

УДК 576.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ УТИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ И ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН IN VITRO

С. П. Баранов, М. А. Виноградова, А. Р. Зарицкий, М. Н. Маслова, В. С. Пронин,
Н. А. Распопов, Д. А. Семёнов, Л. Л. Чайков, М. Н. Черноусова

Работа посвящена выяснению условий устойчивой работы механизма авторегуляции неспецифической проницаемости мембран эритроцитов в крови in vivo. Проведен анализ кинетики основных процессов энергетического метаболизма эритроцитов пробы крови после взятия ее у пациента. Получены экспериментальные графики зависимости концентрации глюкозы в плазме крови от времени, величины проницаемости эритроцитарных мембран для кислорода от времени. Дано объяснение росту средней скорости утилизации глюкозы, а также росту усредненной величины проницаемости эритроцитарных мембран для кислорода. Показано наличие осмотических колебаний в плазме крови и в цитоплазме эритроцитов в пробе крови после ее взятия. Указана возможная причина возникновения этих колебаний.

Системные заболевания организма, число которых за последнее десятилетие неуклонно растет во всех странах, как правило, сопровождаются нарушением кислородно-транспортной функции крови. Нарушение снабжения тканей кислородом зачастую связано с изменением неспецифической проницаемости как мембран эритроцитов, так и мембран клеток-потребителей кислорода.

Целью работы является экспериментальное изучение процессов утилизации глюкозы и проницаемости эритроцитарных мембран и на его основе подтверждение стабилизации трансмембранной разности потенциалов как необходимого условия эффективности действия механизма авторегуляции проницаемости эритроцитарных мембран для кислорода.

Этот механизм и его действие на молекулярном уровне в полной мере разработан в работах М.В. Фока [1]. Там показана роль стабилизации трансмембранной разности потенциалов эритроцитарных мембран для нормального снабжения кровью тканей кислородом как необходимого условия для работы указанного механизма *in vivo*. Суть его заключается в том, что величину проницаемости определяет напряженность электрического поля в липидном матриксе мембран. В [1] показано, как *in vivo* регулируется это поле, вследствие чего эритроциты дозированно (в требуемом количестве), отдают кислород тканям – его потребителям. В данной работе экспериментально изучалось действие этого механизма в эритроцитах пробы крови на протяжении трех часов после ее взятия у пациента.

Согласно работе [2], в норме *in vivo* в эритроцитах генерируется трансмембранная разность потенциалов $U_M \sim 25 - 35$ мВ. Величина U_M определяется степенью диссоциации и зарядовой конфигурацией цитоплазматических белков, в первую очередь гемоглобина Hb (так называемая Доннановская составляющая разности потенциалов – U_D), деятельностью молекулярных K^+/Na^+ насосов ($U_{Na/K}$) и окислительными процессами утилизации глюкозы в реакциях гликолиза (U_{H+}).

Таким образом, величина напряженности электрического поля в липидном матриксе мембраны эритроцитов равна:

$$E_M = \frac{U_M}{d} = \frac{U_D + U_{Na/K} + U_{H+}}{d}, \quad (1)$$

где d – толщина мембраны.

Энергетический метаболизм эритроцитов наиболее прост по сравнению с другими специализированными клетками. В работе [3] показано, что зависимость скорости гликолиза и, соответственно, скорости синтеза АТФ (V_{ATP}^+) от концентрации АТФ в цитоплазме эритроцитов при постоянном рН, который реализуется *in vivo*, имеет вид, показанный на рис. 1. Заметим, что даже если предположить, что АТФ в эритроците нет совсем, то реакция его синтеза все равно будет иметь ненулевую скорость [4]. Поэтому кривая $V^+(n_{ATP})$ при $n_{ATP} = 0$ начинается не из начала координат, а с некоторого положительного значения $V^+(0) > 0$.

