

Био-Вестник

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИЗВЕСТИЯ
АКАДЕМИИ НАУК СССР
СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

6

МОСКВА · 1989

УДК 591.105

©

АТАУЛЛАХАНОВ Ф. И., ВИТВИЦКИЙ В. М., ЖАБОТИНСКИЙ А. М.,
ПИЧУГИН А. В., СИНАУРИДЗЕ Е. И.

РЕГИСТРАЦИЯ АТФ В ЭРИТРОЦИТАХ С ПОМОЩЬЮ ВВЕДЕННОЙ В КЛЕТКИ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

В эритроциты человека путем обратимого осмотического лизиса введен препарат люциферазы, полученный из светляков *Luciola mingrelica*. После добавления люцефирина к суспензии таких эритроцитов наблюдается люминесценция. Люциферин распределяется равномерно между клетками и внешней средой в результате простой диффузии. Значения константы скорости транспорта в эритроцитах разных доноров лежат в пределах 0,009—0,021 л/(с·л клеток). Максимальная интенсивность люминесценции монотонно растет с ростом концентрации люциферина и температуры. Зависимость максимальной интенсивности люминесценции от концентрации люциферина описывается михаэлисовской кинетикой. Значения константы Михаэлиса люциферазы для люциферина внутри эритроцитов лежат в пределах 4,1—21,5 мкМ.

Интенсивность люминесценции эритроцитов, содержащих люциферазу, зависит от внутриклеточной концентрации АТФ. При одной и той же концентрации люциферина соотношение интенсивностей люминесценции контрольных эритроцитов с нормальным уровнем АТФ и эритроцитов, истощенных в отсутствие глюкозы, близко к соотношению в них концентраций АТФ. После добавления глюкозы к истощенным эритроцитам концентрация АТФ в них повышается, а интенсивность люминесценции приближается к уровню контрольных эритроцитов. Введение люциферазы позволяет качественно следить за быстрыми изменениями концентрации АТФ в эритроцитах.

Концентрация АТФ является одним из важнейших биохимических параметров клетки. В настоящее время наиболее быстрым, простым и чувствительным методом определения концентрации АТФ является метод, использующий светящуюся люциферин-люциферазную систему светляков (Beutler, Baluda, 1964; Атауллаханов, Пичугин, 1981; Угарова, Бровко, 1983; Van Dyke, 1985). Как и все другие методы определения АТФ, этот метод требует разрушения клеток. Цель настоящей работы — выяснение принципиальной возможности использования люциферазной системы для непрерывной регистрации уровня АТФ в целых клетках. Для этого в эритроциты человека вводили путем обратимого осмотического лизиса (Ihler et al., 1973; Ihler, 1979) препарат люциферазы, приготовленный из светляков *Luciola mingrelica*.

Для регистрации АТФ с помощью люциферазы необходимо присутствие люциферина. В связи с этим в ходе работы был исследован вопрос о проницаемости эритроцитарной мембраны для люциферина. Исследовано функционирование люциферазы внутри эритроцитов при различных концентрациях люциферина и при изменениях внутриклеточной концентрации АТФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался люциферин фирмы «Serva», ФРГ.

Эритроциты выделяли из крови нормальных здоровых доноров. Кровь заготавливали со стандартным глюкозо-цитратным гемоконсер-

вантом и хранили 1 сут при 4°. Эритроциты осаждали, центрифугируя кровь 10 мин при 1000 g. Плазму и верхний слой осевших клеток удаляли. Эритроциты дважды отмывали двойным объемом 0,9%-ного раствора хлористого натрия, а затем двойным объемом раствора следующего состава (мМ): NaCl — 113, KCl — 3, CaCl₂ — 2, MgCl₂ — 1, Na₂HPO₄ — 1,2, тризма-буфер — 50 мМ, pH 7,4, 37° и использовали для заполнения люциферазой.

