

Федеральное агентство по образованию

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ

Евстифеев А.И., Котов Н.В.

Транспорт кислорода через мембрану эритроцитов

Учебно-методическая разработка
для лабораторного практикума
по специализациям медицинская физика, биофизика

Казань 2014 г.

Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Института физики.

Евстифеев А.И., Котов Н.В. Транспорт кислорода через мембрану
эритроцитов.

Учебно-методическое пособие для студентов 4 курса
Казань, 2014. 30 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено для лабораторного практикума в поддержку курсов по специализации. Транспорт кислорода через мембрану эритроцитов обеспечивает обратимое связывание кислорода гемоглобином.

Рецензент:

Анисимов А.В., проф., д.ф.-м.н.

© Институт Физики Казанского федерального университета. 2014.

Содержание

Введение	4
1 Дыхательная система человека.....	5
1.1 Эритроцит	7
1.2 Строение биологической мембраны	9
1.3 Транспорт кислорода через мембрану эритроцитов	13
1.4 Аквапорины	15
2 Материал и методика измерений	18
2.1 Датчик растворенного кислорода.....	18
2.2 Хлорортутьбензол.....	20
3 Экспериментальная часть	20
3.1 Объекты и методы.....	20
3.2 Модель.....	21
3.3 Экспериментальная установка	23
4. Задание на исследования.....	24
4.1 Измерения кинетики концентрации кислорода при продувании образца воздухом (физиологический раствор)	24
4.2 Определение проницаемости мембран эритроцитов для кислорода	25
4.3 Влияние блокатора аквапорина на проницаемость мембран эритроцитов	26
5. Контрольные вопросы	28
Список литературы	29

Введение

Трансмембранный транспорт кислорода - фундаментальный процесс в жизни аэробных организмов.

Кислород транспортируется от легких к тканям кровеносной системой. Одним из главных элементов этой транспортной системы является эритроцит.

Красные кровяные тельца (эритроциты) — самые многочисленные из форменных элементов. Зрелые эритроциты не содержат ядра и имеют характерную форму двояковогнутых дисков. В эритроцитах содержится содержащий железо белок — гемоглобин, который обеспечивает главную функцию эритроцитов — транспорт газов, в первую очередь — кислорода. Именно гемоглобин придаёт крови характерную красную окраску. В лёгких гемоглобин связывает кислород, превращаясь в оксигемоглобин, он имеет светло-красный цвет. В тканях кислород освобождается из связи, снова образуется гемоглобин, и кровь темнеет. Кроме кислорода, гемоглобин в форме карбогемоглобина переносит из тканей в лёгкие и небольшое количество углекислого газа.

Оксигенация клеток и тканей организма в значительной степени зависит не только от способности гемоглобина связывать и высвобождать кислород, но также и от реологических свойств крови, которые во многом определяются способностью эритроцитов к деформации и объединению в агрегаты, поскольку их функции осуществляются через свободную поверхность мембран.

Целью данной работы является исследование молекулярной системы, осуществляющей транспорт кислорода через мембрану эритроцита.

задачи:

- 1) измерение проницаемости мембран эритроцитов для кислорода;
- 2) исследование изменения проницаемости мембран эритроцитов для кислорода при ингибировании аквапоринов.

1 Дыхательная система человека

Человек и все высокоорганизованные живые существа нуждаются для своей нормальной жизнедеятельности в постоянном поступлении к тканям организма кислорода, который используется в сложном биохимическом процессе окисления питательных веществ, в результате чего выделяется энергия и образуется двуокись углерода и вода.

Для нормального протекания обменных процессов в клетках тканей любых органов необходим как постоянный приток кислорода, так и непрерывное удаление углекислого газа, накапливающегося в ходе обмена веществ. Такой процесс называется дыханием. Функцию дыхания обеспечивает дыхательная система, состоящая из легких и дыхательных путей, которые включают носовые ходы, гортань, трахею, бронхи, мелкие бронхи и альвеолы (рисунок 1).

