

Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности

UDC 577.352.4:611.018.51

E.V. DAVYDOVA, O.I. GORDIENKO*

Temperature Effect on Erythrocyte Membrane Permeability for Cryoprotectants with Different Hydrophobicities

Измерены коэффициенты проницаемости нативных и рСМБС-обработанных эритроцитов человека для 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО) в диапазоне температур 3–37°C и определены значения энергии активации проникновения этих криопротекторов в отдельных температурных диапазонах. Показано, что охлаждение эритроцитов ниже физиологических температур приводит к термотропным изменениям состояния их мембран. Наиболее выраженные изменения энергии активации наблюдаются в диапазоне температур 27–30 и 12°C. Резкое уменьшение энергии активации проникновения гидрофильного криопротектора 1,2-ПД в области температур 30–37°C исчезает после обработки эритроцитов рСМБС, что свидетельствует о существенном вкладе в трансмембранный поток 1,2-ПД белковых гидрофильных каналов. Наличие изломов графиков Аррениуса и увеличение энергии активации проникновения как гидрофильного 1,2-ПД, так и гидрофобного ДМСО в диапазоне температур ниже 12°C не устраняются обработкой эритроцитов сульфгидрильным реагентом. Таким образом, эти эффекты не могут быть объяснены закрытием белковых путей проницаемости для исследованных веществ и связаны, по-видимому, с состоянием липидного бислоя, которое обусловлено структурным переходом белок-липидного комплекса мембран эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, криопротекторы, проницаемость, энергия активации.

Виміряні коефіцієнти проникності нативних та рСМБС-оброблених еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилсульфоксиду (ДМСО) в діапазоні температур 3–37°C і визначені величини енергії активації проникання цих криопротекторів в окремих температурних діапазонах. Показано, що охолодження еритроцитів нижче фізіологічних температур приводить до термотропних змін стану їх мембран. Найбільш виражені зміни енергії активації спостерігаються в діапазоні температур 27–30 та 12°C. Різке зменшення енергії активації проникання гідрофільного криопротектора 1,2-ПД в діапазоні температур 30–37°C зникає після обробки еритроцитів рСМБС, що свідчить про істотний внесок в трансмембранный потік 1,2-ПД білкових гідрофільних каналів. Наявність зламів графіків Ареніуса і збільшення енергії активації проникання як гідрофільного 1,2-ПД, так і гідрофобного ДМСО, в діапазоні температур нижче 12°C не усуваються обробкою еритроцитів сульфгидрильним реагентом. Таким чином, ці ефекти не можна пояснити закриттям білкових шляхів проникності для досліджених речовин і пов'язані, очевидно, зі станом ліпідного бішару, обумовленим структурним переходом білок-ліпідного комплексу мембран еритроцитів.

Ключові слова: еритроцити, криопротектори, проникність, енергія активації.

There were measured the permeability coefficients for native and рСМБС-treated human erythrocytes for 1,2-propane diol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) within 3–37°C temperature range and the values of activation energy for these cryoprotectants' penetration within certain temperature ranges were determined. Erythrocyte cooling below physiological temperatures was shown to result in thermotropic changes of membrane state. The most pronounced changes in activation energy were observed within 27–30 and 12°C range. Sharp decrease in activation energy of penetration of 1,2-PD hydrophilic cryoprotectant within 30–37°C range disappears after erythrocyte treatment with рСМБС, testifying to a significant contribution of 1,2-PD protein hydrophilic channels into a transmembrane flow. The presence of kinks in Arrhenius plots and an increase in activation energy of penetration of both hydrophilic 1,2-PD and hydrophobic DMSO within temperature range below 12°C is not eliminated via erythrocyte treatment with sulphhydryl reagent. Thus, these effects can not be explained by closing the protein pathways of permeability for studied substances and they are apparently associated to the lipid bilayer state, stipulated by a structural transfer of protein-lipid complex of erythrocyte membranes.

Key-words: erythrocytes, cryoprotectants, permeability, activation energy.

Исследования проницаемости биологических и искусственных мембран явились основой существующих представлений о строении биологических мембран. Одна из важных характеристик трансмембранных процессов – зависимость их от тем-

The study of permeability for biological and artificial membranes occurred to be the base for current notions about biological membrane structure. One of the important characteristics of transmembrane processes is their temperature-dependency. Water and dissolved

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.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: cryo@online.kharkov.ua

пературы. Проникновение воды и растворенных веществ через различные структурно обусловленные пути в клеточной мембране характеризуются разными значениями энергии активации [22, 25, 33]. Отклонение аррениусовой зависимости транспортного процесса от простого линейного соотношения свидетельствует о том, что один или несколько факторов, определяющих его течение, изменяет свои характеристики в зависимости от температуры. Для мембраносвязанных транспортных систем и энзимов часто получают нелинейный график Аррениуса, содержащий относительно резкий излом между двумя (иногда больше) линейными сегментами [24, 31]. Чтобы найти такие изломы на аррениусовых зависимостях, необходимо исследовать как можно больше температурных точек температурного диапазона [13, 32, 34].

Излом, или изменение наклона в графике Аррениуса, может быть вызван многими причинами [17, 20]. Была установлена связь между изломами аррениусовых зависимостей мембраносвязанных процессов с фазовыми переходами в липидах мембран. Наличие структурных переходов в плазматических мембранах клеток описано в [1, 11, 15]. Мембраны эритроцитов характеризуются высоким содержанием холестерина. Именно поэтому при калориметрических и рентгеноскопических исследованиях в них не обнаружено термотропных переходов в диапазоне положительных температур [1, 11]. Но наличие таких структурных переходов в мембранах эритроцитов в диапазоне 0–50°C было выявлено другими физико-химическими методами [15, 16, 26].

Таким образом, изучение температурной зависимости пассивной проницаемости позволяет получить ценную информацию о процессах, происходящих в клеточной мембране при охлаждении. На примере проницаемости эритроцитов человека для 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО) для отдельных доноров нами было показано наличие изломов аррениусовых зависимостей в диапазонах температур 8–12, 25–26 и 30–32°C [2]. Нами было высказано предположение, что резкое изменение энергии активации проницаемости в диапазоне 8–12°C связано с уменьшением проницаемости белковых каналов, предположительно обеспечиваемых белком полосы 3 [23, 28, 33, 35, 36], вследствие структурного перехода в мембранах эритроцитов.

Цель работы – изучение температурной зависимости проницаемости для криопротекторов 1,2-ПД и ДМСО мембран нативных и обработанных блокатором белковых каналов эритроцитов в температурном диапазоне 37–0°C.

substance penetration through different structurally stipulated ways into a cell membrane is characterised by various values of activation energy [22, 25, 33]. Deviation of Arrhenius dependency of a transport process from a simple linear ratio testifies to one or several factors, determining its proceeding, as changing its characteristics depending on temperature. For membrane-bound transport systems and enzymes one often obtains a non-linear Arrhenius plot, comprising quite a sharp kink between two (sometimes more) linear segments [24, 31]. In order to find these kinks in Arrhenius plots it is necessary to study as much as possible the temperature points of its range [13, 32, 34].

