

УДК 577.352.4:611.018.51:547.422

В. В. Рамазанов, Р. Ф. Забродский\*, Я. Ю. Найдюк\*, В. А. Бондаренко

## ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ $H^+$ ПРИ МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ УСЛОВИЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)  
\*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом научной темы «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных веществ и криопротекторов» (№ государственной регистрации 0104U006437).

**Вступление.** Изменение температурно-осмотических условий среды в интервале положительных температур является модельным подходом для оценки нарушений в мембранах клеток при замораживании [3]. Осмотическое воздействие на эритроциты при повышении осмолярности среды вызывает перераспределение ионов  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $H^+$  между клеткой и внешней средой, которое опосредуется циклом Якобса-Стюарта [7]. Это вызывает последующее достижение нового осмотического состояния с соответствующим распределением анионов и ионов  $H^+$  между клеткой и средой [10]. Внесение эритроцитов в среду, содержащую медленно проникающий в клетки анион  $SO_4^{2-}$ , вызывает включение механизма обмена внутриклеточного  $Cl^-$  на внеклеточный  $SO_4^{2-}$ , который сопровождается выходом и входом ионов  $H^+$  и активацией функционирования цикла Якобса-Стюарта, что, в конечном счете, обеспечивает согласованность движения ионов к новому равновесному состоянию [16]. Движение анионов и ионов  $H^+$  опосредуется анионным каналом — белком полосы 3, цитоплазматические фрагменты которого образуют макромолекулярные комплексы с карбоангидразой, гемоглобином и цитоскелетом [9,18]. Такая организация при изменении осмотических условий внешней среды обеспечивает кооперативность функционирования всех компонентов и системы в целом. Перераспределение анионов в ходе осмотической адаптации эритроцитов к изменяющимся условиям внешней среды, ставит вопрос

об изменениях в функциональном состоянии системы транспорта, в частности, при гипертоническом воздействии, которое клетки испытывают в условиях замораживания.

**Цель исследования** — выявление особенностей изменения функционального состояния анионного переносчика, как основного белка мембран эритроцитов, являющегося главным структурным звеном в координации распределения ионов  $H^+$  при различных температурно-осмотических условиях, моделирующих условия замораживания.

**Объект и методы исследования.** В работе использовали  $NaCl$  (х.ч.),  $Na_2SO_4$  (х.ч.), сахарозу (ч.д.а.). Полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) и декстран с молекулярной массой 35000 (Д-35000) (Serva), дипиридамола — производства Serva, парахлормеркурийбензоат (ПХМБ) — производства Sigma. Гемин — производства Sigma.

Эритроциты человека получали из донорской крови четырехкратным отмыванием 0,9 % раствором  $NaCl$ .

При внесении эритроцитов в изотонический раствор  $Na_2SO_4$ , не содержащий буферных компонентов, происходит двухфазное изменение рН внешней среды — закисление с последующим защелачиванием. Такое изменение рН связано с обменом внутриклеточного  $Cl^-$  на внеклеточный  $SO_4^{2-}$ . При этом выход ионов  $H^+$  из клетки определяется функционированием цикла Якобса-Стюарта, тогда как вход связан непосредственно с транспортом  $SO_4^{2-}$  в клетку [16].

На рис. 1 представлена характерная экспериментальная кривая установления равновесного значения рН суспензии эритроцитов в изотонической сульфатной среде (0,11 моль/л  $Na_2SO_4$ ).

Используя экспериментальные параметры  $t_{макс}$ ,  $pH_{t_{макс}}$ ,  $pH^0$  (см. рис. 1), по уравнениям [6]:

$$t_{макс} = h \left( \frac{k_{in}}{k_{out}} \right) / (k_{in} - k_{out})$$

$$[H]_{t_{макс}} = [H]^0 \left[ \left( \frac{k_{in}}{k_{out}} \right)^{1 - (k_{in}/k_{out})} - \left( \frac{k_{in}}{k_{out}} \right)^{(k_{in}/k_{out})} (1 - k_{in}/k_{out}) \right]$$

можно рассчитать константы скорости  $k_{out}$  и  $k_{in}$  (выхода и входа ионов  $H^+$ , соответственно). Поскольку в эксперименте регистрируются изменения рН внешней среды, для удобства вычисления транспортных констант концентрации ионов  $H^+$  необходимо представить как изменение их во внешней среде:

$$[H]^o = [H]_o - [H]_\infty$$

$$[H]_{t_{\max}} = [H]_{\max} - [H]_o,$$

где  $[H]_o$ ,  $[H]_{\max}$ ,  $[H]_\infty$  — концентрация ионов  $H^+$  во внешней среде суспензии эритроцитов в начале эксперимента, в момент времени  $t_{\max}$  и при максимальном закислении после внесения эритроцитов в среду, содержащую 0,3 моль/л сахарозы.

