference between activation energies for all pairs of adjacent temperature limits makes 0.99. The temperatures of breaks in Arrhenius dependencies coincide well for all donors (table).

0,99. Задовільно збігаються також температури зламів Ареніусових залежностей для всіх донорів (таблиця).

Еритроцитарні мембрани вирізняються серед інших високим вмістом холестерину. Саме через це калориметричні та рентгеноскопічні дослідження не виявили в них термотропних переходів у діапазоні позитивних температур [1, 11]. Але дослідження транспортних характеристик еритроцитів виявляють такі переходи в їх мембранах при температурах вище 0°C. Багато робіт присвячено дослідженню змін структурно-функціональних параметрів мембран еритроцитів у діапазоні 18-20°C. При цих температурах спостерігаються злами на графіках Ареніуса транспорту глюкози

в інтактних еритроцитах та їх тінях [15], затухання фотохемілюмінесценції білків мембран, активності мембранної ацетилхолінестерази, полегшеної дифузії L-лейцину [11]. При цій же температурі зареєстровано злам на температурній залежності осмотичної стійкості еритроцитів [11]. Ретельні дослідження цього феномену за допомогою різноманітних спинових міток і зондів показали, що незалежно від хімічної природи спинових радикалів, які використовувались в експериментах, критичні температури як для ферментативної активності, так і для структурних змін у ліпідному бішарі реєструються в тому ж інтервалі температур (20°C) [2]. Автори зазначають, що такі структурні переходи спостерігаються для мембран, що суттєво відрізняються за своїм ліпідним складом (тіні еритроцитів, мікосоми головного мозку бика, саркоплазматичний ретикулум). Вони також вказують на те, що ділянки білкової молекули Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФази, які містять SH-групи, характеризуються термоіндукованими конформаційними зсувами при тій же температурі. Обробка препаратів Na,K-АТФази фосфоліпазою, яка відщеплює полярні головки молекул фосфоліпідів і порушує електростатичну взаємодію фосфоліпідів з білками, не знищує термоіндукованих переходів у ліпідному бішарі, але графіки Ареніуса для активності Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФази стають лінійними. Це ще раз підкреслює важливий вплив білок-ліпідних взаємодій на термотропні переходи в білку.

При дослідженні властивостей мембран еритроцитів у діапазоні температур від 20°C до фізіологіч-

Енергія активації проникання 1,2-ПД та ДМСО крізь мембрани еритроцитів людини в різних температурних діапазонах  
Activation energy of 1,2-PD and DMSO permeation via human erythrocyte membranes within various temperature limits

Донор Donor	1,2-ПД 1,2-PD			ДМСО DMSO		
	Діапазон температур, °C Temperature limits, °C	E <sub>A</sub> <sup>'</sup> кДж/моль kJ/mol	<E <sub>A</sub> <sup>'</sup> кДж/моль kJ/mol	Діапазон температур, °C Temperature limits, °C	E <sub>A</sub> <sup>'</sup> кДж/моль kJ/mol	<E <sub>A</sub> <sup>'</sup> кДж/моль kJ/mol
32 33 34	3-8 3-10 3-9	114,7 114,2 134,2	121,0±11,4	3-10 3-12 3-12	92,4 88,6 99,2	93,37±5,38
32 33 34	8-18 10-20 9-18	32,7 29,9 38,9	33,8±4,6	10-20 12-20 12-20	48,4 46,3 42,6	45,8±2,9
32 33 34	18-26 20-25 18-25	84,0 171,0 103,8	119,6±15,6	20-28 20-28 20-25	92,3 94,5 126,4	104,4±19,1
32 33 34	26-32 25-30 25-30	56,1 42,1 41,6	46,6±8,2	28-30 28-30 25-30	79,0 46,4 51,3	58,9±17,6
32 33 34	32-37 30-37 30-37	14,5 22,2 18,3	18,3±3,8	30-37 30-37 30-37	24,9 44,9 24,9	31,57±11,5

