

УДК 577.31 + 577.171.53

АВТОРЕГУЛЯЦИЯ ПОТОКА КИСЛОРОДА ВНУТРЬ КЛЕТОК

М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, Г. А. Прокопенко, Е. В. Переведенцева

Предложен и качественно рассмотрен молекулярный механизм изменения неспецифической проницаемости цитоплазматической мембраны, чувствительный к напряжению кислорода в цитоплазме. Рассмотрена роль этого механизма в регуляции потока кислорода внутрь клетки при изменении ее активности, а также в стабилизации напряжения кислорода в цитоплазме при изменении его напряжения в межклеточной жидкости.

При переходе клетки из состояния покоя в активное состояние потребление кислорода возрастает в десятки раз [1]. Но изменение напряжения кислорода pO_2 в межклеточной жидкости почти не влияет на его поток внутрь клетки и на pO_2 в цитоплазме. Рассмотрим на молекулярном уровне, какой механизм может это обеспечить.

В цитоплазме напряжение кислорода не больше нескольких миллиметров ртутного столба, а в межклеточной жидкости – на порядок больше (не менее 20 мм рт.ст.) [2, 3]. Поэтому, даже если pO_2 цитоплазмы уменьшится до нуля, перепад pO_2 на цитоплазматической мембране не может существенно возрасти. Он увеличится, лишь если возрастет pO_2 в межклеточной жидкости. Но эта величина лежит в узких пределах: от 100 мм рт.ст. при входе в капилляр до 20 мм в летальном углу [4]. Следовательно, возле каждой клетки pO_2 межклеточной жидкости может возрасти не более, чем в несколько раз, даже если возле нее откроется резервный капилляр. Поэтому увеличение потока кислорода в клетку в десятки раз возможно, лишь если во много раз возрастет проницаемость цитоплазматической мембраны.

На основе анализа известных данных можно показать, что проницаемость мембраны может изменяться в ту или другую сторону и в том случае, когда потребность клетки в кислороде остается постоянной, но изменяется pO_2 межклеточной жидкости.

Так, при дыхании гипоксической смесью газов pO_2 цитоплазмы восстанавливается не позднее, чем через 10 минут [5]. Это значит, что за такое время проницаемость цитоплазматических мембран успевает увеличиться в необходимое число раз [6, 7]. С другой стороны, при гипербарической оксигенации pO_2 цитоплазмы остается близким к норме, несмотря на увеличение pO_2 межклеточной жидкости [8]. Это показывает, что проницаемость цитоплазматической мембраны уменьшилась. На адаптацию клеток к изменению pO_2 газовой среды, проявляющуюся в том, что внутриклеточное pO_2 изменяется значительно меньше, чем pO_2 газовой среды, указано также в [9, 10].

В данной работе предложен возможный молекулярный механизм изменения проницаемости мембраны, который обеспечивает поддержание потока кислорода на уровне, отвечающем потребности клетки в данный момент, как при изменении этой потребности, так и при изменении pO_2 в межклеточной жидкости, и одновременно ограничивает pO_2 цитоплазмы безопасными пределами.

В работах [6, 7] было показано, что цитоплазматическая мембрана эритроцита может изменять свою проницаемость для кислорода в несколько тысяч раз, и был предложен молекулярный механизм, приводящий к таким изменениям. Мы полагаем, что механизм изменения неспецифической проницаемости цитоплазматических мембран клеток тканей – потребителей кислорода универсален и во многом аналогичен механизму изменения проницаемости мембраны эритроцита. Основные его черты следующие: 1) Кислород проникает сквозь мембрану главным образом по сквозным порам, имеющимся в ее липидном биослое. 2) Если в расположении молекул обоих монослоев бислоя имеется дальний порядок (двумерный кристалл), то на границах между монокристаллическими участками имеются сквозные поры и проницаемость мембраны велика. Если же в одном из монослоев дальний порядок отсутствует (двумерная жидкость), то сквозных пор мало, ибо они возникают лишь случайно, и проницаемость низкая. 3) Состояние двумерного кристалла устойчиво лишь при достаточно слабом электрическом поле в мембране. В сильном поле один из монослоев переходит в состояние двумерной жидкости и сквозные поры закрываются.

Напряженность поля в мембране может изменяться как вследствие изменения трансмембранной разности электростатических потенциалов, так и из-за адсорбции на поверхности мембраны каких-либо крупных молекул, так как в результате этого та же разность потенциалов будет приходиться на большую толщину. В эритроцитах роль таких молекул играет гемоглобин. Как показали опыты, в деоксигенированных эритроцитах он выстилает внутреннюю поверхность мембраны в один-два сплошных слоя, а в

оксигенированных – занимает заметно меньше половины ее поверхности.

