

УДК 577.23

ЭНЕРГОЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ И МЕТАБОЛИЗМ АДЕНИЛАТОВ
В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г.

Ф.И. АТАУЛЛАХАНОВ, В.М. ВИТВИЦКИЙ*,
С.В. КОМАРОВА, Е.В. МОШАРОВ*Гематологический научный центр РАМН, 125167 Москва;
факс: (095)214-99-48, E-mail: fazli@bioscience.msk.su*

Ключевые слова: эритроцит, АТФ, пул аденилатов, энергетический заряд, аденозин, амфотерицин В, энергетическое истощение, калий.

Амфотерицин В (1–3 мг/л) приводит к быстрому снижению концентрации АТФ в эритроцитах на 11–26% и стимулирует выход K^+ в среду, при этом пул аденилатов остается практически неизменным. Введение аденозина приводит к увеличению пула аденилатов в эритроцитах, поддерживает высокий внутриклеточный уровень АТФ в течение 6–8 ч инкубации, и уменьшает утечку K^+ , вызванную амфотерицином В. В ходе инкубации эритроцитов без глюкозы в течение 4–5 ч концентрация АТФ в них уменьшается до 20–50% от исходного значения, что сопровождается значительным падением пула аденилатов. Последующее добавление глюкозы приводит к частичному восстановлению уровня АТФ. В присутствии аденозина за счет увеличения пула аденилатов концентрация АТФ поднимается значительно выше и практически достигает исходного значения.

Концентрация АТФ в клетке определяется взаимодействием энергетического метаболизма, обеспечивающего синтез АТФ из АДФ и P_i , и метаболизма аденилатов, определяющего величину пула АТФ, АДФ и АМФ. Удобным объектом для изучения взаимодействия этих двух метаболических систем являются эритроциты человека. Единственной системой синтеза АТФ в них является гликолиз. Метаболизм аденилатов в эритроцитах человека не связан с синтезом или разрушением нуклеиновых кислот, нуклеиновые кислоты отсутствуют в эритроцитах млекопитающих, и включает синтез АМФ из аденина или аденозина и его разрушение до инозина и гипоксантина [1–5]. Взаимопревращения между АТФ, АДФ и АМФ осуществляются в аденилаткиназной реакции, катализируемой высокоактивной аденилаткиназой [6, 7]. Можно думать, что метаболизм аденилатов в эритроцитах направлен исключительно на регуляцию внутриклеточных концентраций аденилатов, и в первую очередь – АТФ, однако его роль и механизмы его регуляции в эритроцитах человека до конца не выяснены.

По данным математического моделирования [8, 9], за счет метаболизма аденилатов может обеспечиваться стабилизация энергетического заряда клетки ($([ATP] + 0,5[ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])$) при изменениях активности АТФ-потребляющих процессов. Стабилизация энергетического заряда осуществляется за счет уменьшения пула аденилатов при активации АТФ-потребляющих процессов. К сожалению, выводы модельных работ, касающиеся взаимодействия энергетического метаболизма и метаболизма аденилатов в эритроцитах, не подвергались экспериментальной проверке. Поэтому такое исследование представляет большой интерес.

*Адресат для корреспонденции и запросов отгисков.

В настоящей работе мы исследовали, какое влияние может оказывать метаболизм аденилатов на энергетическое состояние эритроцитов. В качестве субстрата для синтеза аденилатов использовали аденозин, который быстро проникает в клетку [10–12] и включается в синтез АМР в аденозинкиназной реакции [1, 12, 13]. Для изменения энергетического состояния эритроцитов использовались два вида воздействия: активация АТР-потребляющих процессов либо подавление синтеза АТР при гликолизе. Для активации потребления АТР к суспензии эритроцитов добавляли полиеновый антибиотик амфотерицин В (АМВ). В зависимости от концентрации АМВ вызывает различные эффекты в клетках, в том числе увеличение проницаемости клеточной мембраны для ионов и низкомолекулярных соединений, увеличение клеточного объема и лизис клеток [14–17]. Однако, при малых концентрациях, порядка нескольких миллиграммов на литр, его действие является достаточно специфичным и сводится к неселективному увеличению проницаемости клеточной мембраны для одновалентных катионов [16, 17]. Вызванное АМВ увеличение проницаемости мембраны для катионов нарушает ионный баланс в клетке, что в свою очередь приводит к активации транспортной Na^+/K^+ -АТРазы, снижению уровня АТР и активации гликолиза [17–20]. Подавление синтеза АТР при гликолизе осуществляли путем энергетического истощения эритроцитов в отсутствие глюкозы. Длительная инкубация эритроцитов без глюкозы приводит к снижению в них концентрации АТР и величины пула аденилатов, при этом значительно возрастают концентрации АДФ и АМР [21, 22].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для работы использовалась кровь здоровых доноров, в которую для предотвращения свертывания добавляли стандартный гемоконсервант Глюоцигр (1 мл на 4 мл крови). Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 г и удаляли плазму и верхний слой клеток, содержащий лейкоциты и тромбоциты. Оставшуюся эритроцитарную массу отмывали 2–4 раза в трехкратном объеме 0,9% раствора NaCl путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 г.