The kink or a changed slope in Arrhenius plot may be caused by many reasons [17, 20]. A link between the kinks of Arrhenius dependencies of membrane-bound processes with phase transfers in membrane lipids was established. The presence of structural transfers in cell plasmatic membranes is described in the papers [1, 11, 15]. Erythrocyte membranes are characterised by a high cholesterol content. This is why during calorimetric and X-ray studies no thermotropic transfers within positive temperature range was found [1, 11]. However the presence of these structural transfers in erythrocyte membranes within 0–15°C was revealed using the other physical and chemical methods [15, 16, 26].

Thus, studying a temperature dependency of passive permeability enables the obtaining of a valuable information about the processes, proceeding in a cell membrane under cooling. Taking as an example the human erythrocyte permeability for 1,2-propane diol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) for some donors we demonstrated the presence of kinks in Arrhenius dependencies within 8–12, 25–26 and 30–32°C temperature range [2]. We suggested a sharp change in activation energy of permeability within 8–12°C to be associated to a decreased permeability in protein channels, presumably provided by band 3 protein [23, 28, 33, 35, 36] due to a structural transfer in erythrocyte membranes. The research was aimed to study a temperature dependency of membrane permeability for 1,2-PD and DMSO of native erythrocytes and those treated with protein channel blocking agent within 37–0°C.

Materials and methods

Researches were performed in donor blood erythrocytes, procured with “Glycicir” preservative.

As a blocking agent for aqueous protein channels we used the p-chloromercuribenzenesulfonic acid monosodium salt (pCMBS, Sigma, USA). Erythrocytes were incubated with 2 mM pCMBS within 1 hr at 22°C [23]. Following incubation the erythrocytes were washed with phosphate buffer, pH 7.4.

Материалы и методы

Исследования проведены на эритроцитах донорской крови, которую получали на консерванте "Глюцидир".

В качестве блокатора водных белковых каналов использовали p-chloromercuribenzenesulfonic acid monosodium salt (pCMBS, "Sigma", США). Эритроциты инкубировали с 2 мМ pCMBS в течение 1 ч при 22°C [23]. После инкубации эритроциты отмывали фосфатным буфером pH 7,4.

Проницаемость мембран эритроцитов определяли для проникающих криопротекторов 1,2-ПД и ДМСО с интервалом 1,5–2°C методом, разработанным в [4, 7, 12]. Для этого методом малоуглового рассеяния записывали кинетическую кривую гипотонического гемолиза эритроцитов в 1 М водном растворе проникающего криопротектора. Полученную экспериментальную кривую совмещали с теоретической, рассчитанной на основе физико-математической модели гипотонического гемолиза в водном растворе проникающего вещества при соответствующих значениях коэффициента проницаемости [19].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В работе [2] было показано наличие изломов на графиках Аррениуса проницаемости для криопротекторов эритроцитов отдельных доноров. В связи с разбросом результатов и некоторым смещением температур изломов на аррениусовых зависимостях разных доноров не удалось получить однозначных обобщенных выводов. В настоящей работе эксперименты проведены на нативных и обработанных блокатором белковых каналов эритроцитах 6 доноров. Увеличено также число температурных точек, в которых проведены измерения. Анализ результатов и аппроксимация экспериментальных точек как отдельных доноров, так и экспериментальных точек, полученных на эритроцитах всех исследованных доноров, подтверждают полученные выводы о существовании термоиндуцированных изменений энергии активации проникновения неэлектролитов через мембраны эритроцитов. На рис.1 представлена аппроксимация

Erythrocyte membrane permeability was determined for 1,2-PD and DMSO penetrative cryoprotectants with 1.5–2°C interval using the method, designed [4, 7, 12]. For this purpose there was recorded a kinetic curve of erythrocyte hypotonic hemolysis in 1 M aqueous solution of penetrative cryoprotectants, using the low-angle scattering method. Obtained experimental curve was matched with the theoretic one, calculated on physical and chemical model base of hypotonic hemolysis in aqueous solution of a penetrative substance under corresponding values of permeability coefficient [19].

Data were statistically processed using Student's t-criterion.

Results and discussion

Recently [2] there was shown the presence of kinks in Arrhenius plots of erythrocyte permeability of certain donors for cryoprotectants. Due to the result scattering and some shift of kink temperatures in Arrhenius dependencies of different donors we did not manage to obtain the uniform generalised conclusions. In this research the experiments were carried-out in erythrocytes of 6 donors: native cells and those, treated with protein channel blocking agent. A number of temperature points measured increased as well. The analysis of results and approximation of experimental points of certain donors, as well as those, obtained in erythrocytes of all the studied donors, confirm the obtained conclusions about existing of thermoinduced changes in activation energy of non-electrolyte penetration through erythrocyte membranes. Fig. 1 shows the approximation of temperature dependency of native erythrocyte permeability for 1,2-PD in Arrhenius coordinates (points are obtained for erythrocytes of 6 do-

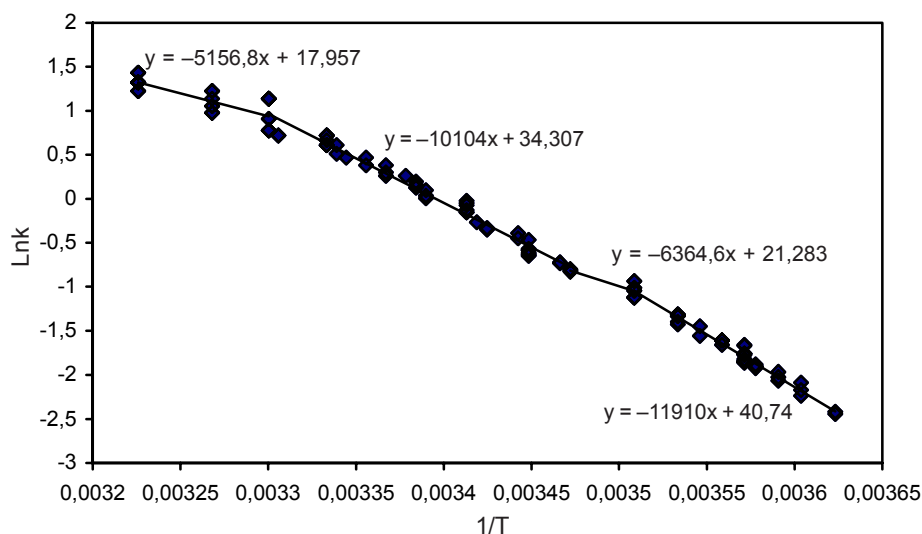


Рис. 1. Аррениусова зависимость коэффициента проницаемости мембран нативных эритроцитов человека для 1,2-ПД в диапазоне температур 3–37°C.

Fig. 1. Arrhenius dependency of permeability coefficient of human native erythrocyte membranes for 1,2-PD within 3–37°C range.

