

УДК 577.352.4

## ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ АСПАРАГИНА

*АТАУЛЛАХАНОВ Ф. И., ВИТВИЦКИЙ В. М., ЖАБОТИНСКИЙ А. М.,  
ПИЧУГИН А. В.*

Аспарагин способен проникать в человеческие эритроциты из внешней среды. Зависимость скорости транспорта аспарагина от его концентрации может быть описана уравнением Михаэлиса—Ментен с параметрами:  $K_m = 2,50$  мМ,  $V = 0,24$  ммоль/ч на 1 л клеток. Заполнение эритроцитов аспарагиной путем обратимого осмотического лизиса не влияет на их проницаемость для аспарагина. При инкубации таких эритроцитов с аспарагином в них накапливается аспарагиновая кислота, что указывает на быструю переработку проникающего в клетки аспарагина находящейся внутри аспарагиной.

Несмотря на длительное исследование транспорта аминокислот через клеточные мембраны, транспорт аминокислот в человеческих эритроцитах остается довольно слабо изученным. В частности, в литературе отсутствуют данные о проницаемости эритроцитов человека для таких важных аминокислот, как аспарагин и глутамин. Изучение транспорта аспарагина представляет не только теоретический интерес, но имеет и практическое значение в связи с возможностью использования эритроцитов в качестве носителей аспарагиназы, применяемой при терапии лейкозов. В работах [1, 2] сообщается, что в суспензии обезьяньих и человеческих эритроцитов, заполненных аспарагиной, не удавалось зарегистрировать аспарагиназную активность. На этом основании авторы делают вывод о непроницаемости обезьяньих и человеческих эритроцитов для аспарагина, однако это утверждение носит качественный характер и не подкрепляется какими-либо количественными данными. Напротив, в эритроциты овцы аспарагин проникает, хотя и относительно медленно [3, 4]. Вообще, системы транспорта аминокислот в эритроцитах млекопитающих очень видоспецифичны [3, 5], что не позволяет использовать данные, полученные на каком-нибудь одном виде животных, для оценки параметров транспорта аминокислот в эритроцитах других видов.

Целью настоящей работы являлось выяснение способности аспарагина проникать в нативные эритроциты человека и в эритроциты, заполненные аспарагиной методом обратимого осмотического лизиса.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты выделяли из донорской крови, заготовленной с гемоконсервантом «глюцидир» и хранившейся одни сутки при 4°. Кровь центрифугировали 10 мин при 1000 g и удаляли плазму и верхний слой осевших клеток. Затем эритроциты отмывали два раза 2—3-кратным объемом физиологического раствора и один раз инкубационным раствором следующего состава: 113 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,2 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5.

При исследовании транспорта аспарагина в нативных эритроцитах их разводили до гематокрита ~10% инкубационным раствором, содержащим 5 мМ глюкозу. Суспензию разливали в тефлоновые ячейки порциями по 40 мл и инкубировали при 37° с постоянным перемешиванием. Через 30 мин инкубации в ячейки добавляли различные количества аспарагина. Определяли накопление аспарагина внутри эритроцитов в ходе инкубации. Для этого из суспензии отбирали пробы объемом 5 мл. Эритроциты в пробах осаждали центрифугированием 10 мин при 1000 g, и из надосадочного раствора отбирали пробу для определения уровня аспарагина в среде. После этого эритроциты дважды отмывали 20-кратным объемом холодного инкубационного раствора. Отмытые таким образом эритроциты, так же как и пробы из надосадочного раствора, смешивали с 2-кратным объемом 0,5 M раствора перхлорной кислоты и через 10 мин

осаждали белки центрифугированием 10 мин при 1000 g. Безбелковый перхлорный экстракт нейтрализовали насыщенным раствором карбоната калия pH 7,0 и использовали для определения концентраций аспарагина и аспарагиновой кислоты.

Для заполнения эритроцитов использовали фармацевтический препарат аспарагиназы из *E. coli*, производства Рижского завода медпрепаратов. Аспарагиназу вводили в эритроциты с помощью обратимого осмотического лизиса [6]. Для лизиса эритроцитов использовали раствор, содержащий 5 мМ глюкозу, 2 мМ  $MgCl_2$ , 1,5 мМ АТР и аспарагиназу. Для запечатывания эритроцитов использовали буферный раствор, содержащий 20 мМ фосфата натрия, pH 7,5, 310 мМ NaCl, 1 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ глюкозу, 1,5 мМ АТР. Отмытые эритроциты смешивали с 4-кратным объемом лизирующего раствора и выдерживали 1 мин при 4°. К полученному гемолизату добавляли эквивалентный объем запечатывающего раствора и смесь инкубировали 30 мин при 37°. После этого заполненные эритроциты осаждали центрифугированием 10 мин при 1000 g, надосадочный раствор удаляли, а эритроцитарную массу отмывали пять раз 3-кратным объемом инкубационного раствора.