В качестве источника люциферазы использовали лиофильно высушенные задние сегменты тела светляков *Luciola mingrelica*. Для заполнения эритроцитов задние сегменты от 50 светляков растирали в стеклянном гомогенизаторе с 5 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,5, содержащего 5 мМ MgCl₂. Гомогенат выдерживали 30 мин при комнатной температуре для экстракции люциферазы, фильтровали через марлю или вату и смешивали с 20 мл охлажденного лизирующего раствора следующего состава: глюкоза — 5 мМ, АТФ — 2 мМ. К полученной смеси добавляли 5 мл отмытой эритроцитарной массы и тщательно перемешивали. Через 1 мин добавляли 30 мл запечатывающего раствора следующего состава (мМ): глюкоза — 5, АТФ — 2, MgCl₂ — 1, NaCl — 300, Na₂HPO₄ — 20, pH 7,5 и смесь инкубировали 30 мин при 37°. После этого клетки отмывали путем разбавления в 10-кратном объеме холодного отмывающего раствора и центрифугирования 10 мин при 1000 g до исчезновения окраски надосадочного раствора. В ходе отмывки удалялась часть клеток, находящаяся в верхнем слое. Окончательный объем массы заполненных люциферазой клеток составлял 40–60% от исходного объема эритроцитарной массы. Добавка АТФ в лизирующий и запечатывающий растворы делалась для поддержания в эритроцитах нормального уровня АТФ. Предварительные исследования показали, что без добавок АТФ в ходе заполнения эритроцитов люциферазой концентрация АТФ в них снижается в 2–3 раза по сравнению с исходной.

Концентрацию АТФ как в нативных, так и в заполненных люциферин-люциферазного метода (Атауллаханов, Пичугин, 1981).

Во всех случаях, если это специально не оговаривается, люминесценцию суспензии эритроцитов регистрировали при 37° и постоянном перемешивании. Постоянная времени системы регистрации люминесценции была менее 1 с.

Люциферин добавляли к суспензии эритроцитов в виде 10⁻⁴ или 10⁻³ М раствора в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,5) с добавкой 1 мМ MgCl₂. Раствор готовили заранее и хранили при 4°. Объем добавок люциферина не превышал 10% от объема суспензии клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Люминесценция суспензии эритроцитов в присутствии люциферина. Отмытые эритроциты, заполненные препаратом люциферазы, разводили до гематокрита 30–40% инкубационным раствором (отмывочный раствор, в который добавлено 10 мМ глюкозы). Суспензию хранили в течение опыта (2–3 ч) при комнатной температуре. Концентрация АТФ и активность люциферазы в эритроцитах за это время не изменялись.

В измерительную ячейку помещали 1–2 мл инкубационного раствора и 0,1–0,2 мл суспензии эритроцитов. После 3-минутной инкубации, необходимой для установления постоянной температуры, в ячейку добавляли люциферин и регистрировали люминесценцию.

Люминесценция возникала сразу после добавления люциферина в суспензию эритроцитов. Ее интенсивность возрастала во времени, выходила на плато, а затем относительно медленно снижалась. Начальная скорость возрастания люминесценции и максимальная интенсивность люминесценции (на плато) эритроцитов увеличиваются с увели-