Известно, что в реакциях гликолиза из одной молекулы глюкозы образуется две молекулы АТФ [5]. Причем 80% суммарного выхода АТФ тратится на работу молекулярных Na^+/K^+ насосов, и скорость V_n^- этих трат подчиняется закону Михаэлиса–Ментен [6]:

$$V_n^- = \frac{A \cdot n_{ATP}}{n_{ATP} + k_M}, \quad (2)$$

где A – константа, k_M – константа Михаэлиса–Ментен, n_{ATP} – концентрация молекул АТФ в цитоплазме, V_n^- – скорость расхода АТФ на работу молекулярных Na^+/K^+ насосов.

Обычно считается [6], что $n_{ATP} \ll k_M$. При этом условии зависимость скорости V_n^- от n_{ATP} подчиняется линейному закону:

$$V_n^- \approx \frac{A}{k_M} \cdot n_{ATP}, \quad (3)$$

а скорость трат АТФ на прочие нужды подчиняется тем же законам и составляет *in vivo* около 20% от V_n^- .

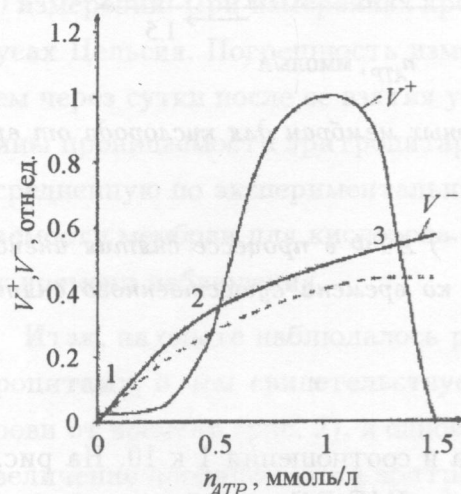


Рис. 1. Зависимости скоростей синтеза (V^+) и расхода (V^-) АТФ от концентрации АТФ (n_{ATP}) в цитоплазме эритроцитов при постоянном рН. Пунктирной линией обозначена скорость расхода АТФ K^+/Na^+ насосами.

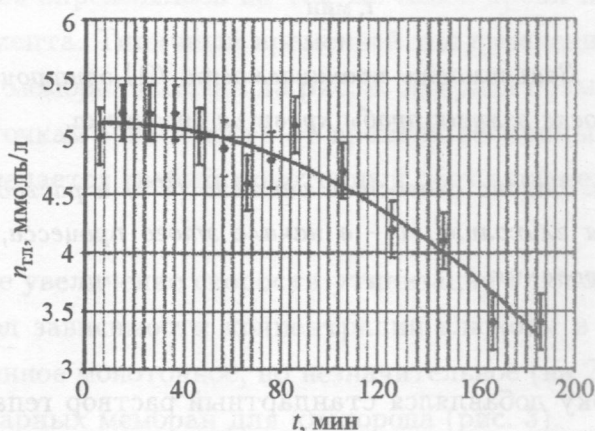


Рис. 2. Зависимость концентрации глюкозы в плазме крови здорового человека от времени после взятия пробы крови из организма.

Однако, проанализировав различные физиологические данные, мы считаем, что *in vivo* зависимость $V^-(n_{ATP})$ при $pH = \text{const}$ несколько отличается от линейной и имеет вид, приведенный на рис. 1 [3].

Чтобы выяснить особенности изменения энергетического метаболизма эритроцитов, то есть процессов синтеза и расхода АТФ как главного энергоносителя, в пробе крови, взятой у пациента, был исследован в течение ~ 3 часов временной ход концентрации глюкозы в пробе крови после ее взятия. При этом, чтобы кровь не сворачивалась, в

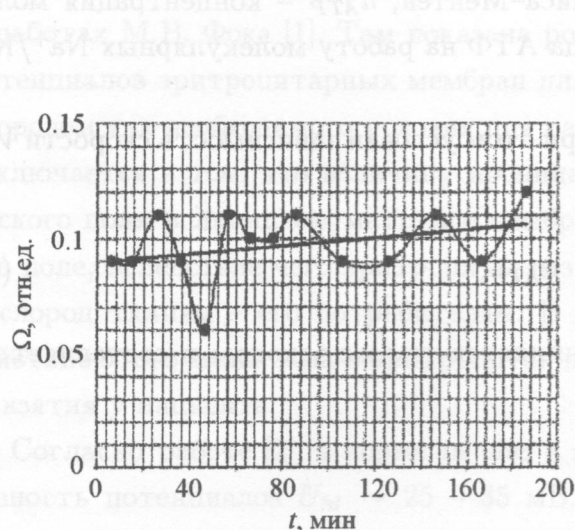


Рис. 3. Зависимость проницаемости (Ω) эритроцитарных мембран для кислорода от времени после взятия пробы крови из организма.