Erythrocyte membranes differ from other ones by their high cholesterol content. For this reason the calorimetric and X-ray investigations do not reveal the thermotropic transition in range of positive temperatures [1, 11]. However the studies on transport characteristics of erythrocytes show such breaks in their membranes at the temperatures higher than 0°C. Many works are dedicated to the investigation of changes in structural and functional parameters of erythrocyte membranes within limits of 18-20°C. At these temperatures there are observed the breaks on Arrhenius dependencies of glucose transport in intact erythrocytes and their ghosts [15], an attenuation of membrane proteins photochemiluminescence, membrane acetylcholinesterase activity, facilitated L-leucine diffusion [11]. At this temperature the break in temperature dependence of erythrocyte osmotic resistance is recorded [11]. Detailed investigation of this phenomenon using various spin labels and probes showed, that independently on chemical origin of spin radicals, used in experiments, the critical temperatures for both enzymatic activity and structural changes in lipid bilayer were recorded within the same temperature limit (20°C) [2]. The authors believe, that these structural transitions are observed in membranes, which considerably differ by their lipid composition (erythrocyte ghosts, microsomes of bovine brain, sarcoplasmic reticulum). They specify also that the parts of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, containing SH-groups, are characterised by thermoinduced conformation shifts at these temperatures. Treating of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase samples with phospholipase, which splits off the



них автори роботи [12] показали, що проникність мембран до фарбника АНС (аніліновий синій) зазнає ряд термоіндукованих змін. Причому в інтервалах температур 20-28 та 36-42°C величини  $E_A$  процесу добре відтворювались в різних дослідах і мали достатньо великі значення (111 та 144 кДж/моль відповідно), тоді як для діапазонів температур 28-36 та 42-46°C варіювали для різних дослідів і мали низькі значення. Також показано [14], що ліпосоми ДМФХ/ДПФХ (диметилфосфатидилхолін/дипальмітоїлфосфатидилхолін) втрачають йони  $K^+$  в діапазоні температур 28-32°C. Ареніусові залежності рухливості малеїмідної та йодацетамідної спинових міток, ковалентно зв'язаних з білками спектрин-актинового комплексу еритроцитів людини та їх тіней, зазнають зламу при температурах 30 і 10-12°C [8-10]. Це свідчить про конформаційний перехід водно-білкової поверхні цитоскелетних білків в еритроцитах.

Інший відомий інтервал температур, в якому спостерігаються особливості ходу температурних залежностей різних функціональних параметрів мембран еритроцитів, лежить в діапазоні 8-12°C. Як вже було зазначено вище, методом ЕПР [8,10] показано, що при 10-12°C спостерігається злам Ареніусової залежності частоти обертання йодацетамідної мітки, зв'язаної з SH-групами гідрофобних ділянок цитоскелетних білків еритроцитів. Це корелює з даними Ареніусової залежності флюоресценції мембранних білків, що має злам при температурі 12°C [1]. Близьку до цього інтервалу температуру (15°C) вказують у роботі [11] як температуру зламу Ареніусової залежності швидкості обмінної дифузії для  $Cl^-$ . При дослідженні температурної залежності часу обміну молекул води еритроцитами [4] ми виявили, що в інтервалі температур 8-12°C графіки Ареніуса зазнають зламу зі значним збільшенням  $E_A$  процесу при температурах нижче 8°C. Якщо прийняти до уваги, що існування білкових каналів, проникних для води та малих неелектролітів, зв'язують з аніонобінним білком смуги 3 [16], а також що периферичні білки актин-спектринового комплексу еритроцитів взаємодіють з інтегральним білком смуги 3 та з ліпідним бішаром [11], то можна вважати, що наявність зламу Ареніусових залежностей у цьому діапазоні температур для всіх зазначених вище процесів є проявом одних і тих самих перебудов в білок-ліпідному комплексі еритроцитарних мембран.

Таким чином, отримані нами зміни в ході температурних залежностей пасивної проникності мембран еритроцитів людини до неелектролітів 1,2-ПД та ДМСО узгоджуються з величезною кількістю існуючих наразі експериментальних даних щодо впливу температури на біологічні

phospholipids polar heads and breaks the electrostatic interaction of phospholipids with proteins, does not eliminate the thermoinduced transitions in lipid bilayers, but the Arrhenius dependencies for  $Na^+, K^+$ -ATPase activity became linear. This accentuates once more the important effect of protein-lipid interactions on thermotropic transitions in proteins.

