



УДК 57.053.2:577.352.4

© 1993 г.

**РЕГУЛЯЦИЯ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА.
РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ, АКТИВИРУЕМЫХ КАЛЬЦИЕМ****Атауллаханов Ф.И., Княткин А.Б.,
Витвицкий В.М., Пичугин А.В.***Гематологический научный центр РАМН, Москва;
Институт иммунологии МЗ РФ, Москва*

С помощью математической модели рассмотрена роль кальция в регуляции объема эритроцитов млекопитающих. Показано, что влияние Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов на стабилизацию объема эритроцитов очень велико. Функционирование этих каналов может обеспечить увеличение коэффициента стабилизации объема в 5–10 раз. Для обоснования и оценки величины этого вклада необходимо выявить отношение максимальной проницаемости K^+ -каналов к константе связывания этих каналов с кальцием. Предложена постановка эксперимента, позволяющая измерить это отношение на интактных эритроцитах.

Исследованиям регуляции ионного гомеостаза и объема в эритроцитах посвящено множество работ [1–7]. Существует ряд работ, в которых анализируются математические модели этой регуляции [1, 5, 8, 9]. Основным критерием для оценки эффективности работы любого стабилизатора является величина коэффициента стабилизации. Для объема эритроцитов это отношение приращения объема к изменению проницаемости мембраны для ионов (при небольших изменениях). Как показывает анализ таких моделей, функционирование Na^+ , K^+ -насоса приводит к стабилизации объема эритроцита. Однако коэффициент стабилизации в моделях оказывается примерно в 10 раз меньше, чем в эксперименте [10].

Практически все модели ионного гомеостаза основаны на одинаковых постулатах и системах уравнений, наиболее последовательно описанных в работе Джекобсона [8]. Ни одна из этих моделей не включает в рассмотрение кальциевую регуляцию, несмотря на то, что влияние кальция на потоки калия в эритроцитах очень велико и впервые описано давно [11].

В данной работе с помощью математической модели исследуется роль кальциевого гомеостаза в регуляции объема эритроцитов.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Модель описывается системой из шести уравнений, включающей три нелинейных дифференциальных и три алгебраических:

$$\frac{d\left(X_1 \frac{V}{V_0}\right)}{dt} = KU_1 + G_1 \frac{\Delta\phi - \frac{F}{RT} \left(X_{1e} - X_1 \exp\left(\Delta\phi \frac{F}{RT}\right) \right)}{\exp\left(\Delta\phi \frac{F}{RT}\right) - 1}; \quad (1)$$

$$\frac{d\left(X_2 \frac{V}{V_0}\right)}{dt} = -NU_1 + G_2 \frac{\Delta\varphi \frac{F}{RT} \left(X_{2e} - X_2 \exp\left(\Delta\varphi \frac{F}{RT}\right)\right)}{\exp\left(\Delta\varphi \frac{F}{RT}\right) - 1}; \quad (2)$$

$$\frac{d\left(X_3 \frac{V}{V_0}\right)}{dt} = -U + G_3 \frac{2\Delta\varphi \frac{F}{RT} \left(X_{3e} - X_3 \exp\left(2\Delta\varphi \frac{F}{RT}\right)\right)}{\exp\left(\Delta\varphi \frac{F}{RT}\right) - 1}; \quad (3)$$

