

УДК 576.3

КИНЕТИКА ГОМЕОСТАТИРОВАНИЯ ОДНОГО ИЗ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ЭРИТРОЦИТОВ – ПОКАЗАТЕЛЯ КИСЛОТНОСТИ pH ИХ ЦИТОПЛАЗМЫ

С. П. Баранов, Г. В. Зайцева, А. Р. Зарицкий,
М. А. Краснова, М. Н. Маслова, Л. Л. Чайков

В работе проведен анализ кинетики гомеостатирования одного из основных параметров энергетического метаболизма эритроцитов – показателя кислотности их цитоплазмы (pH). Получена кривая баланса скоростей подкисления и подщелачивания цитоплазмы на плоскости концентрация АТФ ($n_{\text{АТФ}}$) – pH цитоплазмы. Выяснено, что для ее получения необходимо использовать уравнение баланса скоростей активного и пассивного транспорта катионов (K^+ и Na^+) через цитоплазматические мембраны эритроцитов. Указанные скорости рассмотрены в зависимости от pH и концентрации АТФ в цитоплазме. Выявлены факторы, влияющие на положение полученной кривой баланса. Сделано предположение о существовании в эритроцитах специальных регуляторных субстанций, которые, возможно, могут изменять скорости метаболических процессов.

Ключевые слова: величина pH , концентрация АТФ, баланс скоростей, потоки ионов, трансмембранная разность потенциалов, кривая баланса.

Показатель кислотности (pH) среды играет важную роль в жизнедеятельности организма. Скорости подавляющего большинства процессов метаболизма клеток зависят от pH их цитоплазмы, где протекают различные ферментативные реакции. Данная работа посвящена кинетике гомеостатирования pH цитоплазмы эритроцитов, чей метаболизм является наиболее простым по сравнению с метаболизмом других соматических клеток и чьи основные функции *in vivo* осуществляются в довольно узком по pH диапазоне.

ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский проспект, 53; e-mail: chaik@sci.lebedev.ru.

Целью данной работы является получение на плоскости концентрации АТФ ($n_{\text{АТФ}}$) – pH кривой баланса скоростей роста и убыли концентрации ионов H^+ в цитоплазме эритроцитов в приближении, достаточном для исследования устойчивости состояний метаболизма эритроцитов по основным параметрам – концентрации АТФ ($n_{\text{АТФ}}$) и pH при условии постоянства всех остальных параметров, реализуемых *in vivo*. Также необходимо выявить факторы, влияющие на положение указанной кривой баланса на плоскости ($n_{\text{АТФ}}$, pH).

Результаты данной работы важны для исследований нарушений клеточного метаболизма, влияющих на функции эритроцитов.

Кинетика роста и убыли концентрации ионов H^+ в цитоплазме эритроцитов. Анализ кинетики процессов, определяющих форму и положение кривой баланса скоростей подщелачивания и подкисления цитоплазмы (далее – кривая баланса), удобно проводить, используя принципы проточного гомеостатирования параметров метаболизма клетки, которые были представлены и применены М. В. Фоком и соавторами в работах [1–3]. Согласно этим принципам для описания стационарных состояний метаболизма клеток необходимо рассматривать баланс скоростей противоположно направленных процессов – увеличения и уменьшения рассматриваемого параметра. В этих работах получен общий вид кривой баланса скоростей роста и убыли концентрации АТФ в цитоплазме эритроцитов на плоскости ($n_{\text{АТФ}}$, pH) при условии постоянства остальных параметров метаболизма. Однако вопрос, касающийся кинетики гомеостатирования концентрации ионов H^+ в цитоплазме эритроцитов, в работах [1–3] практически не освещен.

Концентрация ионов H^+ в цитоплазме эритроцитов – $[H^+]_i$ – зависит от концентраций анионов и катионов. Это следует из условия сохранения квазинейтральности электролита, каковым является цитоплазма эритроцитов, а также плазма крови:

$$[H^+]_i = [A^-]_i - [Kat^+]_i, \quad (1)$$

где $[A^-]_i$ – суммарная концентрация проникающих через мембрану анионов в цитоплазме эритроцитов со своими валентностями, $[Kat^+]_i$ – суммарная концентрация катионов в цитоплазме эритроцитов также со своими валентностями.