Отмытые эритроциты ресуспендировали в инкубационной среде следующего состава: NaCl – 135 мМ, KCl – 3 мМ, MgSO_4 – 1 мМ, CaCl_2 – 2 мМ, NaH_2PO_4 – 1,2 мМ, БСА – 2 г/л, Hepes – 24 мМ, pH 7,4.

В ходе экспериментов суспензия эритроцитов с гематокритом 10–20% инкубировалась в тефлоновых ячейках при 37° и постоянном перемешивании в течение 6–8 ч. Каждый опыт проводили на эритроцитах одного донора, одновременно инкубируемых в разных ячейках.

Глюкоза добавлялась к эритроцитам в виде порошка до конечной концентрации 5 мМ в начале инкубации, кроме опытов с истощением эритроцитов. Аденозин и амфотерицин В добавлялись не раньше, чем через 30–40 мин преинкубации. В опытах по истощению эритроцитов аденозина эритроцитами добавляли коформицин («Calbiochem», США) в виде водного раствора с концентрацией 1 мМ до конечной концентрации 4 мкМ [23, 24]. Так как коформицин проникает через клеточную мембрану значительно медленнее аденозина [25], коформицин добавляли за 30–40 мин до аденозина. Аденозин («Sigma», США) в суспензию эритроцитов добавляли в виде 10 мМ раствора в 0,9% NaCl, амфотерицин В («Sigma») – в виде раствора в ДМСО («Sigma») с концентрацией 0,5–2,0 г/л до конечной концентрации 1–3 мг/л суспензии.

Для определения концентраций метаболитов из суспензии эритроцитов в ходе инкубации отбирали пробы. Пробы фиксировались добавлением четырехкратного объема 0,5 М HClO_4 при перемешивании. Через 10 мин смесь центрифугировали в течение 10 мин при 1500 г. Надосадочный экстракт с помощью насыщенного раствора K_2CO_3 нейтрализовали до pH 7 и хранили в замороженном виде.

Концентрацию АТР в перхлорных экстрактах определяли модифицированным люциферин-люциферазным методом [26]. В некоторых опытах определение АТР велось сразу после отбора проб, без их фиксации. При этом пробы суспензии эритроцитов смешивали с десятикратным объемом дистиллированной воды и в течение 1–2 мин определяли концентрацию АТР в лизате [26].

Определение аденозина, инозина и гипоксантина в перхлорных экстрактах проводили с помощью ВЭЖХ на колонке размером 4,6×250 мм заполненной сорбентом Zorbax ODS («Du Pont», США), в изократическом режиме, при скорости потока 2 мл/мин. В качестве элюента использовали 0,2 М раствор фосфата калия, pH 4. Объем вводимой пробы составлял 100 мкл, время элюирования 30 мин. Выход нуклеозидов и оснований с колонки регистрировали с помощью детектора при длине волны 254 нм. Идентификацию пиков и определение концентрации компонентов смеси производили по градуировочным графикам, полученным для смесей нуклеозидов и оснований известных концентраций.