$$X_1 + X_2 - X_4 - Mw = 0; \quad (4)$$

$$X_1 + X_2 + X_4 + w = X_{1e} + X_{2e} + X_{4e} + r = 2L; \quad (5)$$

$$X_4 = X_{4e} \exp\left(\Delta\varphi \frac{F}{RT}\right); \quad (6)$$

где $G_1 = G_1(X_3) = p_1 S/V_0$, $G_2 = p_2 S/V_0$, $G_3 = p_3 S/V_0$; S – площадь поверхности мембраны; X_1, X_2, X_3, X_4 – внутриклеточные и $X_{1e}, X_{2e}, X_{3e}, X_{4e}$ – внеклеточные концентрации ионов калия, натрия, кальция и проникающих анионов (хлора и HCO_3^-) соответственно; V, V_0 – текущий и физиологический объем клетки; $\Delta\varphi$ – трансмембранная разность потенциалов; $p_1 = p_1(X_3)$, p_2, p_3 – проницаемость мембраны для ионов калия, натрия и кальция соответственно; p_{10}, p_{20}, p_{30} – соответствующие проницаемости в физиологическом состоянии; K, N – число переносимых Na^+ , K^+ -АТФ-азой ионов калия и натрия при гидролизе одной молекулы АТФ; w – внутриклеточное количество непроникающих через мембрану молекул; M – средний заряд непроникающих молекул; U_1 – скорость работы Na^+ , K^+ -АТФ-азы; U_2 – скорость работы Ca^{2+} -АТФ-азы; $2L$ – суммарная концентрация осмотически активных веществ в среде; r – внеклеточная концентрация непроникающих через мембрану молекул.

Дифференциальные уравнения (1, 2) описывают изменение внутриклеточных концентраций ионов калия и натрия за счет пассивной утечки катионов по градиентам концентраций в соответствии с приближением Гольдмана [12], а также за счет активного транспорта катионов с помощью Na^+ , K^+ -АТФ-азы (U_1). АТФ-аза при расщеплении одной молекулы АТФ переносит N ионов натрия наружу в обмен на K ионов калия.

Дифференциальное уравнение (3) описывает поведение внутриклеточной концентрации кальция и содержит члены, аналогичные членам уравнения (1).

Алгебраические уравнения описывают условие электронейтральности внутриклеточной среды (4), причем положительные значения M соответствуют отрицательному среднему заряду непроникающих молекул, условие осмотического баланса между внутри- и внеклеточной средой (5), а также условие доннановского равновесия для анионов (6), в предположении, что мембрана для них свободно проницаема.

В уравнения (4, 5) не включена концентрация кальция, поскольку она не превышает долей процента от суммы концентраций ионов как внутри клетки, так и снаружи. Этот факт сильно упрощает модель, поскольку кальций при этом влияет только на проницаемость мембраны для калия.

Для исследования модели необходимо выбрать значения параметров и задать

явный вид функций, описывающих зависимости от концентраций скоростей Na^+ , K^+ -АТФ-азы (U_1), Ca^{2+} -АТФ-азы (U_2) и проницаемости мембраны для калия ($G_1 = G_1(X_3)$).

Полагая, что осмотичность среды определяется только внеклеточными концентрациями проникающих ионов (т.е. $r = 0$), зная при физиологических условиях внеклеточные концентрации ионов ($X_{1e} = 5$, $X_{2e} = 145$, $X_{4e} = 160$ мМ) [1, 13, 14], внутриклеточные концентрации ($X_1 = 110$, $X_2 = 10$, $X_4 = 110$ мМ) [1, 13, 14], а также скорость работы Na^+ , K^+ -АТФ-азы при физиологических условиях ($U_{10} = 2,1 \cdot 10^{-4}$ мМ/с, $K = 2$, $N = 3$) [9], можно рассчитать (из уравнений (1), (2), (4)–(6) в стационарном состоянии) значения параметров $w = 70$ мМ, $M = 0,143$, $G_{10} = 5,1 \cdot 10^{-6}$, $G_{20} = 4,2 \cdot 10^{-6}$ с $^{-1}$. Эти величины не зависят от параметров кальциевой регуляции.

Сравнение параметров M , w , G_{10} , G_{20} с литературными данными [1, 2, 9], показывает, что рассчитанные значения лежат в пределах существующего экспериментального разброса.