температурной зависимости проницаемости нативных эритроцитов для 1,2-ПД в аррениусовых координатах (точки получены для эритроцитов 6 доноров). Из графика видно, что аррениусова зависимость характеризуется увеличением энергии активации в интервале температур ниже 12°C до 100 кДж/моль по сравнению с таковой в диапазоне температур 15–12°C (53 кДж/моль). В диапазоне температур 15–30°C значение энергии активации снова возрастает, однако остается достоверно меньшим, чем в околонулевом диапазоне (84 кДж/моль) (таблица).

При приближении к области физиологических температур наблюдается существенное уменьшение энергии активации с изломом аррениусовой зависимости в интервале температур 27–32°C. В диапазоне 30–37°C энергия активации почти в два раза меньше по сравнению с диапазоном 15–30°C и составляет 42,9 кДж/моль. Обработка эритроцитов pCMBS

практически устраняет уменьшение энергии активации в области физиологических температур и делает ее сравнимой с таковой в области 15–30°C (рис. 2, таблица). Увеличение энергии активации проникновения 1,2-ПД в области 30–37°C после обработки pCMBS подтверждает предположение,

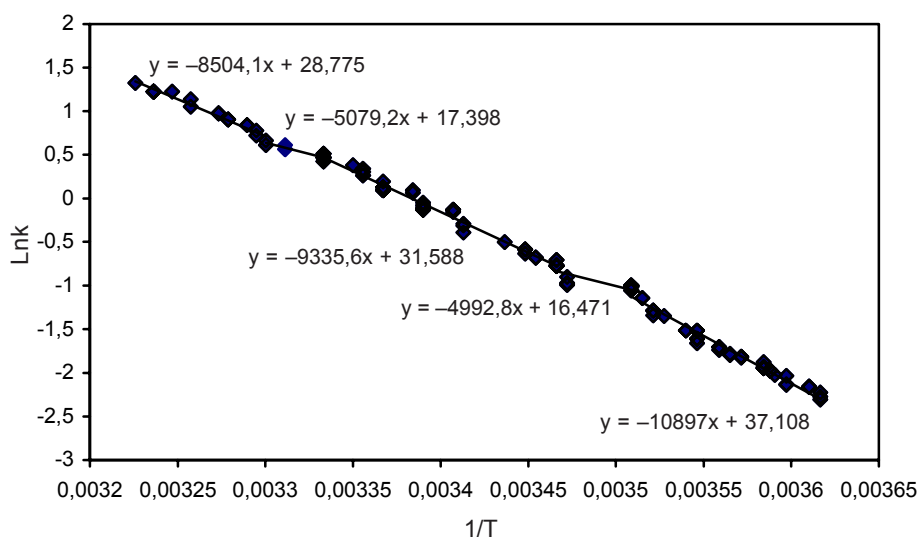


Рис. 2. Аррениусова зависимость коэффициента проницаемости мембран pCMBS-обработанных эритроцитов человека для 1,2-ПД в диапазоне температур 3–37°C
Fig. 2. Arrhenius dependency of permeability coefficient of pCMBS-treated human erythrocyte membranes for 1,2-PD within 3–37°C range.

Энергия активации проникновения криопротекторов в эритроциты человека в различных температурных диапазонах
 Activation energy of cryoprotectant penetration into human erythrocytes in different temperature ranges

Диапазон температур, °C Temperature range, °C	Энергия активации, кДж/моль Activation energy, kJ/mol			
	1,2-пропандиол 1,2-propane diol		Диметилсульфоксид Dimethyl sulfoxide	
	Нативные эритроциты Native erythrocytes	pCMBS-обработанные эритроциты pCMBS-treated erythrocytes	Нативные эритроциты Native erythrocytes	pCMBS-обработанные эритроциты pCMBS-treated erythrocytes
3–12	96,7±3,7 ^a <i>99</i>	93,6±4 <i>90,6</i>	90±2,4 ^c <i>89,7</i>	86,4±3,3 <i>82,5</i>
12–15	55,1±7,4 <i>52,9</i>	44,1±5,4 <i>37,5</i>	52,1±5,9 <i>58,5</i>	48,5±5,4 <i>49,9</i>
15–27	87,6±2,2 ^{a,d,e} <i>84</i>	79,6±1,3 ^d <i>77,6</i>	82,9±2,6 ^{c,f} <i>81,8</i>	76,1±3,8 ^f <i>74,1</i>
27–30	59,1±10,8 <i>61</i>	35,1±9,7 <i>42,2</i>	33,6±10,7 <i>29,5</i>	30,2±5,6 <i>27</i>
30–37	39,3±4,8 ^{b,e} <i>42,9</i>	69,5±3,3 ^b <i>70,7</i>	82,6±4,7 <i>83,9</i>	82,1±5,3 <i>81,6</i>

Примечания: обычным шрифтом обозначены средние значения величин, полученных аппроксимацией для отдельных доноров; курсивом – значения величин, полученных аппроксимацией точек для всех доноров; ^{a, b, c, d, e} – достоверность различия между значениями с одинаковым индексом P>0,99; ^f – P>0,95.

Notes: mean values, obtained by approximating for certain donors are in normal font; values, obtained by approximating points for all the donors are in italic; ^{a, b, c, d, e} – statistical significance between values with the same superscripts is P>0.99; ^f – P>0.95.

nors). As shown in the plot, the Arrhenius dependency is characterised by an increase in activation energy within temperature range below 12°C up to 100 kJ/mol compared to that within 15–12°C range (53 kJ/mol). Within 15–30°C the value of activation energy increases again, but remains statistically and significantly lower versus zero-range (84 kJ/mol) (Table).

When approaching to the area of physiological temperatures there is observed a significant reduction of activation energy with a kink in Arrhenius dependency within 27–32°C range. Within 30–37°C the activation energy is almost twice lower, than within 12–30°C and makes 42.9 kJ/mol. Erythrocyte treatment with pCMBS almost eliminates the reduction of activation energy within physiological temperature range and makes it comparable to that within 12–30°C (Fig. 2, Table). An increased activation energy of 1,2-PD

что проникновение криопротектора происходит двумя параллельными путями (белковым и липидным). После действия блокатора проникновение происходит по липидному пути и имеет более высокую энергию активации. В диапазоне температур ниже физиологических энергия активации несколько уменьшается (с 84 до 77,6 кДж/моль), что, возможно, связано с нарушениями в мембранном ансамбле после действия ртутного реагента.

Исследование температурной зависимости проницаемости для 1,2-ПД рСМБС-обработанных эритроцитов показало, что их обработка сульфгидрильным реагентом не устраняет излома аррениусовой зависимости в области температур ниже 12°C (рис. 2). Энергия активации в диапазоне 3–12°C несущественно меньше, чем для нативных эритроцитов (рис. 2, таблица). В то же время уменьшается энергия активации в области температур 15–12°C и составляет 37,5 кДж/моль. Таким образом, излом аррениусовой зависимости и увеличение энергии активации в области температур ниже 12°C выражены не менее четко, чем для нативных эритроцитов.