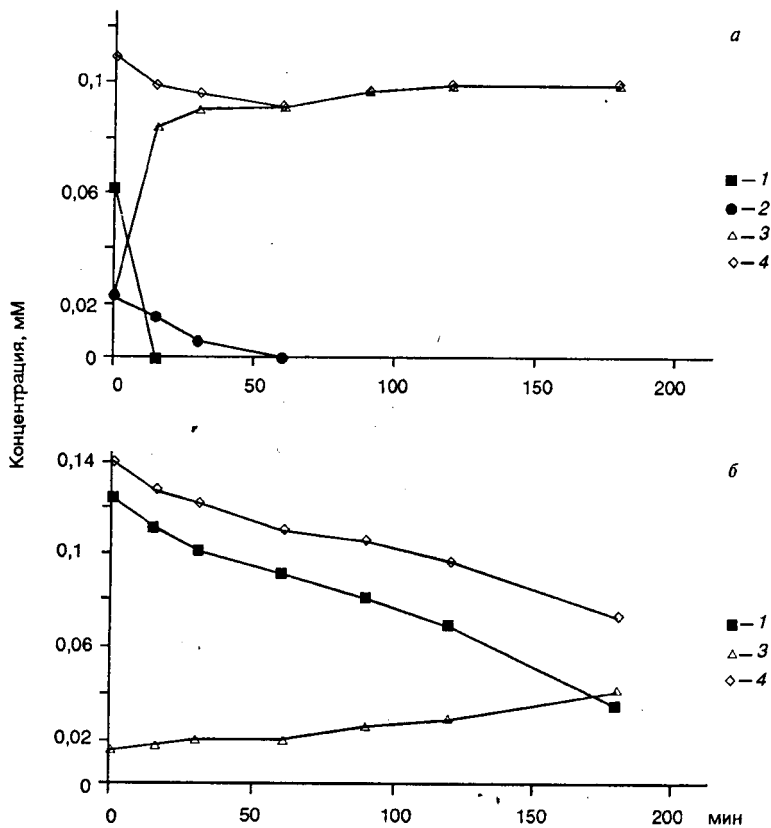


Рис. 1. Изменение концентраций аденозина, инозина и гипоксантина при добавке 0,1 мМ аденозина в суспензию нативных эритроцитов человека без коформина (а) и в присутствии 4 мкМ коформина (б): 1 – аденозин, 2 – инозин, 3 – гипоксантин, 4 – сумма концентраций аденозина, инозина и гипоксантина. Гематокрит суспензии эритроцитов 11,5%

Определение компонентов пула аденилатов проводили в перхлорных экстрактах с помощью ВЭЖХ, используя вышеописанный тип колонки. Перед началом работы на колонку наносился ион-парный реагент – додецилтриметиламмонийбромид (ДТАБ). Для этого новая колонка промывалась в течение 30 мин 0,05 М раствором фосфата калия, рН 6,0 (раствор А), при скорости потока 2 мл/мин, а затем в течение 10 ч тем же раствором, содержащим 0,5 мМ ДТАБ при скорости потока 0,2 мл/мин. Обработанная таким образом колонка приобретает свойства ионообменной и может использоваться без потери стабильности не менее двух месяцев без дополнительных обработок. Перед началом анализа колонка уравнивалась раствором А при скорости потока 2 мл/мин. Анализируемый экстракт в количестве 20–100 мкл наносился на колонку с помощью инжектора для ввода проб. Нуклеотиды с колонки элюировали при скорости потока 2 мл/мин линейным градиентом от раствора А к раствору В (0,7 М раствор фосфата калия, рН 6,0) в течение 30 мин, 100% раствором В в течение 10 мин. После этого колонка уравнивалась раствором А при потоке 2 мл/мин в течение 20 мин. Регистрация выходящих с колонки нуклеотидов осуществлялась с помощью детектора по поглощению света при длине волны 254 нм. Идентификацию пиков и определение концентрации компонентов смеси производили по градуировочным графикам, полученным для смесей нуклеотидов известных концентраций.

Для определения концентрации внеклеточного K^+ образцы суспензии центрифугировали 10 мин при 1500 г и надосадочную жидкость анализировали на пламенном фотометре. Если измерение проводилось не сразу, то надосадочную жидкость замораживали.