В цитоплазме эритроцитов концентрации $[H^+]_i$, $[A^-]_i$, $[Kat^+]_i$ могут меняться за счет ионного обмена цитоплазмы с плазмой крови через цитоплазматические мембраны эритроцитов. В плазме крови величины $[H^+]_e$, $[A^-]_e$, $[Kat^+]_e$ гомеостатируются организмом на строго определенном уровне.

Изменение внутриклеточных концентраций ионов и их распределение между плазмой крови и цитоплазмой эритроцитов зависит от изменений величины трансмембран-

ного потенциала (U_M). Однако само изменение концентраций некоторых ионов внутри эритроцитов приводит к изменению величины U_M . Представляется, что из уравнений, связывающих величину трансмембранной разности потенциалов с концентрациями соответствующих ионов, может быть получена искомая кривая баланса. Проведем оценку потоков ионов с целью выяснения, какие из них вносят наибольший вклад в величину U_M , устанавливающуюся в стационарном состоянии.

Известно, что проникающие через мембрану анионы не вносят вклад в величину трансмембранной разности потенциалов и распределяются между плазмой крови и цитоплазмой эритроцитов в соответствии с больцмановским равновесием [4]:

$$[A^-]_e \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - [A^-]_i = 0, \quad (2)$$

где e_0 – элементарный заряд; k – константа Больцмана; T – температура.

Изменение величины трансмембранной разности потенциалов U_M в основном определяется работой K^+/Na^+ -АТФазы – молекулярного насоса, который выкачивает три иона Na^+ в плазму крови и закачивает два иона K^+ внутрь эритроцита за счет химической энергии, высвобождающейся при расщеплении молекулы АТФ (U_{K^+/Na^+}) [5]. Оценим, какой вклад в величину U_M может вносить выход ионов H^+ (U_{H^+}), появившихся в результате диссоциации кислых продуктов гликолиза. Трансмембранная разность потенциалов складывается из трех компонент:

$$U_M = U_{K^+/Na^+} + U_{H^+} + U_D, \quad (3)$$

где U_D – доннановский потенциал [6], устанавливающийся при $n_{ATP} = 0$, и, соответственно, неработающих K^+/Na^+ -АТФазах.

Выясним, насколько U_{K^+/Na^+} отличается от U_{H^+} . Для этого сравним скорость работы K^+/Na^+ -насосов (активный поток катионов) и скорость образования ионов H^+ , а также связанные с этими скоростями потоки ионов H^+ , K^+ и Na^+ через мембраны эритроцитов.

Скорость образования ионов H^+ в результате диссоциации молочной кислоты, конечного продукта гликолиза, имеет следующий вид:

$$J_{H^+}^+ = 2 \cdot \alpha \cdot I_{gl}, \quad (4)$$

где I_{gl} – скорость гликолиза, α – степень диссоциации молекулы молочной кислоты, которая образуется в единичном акте гликолиза в количестве двух штук; $\alpha = 1.38 \times 10^{-4}$ [7].

Скорость работы K^+/Na^+ -АТФазы (активный поток катионов):

$$V_0 = 2 \cdot \beta \cdot I_{gl}, \quad (5)$$

где β – доля молекул АТФ, образующихся в единичном акте гликолиза в количестве двух штук и расходуемых на работу насосов; $\beta = 0.4 - 0.5$ [8].

Сравнивая величины $J_{H^+}^+$ и V_0 , видим, что в стационарных условиях поток ионов H^+ , которые появляются в результате гликолиза и которые могут пройти через мембрану в единицу времени, на 4 порядка меньше, чем поток катионов, перемещаемых за счет активного транспорта через мембрану в единицу времени. Следовательно, вклад в величину U_M , обусловленный выходом ионов H^+ , пренебрежимо мал по сравнению с потоком катионов через мембрану за счет работы насосов.