Аррениусовы зависимости проницаемости для ДМСО несколько отличаются от таковых для 1,2-ПД. Как и в исследовании [2] полученные изменения энергии активации для проникновения ДМСО в различных температурных диапазонах менее резкие, чем для 1,2-ПД (рис. 3, 4). Энергия активации проницаемости для ДМСО в области температур 3–12°C составляет 89,7 кДж/моль и практически не изменяется после обработки эритроцитов блокатором белковых каналов (82,5 кДж/моль) и совпадает с полученными в работе [2]. В диапазоне температур 15–12°C энергия активации проникновения ДМСО несколько больше таковой для 1,2-ПД и составляет 58,5 кДж/моль для нативных и 49,9 кДж/моль для рСМБС-обработанных эритроцитов. Поэтому излом аррениусовой зависимости в этой области температур менее выражен, чем на аррениусовой зависимости проницаемости 1,2-ПД.

В диапазоне 15–27°C аппроксимация температурной зависимости проницаемости мембран нативных эритроцитов для ДМСО дает значение энергии активации 81,8 кДж/моль и 74,1 кДж/моль для рСМБС-обработанных эритроцитов, что сравнимо со значениями для 1,2-ПД. На аррениусовых зависимостях проницаемости для ДМСО более четко проявляется изменение энергии активации в области 27–30°C (рис. 3, 4). В этом температурном диапазоне энергия активации падает до значений 31,8 кДж/моль для нативных и 30,9 кДж/моль для рСМБС-обработанных эритроцитов. Энергия активации в диапазоне 30–37°C составляет 83,9 кДж/моль для нативных эритроцитов и не отличается от тако-

penetration within 30–37°C after pСМБС treatment confirms our suggestions about two parallel ways (protein and lipid ones) of cryoprotectant penetration. After blocking agent effect the penetration occurs by a lipid way with higher activation energy. Within temperatures lower than physiological ones the activation energy slightly decreases (from 84 down to 77.6 kJ/mol), that is possibly associated to the disorders in a membrane ensemble after mercury reagent effect.

Study of a temperature dependency of permeability for 1,2-PD of pСМБС-treated erythrocytes demonstrated their treatment with sulphhydryl reagent as not eliminating a kink in Arrhenius dependency within temperature range below 12°C (Fig. 2). The activation energy within 3–12°C is insignificantly lower, than in native erythrocytes (Fig. 2, Table). At the same time the activation energy reduces within 15–12°C range and makes 37.5 kJ/mol. Thus, a kink in Arrhenius dependency and an increased activation energy within temperature below 12°C are manifested not less distinctively than for native erythrocytes.

Arrhenius dependencies of permeability for DMSO slightly differ from those for 1,2-PD. As in the research [2] the obtained changes in activation energy for DMSO penetration in various temperature ranges are less sharp, than for 1,2-PD (Fig. 3, 4). The activation energy of permeability for DMSO within 3–12°C range makes 89.7 kJ/mol and remains practically unchanged after erythrocyte treatment with protein channel blocking agent (82.5 kJ/mol) and coincides with those, obtained in the paper [2]. Within 15–12°C range the activation energy of DMSO penetration is slightly higher, compared to that for 1,2-PD and makes 58.5 and 49.9 kJ/mol for native and pСМБС-treated erythrocytes, correspondingly. Therefore a kink in Arrhenius dependency within this temperature range is less pronounced, than in Arrhenius dependency of 1,2-PD permeability.

Within 15–27°C the approximation of membrane penetration temperature dependency of native erythrocytes for DMSO and pСМБС-treated erythrocytes provides activation energy values of 81.8 and 74.1 kJ/mol, correspondingly, that is comparable to the value for 1,2-PD. In Arrhenius dependencies of permeability for DMSO the changes in activation energy within 27–30°C range are more distinct (Fig. 3, 4).

Within this temperature range the activation energy falls down to 31.8 and 30.9 kJ/mol for native and pСМБС-treated erythrocytes. The activation energy within 30–37°C is 83.9 kJ/mol for native erythrocytes and does not differ from that within 15–27°C. After erythrocyte treatment with pСМБС the activation energy within physiological temperatures remains with no significant changes. Apparently, this is stipulated by the fact, that a major part of DMSO penetration is provided by permeability through a lipid bilayer.

вой в диапазоне 15–27°C. После обработки эритроцитов рСМБС энергия активации в области физиологических температур существенно не изменяется. Это обусловлено, по-видимому, тем, что большая часть проникновения ДМСО обеспечивается проницаемостью через липидный бислой.

Анализ научной литературы показывает, что существует несколько температурных диапазонов, в которых наблюдаются аномалии температурных зависимостей процессов, связанных с мембранами эритроцитов: 8–12, 18–20, 28–30 и >40°C. Структурные изменения, вовлеченные в эти переходы, не совсем ясны из-за сложности и анизотропии мембран. Изменение свойств мембраны вследствие разворачивания скелетных белков, как это происходит в зоне структурного перехода при 40°C, при низкой температуре невозможно [15]. По мнению авторов этой работы, более вероятной является гипотеза белок-зависимого латерального фазового разделения липидов с точки зрения известного белок-липидного взаимодействия белка 4.1 [15, 29, 38]. При изучении подвижности липофильной спиновой метки 16-NS в мембранах эритроцитов после различных обработок было показано, что в термотропный переход в мембранах эритроцитов при 8°C вовлечен белок 4.1, который является связующим звеном между цитоскелетом и мембраной и играет ключевую роль в стабилизации спектрин-актинового комплекса. Считают, что белок 4.1 связан как с интегральными белками мембраны, так и с липидами [15, 27, 29]. В работе [15] показано, что белок полосы 3 также может быть связан с белком 4.1, а цитоскелет-мембранный комплекс, состоящий из указанных компонентов, отвечает за термотропный переход в мембранах эритроцитов в области 8°C. Исследование подвижности малеимидной метки [14], которая связывается со спектрином, показало, что в диапазоне температур между 10 и 25°C так называемый параметр беспорядка был стабильным. Повышение температуры выше 25°C вызвало резкое увеличение этого параметра, а снижение температуры ниже 10°C – его уменьшение. В работах [8–10] авторы показали, что аррениусовы зависимости подвижности малеимидной и йодацетамидной спиновых меток, ковалентно связан-