When studying the erythrocyte membrane properties within temperature interval from 20°C up to the physiological ones the authors of the paper [12] showed that membrane permeability for aniline blue dye underwent the series of thermoinduced changes. In this case within temperature intervals of 20-28 and 36-42°C the activation energy values were well-reproduced in various experiments and were of quite high values (111 and 144 kJ/mol, correspondingly), whereas they varied within the temperature limits of 28-36 and 42-46°C for various experiments and were of low values. It is shown also [14], that DMPC/DPPC (dimethylphosphatidylcholine/dipalmitoilphosphatidylcholine) liposomes loose the  $K^+$  ions within temperature limits of 28-32°C. Arrhenius dependencies of motility of maleimide and iodacetamide spin labels, covalently associated with proteins of spectrin-actin complex of human erythrocytes and their ghosts, are underwent the breaks at temperatures of 30 and 10-12°C [8-10]. This testifies to the presence of conformation transition of aqueous-protein surface of erythrocyte cytoskeleton proteins.

Another known temperature interval, within which there are observed the peculiarities in the course of temperature dependencies of various functional parameters of erythrocyte membrane, is within limits of 8-12mC. As it was stated above, it was shown [8, 12] using EPR method, that at 10-12mC there was a break of Arrhenius dependence of rotation frequency of iodacetamide label, associated with SH-groups of hydrophobic parts of erythrocyte cytoskeleton proteins. This correlates with the data on Arrhenius dependence of membrane protein's fluorescence, which has a break at the temperature of 12°C [1]. A temperature close to this interval (15°C) is noted in the paper [11] as the temperature of break of Arrhenius dependence of  $Cl^-$  exchange diffusion rate. When studying the temperature dependence of exchange time with water molecules by erythrocytes [4], we found that within temperature interval of 8-12°C the Arrhenius dependencies underwent the break with a considerable increase of activation energy of this process at the temperatures lower than 8°C. When taking into account that existence of protein channel, being permeable for water and small non-electrolytes, is associated with anion-exchange band 3 protein [16], and that peripheral proteins of erythrocyte actin-spectrin complex interact with integral band 3 protein and lipid bilayer [11], it could be supposed that presence of

системи взагалі та на мембрани еритроцитів зокрема. Отримані температури зламів Ареніусових залежностей лежать в інтервалах температур, відомих як критичні, в яких відбуваються зміни швидкостей багатьох біологічних процесів, пов'язаних з мембранами еритроцитів. Різка зміна  $E_A$  процесу проникання неелектролітів у діапазоні температур 8-12°C співпадає з нашими даними щодо дифузійної проникності мембран еритроцитів для молекул води [4] і даними роботи [11] для обміну  $Cl^-$ . Це ще раз підтверджує уявлення, що гідрофільні пори в мембранах еритроцитів, доступні для води та малих неелектролітів, пов'язані з аніонобінним білком смуги 3, а злам температурної залежності в інтервалі 8-12°C спричинений конформаційним переходом в актин-спектриновому комплексі еритроцитів. Значення  $E_A$  при температурах, нижчих 8°C, для проникання ДМСО є вірогідно меншим, ніж для 1,2-ПД. Очевидно, різке збільшення  $E_A$  проникання цих неелектролітів пов'язано зі зменшенням доступності для них водних пор, а проникання ліпідними шляхами обумовлює менше значення  $E_A$  процесу для більш гідрофобних молекул ДМСО. В інтервалі ж температур 12-20°C значення  $E_A$  для 1,2-ПД є вірогідно меншим, ніж для ДМСО. У роботі [5] показано, що при температурах біля 20°C існує два альтернативних шляхи, які доступні для проникання обох типів молекул. Більша гідрофільність 1,2-ПД, очевидно, забезпечує меншу  $E_A$  при цій температурі, оскільки більша частка потоку 1,2-ПД проходить крізь водні білкові пори.