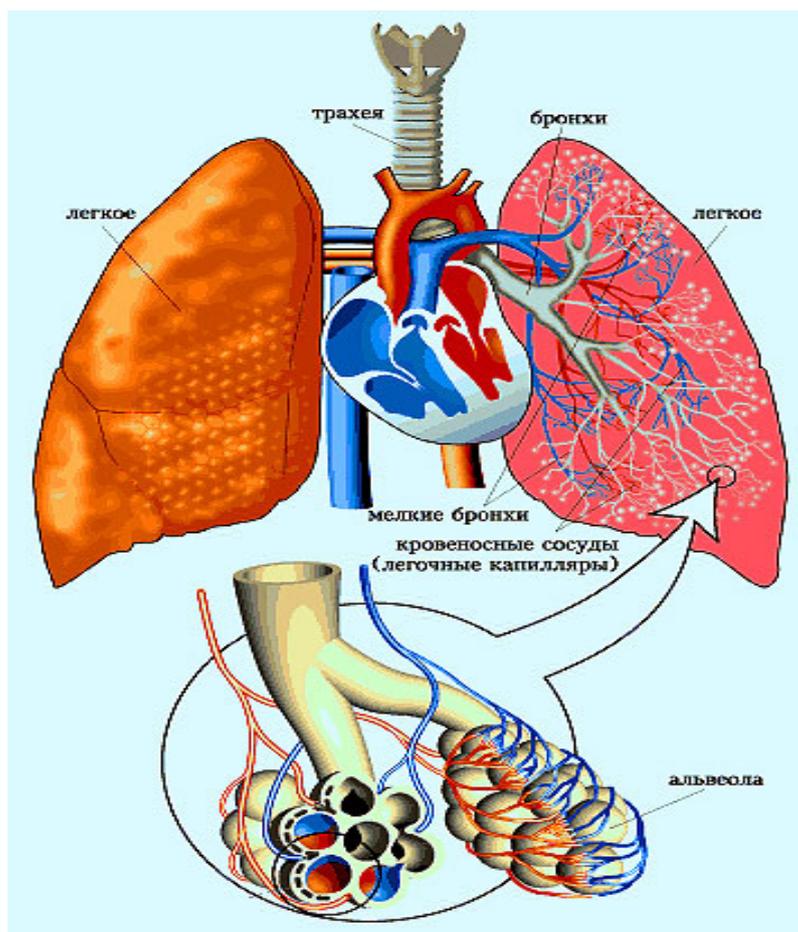


Рисунок 1 - Дыхательная система.

Кислород в составе воздуха через дыхательные пути попадает в лёгкие. Концы самых мелких бронхов в лёгких заканчиваются множеством тонкостенных лёгочных пузырьков альвеол – это 500 миллионов пузырьков диаметром 0,2 мм. Здесь и происходит газообмен.

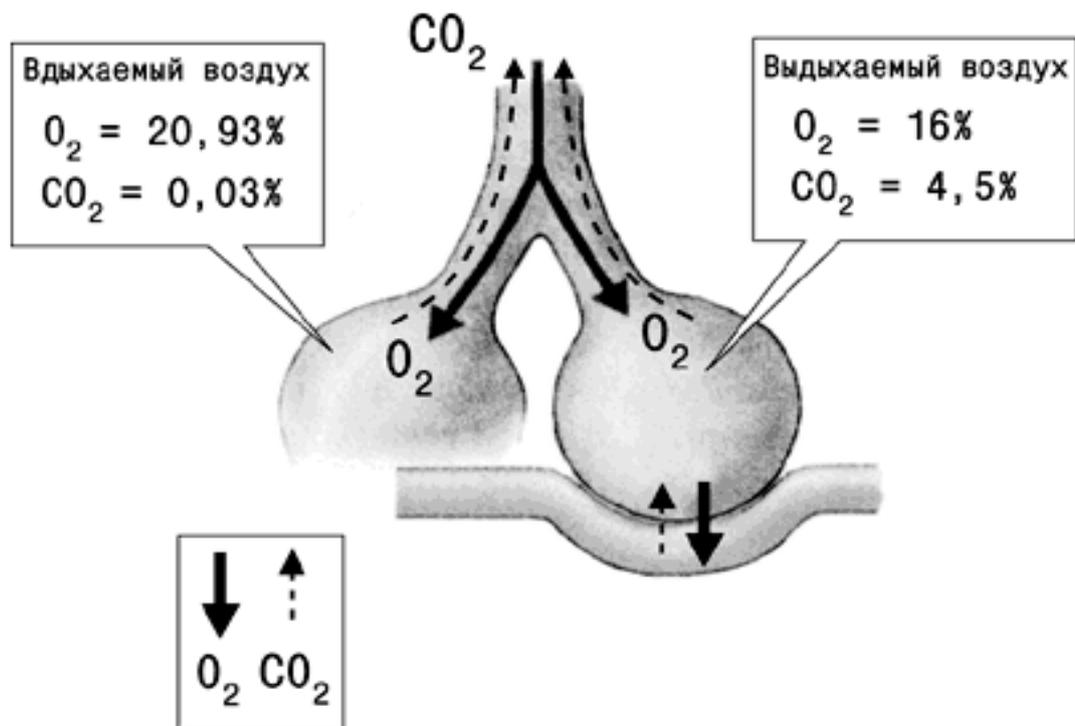


Рисунок 2 - Газообмен между легочными пузырьками и кровью.