Среди параметров, определяющих кальциевую гомеостаз, экспериментально достаточно надежно, на наш взгляд, определены только вне и внутриклеточные концентрации кальция ($X_{3e} = 1,0$, $X_{30} = 0,93 \cdot 10^{-4}$ мМ) максимальная активность Ca^{2+} -АТФ-азы ($U_{2\text{max}} = 2,8 \cdot 10^{-3}$ мМ/с) [15, 16] и максимальная проницаемость мембраны для калия $G_{1\text{max}}(X_3) = 2,6 \cdot 10^{-3}$ с $^{-1}$.

Значения остальных параметров и вид функций, определяющих скорости работы АТФ-аз и калиевую проницаемость, подлежат исследованию и будут рассматриваться ниже.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамический анализ модели. Динамика модели была исследована при следующих предположениях.

1. Скорость Na^+ , K^+ -АТФ-азы является монотонно растущей функцией внутриклеточных концентраций натрия и АТФ. От других переменных скорость не зависит. Мы будем рассматривать только те ситуации, когда внеклеточная концентрация калия постоянна. Ее влияние на скорость работы этой АТФ-азы включено в активность АТФ-азы.

2. Скорость Ca^{2+} -АТФ-азы является монотонно растущей функцией внутриклеточной концентрации кальция [17–19].

3. Проницаемость мембраны эритроцита для калия является монотонно растущей функцией концентрации внутриклеточного кальция.

Анализ модели показал, что в диапазоне допустимых значений объема система имеет единственное стационарное состояние – устойчивый узел. Динамика модели характеризуется тремя масштабами времени. С характерными временами порядка секунд изменяется самая быстрая переменная – внутриклеточная концентрация кальция. В 1000 раз медленнее изменяется концентрация натрия: характерные времена – десятки минут. И еще на два порядка величины больше характерные времена изменения объема эритроцита (десятки часов).

При изменении параметров модели потеря устойчивости обычно происходит единственным образом: пассивные потоки превосходят максимальные скорости откачки ионов насосами, градиенты выравниваются и объем растет до бесконечности.

Влияние калиевых каналов, активируемых кальцием, на стабилизацию объема. Возникновение двухградиентной системы осморегуляции приводит к новому способу управления объемом клетки. Появляется высокая концентрация калия, градиент которого направлен из клетки наружу. Если в ответ на внешнее

воздействие, увеличивающее объем, в мембране эритроцита создать селективную калиевую проводимость, из клетки наружу устремится поток калия и проникающих анионов. Это приведет к уменьшению объема. Природа, видимо, активно использует такую регуляцию.

В различных клетках, помимо неселективной для катионов проницаемости мембраны (при этом проницаемости для ионов натрия и калия меняются синхронно), обусловленной "дефектами" в мембране [5, 20], описано несколько механизмов, изменяющих проницаемость мембраны селективно. Это различные транспортные (за счет градиента концентраций, без затраты энергии гидролиза АТФ) системы. Например, хлорид-зависимая Na^+ , K^+ -котранспортная система, хлорид-зависимая K^+ -транспортная система и др. [21, 22]).

В зрелых эритроцитах млекопитающих единственным устройством, создающим селективную проницаемость мембраны, являются Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы. Вытекание калия из эритроцитов при увеличении внутриклеточной концентрации кальция было описано в 1958 г. [11]. С тех пор детально изучена структура и функционирование ответственных за это каналов [15, 17, 23, 24], однако физиологическая роль этой системы не ясна.

Рассмотрим, как влияют на регуляцию объема Ca^{2+} -зависимые каналы. В уравнения (1)–(6) необходимо ввести вид функций, описывающих зависимость от концентрации кальция проницаемости мембраны для калия и зависимости скоростей Na^+ , K^+ - и Ca^{2+} -АТФ-аз от кальция и других переменных.