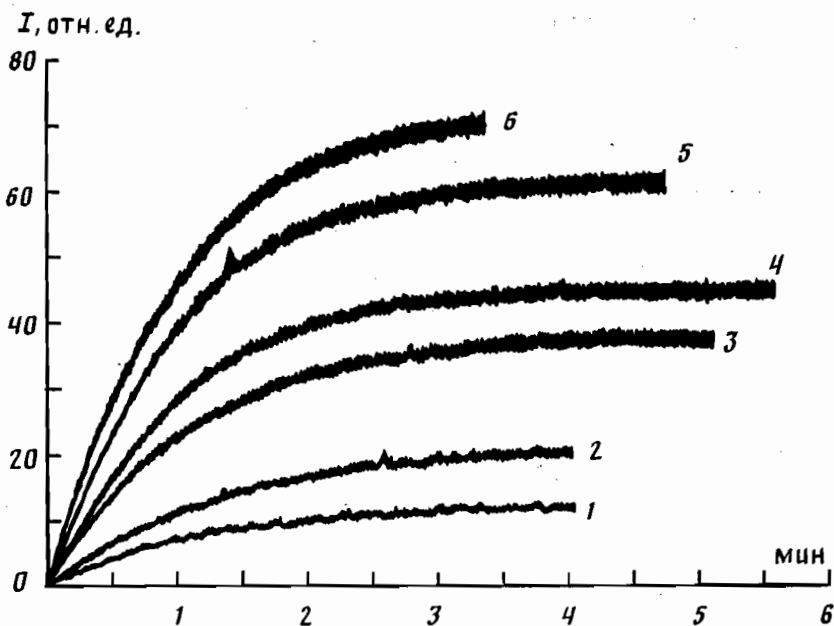


Рис. 1. Изменения интенсивности люминесценции эритроцитов (I), заполненных люциферазой, после введения в суспензию люциферина. В измерительной ячейке 1,2 мл эритроцитов, гематокрит 5%. Добавки раствора люциферина (100 мкМ), мкл: 1 — 10, 2 — 20, 3 — 40, 4 — 60, 5 — 80, 6 — 100

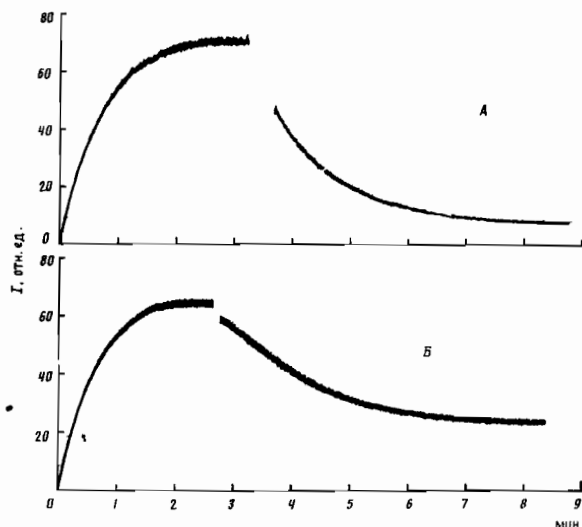


Рис. 2. Выход люциферина из эритроцитов, регистрируемый по интенсивности люминесценции (I), после замены инкубационной среды. В начальный момент добавлен люциферин: А — 80 мкл раствора 140 мкМ на 2 мл суспензии с гематокритом 5,8%; Б — 10 мкл раствора 100 мкМ на 1,2 мл суспензии с гематокритом 32%. В момент, отмеченный стрелкой, суспензия извлечена, эритроциты осаждены, надосадочный раствор удален, в ячейку помещено эквивалентное количество инкубационного раствора без люциферина и возвращены осажденные эритроциты. Процедура смены среды занимала около 6 мин. Концентрация АТФ в эритроцитах в ходе опыта не менялась

чением концентрации люциферина в суспензии (рис. 1). С увеличением концентрации люциферина от 1 до 50 мкМ продолжительность плато уменьшается от нескольких минут до 1–0,5 мин. После адаптации к темноте свечение эритроцитов можно видеть невооруженным глазом.

После удаления клеток путем центрифугирования светящейся суспензии инкубационный раствор не люминесцирует. Увеличение гематокрита суспензии при той же концентрации люциферина увеличивает интенсивность люминесценции. Добавление к суспензии эритроцитов АТФ до концентрации 2 мМоль/л не влияет на люминесценцию. Таким образом, люминесценция обеспечивается люциферин-люциферазным комплексом, находящимся внутри клеток, и не связана с адсорбцией люциферазы на внешней поверхности эритроцитов. При замене инкубационной среды на среду, не содержащую люциферина, наблюдается снижение интенсивности люминесценции (рис. 2). Эти данные показывают, что люциферин способен проходить через мембрану эритроцитов в обоих направлениях.

Распределение люциферина между средой и эритроцитами. Зависимость максимальной интенсивности люминесценции эритроцитов от концентрации люциферина имеет практически линейный участок при малых концентрациях люциферина. Это позволило исследовать распределение люциферина между средой и эритроцитами. В измерительной ячейке смешивали 0,6 мл эритроцитов, содержащих люциферазу, и 0,6 мл инкубационного раствора. После достижения температуры 37° добавляли люциферин до концентрации 1 мкМоль/л суспензии и измеряли максимальную интенсивность люминесценции. Затем эритроциты в суспензии осаждали центрифугированием 5 мин при 1000 g, 0,5 мл надосадочной жидкости переносили обратно в измерительную ячейку и смешивали с 0,5 мл новой порции эритроцитов, содержащих люциферазу. Полученная при этом максимальная интенсивность люминесценции была примерно вдвое ниже первоначального значения, следовательно, отделенная центрифугированием инкубационная среда содержала половину исходно введенного в суспензию люциферина. Это говорит о равномерном распределении люциферина между эритроцитами и средой. Нетрудно показать, что для описанного эксперимента должно выполняться соотношение