Для оценки транспорта использовали величину проницаемости мембран для ионов  $H^+$ , которую вычисляли на основе формулы [8]:

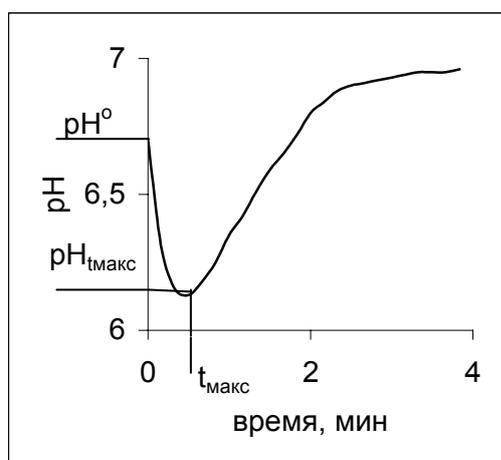
$$P = k (V/A),$$

где  $P$  — проницаемость (см/сек),  $V/A$  — отношение объема внутриклеточной воды к площади поверхности мембраны,  $k$  — константа скорости транспорта ионов  $H^+$  (сек<sup>-1</sup>). В изотонических условиях для эритроцитов  $V/A = 6,3 \times 10^{-5}$  см [19].

Константы ингибирования ( $K_i$ ) дипиридамолом транспорта ионов  $H^+$  в клетку определяли графическим методом Диксона [5].

Для вычисления термодинамических параметров связывания дипиридамола использовали уравнения:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ,  $\Delta G = RT \ln K_i$  [5].

Для обработки реагентами эритроциты с 20 %-м гематокритом суспендировали в среде, содержащей:  $KCl$  — 90,  $NaCl$  — 45, сахарозу — 44, Трис — 10 ммоль/л (рН 7.4) [12]. ПХМБ добавляли в концентрации 1 ммоль/л и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С.



**Рис. 1.** Изменение рН раствора, содержащего 2 мл 0,11 моль/л  $Na_2SO_4$  после внесения 50 мкл осадка эритроцитов.

Обработку эритроцитов модификатором цитоскелета гемином в концентрации 300 мкмоль/л осуществляли в течение 10 мин при 37 °С [17]. По истечении времени эритроциты отмывали 5 раз средой для обработки и до момента использования держали на ледяной бане.

Взаимодействие дипиридамола с мембранами эритроцитов исследовали методом регистрации поляризации флуоресценции. Поляризацию флуоресценции дипиридамола регистрировали при титровании 1 мкмоль/л данного ингибитора мембранами эритроцитов в спектрофотометрической кювете спектрофлуориметра Hitachi MPF-2A при длинах волн возбуждения и эмиссии 400 и 490 нм, соответственно. Величину поляризации флуоресценции вычисляли как описано в [11].

Содержание мембранного белка определяли с помощью метода Лоури, модифицированного путем добавления дезоксихолата [14].

Среднее значение и дисперсию случайной величины рассчитывали исходя из результатов, полученных на эритроцитах от пяти доноров. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при  $p < 0,05$  [1].

**Результаты исследований и их обсуждение.** При гипертоническом воздействии при помещении эритроцитов в солевую или сахарозо-солевую среду отмечается снижение проницаемости ионов  $H^+$  и усиление ингибирования проницаемости дипиридамолом по сравнению с изотонической средой. В свою очередь, модификация эритроцитов ПХМБ приводит к повышению проницаемости мембран для ионов  $H^+$ , но не изменяет эффективность ингибирования с дипиридамолом. Модификация цитоскелета эритроцитов гемином приводит к ингибированию транспорта и незначительному снижению степени ингибирования с дипиридамолом (табл. 1).