Кислород из лёгочных пузырьков проникает в кровь, а углекислый газ из крови – в лёгочные пузырьки (рисунок 2).

Кровеносная система – это транспортная система, которая состоит из мышечного четырехкамерного насоса (сердца) и многих каналов (сосудов), функция которых заключается в доставке крови ко всем органам и тканям и последующем возврате ее к сердцу и легким. По главным составляющим этой системы ее называют также сердечно-сосудистой.

Кровеносная система имеет сложную систему снабжения клеток кислородом. Главная часть ее механизма – мембрана эритроцита.

1.1 Эритроцит

Эритроцит (от греч. erythros - красный, cytos, kytos - клетка) - безъядерная клетка диаметром 7 - 8 мкм (нормоцит). Всего в крови у взрослого человека циркулируют $(25-30) \cdot 10^{12}$ эритроцитов.



Рисунок 3 – Эритроцит.

Эритроциты образуются в красном костном мозге, откуда поступают в кровь со скоростью около $2.5 \cdot 10^6$ /с; в крови они функционируют в течение всего периода своей жизни (100-120 суток), проделывая с кровотоком путь более 1000 км и проходя через систему кровообращения более 100 тыс. раз, а затем разрушаются

макрофагами селезенки и (в меньшей степени) печени и красного костного мозга. Основной функцией эритроцитов является перенос кислорода из лёгких к тканям тела и двуокиси углерода (углекислого газа) в обратном направлении. Безъядерный эритроцит не требует больших затрат кислорода на собственные нужды и это позволяет более полноценно снабжать организм кислородом [1]. Однако, кроме участия в процессе дыхания, эритроциты выполняют в организме также следующие функции:

- регулируют кислотно-щелочное равновесие среды;
- поддерживают изотонию крови и тканей;
- адсорбируют из плазмы крови аминокислоты, липиды и переносят их к тканям.

Форма эритроцитов (двояковогнутый диск) определяет более светлую окраску их центральной части по сравнению с периферической. Благодаря такой форме обеспечиваются:

- увеличение их поверхности (общая ее площадь составляет у взрослого человека около 3800 м^2 , что в 2000 раз превосходит поверхность тела); площадь поверхности каждого эритроцита примерно в 1.5 раза больше, чем у сферы такого же объема;

- снижение диффузионного расстояния (между поверхностью и наиболее удаленной от нее части цитоплазмы) - на 30% по сравнению с такими же элементами сферической формы, благодаря чему создаются оптимальные условия для газообмена;
- возможность увеличения объема эритроцита без повреждения его плазмолеммы благодаря наличию ее резерва, в частности, способность набухать в гипотоничной среде;
- способность к обратимой деформации при прохождении через узкие и изогнутые капилляры. Поддержание формы эритроцитов обеспечивается вследствие осмотического равновесия, которое достигается благодаря деятельности ионных насосов в их мембране, а также особыми элементами цитоскелета.

Цитоплазма эритроцита состоит из воды (60%) и сухого остатка (40%), содержащего, в основном, гемоглобин – белок, основной функцией которого является перенос кислорода. Гемоглобин при высоких концентрациях кислорода обратимо связывает его, превращаясь в оксигемоглобин. При низких концентрациях кислорода оксигемоглобин отдает кислород и превращается в гемоглобин. Эритроциты участвуют также в транспорте двуокиси углерода. Транспорт кислорода и углекислоты взаимозависимые и взаимно сопряженные процессы.

Эффективность функционирования гемоглобина зависит от величины поверхности соприкосновения эритроцита со средой. Суммарная поверхность всех эритроцитов крови в организме тем больше, чем меньше их размеры. При различных заболеваниях крови возможно изменение цвета эритроцитов, их размеров, количества, а также формы; эритроциты могут принимать, например, серповидную, овальную или мишеневидную форму.

1.2 Строение биологической мембраны

Важную роль в эритроците выполняет клеточная (плазматическая) мембрана, пропускающая газы, ионы и воду.

Все биологические мембраны имеют толщину от 5 до 10 нм, содержат белки и липиды. Кроме того, в них присутствуют углеводы, неорганические соли, вода и ряд других соединений.