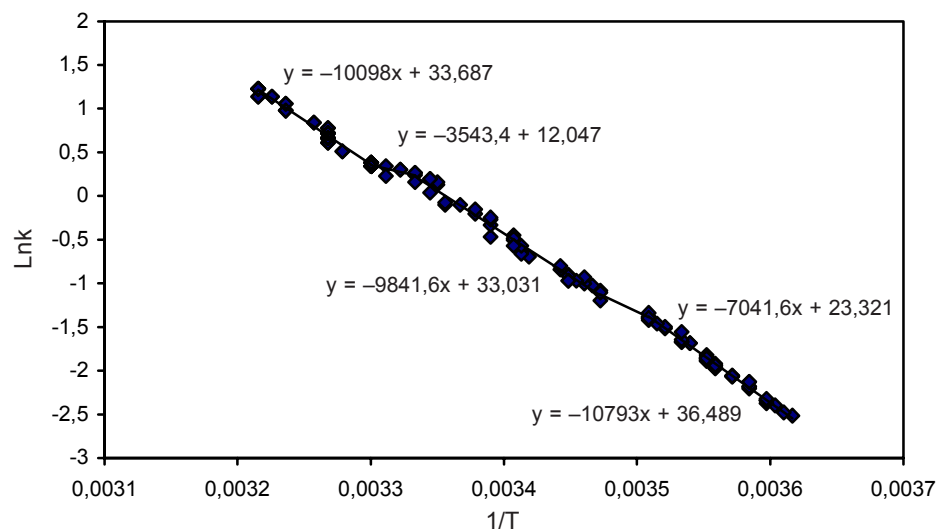


Рис. 3. Аррениусова зависимость коэффициента проницаемости мембран нативных эритроцитов человека для ДМСО в диапазоне температур 3–37°C.

Fig. 3. Arrhenius dependency of permeability coefficient of human native erythrocyte membranes for DMSO within 3–37°C range.

Analysis of scientific literature shows the existence of some temperature ranges, wherein there are observed the abnormalities of temperature dependencies of processes, associated to erythrocyte membranes: 8–12, 18–20, 28–30 and >40°C. Structural changes, involved into these transfers are not completely clear due to membrane complexity and anisotropy. A change in membrane properties due to unfolding of skeletal proteins, as it proceeds in structural transfer area at 40°C, is not possible at low temperature [15]. The authors of this paper consider the hypothesis of protein-dependent lateral phase lipid separation in terms of the known protein-lipid interaction of protein 4.1 as the most probable [15, 29, 38]. When studying the motility of lipophilic spine label 16-NS in erythrocyte membranes after different treatments, the protein 4.1, being a link between cytoskeletal and membrane and playing a key role in stabilising spectrin-actin complex, was demonstrated as involved into thermotropic transfer in erythrocyte membranes at 8°C. Protein 4.1 is considered to be related to both integral membrane proteins and lipids [15, 27, 29]. In the paper [15] the band 3 protein may be also associated to the protein 4.1 and a cytoskeletal-membrane complex, consisting of the mentioned components, is responsible for thermotropic transfer in erythrocyte membranes in 8°C range. Studying the motility of maleimide label [14], binding to spectrin, demonstrated a so-called disorder parameter within temperature range between 10 and 25°C as stable. Temperature rise above 25°C caused a sharp increase in this parameter, but a temperature fall below 10°C did its decrease. In the papers [8–10] the authors demonstrated the Arrhenius dependencies of motility of maleimide and iodoacetamide spin labels, being covalently bound with proteins of spectrin-actin

ных с белками спектрин-актинового комплекса эритроцитов человека и их теней, претерпевают излом при температурах 30 и 10–12°C, а это свидетельствует о конформационном переходе водно-белковой поверхности цитоскелетных белков в эритроцитах.

Термотропные изменения в состоянии мембраны должны отражаться на ее проницаемости. При исследовании нами температурной зависимости времени обмена молекул воды эритроцитами [3] было отмечено, что в диапазоне температур 8–12°C графики

Аррениуса для эритроцитов отдельных доноров претерпевают разрыв с существенным увеличением энергии активации процесса при температурах ниже 8°C. В работе [30] исследовано влияние температуры на подвижность свободного и нагруженного транспортера нуклеозида в эритроцитах человека. Показано, что температурная зависимость максимальной скорости равновесного обмена ³H-уридина претерпевает излом с уменьшением энергии активации при температурах выше 30°C. В то же время подвижность свободного транспортера демонстрировала термотропные изменения при температурах ниже 15°C. Отмечались также температурозависимые изменения транспорта глюкозы [21], облегченной диффузии L-лейцина [11].

Таким образом, температура – это важный фактор, влияющий на структуру и функцию биологических мембран. Изучение температурных зависимостей тех или иных мембраносвязанных процессов является информативным методом для исследования как механизмов этих процессов, так и температурозависимых изменений состояния мембран.

Исследуемые в нашей работе криопротекторы, хотя и проникают через мембраны эритроцитов одинаково быстро, однако характеризуются существенно различными коэффициентами распределения между гидрофобной фазой и водой (0,076 и 0,247 соответственно). В работах [5, 6] было показано, что молекулы криопротекторов могут проникать как через гидрофильные белковые каналы, так и через липидный бислой. Процентное соотношение потоков веществ этими путями отличается вследствие различия физико-химических и геомет-

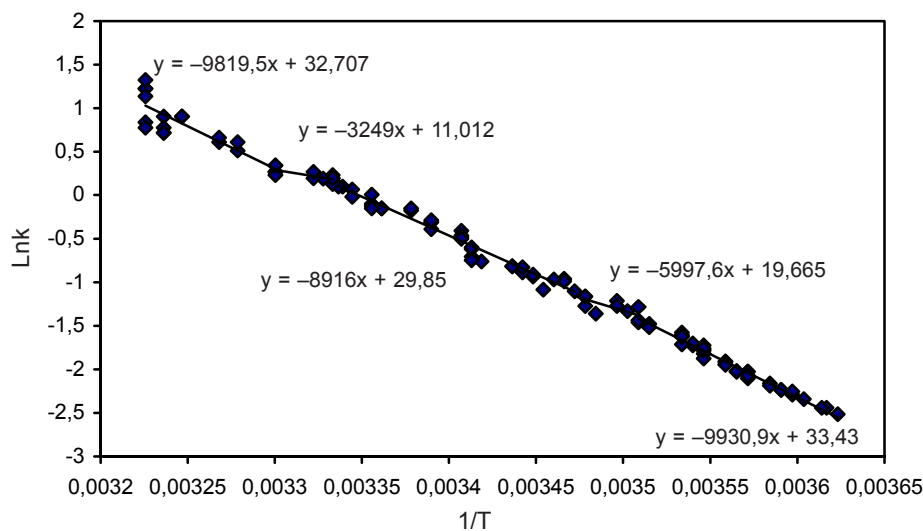


Рис. 4. Аррениусова зависимость коэффициента проницаемости мембран pCMBS-обработанных эритроцитов человека для ДМСО в диапазоне температур 3–37°C.

Fig. 4. Arrhenius dependency of permeability coefficient of pCMBS-treated human erythrocyte membranes for DMSO within 3–37°C range.

complex of human erythrocytes and their ghosts, to undergo the kink at 30 and 10–12°C, that testified to a conformation transfer of water-protein surface of cytoskeletal proteins in erythrocytes.