Мы предполагаем, что в клетках – потребителях кислорода вместо гемоглобина на мембране адсорбируется онкобелок (Opr), который всегда присутствует в них в небольших количествах. Химические свойства Opr изучены еще очень мало, и его роль в клетке не установлена. Однако то, что он присутствует не только в животных, но и в растительных клетках, указывает, что Opr удовлетворяет какие-то фундаментальные потребности, жизненно важные для всех клеток. Одной из таких потребностей может являться регуляция потока кислорода в цитоплазму.

Молекулярная масса Opr близка к молекулярной массе гемоглобина, и его адсорбция на цитоплазматической мембране уменьшает имеющееся в ней электрическое поле точно так же, как и адсорбция гемоглобина. Чтобы Opr выполнял эту роль, его адсорбция должна зависеть от pO_2 в цитоплазме. Однако сам Opr кислород не присоединяет. Зато его присоединяет миоглобин (Mb), также всегда присутствующий в клетках. (Сам он заменить гемоглобин не может, так как его молекула слишком мала. Ее масса в четыре раза меньше массы молекулы гемоглобина.) Мы предполагаем, что оксиммиоглобин (MbO_2) способен образовывать комплексы с онкобелком ($OprMbO_2$), которые десорбируются с мембраны. При этом ее проницаемость будет уменьшаться точно так же, как она уменьшается при десорбции оксигемоглобина (рис. 1).

В общих чертах, цепочка процессов такова. Переход клетки в активное состояние приводит к повышенному расходу кислорода, вследствие чего его концентрация в цитоплазме уменьшается. В результате равновесие в реакции $O_2 + Mb \rightleftharpoons MbO_2$ смещается влево, т.е. концентрация оксиммиоглобина уменьшается. Это вызывает смещение влево равновесия в реакции



В результате концентрация свободного Opr повышается, он адсорбируется на поверхности цитоплазматической мембраны и увеличивает ее проницаемость описанным выше путем.

Оценим, может ли такой механизм обеспечить наблюдаемое на опыте возрастание в 20 – 30 раз потока кислорода в клетки при переходе их в активное состояние и стабилизировать pO_2 цитоплазмы и поток в нее кислорода при изменении pO_2 межклеточной жидкости. Для этого рассмотрим, как соотносятся между собой проницаемости цитоплазматических мембран клеток тканей – потребителей кислорода и эритроцитов.