Блокирующее действие гипертонической среды выявляется также в случае эритроцитов модифицированных ПХМБ или гемином, однако, в данном случае, не отмечается увеличения эффективности ингибирования дипиридамолом. Это указывает на то, что состояние цитоскелета определяет не только проницаемость ионов  $H^+$ , но и эффективность ингибирования проницаемости дипиридамолом.

Определение констант ингибирования ( $K_i$ ) транспорта ионов  $H^+$  дипиридамолом показало, что снижение температуры и гипертоническое воздействие вызывают уменьшение величин  $K_i$ , что указывает на повышение

Таблиця. 1

Влияние модификаторов и гипертонического воздействия на вход ионов  $H^+$  в эритроциты в сульфатной среде

Условия эксперимента		0,11 моль/л $Na_2SO_4$	0,11 моль/л $Na_2SO_4$ + 30% Сахароза	1 моль/л $Na_2SO_4$
		Проницаемость( $P_{in} \times 10^8$ м/сек)		
Интактные Клетки	Контроль	1,26±0,19	0,62±0,09	0,69±0,11
	дипиридамола	0,63±0,08*	0,20±0,03*	0,22±0,04*
Клетки обработаны ПХМБ	Контроль	2,61±0,48	1,01±0,13	0,94±0,13
	дипиридамола	1,13±0,12*	0,47±0,06*	0,50±0,06*
Клетки обработаны гемином	Контроль	0,49±0,06	0,25±0,03	0,26±0,04
	дипиридамола	0,27±0,03*	0,13±0,02*	0,14±0,02*

**Примечание:** \* - статистически достоверно по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ).

средства ингибитора к сайту связывания в анионном канале эритроцитов (табл. 2).

Оценка термодинамических параметров связывания дипиридамола по изменению  $K_i$  показывает, что при гипертоническом воздействии повышение сродства дипиридамола к сайту связывания сопровождается снижением энтальпии связывания ( $\Delta H$ ), которое компенсируется ростом энтропийной составляющей ( $T\Delta S$ ) свободной энергии связывания ( $\Delta G$ ) (табл. 2). Объяснение полученных результатов можно вести к следующему. При образовании комплекса дипиридамола с сайтом связывания в анионном канале эритроцитов

в изотонической среде происходит компактизация сайта связывания, что отражается в соответствующих термодинамических параметрах (табл. 2). Формирование осмотического градиента на мембране, с одной стороны, не является фактором препятствующим взаимодействию ингибитора с анионным каналом, так как  $\Delta G$  в этом случае существенно не изменяется. С другой стороны, положительное значение  $T\Delta S$  указывает на то, что после взаимодействия с дипиридамолом энергетически более выгодным является декомпактизованное состояние сайта по сравнению с изотоническими условиями (табл. 2).

Таблиця 2

Константы ингибирования ( $K_i$ ) дипиридамолом транспорта ионов  $H^+$  при различных температурах и термодинамические параметры связывания дипиридамола в эритроцитах в изотонических и гипертонических условиях

Условия эксперимента	Температура				Термодинамические параметры (кДж/моль)			
	37°C	33°C	30°C	27°C	$\Delta H$	$T\Delta S$	$\Delta G$	
0,11 моль/л $Na_2SO_4$	Константа ингибирования ( $K_i$ )	$23 \times 10^{-6}$	$18 \times 10^{-6}$	$13 \times 10^{-6}$	$9 \times 10^{-6}$	-77,3	-49,9	-27,7
0,11 моль/л $Na_2SO_4$ +30% Сахароза		$8 \times 10^{-6}$	$7,4 \times 10^{-6}$	$7 \times 10^{-6}$	$6 \times 10^{-6}$	-23,3	+6,8	-30,2

Существенная разница  $T\Delta S$  для гипертонических и изотонических условий компенсируется за счет изменения  $\Delta H$  (табл. 2). При этом изменения, наблюдаемые в условиях гипертонического воздействия, вероятно, отражают модификацию структуры связывающего сайта анионного канала для дипиридамола.