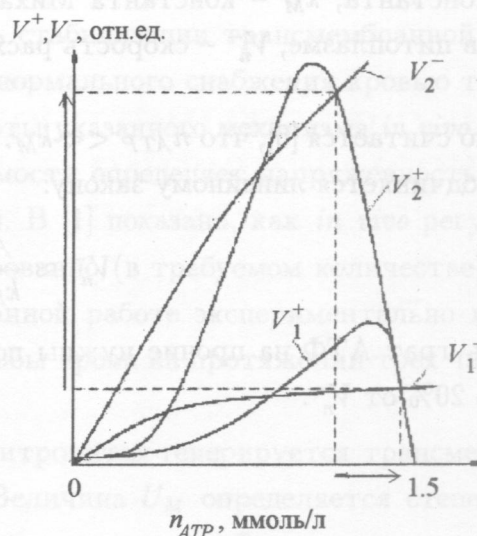


Рис. 4. Баланс скоростей синтеза (V^+) и расхода (V^-) АТФ в процессе снятия ингибирования гликолиза. 1 – в начале этого процесса, 2 – ко времени существенного снятия ингибирования.

пробирку добавлялся стандартный раствор гепарина в соотношении 1 к 10. На рис. 2 приведены данные, полученные с помощью глюкометра IME-DC в пробе крови, взятой из вены здорового человека. Даны экспериментальные точки, полученные через каждые 10 мин. Каждое измерение требовало не менее 1 мин. Временной промежуток между точками определялся технологическими возможностями указанного прибора. Зависимость концентрации глюкозы в плазме крови от времени, усредненная по точкам, имеет падающий характер. На начальном участке скорость утилизации глюкозы составляет 0.01 ммоль/л*ч, на конечном участке – в 10 раз больше. Средняя ошибка измерений определялась не менее чем через сутки (когда закончились основные релаксационные процессы) на той же самой крови по трем измерениям одной и той же пробы. Видно, что скорость расхода глюкозы со временем в среднем увеличивается, что, очевидно, свидетельствует о постепенном снятии ингибирования гликолиза. Заметим также, что на фоне изменения среднего проявляются колебания концентрации глюкозы в плазме крови во времени. Характер этих колебаний относительно кривой устойчиво воспроизводился в измерениях на пробах крови двух десятков здоровых людей. Это свидетельствует о

том, что колебания имеют общий характер и могут быть объяснены релаксационными процессами, протекающими в крови сразу после ее взятия.

Параллельно с опытами по измерению концентрации глюкозы в плазме крови проводились опыты по определению проницаемости эритроцитарных мембран для кислорода с помощью прибора КИНОКС [7]. Этот прибор позволяет через каждые 5–10 мин (время определяется техническими возможностями прибора) с высокой точностью определять проницаемость мембран эритроцитов для кислорода в относительных единицах при различной насыщенности крови кислородом, в нашем случае соответствующей венозной крови. Для одного измерения требовалось 2 мл крови (гепаринизированной как и в первом случае). Поэтому кровь заготавливалась в объеме, достаточном для проведения 20 измерений. При измерениях кровь в кювете прибора термостатировалась при 28 градусах Цельсия. Погрешность измерения определялась на той же самой крови не менее чем через сутки после ее взятия у пациента. Типичный временной ход изменений величины проницаемости эритроцитарных мембран показан на рис. 3. Жирная прямая дает усредненную по экспериментальным точкам зависимость от времени величины проницаемости мембран для кислорода. Отмечается слабый монотонный рост этой величины от времени наблюдения.