Інтервали температур різкого збільшення  $E_A$  проникності 18-20°C та повторного її зменшення 25(28)-32°C задовільно збігаються з інтервалами температур посилення Н-зв'язків води (18-21°C) та їх послаблення (28-32°C), виявлених в системі вода-йони-білки [6] (рис.3). Інтервал температур 25(28)-32°C збігається також з інтервалом температур максимуму проникності ліпосом, виготовлених з ліпідів еритроцитарних мембран [11]. Менші зміни  $E_A$  проникання ДМСО для всіх пар суміжних діапазонів температур можуть бути пов'язані з більшою гідрофобністю ДМСО, внаслідок цього більшою часткою його потоку крізь загальну поверхню ліпідного бішару, більшим безпосереднім впливом ДМСО на водно-білково-ліпідні взаємодії в мембранах [8-10]. Менша ефективна  $E_A$  для проникання 1,2-ПД в інтервалі 30-37°C також підтверджує факт, що більша частка потоку 1,2-ПД проходить крізь водні білкові пори,  $E_A$  дифузії для яких є меншою, ніж для ліпідного бішару [17].

## Висновки

Таким чином, проведені дослідження темпера-

Arrhenius dependence break within these limits for all above stated processes is the expression of the same transformations in protein-lipid complex of erythrocyte membrane.

Thus, the obtained by us changes in temperature dependencies course of passive permeability of human erythrocyte membranes for non-electrolytes 1,2-PD and DMSO correspond to a huge number of existing experimental data on temperature effect on biological systems in general and on erythrocyte membrane, in particular. Obtained temperatures of Arrhenius dependencies breaks are within temperature intervals, known as a critical ones, in which the changes in rates of many biological processes associated with erythrocyte membranes occurred. Sharp change in activation energy of non-electrolytes permeation process within temperature limits of 8-12°C are in accordance with our data on diffusion permeability of erythrocyte membrane for water molecules [4] and with data of the paper [11] on  $Cl^-$  exchange. This confirms once again the notion, that erythrocyte membrane hydrophilic pores, being accessible for water and small non-electrolytes, are associated with anion-exchange band 3 protein, and Arrhenius dependence break within interval of 8-12°C is caused by conformation transition in erythrocyte actin-spectrin complex. Activation energy values at temperatures lower than 8°C are significantly lower for DMSO comparing to 1,2-PD. Obviously, the sharp increase of activation energy of this non-electrolytes permeation is associated with decrease of accessibility of aqueous pores for them, and permeation via lipid layer is caused by the lower value of activation energy for more hydrophobic molecules of DMSO. In contrast, within temperature interval of 12-20°C the activation energy value for 1,2-PD is significantly lower than for DMSO. In our previous work [5] is shown, that at the temperatures about 20°C there are two alternative ways, available for permeation of both types of molecules. Higher hydrophilic index of 1,2-PD, obviously, provides the lower effective activation energy at this temperature, because the major part of 1,2-PD flow transits via aqueous protein pores.

Temperature intervals of sharp increase of activation energy of permeability (18-20°C) and its repeated decrease at 25(28)-32°C satisfactorily coincide with temperature intervals of water H-bonds strengthening (18-21°C) and their weakening (28-32°C), noted in water-ions-proteins system [6] (Fig.3). Temperature interval of 25(28)-32°C coincides also with the one for permeation maximum of lysosomes, composed of erythrocyte membrane lipids [11]. Lower changes of activation energy of DMSO permeability for all pairs of adjacent temperature limits could be associated with higher DMSO hydrophobic index, and thereof with major part of its flow via total lipid bilayer

турної залежності проникності мембран еритроцитів людини для молекул неелектролітів свідчать про складний характер процесів взаємодії мембран з проникними речовинами, що обумовлено як структурою мембран та фізико-хімічними властивостями молекул цих речовин, так і їх взаємодією з водним середовищем. Багатогранний характер системи взаємодій визначає неможливість на даному етапі точного описання причин виявленого ходу температурних залежностей і потребує подальшого їх вивчення. Отримані результати ще раз підтвердили високу чутливість розробленого методу визначення коефіцієнтів проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин, який забезпечує адекватну оцінку досліджуваного параметру, реєструючи тонкі зміни в перебігу складних процесів проникання молекул крізь біологічні мембрани.