В настоящее время общепринятой моделью строения мембран является жидкостно-мозаичная [1, 2].

Структурной единицей мембраны является фосфолипидный бислои. Липидный бислои с обеих сторон покрыт белками. Наружная и внутренняя стороны мембран в большинстве случаев имеют неодинаковый состав, то есть мембраны асимметричны. Липиды и белки, расположенные на наружной стороне плазматической мембраны, обычно имеют ковалентно связанные с ними углеводы. Внутренняя сторона мембраны и внутриклеточные мембраны, как правило, лишены углеводов. В соответствии с жидкой мозаичной моделью мембраны сами липиды и некоторые белки способны передвигаться в плоскости бислоя.

Наиболее подвижным компонентом в ней являются липиды. Они довольно свободно двигаются в плоскости липидного слоя (латеральное перемещение), меняя своих «соседей» в среднем 10⁶ раз в секунду. Молекулы белков также могут перемещаться латерально в плоскости мембраны. Возможно также, что белковые молекулы вращаются вокруг перпендикулярных и параллельных плоскости бислоя осей, что может иметь большое значение при функционировании макромолекул и мембран в целом.

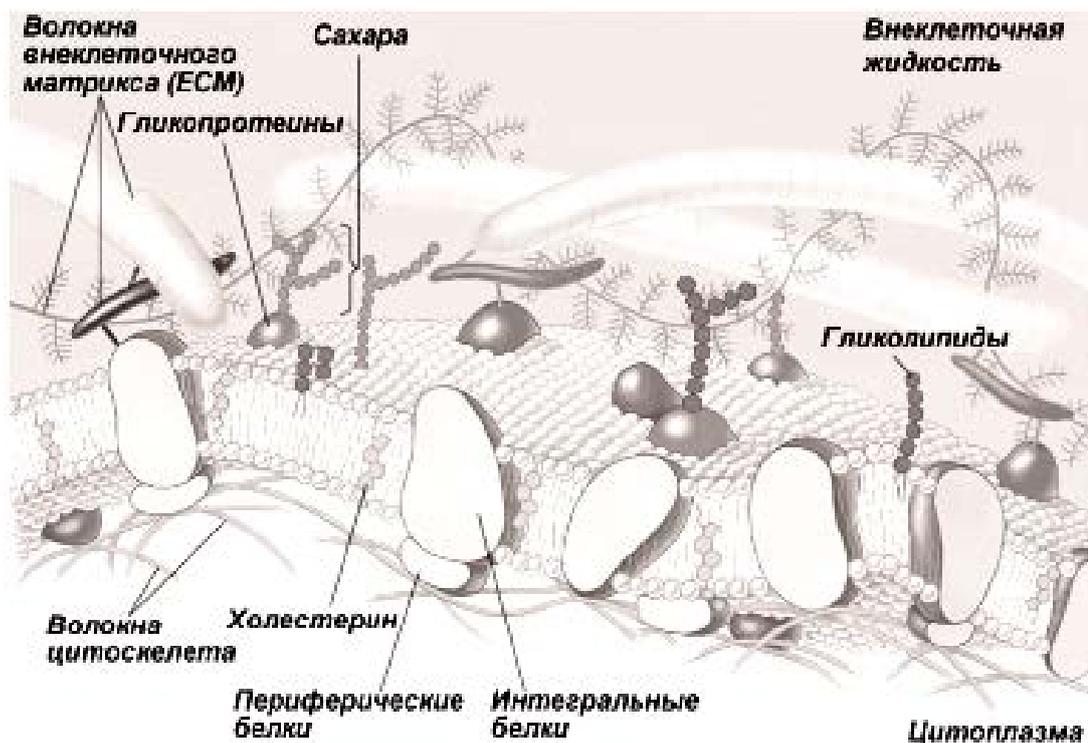


Рисунок 4 - Современная интерпретация жидко - мозаичной модели мембраны.

Однако белковые молекулы не абсолютно свободно перемещаются в плоскости мембраны, поскольку могут существовать взаимодействия между отдельными белковыми молекулами и, кроме того, между белками мембран и цитоскелетом клетки. В свою очередь расположение белковых молекул в мембране оказывает влияние на распределение и ориентацию липидных молекул в зависимости от строения конкретных белков и липидов.