Итак, на опыте наблюдалось резкое увеличение скорости утилизации глюкозы эритроцитами, о чем свидетельствует ход зависимости концентрации глюкозы в плазме крови от времени (рис. 2), и одновременное монотонное, но незначительное (на 20–30%) увеличение проницаемости эритроцитарных мембран для кислорода (рис. 3).

Быстрый рост скорости утилизации глюкозы свидетельствует об увеличении общей энергетической мощности гликолиза и скорости накопления АТФ. В результате должны были бы усилиться все АТФ-зависимые процессы, в том числе генерация трансмембранной разности потенциалов. Следствием последней стало бы уменьшение проницаемости эритроцитарных мембран. Однако на опыте (рис. 3) наблюдается обратная картина: усредненная величина проницаемости незначительно возрастает. Это противоречие требует объяснения.

Наблюдаемое на опыте увеличение скорости расхода глюкозы в плазме крови вызвано распадом ингибирующих гликолиз субстанций. Следствием этого является увеличение скоростей синтеза АТФ (V^+) в цитоплазме эритроцита. Если этот процесс сопровождается ещё большим, по сравнению со скоростью синтеза АТФ (V^+), увеличением скорости трат АТФ (V^-), то баланс скоростей синтеза и расхода АТФ может установиться на новом уровне, соответствующем меньшей концентрации АТФ.

Проиллюстрируем это графически (рис. 4). На первый взгляд может показаться, что при увеличении в 10 раз V^+ и V^- должна увеличиться приблизительно во столько же раз и концентрация АТФ в цитоплазме эритроцитов. Но это невозможно, так как достижение максимального значения n_{ATP} определяется запасами его составных веществ: аденозиновых оснований и неорганического фосфата, которые ограничиваются сразу после взятия крови из организма и не могут увеличиваться в указанное число раз, что на рис. 1 соответствует падению $V^+(n_{ATP})$ до нуля при $n_{ATP} \rightarrow 1.5$ ммоль/л. Вместо этого видим, что увеличение скорости расхода в 10 раз (при соблюдении условия сдвига баланса скоростей синтеза и расхода АТФ в сторону ее трат) влечет за собой небольшое уменьшение концентрации АТФ.

Известно, что скорость работы K^+/Na^+ насосов зависит от рН и от концентрации АТФ в цитоплазме [7]. Чем ниже рН и выше концентрация АТФ, тем выше скорость работы насосов. Значит, при уменьшении концентрации АТФ в цитоплазме скорость работы насосов уменьшается. Это влечет за собой уменьшение величины трансмембранной разности потенциалов, а, следовательно, увеличение проницаемости эритроцитарных мембран [1], что мы и наблюдаем на опыте (см. рис. 3).

Рассмотрим вероятную причину сдвига баланса скоростей синтеза и расхода АТФ в сторону его трат. Поскольку доля потока синтезированного в эритроцитах АТФ, отводимого на скорость работы K^+/Na^+ насосов, падает из-за уменьшения концентрации АТФ в цитоплазме, то наиболее вероятной причиной указанного дисбаланса мы считаем нерибосомальный синтез пептидов в эритроцитах (то есть синтез пептидов на крупных белковых глобулах, требующий затрат АТФ). Известно [8], что такой синтез действительно имеет место в клетках. Даже при уменьшении концентрации АТФ скорость этого энергозависимого процесса может увеличиваться. Остается указать причину, почему этот процесс усиливается после взятия крови из организма. Известно, что в плазме крови непрерывно идет процесс ферментативного распада пептидов на отдельные аминокислоты, осуществляемый пептидазами – крупными глобулярными белками. Концентрация пептидов в плазме крови *in vivo* поддерживается на постоянном уровне (то есть осуществляется гомеостаз) вследствие равновесия между процессами выхода пептидов из всех клеток организма в плазму крови и их ферментативного распада в ней. Таким образом, пептиды, синтезируемые в клетках крови и во всех клетках организма, непрерывно выходят из них и попадают в плазму крови, где они разбираются пептидазами на отдельные аминокислоты, которые, в свою очередь, возвращаются в клетки. После взятия пробы крови у пациента приток пептидов из организма в эту пробу пре-

кращается. Если предположить, что каждая клетка крови производит пептиды с такой же скоростью, что и другие клетки организма, то приток пептидов ослабляется в ~ 10 раз. Поэтому весь поток аминокислот, образующихся в плазме крови, направляется в эритроциты, тем самым и увеличивая скорость трат АТФ на синтез пептидов.