Из-за большой проницаемости цитомембран для ионов H^+ [9], а также из-за малости потока этих ионов по сравнению с активным потоком катионов, рассматриваемую систему для ионов H^+ можно считать практически равновесной. Тогда можно говорить, что концентрации этих ионов между плазмой крови и цитоплазмой эритроцитов распределяются в соответствии с соотношением Больцмана:

$$[H^+]_i \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - [H^+]_e = 0. \quad (6)$$

Поскольку концентрация ионов $[H^+]$ и показатель кислотности pH связаны между собой соотношением $pH = -\lg[H^+]$, выражение (6) принимает следующий вид:

$$pH_i = pH_e - \frac{1}{2.3} \frac{e_0 U_M}{kT}, \quad (7)$$

где pH_i и pH_e – показатели кислотности цитоплазмы эритроцитов и плазмы крови. Видно, что соотношение (7) связывает величину показателя кислотности pH_i эритроцитов с величиной трансмембранной разности потенциалов U_M . Однако было показано, что основной вклад в генерацию трансмембранной разности потенциалов вносит активный транспорт катионов. Значит, для нахождения U_M достаточно рассмотреть уравнения баланса скоростей активного и пассивного транспорта катионов через эритроцитарную мембрану, что в конечном итоге позволит получить кривую баланса подщелачивания и подкисления цитоплазмы.

Уравнения баланса для K^+ и Na^+ имеют следующий вид [10]:

$$2 \cdot V_0 = \frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T} \cdot \Omega_{K^+} \cdot \frac{[K^+]_i \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - [K^+]_e}{e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - 1}, \quad (8)$$

$$-3 \cdot V_0 = \frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T} \cdot \Omega_{Na^+} \cdot \frac{[Na^+]_i \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - [Na^+]_e}{e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - 1}. \quad (9)$$

В левой части уравнений баланса (8) и (9) стоит интенсивность работы K^+/Na^+ -АТФазы (V_0) со своими стехиометрическими коэффициентами, соответственно, для K^+ и Na^+ . В правой части этих уравнений – электродиффузионные потоки катионов, где Ω_{K^+} , Ω_{Na^+} – проницаемости эритроцитарной мембраны для них.

Складывая почленно уравнения (8) и (9) и введя обозначение: $\frac{1}{\Omega} = \frac{2}{\Omega_{K^+}} - \frac{3}{\Omega_{Na^+}}$, получаем:

$$V_0 = \frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T} \cdot \Omega \cdot \frac{([Kat^+]_i) \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - ([Kat^+]_e)}{e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - 1}. \quad (10)$$

Уравнения осмотического баланса между цитоплазмой эритроцитов и плазмой крови имеют следующий вид [4]:

$$[Kat^+]_i + [A^-]_i + W_i + n_i = [Kat^+]_e + [A^-]_e + W_e + n_e = L, \quad (11)$$

где W_i , W_e – концентрации белков со своими коэффициентами осмолярности в цитоплазме эритроцитов и плазме крови соответственно, n_i , n_e – концентрация глюкозы в цитоплазме эритроцитов и плазме крови, $n_i = n_e = 5$ ммоль/л [11], $L = \sum_i N_i \cdot \xi_i = 300$ мОсм – осмолярность, то есть сумма концентраций N_i всех частиц в плазме крови и цитоплазме эритроцитов с соответствующими коэффициентами осмолярности ξ_i .

Подставив в уравнение (10) выраженные из (11) соотношения для $[Kat^+]_i$ и $[Kat^+]_e$, а также принимая во внимание соотношение (2), получим:

$$V_0 = \frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T} \cdot \Omega \cdot \frac{(L - n) \cdot \left(1 - e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}}\right) - (W_e - W_i \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}})}{1 - e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}}}. \quad (12)$$

Для нахождения W_i воспользуемся тем условием, что при установлении на мембране доннановского потенциала (U_D), катионы между внутри- и внеклеточным пространством распределяются в соответствии с соотношением Больцмана [5]:

$$[Kat^+]_i \cdot e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}} - [Kat^+]_e = 0. \quad (13)$$