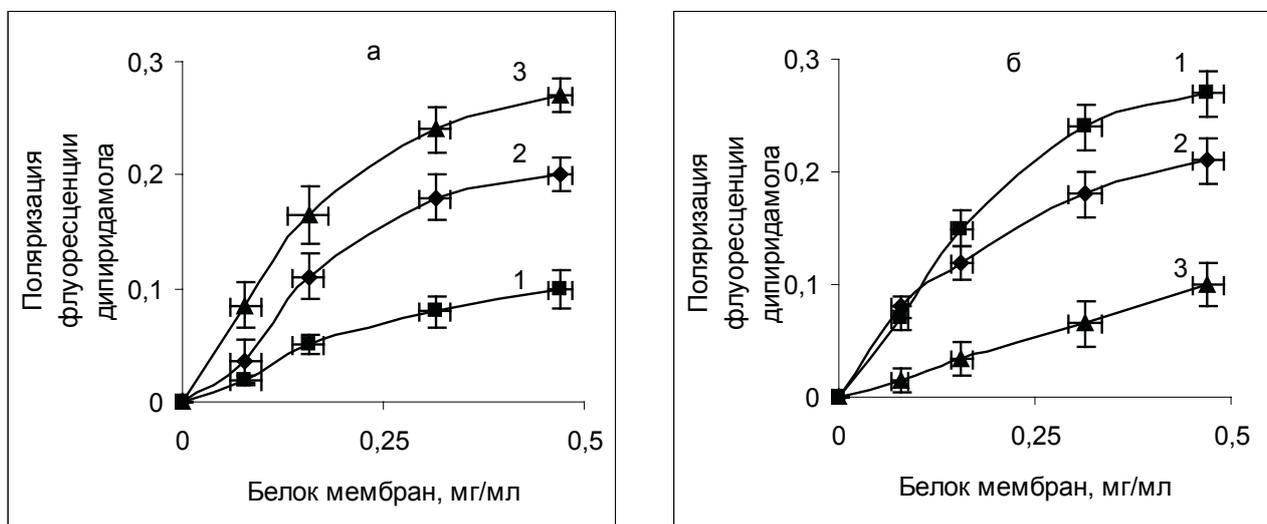
В работе [13] высказывается предположение, о том, что взаимодействие дипиридамола в анионном канале определяется электростатическими и гидрофобными силами. При

этом электростатические эффекты вносят вклад в  $-\Delta H$ , а гидрофобные взаимодействия в  $T\Delta S$  [4]. В результате обе составляющие определяют  $\Delta G$  и константу диссоциации, и, соответственно, сродство ингибитора к анионному каналу. Согласно полученным результатам (табл. 2), гипертоническое воздействие приводит к снижению  $-\Delta H$  и повышению  $T\Delta S$ , поэтому должна уменьшаться роль электростатического взаимодействия и возрастать вклад гидрофобного взаимодей-

ствия при связывании дипиридамола в канале.

Как известно, повышение ионной силы раствора приводит к снижению электростатического потенциала зарядов на молекулах [5]. Для того, чтобы выяснить влияние

ионной силы на связывание дипиридамола в анионном канале, исследовалась поляризация флуоресценции данного ингибитора в присутствии мембран эритроцитов при высокой концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .



**Рис. 2.** Поляризация флуоресценции дипиридамола в зависимости от концентрации мембран эритроцитов в различных средах. а): 1 – 0,11 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 2 – 0,15 моль/л NaCl; 3 – 1,0 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . б): 1 – 1,0 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 2 – 1,0 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 15% декстран; 3 – 1,0 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 15% ПЭГ-1500. Все среды содержали 10 ммоль/л трис (рН 7,4).

Титрование дипиридамола мембранами эритроцитов вызывает нарастание поляризации флуоресценции ингибитора в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl. При концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — 0,11 моль/л, отмечается незначительный рост величины поляризации, однако если среда содержала  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  в концентрации 1,0 моль/л, то отмечался значительный рост поляризации флуоресценции, величина которой выше чем в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl (рис. 2, а). Полученные результаты указывают, что при высокой ионной силе эффективность связывания дипиридамола с сайтом его связывания в анионном канале возрастает. Вероятно, в данном случае связывание ингибитора определяется только гидрофобными взаимодействиями при исключении электростатического влияния. В среде с высокой концентрацией  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  присутствие полимерных криопротекторов (ПЭГ-1500, декстран) приводит к ослаблению роста поляризации флуоресценции дипиридамола. При этом более выраженный эффект отмечается при использовании ПЭГ-1500 по сравнению с декстраном (рис. 2, б). Согласно данным литературы включение в растворы полиэтиленгликолей приводит к снижению полярности среды [15]. Вероятно, что уменьшение эффективности связывания дипиридамола в среде с ПЭГ-1500 определяется изменением характера распределения данного

амфифильного ингибитора между мембраной и внешним раствором в пользу последнего.