$$R = \frac{H}{H - 1 - \frac{I_1}{2I_2}},$$

где R — отношение концентрации люциферина в среде к концентрации люциферина в эритроцитах; H — доля объема суспензии, занимаемая эритроцитами (гематокрит); I_1 — максимальная интенсивность люминесценции суспензии после введения люциферина; I_2 — максимальная интенсивность люминесценции суспензии после замены эритроцитов.

В двух экспериментах на разных эритроцитах получены значения R равные 0,78 и 1,1. Данные по выходу люциферина из эритроцитов в среду (рис. 2, В) также указывают на равномерное распределение люциферина между эритроцитами и средой.

Кинетика люциферазной реакции в эритроцитах. Кинетика изменения интенсивности люминесценции эритроцитов после добавки люциферина определяется двумя факторами: скоростью транспорта люциферина внутрь эритроцитов и зависимостью люциферазной реакции от концентрации люциферина. Максимальная интенсивность люминесценции при данной концентрации люциферина в суспензии, по-видимому, соответствует квазистационарной скорости люциферазной реакции в условиях равновесия между концентрациями люциферина в среде и в эритроцитах. Зависимость максимальной интенсивности люминесценции

Таблица 1

Значения константы Михаэлиса люциферазы для люциферина (K_M), констант скорости транспорта люциферина внутрь эритроцитов (K_1) и из эритроцитов в среду (K_2), полученные на эритроцитах разных доноров

$K_M \pm m$ мкМ	$K_1 \pm m$ 1/(с·л клеток)	K_2 , 1/с ⁻¹
11,4±0,7	0,014±0,002	0,021
8,9±1,8	0,009±0,001	0,014
21,5±4,5	0,021±0,003	0,026
4,1±0,4	0,011±0,001	0,016—0,022
5,4±1,1	0,012±0,002	0,017
10,9±1,2	0,014±0,002	0,019

Примечание. Значения K_M вычислены по экспериментальным данным методом наименьших квадратов с учетом равномерного распределения люциферина между средой и эритроцитами; K_1 — для каждого случая вычислены путем усреднения констант скорости транспорта, полученных для каждой использованной в эксперименте концентрации люциферина. m — средняя квадратичная ошибка.

от концентрации люциферина в суспензии во всех случаях имеет михаэлисовский вид, однако значения констант Михаэлиса для люциферина, полученные в разных экспериментах, сильно различаются между собой (табл. 1).

Кинетика транспорта люциферина через мембрану эритроцитов. Начальная скорость возрастания интенсивности люминесценции эритроцитов после добавки люциферина, когда концентрация люциферина в эритроцитах еще мала, по сравнению с K_M люциферазы соответствует скорости транспорта люциферина внутрь эритроцитов. В каждом эксперименте, используя данные о максимальных интенсивностях люминесценции при концентрациях люциферина, малых по сравнению с K_M люциферазы, можно перейти от скорости возрастания интенсивности люминесценции к скорости накопления люциферина в эритроцитах. Полученная таким образом зависимость скорости транспорта люциферина внутрь эритроцитов от начальной концентрации люциферина в среде оказалась линейной. Значения констант скорости транспорта люциферина внутрь эритроцитов, полученные в разных опытах, приведены в табл. 1.

Зависимость люминесценции эритроцитов от температуры. Зависимость люминесценции эритроцитов, содержащих люциферазу, от температуры представлена в табл. 2. Рост максимальной интенсивности люминесценции отражает, по-видимому, рост активности люциферазы при повышении температуры. Для изучения зависимости скорости транспорта люциферина внутрь эритроцитов от температуры необходимо использовать начальные скорости возрастания интенсивности люминесценции, нормированные на максимальные значения интенсивности люминесценции. Как видно из табл. 2, с увеличением температуры скорость транспорта люциферина и максимальная интенсивность свечения в эритроцитах возрастают экспоненциально.