Проницаемость мембраны для калия можно представить в виде:

$$G_1 = G_{10} + G'_{10} + g_1(X_3), \quad (7)$$

где $G_{10} + G'_{10}$ – физиологическое значение калиевой проницаемости, состоящей из Ca^{2+} -независимой утечки, обусловленной "дефектами" в мембране, – G_{10} , а также из утечки через K^+ -каналы – G'_{10} , соответствующей физиологической концентрации Ca^{2+} . Кальциевая активация K^+ -каналов описывается функцией $g_1(X_3)$. В соответствии с результатами работ [17, 23] эту функцию можно представить в следующем виде:

$$g_1(X_3) = (G_{1\text{max}} \cdot X_3) / (X_3 + k_1), \quad (8)$$

где $G_{1\text{max}}$ – максимальная проницаемость K^+ -каналов, k_1 – константа диссоциации ионов Ca^{2+} с этими каналами.

Для рассмотрения влияния неселективных изменений проницаемости мембраны на изменения объема, к проницаностям G_1 , G_2 и G_3 необходимо прибавить одну и ту же величину gG_{20} . Ее удобно ввести так, чтобы приращение проницаемости измерялось в единицах физиологически нормальной проницаемости какого-нибудь катиона, например натрия. Так, $g = 1$ означает, что проницаемость мембраны возросла вдвое.

Предположим, что скорость работы Na^+ , K^+ -АТФ-азы линейно зависит от внутриклеточной концентрации ионов натрия и АТФ:

$$U_1 = \alpha_1 [\text{ATP}] X_2 \cdot V_0 / V, \quad (9)$$

где α_1 – активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы, $[\text{ATP}]$ – концентрация АТФ.

Согласно [23], скорость откачки ионов кальция из клетки Ca^{2+} -АТФ-азой можно описать формулой:

$$U_2 = \alpha_2 X_3 / (X_3 + k_2)^h, \quad (10)$$

где k_2 – константа диссоциации ионов Ca^{2+} с местом их связывания на

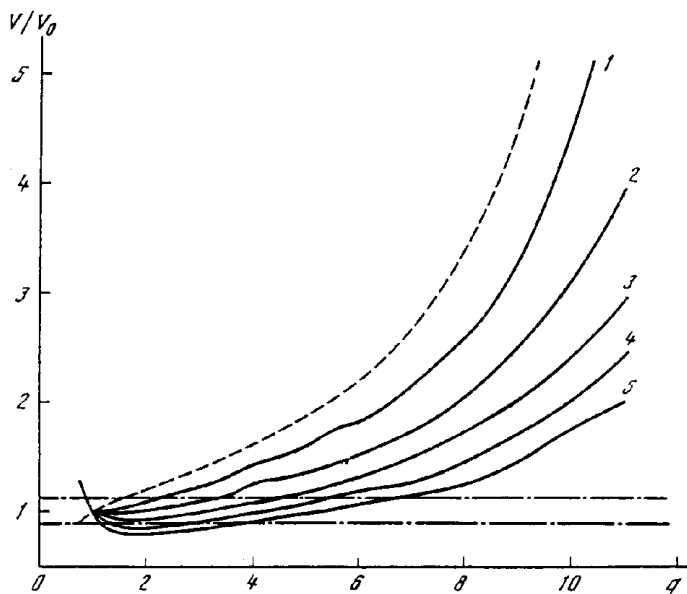


Рис. 1. Влияние кальциевой регуляции на стационарную зависимость относительного объема эритроцита от неселективного изменения проницаемости мембраны g при разных параметрах Ca^{2+} -регулируемых K^+ -каналов (k_1 , мкМ: 300 (1); 150 (2); 100 (3); 75 (4); 60 (5)). Штриховой линией показана зависимость, построенная без учета кальциевой регуляции, штрих-пунктиром – допустимый (10%-ный) диапазон изменения объема

внутриклеточной поверхности Ca^{2+} -насоса, h – число независимых мест связывания.