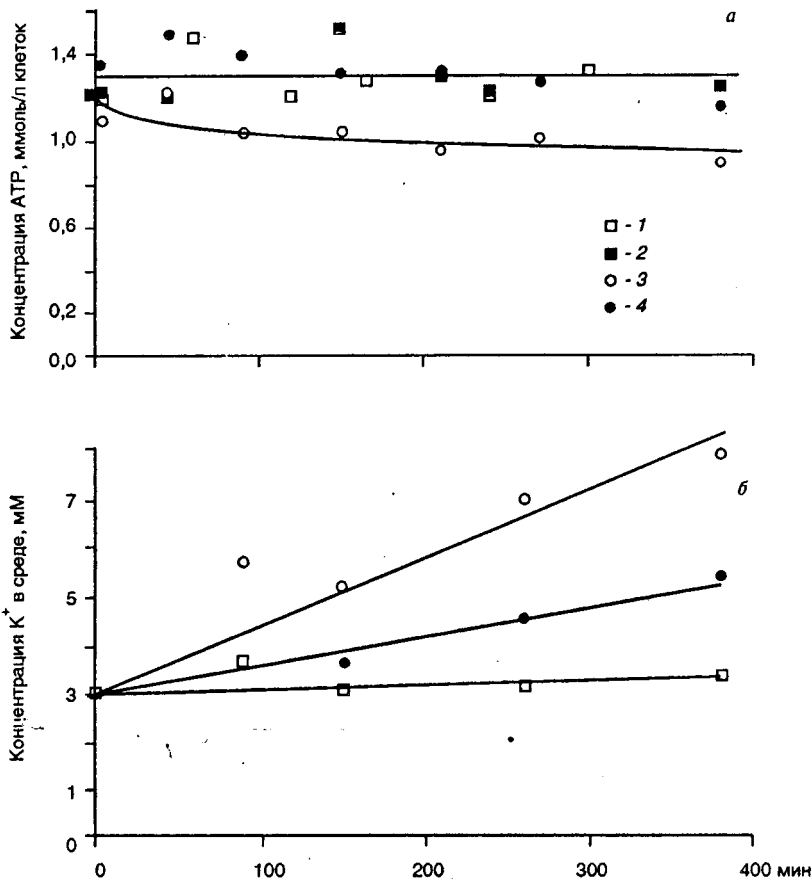


Рис. 2. Влияние аденозина на уровень АТР (а) и выход K^+ из эритроцитов (б) в присутствии амфотерицина В: 1 - контроль; 2 - 0,8 мМ аденозин; 3 - 3 мг/л амфотерицин В; 4 - 3 мг/л амфотерицин В и 0,8 мМ аденозин. Гематокрит суспензии эритроцитов 15,9%

Гемолиз определяли спектрофотометрически по выходу гемоглобина из эритроцитов в среду. Относительную концентрацию гемоглобина в инкубационной среде определяли как отношение оптических плотностей инкубационной среды и водного лизата суспензии при длине волны 415 нм при одинаковом разбавлении.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние аденозина на пул аденилатов и уровень АТР в интактных эритроцитах. При добавлении к суспензии эритроцитов аденозина наблюдается его быстрое дезаминирование с образованием инозина и далее гипоксантина [1, 12]. При концентрациях аденозина меньше 1 мМ его уровень в суспензии удастся поддержать в течение длительного времени только в присутствии ингибитора аденозиндезаминазы коформидина. При этом в ходе инкубации наблюдается снижение концентрации аденозина в суспензии с постоянной скоростью около 0,2–0,3 ммоль/л клеток за 1 ч. Скорость накопления гипоксантина существенно меньше, инозин в суспензии не регистри-

Влияние аденозина на содержание АТР в интактных эритроцитах и в эритроцитах, обработанных амфотерицином В

Концентрация аденозина составляла: в опыте 5 – 0,8 мМ, в остальных опытах – 0,3 мМ. Концентрация амфотерицина В: в опытах 1, 2, 3, 5 – 3 мг/л, в опыте 4 – 1 мг/л. В таблице приведены средние значения и стандартные квадратичные отклонения. В скобках приведено число измерений

№ опыта	Стационарная концентрация АТР, ммоль/л клеток			
	Контроль	В присутствии аденозина	В присутствии амфотерицина В	В присутствии аденозина и амфотерицина В
1	1,7 ± 0,1 (5)	1,9 ± 0,2** (5)	1,51 ± 0,08* (4)	1,86 ± 0,08* (5)
2	1,5 ± 0,2 (6)	1,7 ± 0,1** (5)	1,15 ± 0,05* (6)	1,7 ± 0,2 (5)
3	1,4 ± 0,1 (4)	1,47 ± 0,08 (4)	1,04 ± 0,05* (4)	1,24 ± 0,07* (4)
4	1,37 ± 0,07 (6)	1,5 ± 0,2 (6)	1,2 ± 0,1* (6)	1,3 ± 0,1 (6)
5	1,2 ± 0,1 (7)	1,3 ± 0,1 (5)	1,0 ± 0,1* (7)	1,3 ± 0,1 (7)

* Данные отличаются от контроля с вероятностью погрешности $\alpha < 0,05$.