При оптимальных для жизнедеятельности живых организмов температурах мембрана, как правило, имеет жидкокристаллическое состояние [1, 2] (промежуточное между жидким и твердым). Это состояние обусловлено прежде всего наличием в мембранах системы липид – белок – вода, формирующей различного типа упорядоченные структуры, обладающие в то же время определенной подвижностью. Такое состояние мембран оказывает существенное влияние на их функционирование и объясняет большую чувствительность к различным внешним факторам.

Жидкомозаичная модель объясняет многие свойства биологических мембран, например, неодинаковое число молекул белка на единицу площади,

ассиметрию, возможность расположения белков только на внутренней или только на наружной поверхности, разную толщину мембраны и др.

Эта модель позволяет понять высокое электрическое сопротивление мембраны, избирательную проницаемость, изменчивость, а также латеральную диффузию – перемещение отдельных липидов и белков в плоскости наружного монослоя со значительной скоростью.

Основные функции плазматической мембраны: избирательная проницаемость, межклеточные взаимодействия, эндоцитоз, экзоцитоз.

Липиды (фосфолипиды, сфинголипиды, холестерин) составляют до 45% массы мембран.

Молекула фосфолипида [2] состоит из полярной (гидрофильной) части (головка) и аполярного (гидрофобного) двойного углеводородного хвоста. В водной фазе молекулы фосфолипидов автоматически агрегируют хвост к хвосту, формируя каркас биологической мембраны в виде двойного слоя (бислоя). Таким образом, в мембране хвосты фосфолипидов направлены внутрь бислоя, а головки обращены наружу.

Сфинголипиды – липиды, содержащие основание с длинной цепью (сфингозин или сходную с ним группу).

Холестерин циркулирует во внутренней среде организма в составе липопротеинов, имеет чрезвычайно важное значение для клетки.

Основные фосфолипиды эритроцитарной мембраны – кислые липиды (заряженные отрицательно) сфингомиелин и фосфатидилэтаноламин, и нейтральные липиды (цвиттерионы) фосфатидилхолин и фосфатидилсерин.

Различные классы липидов в мембране расположены не хаотично: существует как трансмембранная асимметрия, так и планарная гетерогенность их распределения. Например, для мембраны эритроцитов человека характерно следующее асимметричное расположение фосфолипидов: во внешней половине бислоя расположено 70% фосфатидилхолина и 80% сфингомиелина, во внутренней же половине находится почти весь фосфатидилсерин и до 70% фосфатидилэтаноламина.

Это свидетельствует о том, что при физиологическом значении рН внутренняя сторона мембраны заряжена отрицательно.

Белки составляют более 50% массы мембран. Большинство мембранных белков имеет глобулярную структуру.

- Интегральные мембранные белки прочно встроены в липидный бислой. Их гидрофильные аминокислоты взаимодействуют с фосфатными группами фосфолипидов, а гидрофобные – с цепями жирных кислот. Молекула белка, проходящая через всю толщю мембраны и выступающая из нее как на наружной, так и на внутренней поверхности, – трансмембранный белок.

- Периферические мембранные белки находятся на одной из поверхностей клеточной мембраны (наружной или внутренней) и нековалентно связаны с интегральными мембранными белками.

Гидрофобный характер сердцевины бислоя определяет возможность (или невозможность) непосредственного проникновения через мембрану различных с физико-химической точки зрения веществ (в первую очередь, полярных и неполярных).

Неполярные вещества (например, холестерин и его производные) свободно проникают через биологические мембраны.

Полярные вещества (например, белки и ионы) не могут проникать через биологические мембраны.

Пути реализации избирательной проницаемости [3] мембран:

- Пассивный транспорт характеризуется низкой специфичностью. Молекулы в обоих направлениях перемещаются по градиенту концентрации без затрат энергии.

- Облегченная диффузия. Транспорт веществ осуществляется с участием компонентов мембраны (каналы и/или белки-переносчики) по градиенту концентрации и без непосредственных затрат энергии; проявляют специфичность к транспортируемым молекулам.

- Активный транспорт – происходящий при участии АТФаз энергозависимый трансмембранный перенос ионов против электрохимического градиента.

1.3 Транспорт кислорода через мембрану эритроцитов

Функцию переноса молекулярного кислорода от легких к клеткам-потребителям у позвоночных животных и человека выполняют специализированные клетки крови – эритроциты. Они наполнены железосодержащим белком гемоглобином, составляющим до 94% сухой массы клетки. В капиллярах легких человека насыщение гемоглобина эритроцитов кислородом происходит за четверть секунды. При этом в цитоплазму эритроцита проникает примерно третья часть переносимого им кислорода. Очевидно, что столь быстрая оксигенация эритроцитарного гемоглобина в легких возможна лишь при условии существования весьма интенсивного переноса кислорода через мембрану эритроцитов.