Регистрация изменений концентрации АТФ в эритроцитах с помощью введенной в них люциферазы. Свежеприготовленную суспензию эритроцитов, заполненных препаратом люциферазы, разделяли на четыре части и инкубировали при 37° и постоянном перемешивании. К одной порции суспензии добавляли глюкозу до концентрации 10 мМоль/л суспензии. К другой порции также добавляли глюкозу в той же концентрации и люциферин в концентрации 10 мкМоль/л суспензии. К третьей порции добавляли только люциферин в концентрации 10 мкМоль/л суспензии, а глюкоза не добавлялась. К четвертой порции в начале инкубации добавляли люциферин в концентрации 10 мкМоль/л суспензии, а после

45 мин инкубации, когда концентрация АТФ значительно снижалась, добавляли глюкозу до концентрации 10 мМоль/л суспензии.

В ходе инкубации из суспензии отбирали пробы для измерения интенсивности люминесценции эритроцитов и концентрации АТФ в них. К пробам из первой порции предварительно добавляли люциферин до концентрации 10 мкМ/л суспензии и измеряли максимальную интенсивность люминесценции.

Результаты одного из экспериментов представлены на рис. 3. В эритроцитах, нагруженных люциферазой и инкубируемых с люциферинном, характер изменений концентрации АТФ в ходе истощения без глюкозы

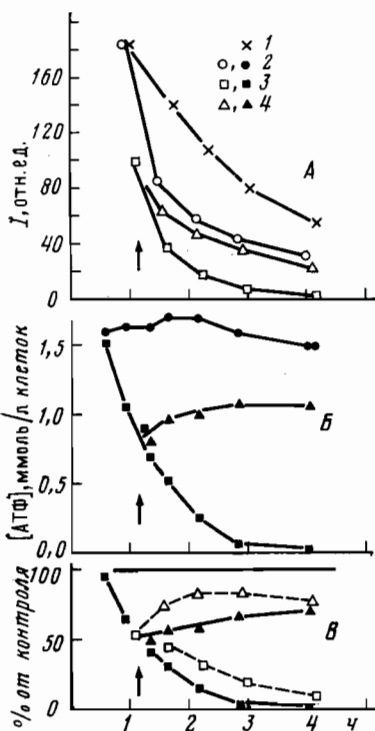


Рис. 3. Связь между изменениями внутриклеточной концентрации АТФ и интенсивностью люминесценции эритроцитов, заполненных люциферазой (1). Гематокрит суспензии 8%. 1 — инкубация эритроцитов с глюкозой без люциферина, 2 — инкубация с глюкозой и с люциферинном, 3 — истощение без глюкозы, 4 — после добавки глюкозы к истощаемым эритроцитам. Белые символы соответствуют интенсивности люминесценции, черные — концентрации АТФ. Стрелкой отмечен момент добавления глюкозы к истощаемым эритроцитам

и после добавки к ним глюкозы такой же, как и в нормальных нативных эритроцитах (Raporport et al., 1977; Атауллаханов с соавт., 1984), хотя уровень АТФ падает в них значительно быстрее, чем при истощении нормальных эритроцитов. Интенсивность люминесценции эритроцитов при длительной инкубации с люциферинном постоянно снижается в ходе инкубации, однако соотношение интенсивностей люминесценции в разных порциях суспензии качественно отражает соотношение концентраций АТФ в эритроцитах. Это особенно хорошо видно, если сравнивать относительные величины, приняв в каждый момент времени за 100% значения интенсивности люминесценции и концентрации АТФ в контрольных эритроцитах, инкубируемых с глюкозой и люциферинном.