Тогда после всех преобразований получаем:

$$V_0 = \frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T} \cdot \Omega \cdot \frac{(L - n - W_e) \cdot \left(1 - e^{-\frac{e_0 \cdot (U_M - U_D)}{k \cdot T}}\right)}{1 - e^{-\frac{e_0 \cdot U_M}{k \cdot T}}}. \quad (14)$$

При $U_M = 10$ мВ и $U_D = 8$ мВ [12] показатели экспонент $\frac{e_0(U_M - U_D)}{kT} = 0.08 < 1$ и $\frac{e_0 U_M}{kT} = 0.32 < 1$, следовательно, можно воспользоваться разложением в ряд показательной функции: $e^{-x} = 1 - x$. В результате имеем:

$$V_0 = \Omega \cdot \frac{e_0(U_M - U_D)}{kT} \cdot (L - n - W_e). \quad (15)$$

Из соотношения (15) можно выразить $\frac{e_0 U_M}{kT}$ и, подставив его в (7), получить связь между скоростью работы насосов и pH_i :

$$V_0 = 2.3 \cdot \Omega \cdot (pH_D - pH_i) \cdot (L - n - W_e), \quad (16)$$

где $pH_D = pH_e - \frac{1}{2.3} \frac{e_0 U_D}{kT}$ – показатель кислотности цитоплазмы эритроцитов, реализующийся при установлении на мембране потенциала Доннана.

В условиях гомеостаза V_0 является функцией $n_{\text{АТР}}$ и pH_i :

$$V_0 = f_1(n_{\text{АТР}}) \cdot f_2(pH_i). \quad (17)$$

Согласно [4], при небольших $n_{\text{АТР}}$ скорость работы K^+/Na^+ -насосов линейно зависит от $n_{\text{АТР}}$:

$$f_1(n_{\text{АТР}}) = \gamma \cdot n_{\text{АТР}}, \quad (18)$$

где γ – максимальная скорость работы K^+/Na^+ -насосов.

Зависимость скорости работы K^+/Na^+ -АТФазы от величины pH представляет собой колоколообразную кривую [13]. Согласно [14], для осуществления устойчивого гомеостаза цитоплазмы эритроцитов по pH , рабочий диапазон активности K^+/Na^+ -АТФазы должен находиться на падающей ветви колоколообразной кривой. С достаточной точностью в интересующем нас диапазоне зависимость скорости работы насосов от pH_i может быть представлена в виде прямой: $f_2(pH_i) = -B \cdot pH_i + C$, где B и C – некоторые константы, определяющие наклон и положение этой прямой.

Учитывая все вышесказанное, приходим к конечному аналитическому выражению для кривой баланса скоростей подкисления и подщелачивания цитоплазмы:

$$pH_i = \frac{M \frac{n_{\text{АТР}}}{\Omega} - F \cdot pH_D}{N \frac{n_{\text{АТР}}}{\Omega} - F}, \quad (19)$$

где $M = \gamma \cdot C$; $N = \gamma \cdot B$; $F = L - n - W_e$. Величины этих констант в стационарных условиях постоянны.

Зависимость (19) представляет собой гиперболу. На рис. 1 представлены три участка таких гипербол, относящихся к физиологическому диапазону изменений pH и $n_{\text{АТФ}}$ и рассчитанные для одних и тех же коэффициентов M , N , F , но для разных значений величины Ω . Верхней кривой MN_1 соответствует наибольшая проницаемость Ω_1 , кривой MN_2 – проницаемость $\Omega_2 < \Omega_1$, а кривой MN_3 – проницаемость $\Omega_3 < \Omega_2 < \Omega_1$.

Необходимо отметить, что согласно работе [13] величина проницаемости Ω зависит от трансмембранной разности потенциалов. Изменение электрического поля в мембране, обусловленное разностью потенциалов U_M , влияет на агрегатное состояние липидов (жидкость–кристалл). От состояния липидов зависит количество и размер сквозных долгоживущих пор, через которые происходит основной неспецифический трансмембранный транспорт большинства частиц, в том числе и ионов. При увеличении трансмембранной разности потенциалов количество пор в мембране уменьшается, и, соответственно, проницаемость становится меньше. На фазовой плоскости это отражается деформацией кривой баланса в сторону более низких значений (на рис. 1 – MN_2).