Thermotropic changes in a membrane state should affect its permeability. When we studied a temperature dependency of exchange time of water molecules with erythrocytes [3], the Arrhenius plots for erythrocytes of some donors within 8–12°C were noted to undergo a rupture with a significant rise in activation energy of the process at temperatures below 8°C. In the paper [30] there was investigated the temperature effect on motility of free and charged transport of nucleoside in human erythrocytes. Temperature dependency of maximum rate of equilibrium exchange of ³H-uridine was demonstrated as undergoing a kink with a decrease in activation energy at temperatures above 30°C. At the same time the motility of free carrier demonstrated thermotropic changes at temperatures below 15°C. Temperature-dependent changes in glucose transport [21], L-leucine facilitated diffusion were also observed [11].

Thus, the temperature is an important factor, affecting the structure and function of biological membranes. The study of temperature dependencies of these or those membrane-bound processes is an informative method to investigate both mechanisms of these processes and temperature-dependent changes in membrane state.

Even if the studied in our research cryoprotectants penetrate through erythrocyte membranes in an equally rapid way, they are characterised by significantly different coefficients of distribution between hydrophobic phase and water (0.076 and 0.247, correspondingly). In the papers [5, 6] the cryoprotective mole-

рических параметров, в частности их гидрофильности или гидрофобности. При изучении проницаемости веществ с различной степенью гидрофобности термотропные изменения свойств мембраны могут проявляться по-разному.

Проведенный нами анализ температурных зависимостей проницаемости нативных и pCMBS-обработанных эритроцитов для криопротекторов не только подтверждает наличие термотропных переходов в мембранах эритроцитов при охлаждении ниже физиологических температур, но и указывает на то, что вклад белкового пути проникновения этих неэлектролитов становится существенным только в области температур, близких к физиологическим (выше 30°C). Тот факт, что излом аррениусовой зависимости с резким уменьшением энергии активации в области температур 30–37°C наблюдается для гидрофильного неэлектролита 1,2-ПД, но не для гидрофобного ДМСО, свидетельствует о том, что в данном случае имеет место излом аррениусовой зависимости не в связи с изменением свойств липидного матрикса, как пути проникновения, а открытием другого параллельного пути – гидрофильного канала. То, что обработка эритроцитов pCMBS устраняет изменение энергии активации проникновения гидрофильного неэлектролита в области 30–37°C, но не влияет на энергию активации гидрофобного ДМСО, подтверждает этот вывод.

Различия поведения аррениусовых зависимостей для двух исследованных криопротекторов в области температур, близких к физиологическим, проявляются также в более выраженных изменениях в диапазоне 27–30°C для ДМСО. Резким падением энергии активации в этой области характеризуются как индивидуальные, так и аппроксимированные по всем точкам графики Аррениуса для нативных и pCMBS-обработанных эритроцитов. Для 1,2-ПД падение энергии активации в указанном температурном диапазоне четко наблюдалось на аррениусовых зависимостях только некоторых доноров для нативных эритроцитов и на всех индивидуальных и усредненной зависимостях для pCMBS-обработанных эритроцитов. Возможно, это обусловлено тем, что указанные изменения связаны с изменением состояния липидного бислоя, а не белковых путей проницаемости. Уменьшение же энергии активации проникновения 1,2-ПД в нативные эритроциты при дальнейшем повышении температуры (30–37°C), связанное с проникновением через гидрофильные каналы, может маскировать эффекты в области 27–30°C.

В работах [2, 3] нами было высказано предположение, что резкое увеличение энергии активации проникновения воды и криопротекторов в области

могут быть продемонстрированы как способные проникать как через гидрофильные белковые каналы, так и липидный бислой. Процентное соотношение потоков вещества по этим путям различается из-за разницы физических-химических и геометрических параметров, в частности, гидрофильности или гидрофобности. При изучении проницаемости веществ с различной степенью гидрофобности термотропные изменения свойств мембраны могут проявляться по-разному.

Проведенный нами анализ температурных зависимостей проницаемости для нативных и pCMBS-обработанных эритроцитов для криопротекторов подтверждает наличие термотропных переходов в мембранах эритроцитов при охлаждении ниже физиологических температур, но и указывает на то, что вклад белкового пути проникновения этих неэлектролитов становится существенным только в области температур, близких к физиологическим (выше 30°C). Тот факт, что излом аррениусовой зависимости с резким уменьшением энергии активации в области температур 30–37°C наблюдается для гидрофильного неэлектролита 1,2-ПД, но не для гидрофобного ДМСО, свидетельствует о том, что в данном случае имеет место излом аррениусовой зависимости не в связи с изменением свойств липидного матрикса, как пути проникновения, а открытием другого параллельного пути – гидрофильного канала. То, что обработка эритроцитов pCMBS устраняет изменение энергии активации проникновения гидрофильного неэлектролита в области 30–37°C, но не влияет на энергию активации гидрофобного ДМСО, подтверждает этот вывод.

Различия поведения аррениусовых зависимостей для двух исследованных криопротекторов в области температур, близких к физиологическим, проявляются также в более выраженных изменениях в диапазоне 27–30°C для ДМСО. Резким падением энергии активации в этой области характеризуются как индивидуальные, так и аппроксимированные по всем точкам графики Аррениуса для нативных и pCMBS-обработанных эритроцитов. Для 1,2-ПД падение энергии активации в указанном температурном диапазоне четко наблюдалось на аррениусовых зависимостях только некоторых доноров для нативных эритроцитов и на всех индивидуальных и усредненной зависимостях для pCMBS-обработанных эритроцитов. Возможно, это обусловлено тем, что указанные изменения связаны с изменением состояния липидного бислоя, а не белковых путей проницаемости. Уменьшение же энергии активации проникновения 1,2-ПД в нативные эритроциты при дальнейшем повышении температуры (30–37°C), связанное с проникновением через гидрофильные каналы, может маскировать эффекты в области 27–30°C.

В работах [2, 3] нами было высказано предположение, что резкое увеличение энергии активации проникновения воды и криопротекторов в области

температур ниже 12°C может быть связано с блокированием белкового пути диффузии этих веществ вследствие конформационного перехода в актинспектриновом комплексе цитоскелета эритроцитов и связанного с ним анионообменного белка полосы 3. Роль белка полосы 3 в проницаемости мембран эритроцитов для молекул воды и малых неэлектролитов была отмечена в работах [18, 33, 35, 37]. Однако проведенное в данной работе исследование температурной зависимости проницаемости рСМБС-обработанных эритроцитов показало, что обработка эритроцитов сульфгидрильным реагентом не устраняет излома аррениусовой зависимости в области температур ниже 12°C как для 1,2-ПД, так и для ДМСО. Следовательно, увеличение энергии активации при охлаждении ниже 12°C связано с состоянием липидного матрикса (вязкости, наличием дефектных гидрофильных пор). По-видимому, структурный переход белков цитоскелета играет существенную роль в нарушении мембранного ансамбля в этой области температур, однако увеличение энергии активации обусловлено скорее состоянием липидного бислоя, а не закрытием белковых каналов.