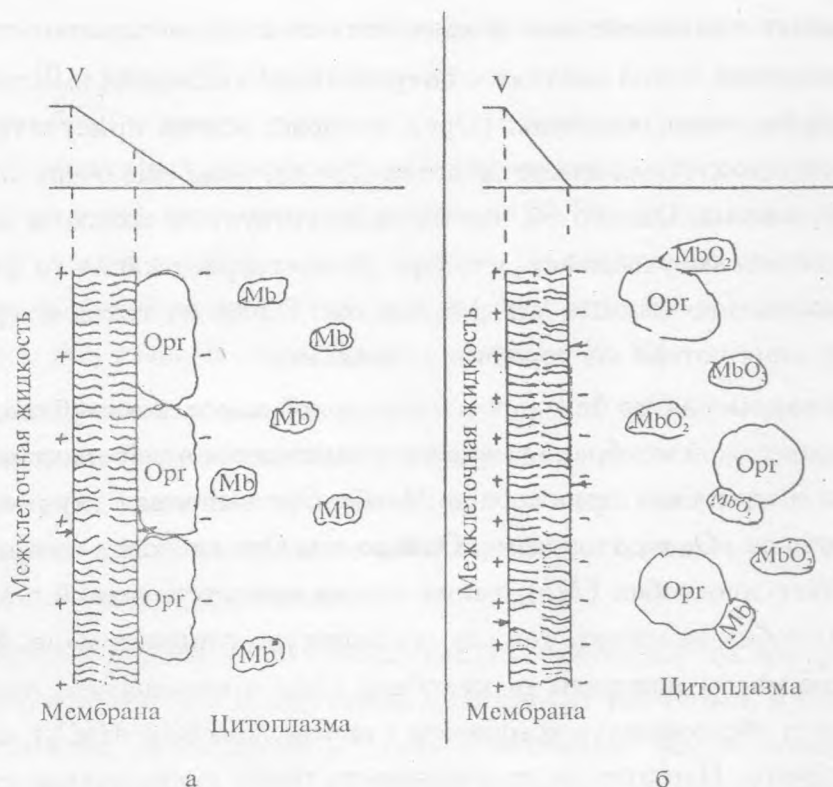


Рис. 1. Схема молекулярного механизма регуляции числа сквозных пор в липидном бислое мембраны. Внизу – участок мембраны и прилегающая к нему цитоплазма, сверху – распределение потенциала. Стрелками отмечены поры в монослоях. а) Кислорода мало. Онкобелок (Opr) адсорбировался на мембране. Оба ее монослоя в состоянии двумерного кристалла. Пора сквозная. б) Кислорода много. Онкобелок вступил в комплекс с оксимиоглобином (MbO₂), и этот комплекс (MbO₂Opr) десорбировался с мембраны. Внутренний монослой перешел в состояние двумерной жидкости. Хотя пор в нем стало больше, но ни одна из них не совпадает с порой в монослое, оставшемся в состоянии двумерного кристалла; сквозных пор нет.

Процесс насыщения эритроцита кислородом в первом приближении подчиняется экспоненциальному закону:

$$F = \sigma_{rc} S_{rc} (pO_{2alv} - pO_{2rc}) = \sigma_{rc} S_{rc} \Delta P_0 e^{-t/\tau}, \quad (2)$$

где F – поток кислорода в эритроцит, σ_{rc} и S_{rc} – удельная проницаемость для кислорода и площадь поверхности его мембраны, pO_{2alv} – парциальное давление кисло-

рода в альвеолярном газе, pO_{2rc} – напряжение кислорода в цитоплазме эритроцита, $\Delta P_0 = 60$ мм рт.ст. – разность этих величин при входе в капилляр легкого, t – текущее время от момента входа эритроцита в этот капилляр, τ – постоянная времени.

За время прохождения по капилляру легких $t_l = 0,8$ с гемоглобин эритроцита успевает почти полностью прийти в равновесие с альвеолярным газом. На выходе из легких $pO_{2alv} - pO_{2rc} \leq 1$ мм рт.ст. Из (2) следует, что $\tau \leq 0,25$ с. Это согласуется с тем, что при предельной нагрузке, когда кровоток через легкие ускоряется в три раза, pO_2 артериальной крови уменьшается на 8%, откуда получается $\tau = 0,1$ с. Для оценок возьмем среднее, положив $\tau = 0,17$ с.

Проинтегрировав (2) по времени от 0 до t_l , найдем количество кислорода Q , получаемое эритроцитом в легких:

$$Q = \sigma_{rc} S_{rc} \Delta P_0 \tau (1 - e^{-t_l/\tau}) \quad (3)$$

(так как $t_l > 4\tau$, то для дальнейших расчетов мы пренебрежем экспоненциальным членом в этой формуле).

Это количество кислорода клетки, обслуживаемые эритроцитами, получают равномерно в течение всего времени $t_c = 45$ с движения эритроцита по кругу кровообращения. Поэтому

$$Q = \sigma_{tc} S_{tc} (pO_{2icl} - pO_{2c}) t_c, \quad (4)$$

где σ_{tc} и S_{tc} – удельная проницаемость для кислорода и суммарная площадь поверхности цитоплазматических мембран тканевых клеток, приходящихся на один эритроцит, а pO_{2icl} – напряжение кислорода в межклеточной жидкости.

Приравняв друг другу правые части (3) и (4), получим: $\sigma_{rc}/\sigma_{tc} = (pO_{2icl} - pO_{2c}) t_c / \sigma_{rc} \Delta P_0$. Подставив сюда приведенные выше данные и воспользовавшись тем, что $pO_{2icl} - pO_{2c} \approx \Delta P_0$ и $S_{tc} = 7S_{rc}$, получим: $\sigma_{rc}/\sigma_{tc} \geq 2000$.

Как видно, у клеток тканей – потребителей кислорода проницаемость для кислорода их цитоплазматических мембран много меньше наибольшей проницаемости мембран эритроцитов. Но в то же время она в несколько раз больше наименьшей проницаемости мембран эритроцитов, измеренной нами *in vitro*.

Принципиальная возможность дальнейшего уменьшения проницаемости указывает, что в мембранах клеток в состоянии покоя еще имеется достаточное количество сквозных пор на границах между кристаллическими участками мембраны, так что основной поток кислорода проходит по ним, а не каким-то другим путем. В то же время ясно, что

в мембране, проницаемость которой на три с лишним порядка меньше наибольшей возможной, кристаллических участков должно быть мало. В таком случае длина общих границ между ними пропорциональна квадрату их числа. Следовательно, для 20-30-кратного увеличения проницаемости мембраны достаточно всего лишь приблизительно 5-кратного увеличения числа этих участков.