### Література

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук.думка, 1982.— 256 с.
2. Болдырев А.А. Возможные причины нелинейности графиков Аррениуса для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -зависимой аденозинтрифосфатазы // Биомакромолекулы в методе спиновых меток и зондов.— М.:Наука, 1988.— С.80-92.
3. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Алексєєва Л.І., Коваленко І.Ф. Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності // Доповіді НАНУ.— 2002.— 10.— С. 172-177.
4. Гордієнко О.І., Емец Б.Г., Жиликова 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.
5. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів // Вісн.ХНУ.— 2002.— Т.568.— Біофіз.вісн.— 2(11)— С. 45-50.
6. Кяйвярйнен А.И. Термодинамический анализ процессов в трехкомпонентной системе вода-ионы-макромолекулы // Биофизика.—1988.— Т.33, №3.— С.540.
7. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.— 2001.— №2.— С. 72-79.
8. Цымбал Л.В. Влияние неспецифических факторов на динамическую структуру цитоплазмы эритроцитов// Пробл. криобиологии.— 2000.— №3.— С.8-14.
9. Цымбал Л.В., Гаврилова И.И., Моисеев В.А. Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов// Криобиология.—1985.—3.—С.20-24.
10. Цымбал Л.В., Моисеев В.А. Влияние криопротекторов на мембраносвязанные и цитозольные белки эритроцитов// Пробл. криобиол.— 1992.— №2.— С. 13-19.
11. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.— Минск: Наука и техника.— 1981.— 216 с.
12. Черницкий Е.А., Воробей А.В., Конев С.В. Термические переходы в эритроцитарных мембранах, выявленные по проницаемости их к АНС // Биофизика.— 1978.— Т.23, №1.— С. 80-84.
13. Пат. 41098А (Україна) МПК<sup>7</sup> G01N33/49. Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично

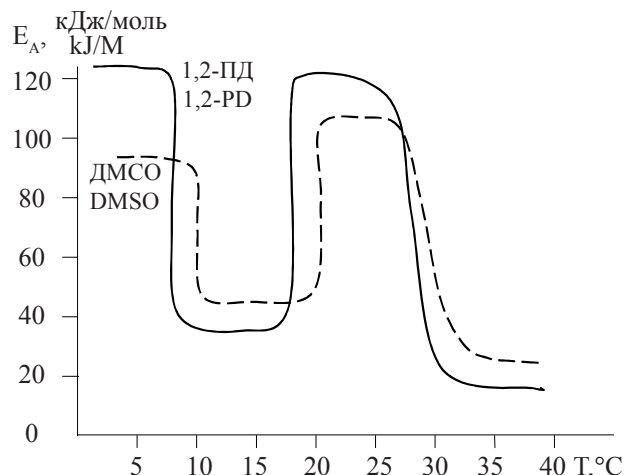


Рис. 3. Вплив температури на  $E_A$  проникання криопротекторів крізь мембрани еритроцитів людини.

Fig.3. Temperature effect on  $E_A$  of cryoprotectant's permeation via human erythrocyte membrane.

surface, and greater direct effect of DMSO on water-protein-lipid interactions in membranes [8-10]. Lower effective activation energy for 1,2-PD permeation within interval of 30-37°C also confirms the fact, that the major part of 1,2-PD passes via aqueous protein pores, which diffusion activation energy is lower, than for lipid bilayer [17].

### Conclusions

Thus, the conducted investigations on temperature dependence of human erythrocyte membrane for non-electrolyte molecules testify to a complex character of membrane and permeable substances' interaction processes, which is caused by both membrane structure, physical and chemical properties of molecules of these substances and their interaction with aqueous environment. Versatile character of interactions system determines the impossibility to describe in details the reasons of the found course for temperature dependencies at this moment and requires a further investigation. Obtained results confirmed once again a high sensibility of elaborated method for determining the erythrocyte membrane permeability for electrically neutral substances, which provides an adequate estimation of studied parameter with and revealing of fine changes in complex processes of molecules permeation via biological membranes.

### References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes of biological membranes at cooling.— Kiev: Naukova Dumka, 1982.— 256 p.
2. Boldyrev A.A. Possible reasons of non-linear character of Arrhenius plots for  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -dependent adenosine triphosphatase // Biomacromolecules in method of spin labels and probes.— Moscow: Nauka, 1988.— P. 80-92.
3. Gordienko O.I., Gordienko E.O., Alekseeva L.I., Kovalenko I.F. Estimation of population state of human erythrocytes using their distribution by sphericity index // Dopovidi NANU.— 2002.— Vol.10.— P. 172-177.