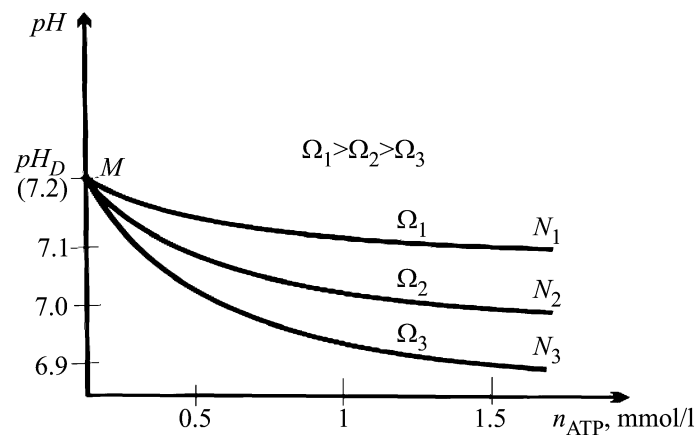


Рис. 1: MN_1 , MN_2 , MN_3 – кривые баланса подщелачивания и подкисления цитоплазмы эритроцитов на плоскости $(n_{\text{АТФ}}, pH)$ при различных проницаемостях мембран эритроцитов для катионов. Кривой MN_1 соответствует наибольшая проницаемость – Ω_1 , кривой MN_2 – проницаемость $\Omega_2 < \Omega_1$ и кривой MN_3 – проницаемость $\Omega_3 < \Omega_2 < \Omega_1$.

Устойчивость состояний, соответствующих точкам на кривой MN . Анализ устойчивости точек на кривой MN (рис. 1) будем проводить, используя условия Ляпунова. Зададим положительное приращение величине pH в некоторой точке кривой

MN при постоянстве концентрации АТФ. При этом попадаем в область более низких концентраций ионов H^+ , что возможно лишь при доминировании в этой области скорости убыли ионов H^+ . Значит, частная производная скорости изменения концентрации ионов H^+ по pH отрицательна. Следовательно, выбранная точка устойчива по pH . Аналогично, зададим малое положительное приращение величине n_{ATP} при постоянстве pH . При этом также попадаем в область доминирования скорости убыли концентрации ионов H^+ . Значит, частная производная скорости изменения концентрации ионов H^+ по n_{ATP} отрицательна. Следовательно, выбранная точка кривой MN устойчива по n_{ATP} . Монотонность же убывания величины pH при возрастании величины n_{ATP} обеспечивает устойчивость любой точки кривой MN как по pH , так и по n_{ATP} .

Примечание. Как уже было сказано, М. В. Фок в своих работах [1–3] провел анализ кинетики концентрации АТФ в цитоплазме – другого важного параметра метаболизма эритроцита, получив на фазовой плоскости (n_{ATP} , pH) кривую баланса скоростей синтеза и расхода АТФ. Эта кривая имеет сложную форму, поэтому участки, устойчивые по n_{ATP} , чередуются с участками, не устойчивыми по этому параметру. К тому же точки этой кривой не устойчивы по pH во всем рассматриваемом диапазоне изменения n_{ATP} , если не вводятся какие-то дополнительные условия. Полученная же в настоящей работе кривая баланса скоростей подкисления и подщелачивания цитоплазмы устойчива и по pH , и по n_{ATP} на всем ее протяжении. Поэтому при ее пересечении с устойчивыми по n_{ATP} участками кривой, полученной М. В. Фоком, реализуется состояние, устойчивое сразу по двум параметрам – pH и n_{ATP} .