Согласно данным литературы [2], если мембраны получены из эритроцитов, обработанных ингибитором анионного канала ДИДС, то, независимо от вида и концентрации соли, показатели поляризации во всех случаях изменяются одинаково и достигают той величины (~0,1), которая выявляется в среде с 0,11 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  или 1,0 моль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 15 % ПЭГ-1500 (рис. 2). Эти данные и полученные нами результаты свидетельствуют, что в указанных средах остаточная величина поляризации флуоресценции (~0,1) не определяется связыванием дипиридамола в анионном канале, а, вероятно, она обусловлена эффектом рассеяния света из-за высокой концентрации мембран. Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими, что дипиридамола не связывается с анионным каналом в сульфатной среде [13]. Тем не менее, при концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  равной 1,0 моль/л отмечается существенное нарастание поляризации флуоресценции (рис. 2), что указывает на то, что прирост поляризации флуоресценции, при значительной ионной силе, связан с повышением сродства ингибитора к анионному каналу. Такой вывод согласуется с результатами, полученными при изучении ингибиторной эффективности дипиридамола на транс-

порціонов  $H^+$  в середі, що містить 1 моль/л  $Na_2SO_4$  по порівнянню з ізотонічною середою (табл. 1). Як передбачається [13], нейтралізація додативного заряду в каналі хлоридним аніоном являється попереднім кроком для наступного гідрофобного взаємодіяння дїпіридамола з сайтом зв'язування. Поєтому, вельма веројатно, що нейтралізація додативного заряду високої іонної силою в мембранах або при гіпертонічному впливі на клітки знімає електростатичний контроль і підвищує сродство інгібітора до аніонному каналу. С другої сторони, дослідження поляризації флуоресценції дїпіридамола з мембранами еритроцитів в присутстві ПЭГ-1500 показує, що даний полімер усуває посилення поляризації в середі з високої концентрацією  $Na_2SO_4$  (рис. 2). Значительне ослаблення росту поляризації флуоресценції дїпіридамола в середі з ПЭГ-1500 указує на те, що присутствіє полімера в середі приводить до змєненню характеру розподілення амфїфільного інгібітора між мембраною і зовнішнім розчином в користь останнього із-за зніження полярності зовнішньої середі. В зв'язі з цим можна передположити, що зв'язування інгібітора в аніонному каналі еритроцитів знаходиться під контролем не тільки електростатичних сил, но і гідрофобних взаємодіянь. Даний висновок згодиться з існуючими передположеннями в роботі [13].

Согласно даним літератури в відсутстві аніонів  $Cl^-$  самообмін  $SO_4^{2-}$  не інгібується дїпіридамолом. Як передбачають автори,  $Cl^-$  необхідний для нейтралізації додативного заряду модифікуючого сайту в аніонному каналі, при котрому відкривається гідрофобний карман для встраювання інгібітора [13]. В то же время, виявлено інгібіторне свойство дїпіридамола в ізотонічній середі, що містить 0,11 моль/л  $Na_2SO_4$ , т.е., в середі не містять аніонів хлориду (табл. 1). Поскільки в наших експериментах осадок еритроцитів, отмитий фізіологічним розчином  $NaCl$ , складав по гематокриту 75–80 %, то внесення його в експериментальну середу в кількості 50 мкл на 2 мл, дає «загрязнення»  $Cl^-$  — аніоном в концентрації околу 1 ммоль/л, і, веројатно, цього кількості достатньо для проявлення інгібуючого ефекта дїпіридамола.