В соответствии с результатами работ [18, 19] $h = 2$. В физиологических условиях пассивный поток Ca^{2+} внутрь клетки оценивается как $U_{20} = 2,8 \cdot 10^{-6}$ мМ/с [25]. В стационарных условиях из уравнения (3) следует, что скорость работы Ca^{2+} -АТФ-азы равна пассивному потоку кальция внутрь. Откуда, зная концентрацию кальция в физиологических условиях, можно оценить $k_2 = 2,9 \cdot 10^{-3}$ мМ, что согласуется с данными работ [17, 19]. Величину этого потока можно использовать, чтобы найти нормальную проницаемость мембраны для кальция. Подставив его в уравнение (3) в стационарном состоянии, при физиологическом значении концентрации Ca^{2+} и трансмембранного потенциала $E = 8$ мВ [9, 10], найдем $G_{20} = 2,0 \cdot 10^{-6}$ с $^{-1}$.

Наблюдаются большие различия в экспериментальных значениях параметров K^+ -каналов в эритроцитах и в первую очередь в их чувствительности к Ca^{2+} (k_1) [17, 23, 24]. Поэтому влияние кальциевой регуляции на стационарную зависимость относительного объема эритроцита от неселективного изменения проницаемости мембраны для K^+ , Na^+ , Ca^{2+} при разных параметрах Ca^{2+} -регулируемых K^+ -каналов показано на рис. 1. Видно, что работа этих каналов может сильно увеличивать диапазон допустимых изменений объема эритроцита, а эффект зависит от чувствительности каналов к Ca .

Для того чтобы количественно охарактеризовать стабилизацию объема, назовем диапазоном стабилизации объема интервал изменений проницаемости g , в котором объем меняется не более чем на 10%.

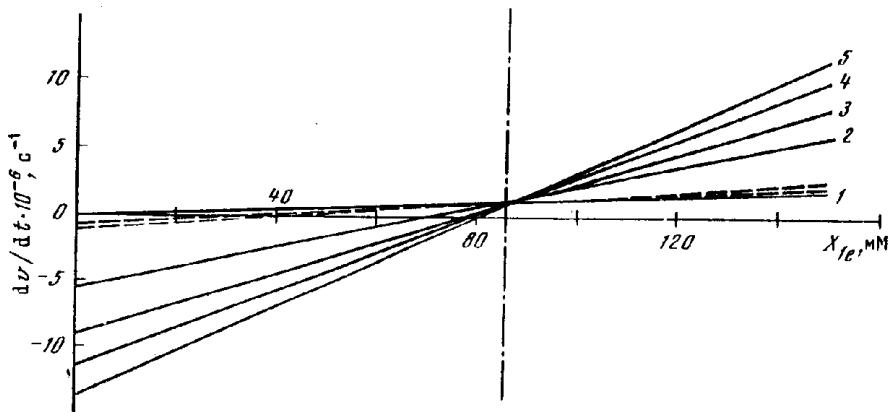


Рис. 2. Влияние кальциевой регуляции на зависимость скорости изменения относительного объема эритроцита от внеклеточной концентрации калия — X_{1e} , при разных проницаемостях мембраны для кальция: $g = 1$ (1); 5 (2); 9 (3); 13 (4); 17 (5). Параметры Ca^{2+} -регулируемых K^{+} -каналов: $k_1 = 60$ мкМ — сплошные линии, 1,2 мМ — штриховые