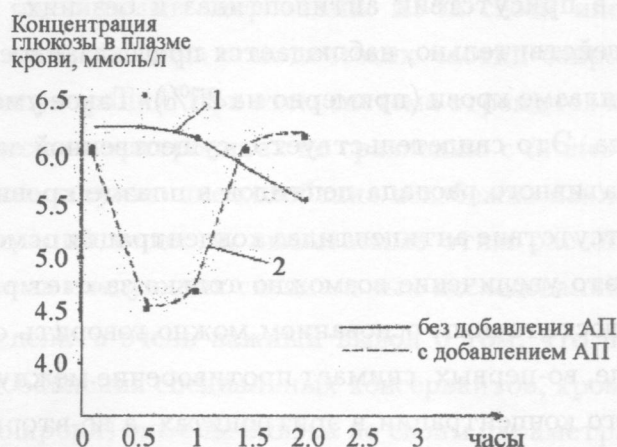


Рис. 5. Зависимость концентрации глюкозы в плазме пробы крови после взятия ее из организма от времени: 1 — без добавления антипептидаз, 2 — с добавлением антипептидаз.

Остается показать, что процессы ферментативного распада пептидов в плазме пробы крови действительно имеют место, обеспечивая тем самым быстрый рост концентрации аминокислот в плазме крови сразу после ее взятия из организма, давая начало релаксационным осмотическим процессам. Если предположение — верно, то это немедленно отразится на осмотических явлениях. В опытах с глюкозой наблюдение колебаний ее концентрации (см. рис. 2) можно объяснить наличием как раз таких осмотических процессов, которые вызывают изменение объема эритроцитов. Мы предположили, что началом процессов, нарушающих осмотическое равновесие в системе “плазма–цитоплазма эритроцитов”, является прекращение притока пептидов в кровь из всей другой массы клеток организма и отток в эти клетки из плазмы свободных аминокислот, появляющихся вследствие ферментативного распада пептидов. При этом осмолярность плазмы крови (то есть сумма произведений концентраций веществ, умноженных на соответствующие коэффициенты осмолярности) должна существенно возрасти, а, следовательно, вода должна выходить из эритроцитов, объем плазмы крови увеличиваться, а концентрация глюкозы в плазме существенным образом уменьшаться. Однако в опытах этого не видели, что может свидетельствовать о высокой скорости процессов распада пептидов в плазме крови и выхода воды из эритроцитов. Для проверки предположения мы

провели специальный опыт, целью которого было замедлить ферментативный распад пептидов в плазме крови путем введения в плазму крови специальных веществ (антипептидаз), ингибирующих указанные процессы. На рис. 5 показаны результаты этого опыта. Там представлены графики зависимости изменения концентрации глюкозы в пробе крови от времени в присутствии антипептидаз и без них. Видно, что в присутствии антипептидаз, действительно, наблюдается предсказанное выше уменьшение концентрации глюкозы в плазме крови (примерно на 25%). Такое уменьшение наблюдается в течение целого часа. Это свидетельствует о существенной задержке указанных выше процессов ферментативного распада пептидов в плазме крови и выхода воды из эритроцитов. Значит, в отсутствие антипептидаз концентрация осмотических частиц в плазме увеличивается, а это увеличение возможно только за счет роста концентрации аминокислот. Поэтому с достаточным основанием можно говорить о том, что вся цепь процессов, описанная выше, во-первых, снимает противоречие между ускорением синтеза АТФ и уменьшением его концентрации в эритроцитах, а во-вторых, обеспечивается ростом концентрации аминокислот в цитоплазме эритроцитов за счет перехода их из плазмы крови. При таком переходе концентрация аминокислот в цитоплазме может возрасти в десятки раз и вызвать соответствующее увеличение скорости синтеза из них пептидов в той мере, которая указана выше. При этом изменения осмолярности плазмы крови неизбежно вызывают релаксационные процессы, сопровождающиеся изменением объема эритроцитов за счет изменения концентрации осмотических частиц внутри и вне их.