** Данные отличаются от контроля с вероятностью погрешности $\alpha < 0,1$. Остальные данные достоверно от контроля не отличаются ($\alpha > 0,1$).

Таблица 2

Влияние аденозина на пул аденилатов в интактных эритроцитах и в эритроцитах, обработанных амфотерицином В

Приведены начальные (нач.) и конечные (кон.) уровни пула аденилатов в ходе инкубаций. Ошибка определения определялась погрешностью измерения концентраций компонентов пула аденилатов и составляла около 10%. Номера опытов в табл. 2 соответствуют номерам опытов в табл. 1

№ опыта	Время инкубации, ч	Пул аденилатов, ммоль/л клеток							
		Контроль		В присутствии аденозина		В присутствии амфотерицина В		В присутствии аденозина и амфотерицина В	
		нач.	кон.	нач.	кон.	нач.	кон.	нач.	кон.
1	7	2,45	2,25	2,45	3,50	2,45	2,30	2,45	3,10
2	8	1,90	2,10	2,00	3,25	1,90	2,10	1,80	2,60
3	5,5	2,00	1,70	2,20	2,75	2,10	1,60	1,85	2,45
4	5	–	–	1,85	2,40	1,85	1,85	1,85	2,35

рутся (рис. 1). Наблюдаемое в присутствии коформина падение концентрации аденозина сопровождается незначительным ростом концентрации АТР (табл. 1, рис. 2,а) и увеличением пула аденилатов в эритроцитах (табл. 2).

Влияние аденозина на пул аденилатов и уровень АТР в эритроцитах, обработанных амфотерицином В. В ходе предварительных экспериментов было показано, что в пределах 1–3 мг/л АМВ стимулирует выход K^+ из эритроцитов и приводит к снижению в них концентрации АТР (рис. 2, табл. 1). При этом объем эритроцитов в ходе нескольких часов инкубации практически не изменяется, гемолиз составляет менее 1%. Повышенный выход K^+ из эритроцитов и сниженный уровень АТР сохранялись в течение нескольких часов инкубации, при этом пул аденилатов оставался практически неизменным. Введение аденозина приводит к компенсации вызванного АМВ снижения уровня АТР в эритроцитах (рис. 2, табл. 1). Эта компенсация обеспечивается за счет роста пула аденилатов (табл. 2). Скорость потребления аденозина в суспензии эритроцитов, обработанных АМВ, практически не отли-

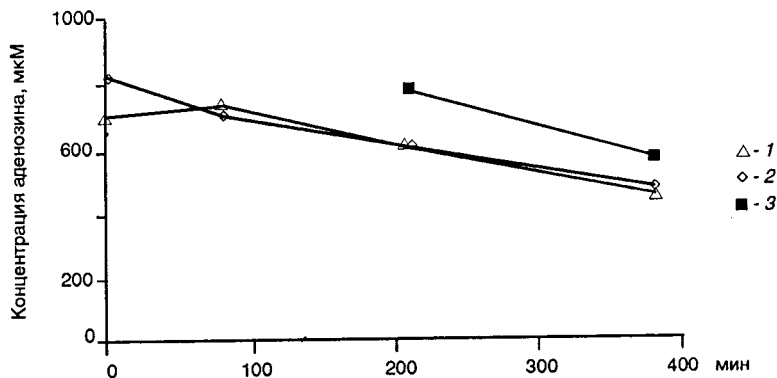


Рис. 3. Изменение концентрации аденозина в присутствии коформицина в суспензии интактных эритроцитов (1), эритроцитов, обработанных амфотерицином В (2), и энергетически истощенных эритроцитов (3). Исходная концентрация аденозина во всех экспериментах 0,8 мМ. Концентрация амфотерицина В – 3 мг/л