Експерименти показує, що зніження температури в більшій степені впливає на вход іонів  $H^+$ , чєм на їх вихід, відповідно при зніженні температури від 37°C до 15°C відношення  $P_{out}/(P_{out}+P_{in})$  в ізотонічній середі порівнюється до одиниці (рис. 3,

крива 1). В то же время, в гіпертонічній середі при 25°C відзначається прирост величини вказаного відношення і при дальнєшєм підвищенні температури його різке зніження (рис. 3, крива 2). При модифікації еритроцитів геміном температурна залежність кривою  $P_{out}/(P_{out}+P_{in})$  стає кілька менше вираженою (рис. 2) вслєдствие того, що даний відношення вище при температурі

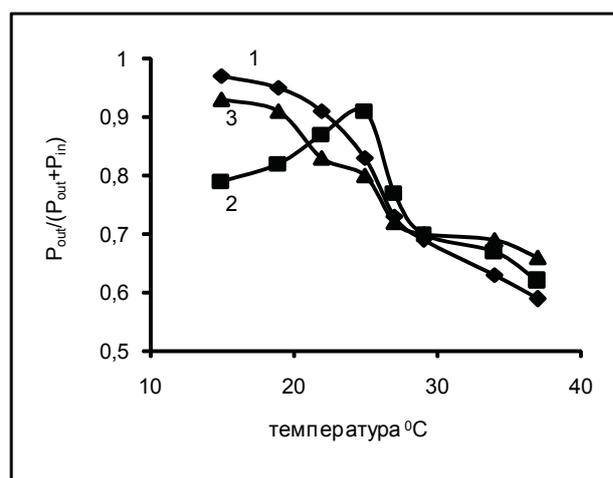


Рис. 3. Залежність відношення проникності еритроцитів для іонів  $H^+$  від температури. 1,3 - ізотонічні умови (0,11 моль/л  $Na_2SO_4$ ), 2 - гіпертонічні умови (0,11 моль/л  $Na_2SO_4$  + 30% сахарози). 3 - еритроцити модифіковані геміном.

25–37 °C і нижє при 15–25 °C.

Цьє обстојательство указує на кілька більше змєненню згодності функціонування  $Cl^-/SO_4^{2-}$  обміну і циклу Якобса-Стюарта в ході розподілення аніонів і іонів  $H^+$ . Согласно даним літератури, обробка еритроцитів геміном приводить до змєненню нормальних взаємодіянь білка смуги 4.1 з білками цитоскелета і понижєнню механічної стійкості мембрани [17]. В зв'язі з цими даними можна передположити, що згодність роботи  $Cl^-/SO_4^{2-}$  обміну з циклом Якобса-Стюарта в певній степені визначається станом цитоскелета.

Більше затримання обміну  $Cl^-$  на  $SO_4^{2-}$  і  $H^+$  при зніженні температури, по порівнянню з виходом  $Cl^-$  і  $H^+$  при функціонуванні циклу Якобса-Стюарта, приводить до порушенню згодності функціонування двох транспортних систем. При цєм більшє долю виходу аніонів  $Cl^-$  із клітки забезпечує цикл Якобса-Стюарта. Однак нижє 25 °C при гіпертонічному впливі різке змєненню відношення  $P_{out}/(P_{out}+P_{in})$  указує на те, що мембрани еритроцитів набувають неспецифічну проникність для аніонів  $SO_4^{2-}$ . Отримані резуль-

таты указывают на то, что гипертоническое воздействие на эритроциты при температуре ниже 25 °С вызывает не только нарушение согласованного механизма функционирования двух транспортных систем, но и, возможно, приводит к повреждению клеточной мембраны.

Таким образом, при изменении температурно-осмотических условий среды выявляются определенные модификации в системе транспорта ионов  $H^+$ , которые включают как изменение функциональных характеристик, так и структурные нарушения. При гипертоническом воздействии происходит: а) ингибирование транспорта ионов  $H^+$  в эритроциты, как это имеет место в случае модификации цитоскелета клеток, б) повышается ингибиторная эффективность дипиридамола на транспорт ионов  $H^+$  в эритроциты, данное повышение не выявляется в эритроцитах, модифицированных по цитоскелету. Это позволяет высказать предположение о роли состояния цитоскелета в системе транспорта ионов  $H^+$ . При гипертоническом воздействии, как и при снижении температуры среды, повышается сродство дипиридамола к сайту связывания в анионном канале мембран эритроцитов, что, вероятно, связано с ослаблением электростатического контроля при связывании данного ингибитора, когда основную роль в связывании выполняют гидрофобные взаимодействия. Снижение температуры среды ниже 25 °С в условиях гипертонического воздействия, по сравнению с изотоническими условиями, приводит к резкому изменению соотношения скорости выхода и входа ионов  $H^+$  в эритроцитах, что указывает не только на нарушение согласованного распределения данных ионов при обмене хлорида на внеклеточный сульфат, но и на повреждение клеточной мембраны.