Итак, в серии выполненных экспериментов наблюдалось существенное увеличение скорости утилизации глюкозы эритроцитами примерно в 10 раз. При этом было обнаружено не столь существенное увеличение (примерно на 20%) неспецифической проницаемости эритроцитарных мембран, что свидетельствует при таком значительном изменении энергетики о высокой стабилизации этого важнейшего для кислородно-транспортной функции эритроцитов параметра. Показано, что такая стабилизация проницаемости достигается за счет отвода излишнего потока энергии в виде АТФ на нерибосомальный синтез регуляторных пептидов в цитоплазме эритроцитов. При этом скорость работы K^+/Na^+ насосов меняется незначительно и, соответственно, также незначительно изменяется трансмембранная разность потенциалов, поле в липидах мембраны и неспецифическая проницаемость эритроцитарных мембран. Из экспериментальных результатов следует, что причиной перераспределения потоков энергии после взятия крови у пациента является быстрый рост концентрации аминокислот в ее плаз-

ме вследствие ферментативного распада пептидов, осуществляемого белковыми молекулами – пептидазами. Возникает осмотическое неравновесие между плазмой крови и цитоплазмой эритроцитов. Это неравновесие порождает процессы релаксации концентраций различных веществ (в первую очередь глюкозы и аминокислот) в указанных средах, идущие с различными скоростями. Из-за своей инерционности релаксационные процессы для каждого вида осмотических частиц сопровождаются затухающими колебаниями их концентраций. При этом система стремится к состоянию, в котором метаболические процессы в эритроцитах по сравнению с *in vivo* рассогласованы. Поэтому на упомянутые выше затухающие колебания неизбежно накладываются незатухающие колебания концентраций веществ, вызываемые этим рассогласованием [3]. Изучение этих процессов – тема следующих специальных исследований.

Можно также сделать очень важный вывод о том, что после трех часов хранения пробы крови (без добавления специальных консервантов, кроме гепарина, препятствующего сворачиванию крови) она еще близка по своим параметрам к состоянию *in vivo* (на это указывает незначительное изменение проницаемости эритроцитарных мембран, как одного из главных параметров), а значит, ее можно переливать пациенту без ущерба для здоровья. Однако следует проследить описанные в данной работе процессы в течение более длительного времени, чтобы детально разобраться в причинах нарушения кислородно-транспортной функции эритроцитов, что, в свою очередь, позволит разработать методики восстановления этой важной функции.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] М. В. Фок, *Некоторые вопросы биохимической физики, важные для врачей* (М., Наука, 2003).
- [2] М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, Г. А. Зарицкая, Е. В. Переведенцева, *Авторегуляция неспецифической проницаемости мембраны эритроцита* (М., Наука, 1999).
- [3] М. А. Виноградова, А. Р. Зарицкий, В. С. Пронин и др., Краткие сообщения по физике ФИАН **35**(6), 39 (2008).
- [4] М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, *Авторегуляция, как основа гомеостаза клеток* (М., Космосинформ, 1997).
- [5] Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц, *Современная биохимия в схемах* (М., Мир, 1984).
- [6] Ф. И. Атауллаханов, *Регулирование внутриклеточных процессов в эритроцитах*. В сб.: Физика живого. Под ред. С.Д. Захарова (М., Знание, 1986), стр. 22.

- [7] М. В. Фок, *Некоторые аспекты биохимической физики, важные для медицины* (М., Физматлит, 2007).
- [8] Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин, *Биологическая химия* (М., Медицина, 1990), стр. 416.

Поступила в редакцию 20 октября 2008 г.