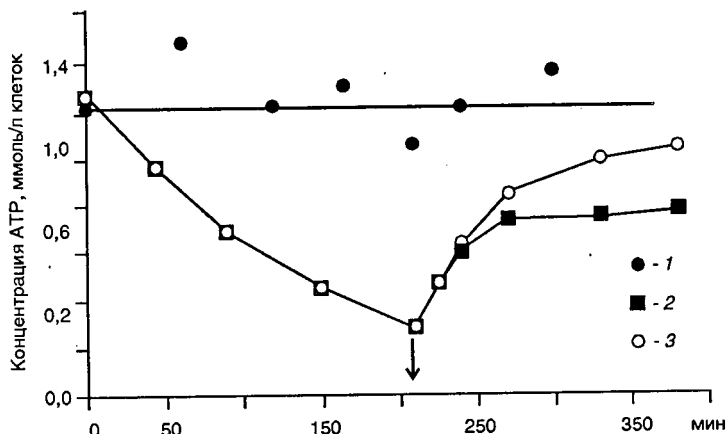


Рис. 4. Влияние глюкозы и аденозина на содержание АТФ в энергетически истощенных эритроцитах: 1 – контроль; 2, 3 – преинкубированные без глюкозы эритроциты; в момент, отмеченный стрелкой, были добавлены соответственно глюкоза и глюкоза с аденозином (0,8 мМ). Гематокрит суспензии эритроцитов 15,9%

чается от скорости его потребления нативными эритроцитами (рис. 3). Это связано с одинаковым увеличением пула аденилатов в обоих случаях (табл. 2).

В присутствии аденозина наблюдается снижение вызванного АМВ потока K^+ из эритроцитов (рис. 2, б).

Влияние аденозина и амфотерицина В на энергетический заряд эритроцитов. В контрольных эритроцитах энергетический заряд остается неизменным в течение эксперимента. Добавление как АМВ, так и аденозина приводит к снижению энергетического заряда. Комбинация АМВ и аденозина оказывает аддитивное влияние на энергетический заряд (табл. 3).

Влияние аденозина на содержание АТФ и пул аденилатов в энергетически истощенных эритроцитах. В ходе инкубации эритроцитов без глюкозы в течение 4–5 ч концентрация АТФ в них уменьшается до 20–50% от исходного

Влияние аденозина и амфотерицина В на энергетический заряд эритроцитов

Приведены средние значения и стандартные квадратичные отклонения по результатам опытов, представленных в табл. 2, включая не только начальные и конечные, но и промежуточные значения. В скобках приведено количество измерений

Условия	Энергетический заряд	Данные отличаются от контроля с вероятностью погрешности
Контроль	$0,86 \pm 0,05$ (n = 13)	
В присутствии аденозина	$0,82 \pm 0,06$ (n = 18)	< 0,1
В присутствии амфотерицина В	$0,78 \pm 0,04$ (n = 11)	< 0,001
В присутствии аденозина и амфотерицина В	$0,76 \pm 0,05$ (n = 12)	< 0,001

Таблица 4

Влияние аденозина на пул аденилатов (а) и энергетический заряд (φ) после добавления глюкозы к истощенным эритроцитам

Ошибка определения пула аденилатов составляла около 10%

Контроль	Уровень в момент добавки глюкозы	Конечный уровень после добавки глюкозы без аденозина	Конечный уровень после добавки глюкозы с аденозином
а	2,35	1,85	1,97
φ	0,90	0,61	0,88
а	2,45	1,75	2,10
φ	0,78	0,58	0,84
а	1,90	1,23	1,83
φ	0,89	0,59	0,90

значения, а энергетический заряд падает на 30–35%. Добавление глюкозы приводит к частичному восстановлению уровня АТФ за 2–3 ч. В присутствии аденозина концентрация АТФ поднимается значительно выше, чем без него и практически достигает исходного значения (рис. 4). Добавление коформицина к истощенным эритроцитам не влияет на восстановление в них уровня АТФ. После добавления глюкозы уровень АТФ в истощенных эритроцитах с коформицином и без него поднимается до одного и того же значения, меньшего, чем уровень, достигаемый в присутствии аденозина. Результаты экспериментов по влиянию аденозина на пул аденилатов в истощенных эритроцитах сведены в табл. 4. В присутствии аденозина пул аденилатов в истощенных эритроцитах растет так же, как в интактных эритроцитах и эритроцитах, обработанных АМВ. Восстановление уровня АТФ в истощенных эритроцитах сопряжено с быстрым восстановлением нормального значения энергетического заряда (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что интактные эритроциты поддерживают практически постоянные значения концентрации АТФ и пула аденилатов в течение нескольких часов инкубации *in vitro*. При воздействии АМВ в эритроцитах наблюдается снижение энергетического заряда и уровня АТФ, что объясняется активацией транспортных АТФаз в результате ионного дисбаланса, вызываемого в клетках АМВ [17–20]. Однако пул аденилатов