Таким образом, сравнение аррениусовых зависимостей проникновения веществ с различной степенью гидрофобности предоставляет дополнительные возможности для получения информации об отклике мембран на охлаждение. На справедливость предложенного подхода при интерпретации полученных результатов указывают и авторы работы [13], которые отмечали, что критические температуры, определяемые путем сегментарной подгонки точек в аррениусовых координатах, являются не просто свойством исследуемого объекта, но и свойством зонда, выбранного для исследования, а также исследуемой температурной зоны.

Выводы

1. Проведенные исследования показали, что термотропные изменения в состоянии плазматических мембран при охлаждении эритроцитов ниже физиологических температур приводят к резким изменениям энергии активации пассивного проникновения малых неэлектролитов. Наиболее выраженные изменения энергии активации наблюдаются в диапазоне температур 27–30 и 12–15°C как для нативных, так и рСМБС-обработанных эритроцитов, что свидетельствует об изменении состояния липидного бислоя.

2. Резкое уменьшение энергии активации проникновения гидрофильного криопротектора 1,2-ПД в области температур 30–37°C исчезает после обработки эритроцитов рСМБС. Следовательно, в этой области температур существенный вклад в транс-

transfer in actin-spectrin complex of erythrocyte cytoskeleton and related to it anion-exchanged band 3 protein. The role of band 3 protein in erythrocyte membrane permeability for water and small non-electrolyte molecules was noted in the papers [18, 33, 35, 37]. However the presented in this paper research of temperature dependency of рСМБС-treated erythrocyte permeability demonstrated the erythrocyte treatment with sulphhydryl reagent as not eliminating a kink in Arrhenius dependency within temperature range below 12°C for both 1,2-PD and DMSO. Consequently, an increased activation energy during cooling below 12°C is associated to the state of lipid matrix (viscosity, presence of defect hydrophilic pores). Apparently, a structural transfer of cytoskeletal proteins plays a significant role in disordered membrane ensemble within this temperature range, but an increase in activation energy is rather stipulated by a state of lipid bilayer, but not protein channel closing.

Thus, a comparison of Arrhenius dependencies of penetration of substances with different hydrophobicity degree provides additional opportunities for obtaining the information about membrane response to cooling. The authors of the paper [13] point to the correctness of the proposed approach when interpreting the results obtained. They note, that the critical temperatures, determined via a segmented fitting of points in Arrhenius coordinates are not just a feature of the studied object, but that for the probe, selected for research, as well as studied temperature zone.

Conclusions

1. The performed research demonstrated the thermotropic changes in plasma membrane state under erythrocyte cooling below physiological temperature as resulting in sharp changes in activation energy of passive penetration of small non-electrolytes. The most pronounced changes in activation energy are noted within 27–30 and 12–15°C range for both native and рСМБС-treated erythrocytes, testifying to a changed lipid bilayer state.

2. A sharp decrease in activation energy of 1,2-PD hydrophilic cryoprotectant penetration within 30–37°C range disappears after erythrocyte treatment with рСМБС. Consequently, within this temperature range a significant contribution into 1,2-PD transmembrane flow is made by protein hydrophilic channels. Penetration of DMSO hydrophobic cryoprotectant is mostly provided by penetration through a lipid bilayer.

3. The presence of kinks in Arrhenius plots and an increase in activation energy of penetration of both hydrophilic 1,2-PD and hydrophobic DMSO within temperature range below 12°C are not eliminated via erythrocyte treatment with sulphhydryl reagent. Thus, these effects can not be explained by blocking protein

мембранный поток 1,2-ПД вносят белковые гидрофильные каналы. Проникновение гидрофобного криопротектора ДМСО обеспечивается в основном проникновением через липидный бислой.

3. Наличие изломов графиков Аррениуса и увеличение энергии активации проникновения как гидрофильного 1,2-ПД, так и гидрофобного ДМСО в диапазоне температур ниже 12°C не устраняются обработкой эритроцитов сульфгидрильным реагентом. Таким образом, эти эффекты не могут быть объяснены закрытием белковых путей проницаемости для исследованных веществ. Изменения свойств проницаемости в этом диапазоне температур связаны, по-видимому, с состоянием липидного бислоя, которое обусловлено структурным переходом белок-липидного комплекса мембран эритроцитов.

Авторы выражают благодарность рецензенту Цымбал Л.В. за полезное обсуждение.

Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 256 с.
2. Гордієнко О.І. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду // Пробл. криобиології.— 2003.— №1.— С. 38–45.
3. Гордієнко О.І., Емец Б.Г., Жилыкова Т.А., Шейкин В.І. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биол. мембраны.— 1985.— Т.2, №3.— С. 310–314.
4. Гордієнко О.І. Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є. Фізико-математична модель та експериментальне визначення явища гіпотонічного гемолізу // Доповіді НАНУ.— 1998.— Т. 11.— С.173–176.
5. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів// Вісник ХНУ. Біофіз. вісник.— 2002.— Вип. 2(11).— С.43–47.
6. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низки амідів // Вісник ХНУ. Біофіз. вісник.— 2003.— Вип. 1(12).— С.92–96.
7. Гордієнко О.І., Панина Ю.Е., Коваленко І.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Вісник Харків. ун-ту. Біофіз. вісник.— 1998.— Вип. 2(2).— С. 59–63.
8. Цымбал Л.В. Влияние неспецифических факторов на динамическую структуру цитоплазмы эритроцитов// Пробл. криобиології.— 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.криобиології.— 1992.— №2.— С.13-19.
11. Черницький Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.— Минск: Наука и техника, 1981.— 216 с.

pathways of permeability for the studied substances. Changes in permeability properties within this temperature range are apparently associated to a state of lipid bilayer, stipulated by a structural transfer of protein–lipid complex of erythrocyte membranes.

Authors express gratitude to Dr. Liliya Tsymbal for useful discussion.