Получаемая при центрифугировании заполненных эритроцитов эритроцитарная масса имела неоднородный состав. Поверх равномерно окрашенного слоя клеток лежал значительный слой клеток с постепенно уменьшающейся интенсивностью окраски. В ходе отмывки слой слабо окрашенных клеток удаляли. Окончательный объем эритроцитарной массы после процедуры заполнения и отмывки составлял 50—70% от исходного объема. Удельная активность аспарагиназы (в пересчете на объем клеток) в заполненных таким образом эритроцитах составляла около 40% от удельной активности аспарагиназы в лизирующем растворе.

При исследовании транспорта аспарагина в эритроцитах, заполненных аспарагиназой, их разбавляли инкубационным раствором, содержащим 10 мМ глюкозу и 1,2 мМ аспарагин, до гемотокрита около 40% и инкубировали порциями по 10 мл в тефлоновых ячейках при 37° с постоянным перемешиванием. Определяли изменения концентраций аспарагина и аспарагиновой кислоты в инкубационной среде и внутри эритроцитов. Для этого образцы суспензии объемом 1 мл центрифугировали 10 мин при 1000 g. Из надосадочного раствора и из эритроцитарной массы готовили безбелковые перхлорные экстракты. Перед приготовлением перхлорного экстракта эритроциты дважды отмывали 20-кратным объемом холодного инкубационного раствора.

Активность аспарагиназы, концентрации аспарагина и аспарагиновой кислоты определяли ферментативным методом [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В предварительных экспериментах было установлено, что при концентрациях аспарагина в среде 5—10 мМ он проникает в нативные эритроциты человека, причем скорость накопления аспарагина в эритроцитах практически не зависит от его концентрации в среде и составляет 0,1—0,2 ммоль/ч на 1 л клеток.

На рис. 1 представлены результаты эксперимента по исследованию транспорта аспарагина в нативных эритроцитах в диапазоне концентраций аспарагина 0,18—3,54 мМ. Как видно на рис. 1, при каждой концентрации аспарагина в среде он накапливается в эритроцитах практически с постоянной скоростью. В указанном диапазоне концентраций наблюдается существенный рост скорости накопления аспарагина в эритроцитах с ростом его концентрации в среде.

Концентрация аспарагина в эритроцитах в контроле при отсутствии аспарагина в среде составляла ~0,1 ммоль на 1 л клеток и не изменялась в ходе инкубации. Концентрация аспарагиновой кислоты в эритроцитах во всех случаях оставалась постоянной и была ~0,18 ммоль на 1 л клеток.

При построении в обратных координатах зависимость скорости накопления аспарагина в эритроцитах от концентрации аспарагина в среде, определяемая по данным рис. 1, хорошо аппроксимируется прямой линией (рис. 2а). Таким образом, в изученном диапазоне концентраций, процесс транспорта аспарагина из внешней среды в эритроциты может быть описан уравнением Михаэлиса—Ментен с определяемыми по рис. 2а значениями параметров:  $K_m=2,50$  мМ,  $V=0,24$  ммоль/ч на 1 л клеток (рис. 2б).

При инкубации эритроцитов, заполненных аспарагиназой, в среде, содержащей аспарагин, в них накапливается не аспарагин, а аспарагиновая кислота. Кинетика накопления аспарагиновой кислоты зависит от количества фермента, вводимого в эритроциты. Если лизирующий раствор содержит 100 и более ед. на 1 л аспарагиназы, то скорость накопления аспарагиновой кислоты в эритроцитах быстро снижается в

Рис. 1. Накопление аспарагина в нативных эритроцитах человека при инкубации в среде с различными концентрациями аспарагина: 1—0; 2—0,18 мМ; 3—0,35 мМ; 4—0,71 мМ; 5—3,54 мМ. Гематокрит—10,7%