Изменения скоростей процессов метаболизма приводят к изменениям конфигурации и взаимного расположения указанных кривых, что может привести к смещению точки пересечения, вплоть до ее исчезновения. Поэтому для реализации устойчивого состояния клетки должен существовать специальный механизм регулирования указанных выше скоростей. Такая регуляция может осуществляться организмом (гормонами, нервными импульсами), а также самой клеткой (так называемая авторегуляция). Мы считаем, что организм может обеспечить только условия для эффективного действия клеточного авторегуляторного механизма. Наиболее вероятными агентами, осуществляющими этот механизм, являются биологически активные вещества пептидной природы, синтезируемые в клетке. По нашему мнению, эритроциты в этом отношении не являются исключением. Однако они не имеют генома и рибосом, а значит, единственный оставшийся способ синтеза пептидов – нерибосомальный. Известно, что данный вид синтеза могут осуществлять бактерии и грибы [15, 16]. Проверка выдвинутой на-

ми гипотезы о синтезе нерибосомальных пептидов в эритроцитах требует отдельных исследований, которые уже предлагались в [17].

Заключение. В работе подробно рассмотрена кинетика гомеостирования концентрации ионов H^+ – одного из основных параметров, от которого зависят скорости протекания основных процессов метаболизма эритроцитов. На фазовой плоскости (n_{ATP}, pH) получена кривая баланса скоростей роста и убыли концентрации ионов H^+ (величины pH цитоплазмы). Показано, что точки этой кривой на всем ее протяжении устойчивы по pH и по n_{ATP} . Положение кривой баланса на плоскости (n_{ATP}, pH) зависит от усредненной проницаемости эритроцитарной мембраны для катионов (K^+ и Na^+).

Показано, что точке пересечения кривых баланса скоростей роста и убыли концентрации ионов H^+ и кривой баланса скоростей синтеза и расхода АТФ, лежащей на устойчивых участках этих кривых, соответствует состояние, в котором может быть обеспечен гомеостаз эритроцита. Однако такой гомеостаз не возможен без специального регулирования скоростей процессов метаболизма. Поэтому выдвинута гипотеза о существовании в эритроцитах нерибосомального синтеза пептидов, способных *in vivo* осуществлять указанное регулирование.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, *Авторегуляция, как основа гомеостаза клеток* (М., Космосинформ, 1997).
- [2] М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, Г. А. Прокопенко, В. И. Грачев, Препринт ФИАН № 134 (М., ФИАН, 1990).
- [3] М. А. Виноградова, А. Р. Зарицкий, В. С. Пронин и др., Краткие сообщения по физике ФИАН **35**(6), 39 (2008).
- [4] Ф. И. Атауллаханов, Н. О. Корунова, И. С. Спиридонов и др., Биологические мембраны **26**(3), 163 (2009).
- [5] А. Б. Рубин, *Биофизика* (М., изд. МГУ, 2004), Том 2.
- [6] Ю. А. Владимиров, Д. И. Рощупкин, А. Я. Потапенко, А. И. Деев, *Биофизика* (М., Медицина, 1983).
- [7] *Краткий справочник физико-химических величин* под редакцией Мищенко К.П. и Равделя А.А. (Л., Химия, 1974).
- [8] Ф. И. Атауллаханов, Дис. д-ра. физ.-мат. наук (ИБФ АН СССР, Пущино, 1982).
- [9] В. Ф. Антонов, Соросовский образовательный журнал **10**, 10 (1998).

- [10] В. С. Маркин, Ю. А. Чизмаджев, *Индукцированный ионный транспорт* (М., Наука, 1974).
- [11] Е. А. Черницкий, А. В. Воробей, *Структура и функции эритроцитарных мембран* (Минск, Наука и техника, 1981).
- [12] Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц, *Современная биохимия в схемах* (М., Мир, 1984).
- [13] А. Р. Зарицкий, В. С. Пронин, Краткие сообщения по физике ФИАН, № 12, 8 (2006).
- [14] М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, Г. А. Зарицкая, Е. В. Переведенцева, *Авторегуляция неспецифической проницаемости мембраны эритроцита* (М., Наука, 1999).
- [15] Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровин, *Биологическая химия* (М., Медицина, 1990).
- [16] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **105**, 715 (2005).
- [17] С. П. Баранов, М. А. Виноградова, А. Р. Зарицкий и др., Краткие сообщения по физике ФИАН **35**(11), 42 (2008).

Поступила в редакцию 20 марта 2012 г.