Во всех случаях интенсивность люминесценции эритроцитов, инкубируемых без люциферина, выше, чем у эритроцитов, инкубируемых с люциферинном. Присутствие люциферина в инкубационной среде не влияло на концентрацию АТФ в эритроцитах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные говорят о том, что люциферин может свободно проникать через мембрану эритроцитов. По-видимому, транспорт люциферина через мембрану эритроцитов осуществляется путем простой диффузии. На это указывает ряд фактов: линейная зависимость начальной скорости транспорта от концентрации люциферина, свободное проникновение люциферина как внутрь эритроцитов, так и наружу, равномерное распределение люциферина между эри-

троцитами и средой, экспоненциальная зависимость скорости транспорта от температуры. Кроме того, из предположения о пассивной диффузии люциферина через мембрану эритроцитов следует, что при малых значениях гематокрита и малых концентрациях люциферина, когда внешняя концентрация люциферина может считаться постоянной и ин-

тенсивность люминесценции линейно зависит от концентрации люциферина в эритроцитах, должно выполняться равенство

$$\ln(1-I/I_{\max}) = -K_2 t, \quad (1)$$

где t — время, прошедшее от момента добавки люциферина; I — интенсивность люминесценции эритроцитов в момент времени t ; I_{\max} — максимальная интенсивность люминесценции, достигаемая при равновесии концентраций люциферина внутри и снаружи эритроцитов; K_2 — константа скорости транспорта люциферина из эритроцитов наружу.

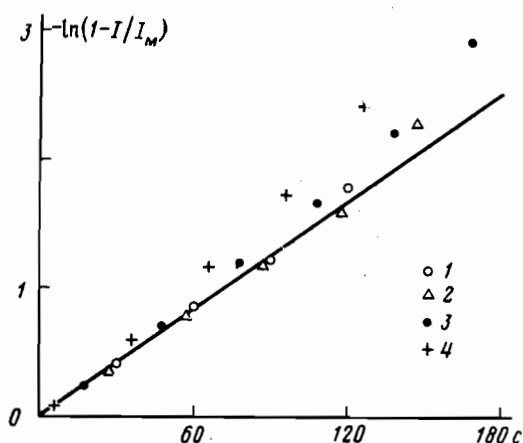


Рис. 4. Обработка кривых нарастания интенсивности люминесценции заполненных люциферазой эритроцитов после добавки люциферина. Точки, обозначенные символами 1—4, получены при обработке кривых 1—4, соответственно представленных на рис. 1

Полученные экспериментальные данные удовлетворяют равенству (1). На рис. 4 приведены зависимости $-\ln(1-I/I_{\max})$ от t , построенные по данным, представленным на рис. 1. Как видно на рис. 4, с ростом концентрации люциферина полученные зависимости начинают сильно отклоняться от линейной. Это обусловлено нелинейным ростом интенсивности люминесценции с ростом концентрации люциферина. По начальному наклону линий на рис. 4 можно определить значение K_2 . Эти значения для каждого эксперимента приведены в табл. 1, из которой видно, что значения K_1 и K_2 , полученные в одном и том же опыте, близки, однако значение K_1 во всех случаях меньше, чем K_2 . Исходя из рав-

Таблица 2

Температурная зависимость максимальной интенсивности люминесценции (I_{\max}) и начальной скорости возрастания интенсивности люминесценции (V) эритроцитов, заполненных люциферазой

$t, ^\circ\text{C}$	I_{\max} , отн. ед.	V , отн. ед./с	V/I_{\max} , 1/с
23	23,5	0,10	0,0042
30	48	0,35	0,0072
37	72	1,04	0,0144

Примечание. В измерительную ячейку помещали 1,2 мл суспензии эритроцитов, гематокрит 4,8%. После выравнивания температуры добавляли 100 мкл раствора люциферина с концентрацией 100 мкМ.

номерности распределения люциферина между средой и эритроцитами, следует ожидать равенства значений K_1 и K_2 . Наблюдаемые различия скорее всего связаны с тем, что эти параметры получены разными способами.

Большой разброс значений константы Михаэлиса люциферазы для люциферина, наблюдаемый в экспериментах, можно объяснить индивидуальными различиями внутриклеточных условий в эритроцитах. Показано, например, что константа Михаэлиса люциферазы для люциферина очень сильно зависит от рН в области физиологических значений рН (Филиппова, Угарова, 1979). Однако не исключено, что популяция светляков гетерогенна по этому параметру.