- нейтральних речовин / Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко, І.Ф. Коваленко. Заявлено 09.02.2001. Публ. 15.08.2001. Бюл. N7.
14. *Block M.C., Neut-Kok E.C.M., Deener L.L.M., Gier J.* The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes // *BBA.*– 1975.– Vol.406, N2.– P. 187-196.
  15. *Lacko L., Wittke B., Geck P.* The temperature dependence of the exchange transport of glucose in human erythrocytes // *J. Cell. Physiol.*– 1973.– Vol.82, N2.– P. 213-218.
  16. *Solomon A.K., Chasan D., Dix J.A. et al.* The aqueous pore in red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // *Biomembranes and cell function.*– Ann. N-Y Acad. Sci, 1983.– Vol.414.– P. 97-124.
  17. *Toon M.R., Solomon A.K.* Transport parameters in human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas // *BBA.*–1991.– Vol.1063.– P. 179-190.
4. *Gordienko O.I., Yemets B.G., Zhylyakova T.A., Sheykin V.I.* Temperature dependence of water diffusion permeability of erythrocyte membrane permeability in media with various ion strength // *Biol. membrany.*– 1985.– Vol. 2, N3.– P. 310-314.
  5. *Gordienko O.I., Linnik T.P.* Mechanisms of permeation of non-electrolytes of diol series through erythrocyte membrane // *Visnyk KhNU.*– 2002.– Vol.568.– *Biophysical bulletin.*– 2(11).– P.45-50.
  6. *Kyavaryainen A.I.* Thermodynamic analysis of processes in three-component system of water-ions-macromolecules // *Biofizika.*– 1988.– Vol.33, N.3.– P. 540.
  7. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Fowl sperm cryopreservation. I. Cytotoxicity of Diols and Amides // *Problems of Cryobiology.*– 2001.– N2.– P. 72-79.
  8. *Tsymbal L.V.* Action of non-specific factors on dynamic structure of the red cell cytoplasm // *Problems of Cryobiology.*– 2000.– N3.– P. 8-14.
  9. *Tsymbal L.V., Gavrilova I.I., Moiseyev V.A.* Examination of the effect of polyalcohols on to dynamic structure of biological membranes using spin probes // *Kriobiologiya.*– 1985.– N3.– P. 20-24.
  10. *Tsymbal L.V., Moiseyev V.A.* Cryoprotectant effect on erythrocyte membrane-bound and cytozol proteins // *Problems of Cryobiology.*– 1992.– N2.– P. 13-19.
  11. *Chernitskii E.A., Vorobey A.V., Konev S.V.* Thermal transitions in erythrocyte membranes, revealed by their permeability for ANS // *Biofizika.*– 1978.– Vol. 23, N1.– P. 80-84.
  12. *Chernitskii E.A., Vorobey A.V., Konev S.V.* Thermal transitions in erythrocyte membranes revealed by their permeability to ANS // *Biofizika.*– 1978.– Vol.23, N1.– P. 80-84.
  13. *Patent 41098A (Ukraine) IPC<sup>7</sup> G01N33/49.* Method of determining of erythrocyte permeability coefficient for electrically neutral substances / Gordienko E.O., Gordienko O.I., Gordienko Yu.E., Kovalenko I.F. Filed 09.02.2001. Published 15.08.2001. Bulletin N7.
  14. *Block M.C., Neut-Kok E.C.M., Deener L.L.M., Gier J.* The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes // *BBA.*– 1975.– Vol.406, N2.– P. 187-196.
  15. *Lacko L., Wittke B., Geck P.* The temperature dependence of the exchange transport of glucose in human erythrocytes // *J. Cell. Physiol.*– 1973.– Vol.82, N2.– P. 213-218.
  16. *Solomon A.K., Chasan D., Dix J.A. et al.* The aqueous pore in red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // *Biomembranes and cell function.*– Ann. N-Y Acad. Sci, 1983.– Vol.414.– P. 97-124.
  17. *Toon M.R., Solomon A.K.* Transport parameters in human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas // *BBA.*–1991.– Vol.1063.– P. 179-190.

Надійшла 14.01.2003

Accepted in 14.01.2003