при этом также остается практически неизменным. Снижение концентрации АТР и энергетического заряда более выражено при энергетическом истощении эритроцитов и сопряжено со значительным уменьшением пула аденилатов. Это может говорить либо о том, что для уменьшения пула аденилатов необходимо значительное снижение уровня АТР, либо о том, что скорость уменьшения пула аденилатов регулируется какими-то факторами, которые изменяются по-разному при активации АТР-потребляющих процессов и при энергетическом истощении эритроцитов.

Добавление аденозина обеспечивает рост пула аденилатов как в интактных эритроцитах, так и в эритроцитах с активированным потреблением АТР, а также в энергетически истощенных клетках. Рост пула аденилатов, по-видимому, происходит за счет включения аденозина в аденозинкиназную реакцию. Пул аденилатов растет с практически одинаковой скоростью во всех исследованных случаях, однако достоверный рост концентрации АТР в присутствии аденозина наблюдается только в эритроцитах, энергетический метаболизм которых подвергался различным воздействиям. Но даже в таких эритроцитах не наблюдается рост концентрации АТР, превышающий контрольный уровень.

Полученные результаты противоречат предсказаниям математических моделей энергетического метаболизма и метаболизма аденилатов [8, 9] о том, что пул аденилатов должен падать с ростом скорости потребления АТР. Экспериментально в этих условиях наблюдается рост пула аденилатов, и это требует пересмотра модельных представлений о системе метаболизма аденилатов.

Рост пула аденилатов при увеличении нагрузки на транспортные АТРазы позволяет эритроцитам поддерживать более высокий, близкий к нормальному, уровень АТР. Мы полагаем, что увеличение концентрации АТР в присутствии аденозина приводит к дополнительной активации ионного транспорта Na^+/K^+ -АТРазой и, как следствие, к наблюдаемому снижению потока K^+ из эритроцитов, вызванного воздействием АМВ. Таким образом, метаболизм аденилатов может играть определенную роль в регуляции АТР-зависимых процессов, в частности, ионных насосов. Надо отметить, что наши результаты не исключают возможности прямого влияния аденозина на ионный транспорт, однако такое влияние представляется маловероятным.

В присутствии аденозина заметно снижается энергетический заряд эритроцитов. Скорее всего, это связано с тем, что потребление АТР на синтез адениннуклеотидов из аденозина само по себе создает значительную нагрузку на энергетический метаболизм эритроцитов. На основании этого можно предположить, что относительно низкие скорости обмена аденилатов в эритроцитах в норме [21, 22, 28, 29] обусловлены допустимым уровнем нагрузки, которую метаболизм аденилатов может оказывать на энергетический метаболизм.

Работа была выполнена при поддержке Московского комитета по науке и технологиям, договор ГН-18/94.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dean, B.M., and Perrett, D. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **437**, 1-15.
2. Paglia, D.E., Valentine, W.N., Nakatani, M., and Brockway, R.A. (1986) *Blood*, **67**, 988-992.
3. Rapoport, I., Rapoport, S.M., Maretzki, D., and Elsner, R. (1979) *Acta Biol. Med. Germ.*, **49**, 11-16.
4. Van den Berghe, G., and Bontemps, F. (1990) *Biomed. Bioch. Acta*, **49**, 117-122.
5. Smolenski, R.T., Fabianovska-Majewska, K., Montero, G., Duley, J.A., Fairbairn, L.D., Marlewski, M., and Simmonds, H.A. (1992) *Bioch. Pharmacol.*, **43**, 2053-2057.
6. Mansell, M.A., Allsop, J., North, M.E., Simmonds, R.J., Harkness, R.A., and Watts, R.W.E. (1981) *Clin. Sci. Mol. Med.*, **61**, 757-764.
7. Mohrenweiser, H.W., Fieck, S., and Wursinger, K.H. (1981) *Amer. J. Hematol.*, **11**, 125-136.
8. Joshi, A., and Palsson, B.O. (1990) *J. Theor. Biol.*, **142**, 515-545.
9. Schauer, M., Henrich, R., and Rapoport, S.M. (1981) *Acta Biol. Med. Germ.*, **40**, 1659-1682.