В ходе работы продемонстрирована принципиальная возможность непрерывной регистрации изменений уровня АТФ в эритроцитах с помощью введенной в клетки люциферин-люциферазной системы. При этом обнаружено, что в ходе длительных инкубаций интенсивность люминесценции нагруженных люциферазой эритроцитов существенно снижается даже при постоянном уровне АТФ (рис. 3). Наблюдаемое снижение интенсивности люминесценции, по-видимому, обусловлено двумя причинами. Во-первых, образованием продукта люциферазной реакции, ингибирующего реакцию. Этим объясняется возникающее в начале инкубации резкое различие между люминесценцией эритроцитов, инкубированных в присутствии люциферина и без него (рис. 3, А). Во-вторых, тепловой инактивацией люциферазы в ходе инкубации при 37°. Этим объясняется постепенное снижение интенсивности люминесценции, наблюдаемое в ходе всей инкубации у эритроцитов, инкубированных без люциферина, и на поздних стадиях инкубации у эритроцитов, инкубированных с люциферинном. Как уже отмечалось выше, инкубация эритроцитов, содержащих люциферазу, но без люциферина при комнатной температуре в течение нескольких часов не влияет на интенсивность их люминесценции после добавки люциферина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Жаботинский А. М., Пичугин А. В., Помазанов В. В., Титкова Н. Ф. Влияние гликолиза на метаболизм аденилатов в эритроцитах человека//Биохимия. 1984. Т. 49. № 1. С. 104.
- Атауллаханов Ф. И., Пичугин А. В. Модификация люциферин-люциферазного метода определения концентрации АТФ в эритроцитах//Биофизика. 1981. Т. 26. № 1. С. 86.
- Угарова Н. Н., Бровко Л. Ю. Биoluminescence и ее аналитическое применение//Химическая энзимология/Под ред. И. В. Березина, К. Мартинек. М.: МГУ, 1983. С. 154.
- Филиппова Н. Ю., Угарова Н. Н. Высокоочищенная люцифераза светляков *Luciola mingrelica* и ее кинетические свойства//Биохимия. 1979. Т. 44. № 10. С. 1899.
- Beutler E., Baluda M. C. Simplified determination of blood adenosine triphosphate using the firefly system//Blood J. Hematol. 1964. V. 23. № 5. P. 688.
- Ihler G. M., Gley R. H., Schnure F. W. Enzyme loading of erythrocytes//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. № 9. P. 2663.
- Ihler G. M. Potential use of erythrocytes as carriers for enzymes and drugs//Drugs carriers in biology and medicine/Ed. G. Gregoriadis. London: Acad. Press, 1979. P. 129.
- Rapoport I., Berger H., Elsner R., Rapoport S. M. pH-Dependent changes of 2,3-diphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states in vitro//Europ. J. Biochem. 1977. V. 73. № 2. P. 421.
- Van Dyke K. (Editor) Bioluminescence and chemiluminescence: instruments and application. V. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985.

Научно-исследовательский институт
технологии и безопасности
лекарственных средств,
Кулава

Поступила в редакцию
12.V.1988

ATP REGISTRATION IN THE ERYTHROCYTES BY MEANS
OF LUCIFERASE ENTRAPPED IN THE CELLS

*Scientific Research Institute for Technology and Safety
of Medicinal Remedies, Kupavna, Moscow region*

The luciferase preparation obtained from fireflies *Luciola mingrelica* has entrapped into the human erythrocytes by means of reversible osmotic lysis. The addition of luciferin to such erythrocytes leads to the appearance of luminescence, conditioned by the entrance of luciferin into the cells. Luciferin is uniformly distributed between cells and external medium. Luciferin transport through the erythrocyte membrane is a result of simple diffusion. Values of rate constant of luciferin transport through the membrane lie between 0,009—0,021 1/s 1 cells for erythrocytes of different donors. The maximum luminescence intensity increases monotonously with rise of temperature and luciferin concentration. The dependence of the maximum luminescence intensity on luciferin concentration is described by Michaelis kinetics. Obtained in different experiments, values of luciferase Michaelis constant for luciferin inside erythrocytes lie between 4.1—21.5 μ M.

Luminescence intensity of the luciferase containing erythrocytes depends on the intracellular ATP concentration. Under the same luciferin concentration the correlation of luminescence intensities of control erythrocytes with normal ATP level and erythrocytes depleted without glucose is near to correlation of their ATP concentrations. After the addition of glucose to the depleted erythrocytes their ATP concentration rises and luminescence intensity approaches to the level of control erythrocytes. Luciferase entrapment permit one to control rapid ATP concentration changes in the erythrocytes.