#### Выводы.

1. При гипертоническом воздействии выявляется ингибирование транспорта ионов  $H^+$  и усиление ингибиторного действия дипиридамола за счет повышения сродства данного ингибитора к сайту связывания в анионном канале, это сопровождается уменьшением значения  $\Delta H$  (от -77,3 кДж/моль до -23,3 кДж/моль) и изменением величины  $T\Delta S$  (от -49,9 кДж/моль до +6,8 кДж/моль). Это свидетельствует о том, что в условиях гипертонического воздействия комплекс сайт-ингибитор находится в менее компактизованном состоянии по сравнению с изотоническими условиями.

2. Связывание дипиридамола с мембранами эритроцитов устраняется наличием в среде ПЭГ-1500 и усиливается в при-

сутствии высокой концентрации соли (1,0 моль/л  $Na_2SO_4$ ). Полученные результаты позволяют предположить, что связывание дипиридамола в анионном канале находится под контролем гидрофобных и электростатических сил.

3. При снижении температуры ниже 25 °С, гипертоническое воздействие вызывает резкое снижение отношения коэффициентов проницаемости мембран для ионов  $H^+$  ( $P_{out}/(P_{out}+P_{in})$ ), что, вероятно, связано с нарушением целостности клеточных мембран.

**Перспективы дальнейших исследований.** В последующих исследованиях планируется выявить влияние модификации функционального состояния системы транспорта ионов  $H^+$  в период подготовки эритроцитов к замораживанию на гемостатические свойства размороженных клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов/Ашмарин И.П., Васильев И.П., Амбросов В.А. — Л.: Из-во Ленингр. Унта. 1975.—76 с.
2. Балакирев А.Н. Модификация транспорта ионов  $H^+$  и связывания дипиридамола с мембранами эритроцитов крысы при гипертоническом воздействии/А.Н. Балакирев, Ф.Абу-Аль-Асаль, В.В. Рамазанов//Проблемы криобиологии.— 2002.— № 3.— С. 84—86.
3. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: автореф. дис. докт. биол. наук: спец. 03.00.19. «Криобиология»/В.А. Бондаренко — Харьков. 1988.— 36 с.
4. Джоунс М. Биохимическая термодинамика/Джоунс М. — М.: Мир. 1982.—440 с.
5. Пасынский А.Г. Биофизическая химия/Пасынский А.Г. — М.: Высш. школа. 1968.—432с.
6. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде/В.В. Рамазанов, Н.А. Лупилова, А.Ф. Тодрин, Т.П. Бондаренко//Проблемы криобиологии. — 1999.— № 4 — С. 34—41.
7. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells/J. D. Bisognano, J. A. Dix, P. R. Pratap, T. S. Novak, J. C. Freedman//J. Gen. Physiol.—1993.—Vol.102, № 1.—P.99—123.
8. Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells//J. Gen. Physiol. — 1977. — Vol. 70, № 3. — P. 283—306.
9. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane/L. J. Bruce, R. Beckmann, M. L. Ribeiro, et al.//Blood.— 2003.—Vol.101, № 10.—P.4180—4188.
10. The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by use of «probes»/Z. I. Cabantchik, P. A. Knauf, A. Rothstein//Biochim. Biophys. Acta.—1978.—Vol.515.—P.239—302.
11. Characterization of the calorimetric C transition of the human erythrocyte membrane/S. R. Davio, P. S. Low//Biochemistry.—1982.—Vol.21, № 15.— P.3585—3593.
12. Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins/C. W. M. Haest, D. Kamp, B. Deuticke//Biochim. Biophys. Acta.—1981.—Vol.643.—P.219—326.
13. Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyridamole with a stilbene disulfonate binding site on the band 3 protein/B. Legrum, H. Passow//Biochim. Biophys. Acta.—1989.—Vol.979, № 2.—P.193—207.