Из-за наличия у клеток трансмембранной разности потенциалов и связанного с ней электрического поля внешний монослой каждого независимого участка мембраны большую часть времени находится в состоянии двумерного кристалла, а внутренний – в состоянии двумерной жидкости. Чтобы это поле ослабло достаточно сильно, и второй монослой тоже перешел бы в состояние двумерного кристалла, на каждом независимом участке мембраны должно адсорбироваться хотя бы несколько молекул Opr , лишь тогда они займут заметную долю его поверхности. Расчет показывает, что вероятность этого пропорциональна второй – третьей степени концентрации Opr , не образовавшего комплексы с MbO_2 . Поэтому для 20-30-кратного изменения проницаемости мембраны достаточно, чтобы концентрация свободного Opr изменилась всего лишь раза в три.

Можно думать, что предложенный молекулярный механизм регуляции потока кислорода в цитоплазму клеток – потребителей кислорода принципиально может обеспечить необходимое изменение этого потока. По-видимому, принципиально возможна также и стабилизация pO_2 цитоплазмы, а также потока в нее кислорода при изменении pO_2 межклеточной жидкости. Однако очевидно, что для того и другого необходимо, чтобы концентрация MbO_2 была больше концентрации Opr . Иначе MbO_2 не хватит, чтобы оторвать почти все молекулы Opr от поверхности мембраны. Но константа диссоциации MbO_2 такова, что при значении pO_2 несколько *мм рт.ст.*, какое обычно бывает в клетках, он оксигенирован только приблизительно на 30%. К тому же, так как реакция (1) обратима, то часть MbO_2 всегда остается свободной.

Итак, для работы механизма авторегуляции потока кислорода требуется, чтобы концентрация Mb была значительно больше концентрации Opr , а константа диссоциации комплекса MbO_2Opr была достаточно малой, чтобы этих комплексов хватило для удаления с мембраны значительной доли адсорбированного на ней Opr .

В клетках здоровых тканей концентрация Opr действительно значительно меньше концентрации Mb . Так, концентрация Mb лежит в пределах от 0,4% в нервных тканях до 2,7% в мышцах, в то время как концентрация Opr настолько мала, что его присутствие обнаруживается в основном с помощью иммунологических методов. Остается выяснить, имеются ли в здоровых клетках комплексы MbO_2Opr и действительно ли они находятся

в цитоплазме, а не на мембране.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Вейсс Ч., Антони Г., Вицлеб Э., Тевс Г., Гроте И. Физиология человека. М., Мир, т. 3, 1986.
- [2] Lin S. H. J. Theor. Biol., **60**, 449 (1976).
- [3] Boag J. M. Oxygen Diffusion and Oxygen Depletion Problems in Radiobiology. Inst. of Cancer Research, Phys. Dept., Sutton, 1978.
- [4] Бураковский В. И., Бокерия Л. А. Гипербарическая оксигенация в сердечно-сосудистой хирургии. М., Медицина, 1974.
- [5] Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А., Магдон Э. Кислородный эффект и лучевая терапия опухолей. М., Медицина, 1980.
- [6] Фок М. В., Зарицкий А. Р., Зарицкая Г. А., Переведенцева Е. В. Успехи физических наук, **164**, N 3, 335 (1994).
- [7] Зарицкий А. Р., Переведенцева Е. В., Прокопенко Г. А., Фок М. В. Краткие сообщения по физике ФИАН, N 9 – 10, 24 (1994).
- [8] Gobbign R. F., Plogmakers F., Gondrie P., and Abboud R. Amer. J. Physiol., **224**, N 4, 870 (1973).
- [9] Koch C. J. Br. J. Cancer., **37**, Suppl. III, 163 (1978).
- [10] Березовский В. А. 13 Съезд Всесоюз. Физиол. об-ва им. И. П. Павлова. т. 1, Алма-Ата, 1979, с. 503.
- [11] Дыхание и спорт. Матер. XV Всесоюз. науч. конф. по спортивной медицине. М., 1971.
- [12] Коробков А. В., Башкиров А. А., Ветчинкина К. Т. Нормальная физиология. М., Высшая школа, 1980.
- [13] Киселев Л. Л. Молекулярная биология, **19**, 309 (1985).

Поступила в редакцию 11 октября 1995 г.