References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes in biological membranes under cooling.— Kiev: Nauk. dumka, 1982.— 256 p.
2. Gordienko O.I. Temperature effect on membrane permeability of human erythrocytes for 1,2-propanediol and dimethyl sulfoxide // Problems of Cryobiology.— 2003.— N1.— P. 38–45.
3. Gordienko O.I., Emets B.G., Zhilyakova T.A., Sheikin V.I. Temperature dependency of aqueous diffusive permeability of erythrocyte membranes in media with different ion strength // Biol. Membrany.— 1985.— 2, N3.— P. 310–314.
4. Gordienko O.I., Kovalenko I.F., Panina Yu. E. Physical and mathematical model and experimental determination of hypotonic hemolysis phenomenon // Doklady NAN Ukrainy.— 1998.—Vol. 11.— P. 173–176.
5. Gordienko O.I., Linnik T.P. Mechanisms of penetration of non-electrolytes of diol series through erythrocyte membranes // Visnyk KhNU. Biophysical Bulletin.— 2002.—Issue 2 (11).— P. 43–47.
6. Gordienko O.I., Linnik T.P. Permeability of human erythrocyte membranes for non-electrolytes of amide series // Visnyk KhNU. Biophysical Bulletin.— 2003.— Issue 1 (12).— P. 92–96.
7. Gordienko O.I., Panina Yu.E., Kovalenko I.F. Determination of coefficients of permeability of erythrocyte membranes for cryoprotectants // Visnyk KhNU. Biophysical Bulletin.— 1998.— Issue 2(2).— P. 59–63.
8. Tsymbal L.V. Effect of non-specific factors to dynamic structure of erythrocyte cytoplasm // Problems of Cryobiology.— 2000.— N3.— P. 18–14.
9. Tsymbal L.V., Gavrilova I.I., Moiseyev V.A. Study of effect of polyalcohols on dynamic structure of biological membranes by method of spin probes // Kriobiologiya.— 1985.— N3.— P. 20–24.
10. Tsymbal L.V., Moiseyev V.A. Effect of cryoprotectants on membrane-bound and cytosol proteins of erythrocytes // Problems of Cryobiology.— 1992.— N2.— P. 13–19.
11. Chernetsky E.A., Vorobej A.V. Structure and functions of erythrocyte membranes.— Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.— 216 p.
12. Patent 41098A (Ukraine) IPC⁷ G01N33/49. Way for determination of permeability coefficient of erythrocytes for electrically neutral substances / E.O. Gordienko, O.I. Gordienko, Yu.E. Gordienko, I.F. Kovalenko. Applied 09.02.2001. Published 15.08.2009. Bull. N7.— 2001.— P. 1.134.
13. Bagnall D.J., Wolfe J. Arrhenius plots: information or noise?// CryoLetters.— 1982.— Vol.3, N 3.— P.7–16.
14. Barber M.J., Rosen G.M., Rauckman E.J. Studies of the mobility of maleimide spin labels within the erythrocyte membrane // BBA.— 1983.— Vol. 732, N1.— 126–132.
15. Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marchesi V.T. Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid//Biochemistry.— 1985.— Vol. 24, N27.— P. 7876–7880.
16. Galla H.J., Luisetti J. Lateral and transversal diffusion and phase transition in erythrocyte membranes // BBA.— 1980.— Vol. 596, N1.— P. 108–117.

12. Пат. 41098А (Україна) МПК⁷ G01N33/49. Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин/ Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко, І.Ф. Коваленко / Заявлено 09.02.2001. Опубл. 15.08.2001.– Бюл.№7.– С. 1.134.
13. *Bagnall D.J., Wolfe J.* Arrhenius plots: information or noise?// *CryoLetters.*– 1982.– Vol. 3, N3.– P.7–16.
14. *Barber M.J., Rosen G.M., Rauckman E.J.* Studies of the mobility of maleimide spin labels within the erythrocyte membrane // *BBA.*– 1983.– Vol. 732, N1.– 126–132.
15. *Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marchesi V.T.* Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid // *Biochemistry.*– 1985.– Vol. 24, N27.– P. 7876–7880.
16. *Galla H.J., Luisetti J.* Lateral and transversal diffusion and phase transition in erythrocyte membranes // *BBA.*– 1980.– Vol. 596, N1.– P. 108–117.
17. *Gardiner W.C.* Temperature dependence of bimolecular gas reaction rates//*Acc. Chem. Res.*– 1977.– Vol. 10.– P. 326.
18. *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, N1.– P. 105–113.
19. *Gordienko E.A., Gordienko Yu.E., Gordienko O.I.* The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *CryoLetters.*– 2003.– Vol. 24, N4.– P. 229–244.
20. *Han M.N.* Non-linear Arrhenius plots in temperature dependent kinetic studies of enzyme reactions. 1. Single transition processes // *J. Theo. Biol.*– 1972.– Vol. 35, N3.– P. 543–568.
21. *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.
22. *Macey R.I.* Transport of water and urea in red blood cells// *Am. J. Physiol.*– 1984.– Vol. 246, N3.– P. 195–203.
23. *Macey R.L., Farmer R.E.L.* Inhibition of water and solute permeability in human red cells // *BBA.*–1970.– Vol. 211.– P. 104–106.
24. *McElhaney R.N.* Effects of membrane lipids on transport and enzymic activities in Membrane Lipids of Procarvates /*Current Topics in membranes and Transport.*– New York: Academic Press,1982.– Vol. 17.– 317 p.
25. *McElhaney R.N.* The effect of membrane lipids on permeability and transport in procarvates // *Structure and Properties of cell membranes.V.II. Molecular basis of selected transport systems / G.Benga ed.*– Florida:CRC Press, 1985.– Vol.2.– P. 20–51.
26. *Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M.* Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis of human red blood cells // *J.Cell.Biochem.*– 1984.– Vol. 25, N2.– P. 61–72.
27. *Mueller T.J., Morrison M.* In erythrocyte membrane, Liss, New York.– 1981.– Vol.2.– P. 95–112.
28. *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.
29. *Pasternack G.R., Anderson R.A., Leto T.L., Macchesi V.T.* Interaction between protein 4.1 and band 3//*J.Biol.Chem.*– 1985.– Vol. 260, N6.– P. 3676–3683.
30. *Plagemann P.G.W., Wohlhueter R.M.* Effect of temperature on kinetics and differential mobility of empty and loaded nucleoside transporter of human erythrocytes//*J. Biol. Chem.*– 1984.– Vol. 259, N14.– P. 9024–9027.
31. *Sandermann H.* Regulation of membrane enzymes by lipids// *BBA.*– 1978.– Vol. 515, N3.– P. 209.
32. *Silvius J.R., McElhaney R.N.* Nonlinear Arrhenius plots and analysis of reaction and motional rates in biological membranes // *J.Theor.Biol.*– 1980.– Vol. 88, N1.– P. 135–152.
33. *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 // *Biomembranes and cell function.*– New York:Ann.N-Y Acad.Sci., 1983.– Vol. 414.– P. 97–124.
34. *Sprague E.D., Larrabee C.E., Halsall H.B.* Statistical evaluation of alternative models: application to ligand-protein binding // *Anal. Biochem.*– 1980.– Vol. 101, N1.– P. 175.
35. *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, N1.– P. 57–71.
36. *Toon M.R., Solomon A.K.* Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas // *BBA.*– 1991.– Vol. 1063, N2.– P. 179–190.
37. *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, N2.– P. 137–146.

- cations, nonelectrolytes and water // Biomembranes and cell function.– New York: Ann. N.-Y. Acad.Sci., 1983.– Vol. 414.– P. 97–124.
34. *Sprague E.D., Larrabee C.E., Halsall H.B.* Statistical evaluation of alternative models: application to ligand-protein binding // *Anal. Biochem.*– 1980.– Vol. 101, N1.– P. 175.
35. *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, N1.– P. 57–71.
36. *Toon M.R., Solomon A.K.* Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas // *BBA.*– 1991.– Vol. 1063, N2.– P. 179–190.
37. *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, N2.– P. 137–146.
38. *Zhang D., Kiyatkin A, Bolin J.T., Low P.S.* Crystallographic structure and functional interpretation of cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3// *Blood.*– 2000.– Vol. 96, N9.– P. 2925–2933.

Accepted in 11.08.2009

Поступила 11.08.2009