14. Ox erythrocyte agglutinability. 1. Variation in the membrane protein/A.H. Maddy, R.L. Spooner//Vox Sang.—1970.—Vol.18, № 1.—P.34–41.
15. Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion S. Ohki, K. Arnold//J. Membr. Biol.—1990.—Vol.114.—P.195–203.
16. Characterization of anion transport system in trout red blood cell/L. Romano, H. Passow//Am. J. Physiol.—1984.—Vol.246.—P.330–338.
17. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin/N. Shaklai, N. Avissar, E. Rabizaden, M. Shaklai//Biochem. Internat.—1986.—Vol.13, № 3.—P.467–477.
18. The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl<sup>-</sup>/HCO<sup>3-</sup>-exchanger binds carbonic anhydrase IV/Sterling D., Alvarez B.V., Casey J.R.//J Biol Chem.—2002.—Vol.277, № 28.—P.25239–25246.
19. Irreversible inactivation of red cell chloride exchange with phenylglyoxal, and arginine-specific reagent/J.O. Wieth, P.J. Bjerrum, C.L. Borders//J Gen Physiol. — 1982. — Vol. 79, № 2. — P. 283–312.

**УДК** 577.352.4:611.018.51:547.422

### **ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ТРАНСПОРТУ ІОНІВ Н<sup>+</sup> ПРИ МОДИФІКАЦІЇ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ В УМОВАХ, МОДЕЛЮЮЧИХ УМОВИ ЗАМОРОЖУВАННЯ**

**Рамазанов В. В., Забродський Р. Ф., Найдюк Я. Ю., Бондаренко В. А.**

**Резюме.** Вивчали транспорт іонів Н<sup>+</sup> в еритроцитах внесених в ізотонічну і гіпертонічну середовища, що містять сульфат натрію. Зниження температури середовища нижче 25°C в умовах гіпертонічної дії в порівнянні з ізотонічними умовами призводить к різкій зміні відношення швидкості виходу та входу іонів Н<sup>+</sup> в еритроцитах. Отримані данні дозволяють передбачити, що при гіпертонічній дії порушення погодженого розподілу іонів Н<sup>+</sup> поміж клітиною та середовищем при обміні хлориду на сульфат відбувається при зміні структури аніонного переносника і порушення цілісності мембрани.

**Ключові слова:** еритроцити, транспорт іонів Н<sup>+</sup>, модифікатори мембрани, криопротектори.

**УДК** 577.352.4:611.018.51:547.422

### **ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ Н<sup>+</sup> ПРИ МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ УСЛОВИЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ.**

**Рамазанов В. В., Забродский Р. Ф., Найдюк Я. Ю., Бондаренко В. А.**

**Резюме.** Исследовали транспорт ионов Н<sup>+</sup> в эритроцитах, внесенных в изотоническую и гипертонические среды, содержащие сульфат натрия. Снижение температуры среды ниже 25°C в условиях гипертонического воздействия, по сравнению с изотоническим условием, приводит к резкому изменению соотношения скорости выхода и входа ионов Н<sup>+</sup> в эритроцитах. Полученные результаты позволяют предположить, что при гипертоническом воздействии нарушение согласованного распределения ионов Н<sup>+</sup> между клеткой и средой при обмене хлорида на сульфат происходит вследствие изменения структуры анионного переносчика и нарушения целостности мембраны.

**Ключевые слова:** эритроциты, транспорт ионов Н<sup>+</sup>, модификаторы мембраны, криопротекторы.

**UDC** 577.352.4:611.018.51:547.422

### **H<sup>+</sup>ION TRANSPORT SYSTEM FUNCTIONING upon ERYTHROCYTE MEMBRANE MODIFICATIONS under CONDITIONS MODELING FREEZING CONDITIONS**

**Ramazanov V. V., Zabrodskiy R. F., Nayuk Ya.Yu., Bondarenko V. A.**

**Summary.** H<sup>+</sup>ion transport in erythrocytes placed in isotonic and hypertonic media containing sodium sulfate was investigated. A decline in medium temperature below 25°C under hypertonic conditions led to a drastic change in the ratio between H<sup>+</sup>ion ingress and egress rates into erythrocytes as compared to isotonic conditions. The results obtained allow assuming that upon hypertonic impact a distortion of coordinated distribution of H<sup>+</sup>ions between the cell and medium, when chloride is exchanged for sulfate, is realized due to structural changes of the anion transporter and impairment of membrane integrity.

**Key words:** erythrocytes, H<sup>+</sup>-ion transport, membrane modifiers, cryoprotectants.

**Стаття надійшла 11.08.2010 р.**