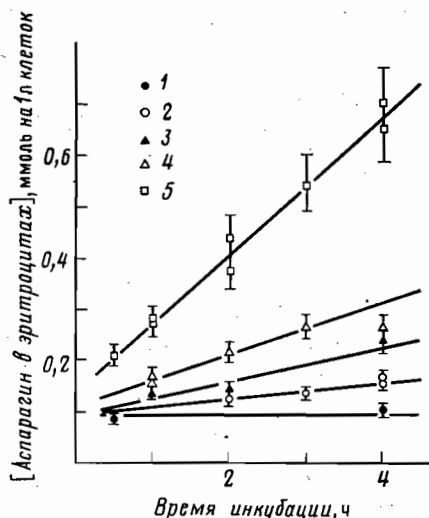


Рис. 1

Рис. 2. Зависимость скорости транспорта аспарагина в эритроциты, определяемой по наклону прямых на рис. 1, от концентрации аспарагина в среде в обратных координатах (а) и в нормальных координатах (б). Прямая на рис. 2а и гипербола на рис. 2б соответствуют уравнению Михаэлиса—Ментен с параметрами:  $K_m=2,50$  мМ,  $V=0,24$  ммоль/ч на 1 л клеток

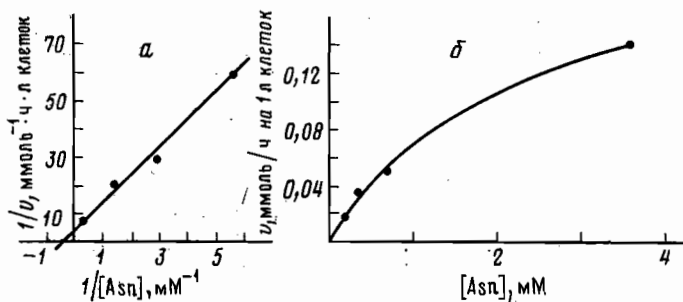


Рис. 2

ходе инкубации (рис. 3а). Одновременно наблюдается быстрое снижение концентрации аспарагина и накопление аспарагиновой кислоты в инкубационной среде (рис. 3б). Если лизирующий раствор содержит менее 10 ед. на 1 л аспарагиназы, то аспарагиновая кислота в течение опыта накапливается в эритроцитах практически с постоянной скоростью (рис. 4а), а снижение концентрации аспарагина и накопление аспарагиновой кислоты в инкубационной среде незначительны (рис. 4б).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты демонстрируют заметную проницаемость мембраны нативных человеческих эритроцитов для аспарагина. Михаэлисовский вид зависимости скорости транспорта аспарагина от его концентрации говорит о наличии в мембране эритроцитов человека транспортной системы, переносящей аспарагин внутрь клетки. Постоянство концентрации аспарагина в нативных эритроцитах, наблюдаемое при инкубации в среде, не содержащей аспарагина, указывает на отсутствие заметного транспорта аспарагина из эритроцитов наружу. По-видимому, это обусловлено несимметричным функционированием системы транспорта аспарагина относительно внутренней и внешней сторон клеточной мембраны, что характерно и для транспорта ряда других аминокислот [8, 9].

Накопление аспарагиновой кислоты, наблюдаемое в заполненных аспарагиназой эритроцитах при их инкубации с аспарагином, объясняется быстрым разрушением проникающего в клетку аспарагина. Как видно из представленных результатов, скорость накопления аспарагиновой кислоты в эритроцитах зависит от концентрации аспарагина в

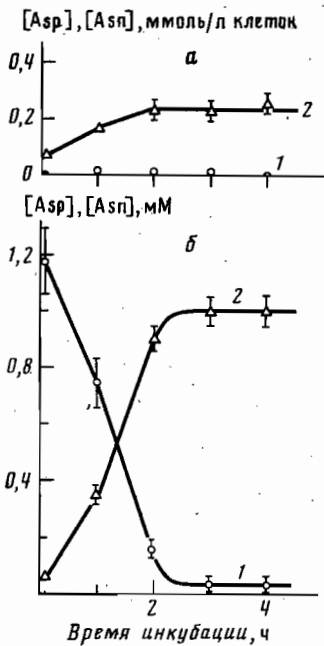


Рис. 3

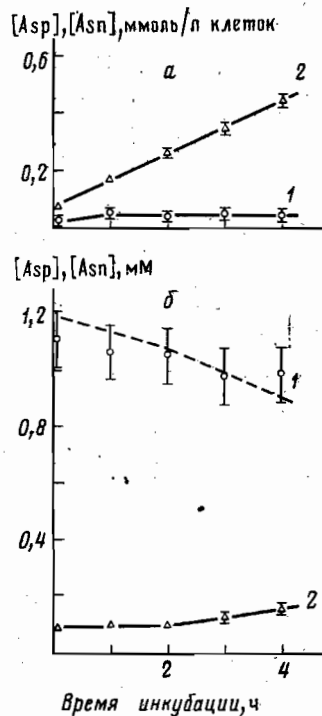


Рис. 4

Рис. 3. Изменения концентраций аспарагина и аспарагиновой кислоты в ходе инкубации в эритроцитах, содержащих высокую концентрацию аспарагиназы (а) и в инкубационной среде (б). Использованный при заполнении эритроцитов лизирующий раствор содержал 600 ед. на 1 л аспарагиназы. 1 — аспарагин, 2 — аспарагиновая кислота; гематокрит — 40%