10. Muller, M.M., Kuzmits, R., Frass, M., and Mamoli, B. (1980) *J. Neurol.*, **223**, 59-66.
11. Moser, G.H., Schrader, J., and Densen, A. (1989) *Amer. J. Physiol.*, **256**, c799-c806.
12. Plagemann, P.J.W. (1986) *J. Cell. Physiol.*, **128**, 491-500.
13. Meyskens, F.L., and Williams, H.E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 170-179.
14. Hamilton-Miller, J.M.T. (1974) *Adv. Appl. Microbiol.*, **17**, 109-115.
15. Эл-Суфи С.А.Ф., Сабиров Р.З., Красильников О.В. (1991) *Докл. АН СССР*, **317**, 480-481.
16. DeKruiff, V., Gerritsen, W.J., Oerlemans, A., Demel, R.A., and Van Deenen, L.L.M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 30-36.
17. Brajburg, J. (1985) *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **27**, 172-176.
18. Blum, S.F., Shohet, S.B., Nathan, D.C., and Gardner, F.H. (1969) *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 980-983.
19. Segel, G.B., Feig, S.A., Glader, B.E., Muller, A., Dutcher, P., and Nathan, D.B. (1975) *Blood*, **46**, 271-278.
20. Halperin, J.A., Brugnara, C., Kopin, A.S., Ingwall, J., Tosteson, D.C. (1987) *J. Clin. Invest.*, **80**, 128-137.
21. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., Пичугин А.В., Помазанов В.В., Титкова Н.Ф. (1984) *Биохимия*, **49**, 104-110.
22. Rapoport, I., Berger, H., Elsner, R., and Rapoport, S.M. (1977) *Europ. J. Biochem.*, **73**, 421-427.
23. Rapoport, I., Rapoport, S.M., and Gerber, G. (1987) *Biomed. Bioch. Acta*, **46**, 317-329.
24. Henderson, J.F., Brox, L., Zombor, G., Hunting, D., and Lomax, C.A. (1977) *Bioch. Pharmacol.*, **26**, 1967-1972.
25. Rogler-Brown, T., and Parks, R.E. (1980) *Bioch. Pharmac.*, **29**, 2491-2497.
26. Атауллаханов Ф.И., Пичугин А.В. (1981) *Биофизика*, **26**, 86-88.
27. Бронштейн И.Н., Семдяев К.А. (1986) *Справочник по математике*. Наука, Москва.
28. Bishop, C. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 1778-1779.
29. Lalanne, M., and Willemot, J. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.*, **66B**, 367-372.

Поступила в редакцию
12.04.95
После доработки
04.10.95

ENERGY-DEPENDENT PROCESSES AND ADENYLATE METABOLISM IN HUMAN ERYTHROCYTES

F.I. Ataulkhanov, V.M. Vitvitsky, S.V. Komarova, E.V. Mosharov

*Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences, 125167 Moscow:
fax: (095)214-99-48, E-mail: fazli@bioscience.msk.su*

Key words: erythrocyte, ATP, adenylyte pool, energy charge, adenosine, amphotericin B, energy depletion, potassium.

Amphotericin B (1-3 mg/l) decreases the ATP content in erythrocytes by 11-26% and stimulates the K⁺ efflux but has no effect on the adenylyte pool. Adenosine added to the erythrocyte suspension increases the adenylyte pool, maintains a high intracellular ATP level for 6-8 hours of incubation at 37°C and diminishes the amphotericin B-induced leakage of K⁺. Incubation of erythrocytes without glucose for 4-5 hours leads to a 20-50% loss of ATP accompanied by a significant reduction of the adenylyte pool. Further addition of glucose partly restores the ATP level. In the presence of adenosine the ATP concentration is restored far more pronounced reaching nearly the original level due to the increase of the adenylyte pool.