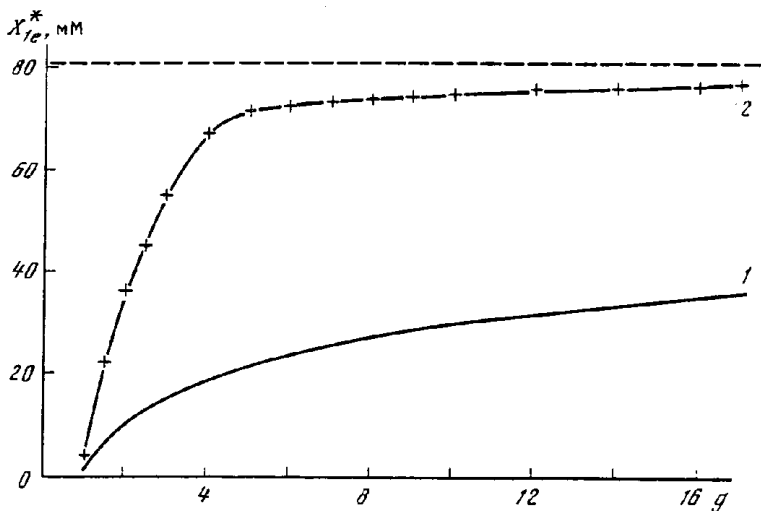


Рис. 3. Зависимость внеклеточной концентрации калия (X_{1e}^*), соответствующей неизменному объему, от проницаемости мембраны для Ca^{2+} (см. подпись к рис. 2), при разных значениях параметра K^{+} -каналов: $k_1 = 1,2$ мМ (1); 60 мкМ (2). Штриховая прямая — предельное значение X_{1e}^*

Так, диапазон стабилизации объема, выделенный на рис. 1 штрихпунктирными прямыми, при уменьшении константы k_1 от 300 до 60 мкМ изменяется соответственно от 2 до 7 (кривые 1 и 5 на рис. 1). Соответствующее значение в отсутствие кальциевой регуляции — 1,5 (пунктирная кривая на рис. 1). Чем чувствительнее каналы к Ca^{2+} , тем больше уменьшается объем при небольших изменениях проницаемости и для кривых 4, 5 даже выходит за рамки допустимого.

Таким образом, основная физиологическая роль Ca^{2+} -управляемых K^{+} -каналов в эритроцитах, видимо, состоит в улучшении стабилизации объема при неспецифических изменениях проницаемости мембраны.

Способ определения параметров кальциевой регуляции на интактных эритроцитах. Чтобы оценить вклад K^+ -каналов в стабилизацию объема эритроцитов, необходимо измерить отношение максимальной проницаемости каналов к константе диссоциации Ca^{2+} с этими каналами. Непосредственно измерить эти параметры на интактных эритроцитах пока невозможно. Однако анализ модели позволяет получить оценку этого отношения, не разрушая эритроциты.

При изменении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , например с помощью ионофора A23187, объем эритроцита должен измениться в соответствии с рис. 1. Кинетика выхода объема на новый стационарный уровень, как показывают расчеты, такова, что первые несколько часов объем изменяется практически линейно. Изменения объема можно попытаться компенсировать изменением отношения внеклеточной концентрации K^+ и Na^+ (оставляя их сумму постоянной).

На рис. 2 показана зависимость скорости изменения объема эритроцита (на линейном участке) от внеклеточной концентрации калия. Видно, что для каждого значения проницаемости мембраны для Ca^{2+} (кривые 1–5) есть своя внеклеточная концентрация калия (X_{1e}^*), при которой изменения объема полностью компенсированы. Это характерное значение концентрации K^+ при заданной проницаемости зависит только от параметров K^+ -каналов: чем чувствительнее каналы к Ca^{2+} (т.е. больше G_{1max}/k_1), тем больше эта концентрация.

На рис. 3 показана зависимость X_{1e}^* от g при $k_1 = 1,2$ мМ (кривая 1) и 60 мкМ (кривая 2). Видно, что наиболее сильные изменения наблюдаются при физиологических условиях. Поэтому для оценки вклада Ca^{2+} -регулируемых K^+ -каналов в стабилизацию объема эритроцитов достаточно измерить изменение X_{1e}^* при небольшом увеличении кальциевой проницаемости мембраны на интактных эритроцитах и сравнить эту величину с измеренной на эритроцитах с заблокированными K^+ -каналами (с помощью ингибитора или в бескальциевой среде).