Рис. 4. Изменения концентраций аспарагина и аспарагиновой кислоты в ходе инкубации в эритроцитах, содержащих низкую концентрацию аспарагиназы (а) и в инкубационной среде (б). Использованный при заполнении эритроцитов лизирующий раствор содержал 6,5 ед. на 1 л аспарагиназы. 1 — аспарагин, 2 — аспарагиновая кислота; гематокрит — 37%. Пунктирной линией показано изменение концентрации аспарагина в среде, вычисленное при условии постоянства суммы концентраций аспарагина и аспарагиновой кислоты в суспензии

среде. При слабо изменяющемся уровне аспарагина в среде накопление аспарагиновой кислоты в эритроцитах идет практически с постоянной скоростью (рис. 4), при значительном снижении уровня аспарагина в среде оно также снижается и прекращается при падении уровня аспарагина до нуля (рис. 3). Следовательно, скорость накопления аспарагиновой кислоты в заполненных аспарагиназой эритроцитах соответствует скорости транспорта аспарагина в них. При равенстве концентраций аспарагина в среде скорости накопления аспарагиновой кислоты в заполненных эритроцитах близки к скоростям транспорта аспарагина в нативных эритроцитах. Таким образом, можно заключить, что в заполненных аспарагиназой эритроцитах сохраняется нормальный транспорт аспарагина.

Накопление аспарагиновой кислоты в эритроцитах не связано с присутствием ее в инкубационной среде. Согласно литературным данным, аспарагиновая кислота не проникает в нативные эритроциты человека [3]. Можно было бы предположить, что процедура заполнения эритроцитов приводит к появлению неспецифической проницаемости для аспарагиновой кислоты. Очевидно, что экспериментальные данные (рис. 3 и 4) противоречат такому предположению.

Накопление аспарагиновой кислоты в среде, при инкубации эритроцитов, содержащих большое количество аспарагиназы, объясняется

действием аспарагиназы, попадающей в среду из-за разрушения части клеток. Если концентрация аспарагиназы в эритроцитах составляет 100 и более ед. на 1 л клеток, то количество фермента, высвобождающееся при разрушении нескольких процентов клеток, достаточно для быстрого перевода находящегося в инкубационной среде аспарагина в аспарагиновую кислоту.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Updike S. J., Wakamiya R. T., Lightfoot E. N.* Science, 1976, v. 193, p. 681—683.
2. *Updike S. J., Wakamiya R. T.* J. Lab. Clin. Med., 1983, v. 101, p. 679—691.
3. *Young J. D., Ellory J. C.* In: Membrane Transport in Red Cells/Eds Ellory J. C., Lev V. L. London—New York—San Francisco: Acad. Press, 1977, p. 301—325.
4. *Young J. D., Ellory J. C., Tucker E. N.* Biochem. J., 1976, v. 154, p. 43—48.
5. *Young J. D., Jones S. E. M., Ellory J. C.* Proc. Roy. Soc., London, ser. B, 1980, v. 209, p. 355—375.
6. *Ihler G. M.* Pharmacol. and Ther., 1983, v. 20, p. 151—169.
7. Methods of Enzymatic Analysis/Ed. Bergmeyer H. U. 2nd Engl. ed., v. 4, Weinheim: Chemie; New York—London: Acad. Press, 1974, p. 1696—1700.
8. *Christensen H. N.* Biological Transport, Reading: W. A. Benjamin, 1975.
9. *Al-Salech E. A., Wheeler K. P.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 684, p. 157—171.

Научно-исследовательский институт  
по биологическим испытаниям  
химических соединений,  
Купавна Московской обл.

Поступила в редакцию  
28.II.1985

#### PERMEABILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES TO ASPARAGINE

*ATAULLAKHANOV F. I., VITVITSKY V. M., ZHABOTINSKY A. M.,  
PICHUGIN A. V.*

*Institute of Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna, Moscow Region*

Asparagine is able to penetrate into human erythrocytes from the external medium. The dependence of the asparagine transport rate on its concentration can be described by the Michaelis—Menten equation with parameters:  $K_m=2.50$  mM,  $V=0.24$  mmol/l cells per hour. Loading of erythrocytes with asparaginase does not influence their permeability to asparagine. Aspartate is accumulated inside these erythrocytes during incubation with asparagine, thus reflecting rapid transformation of penetrating asparagine by entrapped asparaginase.