Предлагаемый эксперимент позволит не только оценить величину отношения важных молекулярных констант, но, главное, позволит проверить, действительно ли велика роль эффекта Гардоша в регуляции объема эритроцита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tosteson D.C., Hoffman J.F. // J. Gen. Physiol. 1960. V. 44. N 1. P. 169–194.
2. Cavieses J.D. // Membrane Transport in Red Cells / Eds. Ellory J.C., Lew V.L. L.: Acad. Press, 1977. P. 1–37.
3. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982. 304 с.
4. Антонов В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука, 1982. 150 с.
5. Beauge L., Lew V.L. // Membrane Transport in Red Cells / Eds. Ellory J.C., Lew V.L. L.: Acad. Press, P. 39–51.
6. Garrahan P.J., Glynn I.M. // J. Physiol. 1967. V. 192. P. 159–174.
7. Orringer E.P., Parker J.C. // Prog. Hematol. 1973. V. 8. P. 1–23.
8. Jakobsson E. // Amer. J. Physiol. 1980. V. 238. N 5. P. C196–C206.
9. Brumen M., Heinrich R. // Biosystems. 1984. V. 17. N 2. P. 155–169.

10. Мороз И.А., Атауллаханов Ф.И., Кияткин А.Б., Пичугин А.В., Витвицкий В.М. // Биол. мембраны. 1989. Т. 6. № 4. С. 409–419.
11. Gardos G. // Biochim. et biophys. acta. 1958. V. 30. P. 653–654.
12. Goldman D. // J. Gen. Physiol. 1943. V. 27. P. 37–60.
13. Веренинов А.А., Марахова И.И. // Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986. 291 с.
14. Beilin L.J., Knight G.J., Munro-Faurhe A.D., Anderson J. // J. Clin. Invest. 1966. V. 45. P. 1817–1825.
15. Wiley J.S., McCulloch K.E. // Pharmacol. Ther. 1982. V. 18. P. 271–292.
16. Покудин Н.И., Петруняк В.В., Орлов С.И. // Биохимия. 1988. Т. 53. С. 753–757.
17. Lew V.L., Ferreira H.G. // Nature. 1976. V. 263. P. 336–338.
18. Ferreira H.G., Lew V.L. // Nature. 1976. V. 259. P. 47–49.
19. Larsen F.L., Katz S., Roufogalis B.D. // Biochem. J. 1981. V. 200. P. 185–191.
20. Lew V., Beauge L. // Membrane transport in biology / Eds. Giebisch H., Tosteson D., Ussing G. Heidelberg: Springer Verlag, 1979. V. 2. P. 81–115.
21. Duhm J., Gobel O. // J. Membrane Biol. 1984. V. 77. № 3. P. 243–254.
22. Garay R., Nazaret C., Diez J., Dagher G., Hannaert P., Braquet P. // Biomed. Biochim. acta. 1983. V. 42. № 11/12. P. S53–S57.
23. Орлов С.И., Покудин Н.И., Котелевцев Ю.В. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. P. 1373–1386.
24. Орлов С.И. // Успехи современной биологии. 1985. V. 100. № 2(5). P. 203–218.
25. Larsen F.L. // Nature. 1981. V. 294. P. 667–668.

Поступила в редакцию
24.IX.1992

HUMAN RED BLOOD CELL VOLUME REGULATION. THE ROLE OF CALCIUM ACTIVATED K⁺ CHANNELS

Атауллаханов Ф.И., Кияткин А.Б.,
Витвицкий В.М., Пичугин А.В.

*National Scientific Center of Haematology
of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

The role of calcium ions in the mammalian red blood cell volume regulation is investigated using mathematical modelling. It is shown in the effect of Ca²⁺-activated K⁺ channels on the red blood cell volume stabilization is rather strong. These channels' functioning can provide a 5–10 fold increase in the stabilization volume coefficient. This contribution may be estimated exactly if the ration of maximal K⁺ channel permeability to a Ca-binding constant of these channels is known. An experiment design which enables this ratio to be measured for intact red blood cells is suggested.