Известно, что мембрана эритроцитов не оказывает существенного сопротивления для диффузии кислорода [4]. Подтверждение этому было получено в модельных экспериментах, выполненных методом остановленной струи. С помощью этого метода можно наблюдать кинетику процесса переноса кислорода из внешней среды в цитоплазму эритроцитов по изменению во времени соотношения окси- и дезоксигемоглобина [5]. Полученные этим методом результаты показали, что скорость поглощения O_2 эритроцитами определяется скоростью диффузии, а не химической реакцией взаимодействия O_2 с гемоглобином в клетке. Установлено, что основным диффузионным барьером, определяющим скорость переноса O_2 в цитоплазму эритроцитов, является высокое диффузионное сопротивление неперемешиваемого слоя воды, окружающего клетку, а вклад сопротивления мембраны незначителен [6, 7].

Объем, качество и уровень теоретического анализа экспериментального материала, подтверждающего надежность этих представлений, оказались настолько убедительными, что дальнейшие

исследования роли мембраны в кислородном газообмене эритроцитов с помощью метода остановленной струи были фактически свернуты более 20 лет тому назад.

Высокая проницаемость мембран эритроцитов для кислорода может быть обусловлена высокой проницаемостью липидного бислоя. Такое объяснение основано на традиционном предположении о том, что проницаемость для кислорода липидного бислоя биологических и модельных мембран близка к проницаемости слоя воды аналогичной толщины. Эти представления вытекают, в основном, из результатов косвенных экспериментов с использованием флуоресцентных и спиновых зондов [8].

Этой точке зрения, однако, противоречит тот факт, что величина микровязкости липидного бислоя биологических мембран примерно на два порядка выше вязкости воды. В соответствии с законами диффузии, подвижности молекул кислорода в таких средах должны сильно различаться. С этим согласуются результаты прямых измерений трансмембранных диффузионных потоков O_2 через монослойные липидные мембраны, которые показали, что диффузионное сопротивление этих мембран для кислорода на 2-3 порядка выше, чем у слоя воды аналогичной толщины.

В работе [9] был рассчитан коэффициент проницаемости монослойной мембраны из суммарных липидов эритроцитов; средняя величина коэффициента проницаемости при поверхностном давлении 27,6 мН/м равна $(3,42 \pm 0,11) \cdot 10^{-5}$ м/с. Полученная величина примерно на 4 порядка ниже ранее принятой в литературе, что свидетельствует о высоком диффузионном сопротивлении липидного бислоя мембраны эритроцитов для кислорода.

В работе [8] был определен коэффициент диффузии кислорода в липидном бислое мембраны эритроцитов по тушению флуоресценции гидрофобного зонда пирена. Коэффициент проницаемости липидного бислоя рассчитывали из величины коэффициента диффузии; по данным работы [8] равен для мембраны эритроцитов при 25° С около 0,3 м/с. Эта величина примерно на 4 порядка выше, чем коэффициент проницаемости монослоя из

эритроцитарных липидов, полученный в работе [9]. Одна из возможных причин столь значительного различия состоит в том, что молекула зонда, встроенная в бислой, формирует структурный дефект, в котором концентрация и диффузионная подвижность кислорода значительно выше, чем в нативной липидной мембране.

В экспериментах, выполненных методом остановленной струи, было установлено [10], что процесс поглощения кислорода эритроцитами чувствителен к ртутьсодержащим сульфгидрильным реагентам. В контрольных экспериментах было показано, что эффект снижения скорости поглощения кислорода эритроцитами не связан полностью с влиянием SH-реагентов на гемоглобин и структуру липидного бислоя.

Совокупность результатов, полученных в работе [10], указывает на вклад мембранных белков в процесс транспорта кислорода через мембрану эритроцитов человека. Наиболее вероятным кандидатом на роль кислородной поры, обеспечивающей высокую скорость диффузии кислорода через эритроцитарную мембрану, является белок аквапорин 1 (AQP1).

1.4 Аквапорины

В мембране эритроцитов есть специализированные каналы пассивного транспорта кислорода. Эти каналы были идентифицированы как аквапорины 1 (AQP1). Считается, что аквапорины – белки водных каналов (рисунок 5). Но на сегодняшний день выявлены также аквапорины, транспортирующие CO, CO₂, O₂, NH₄.

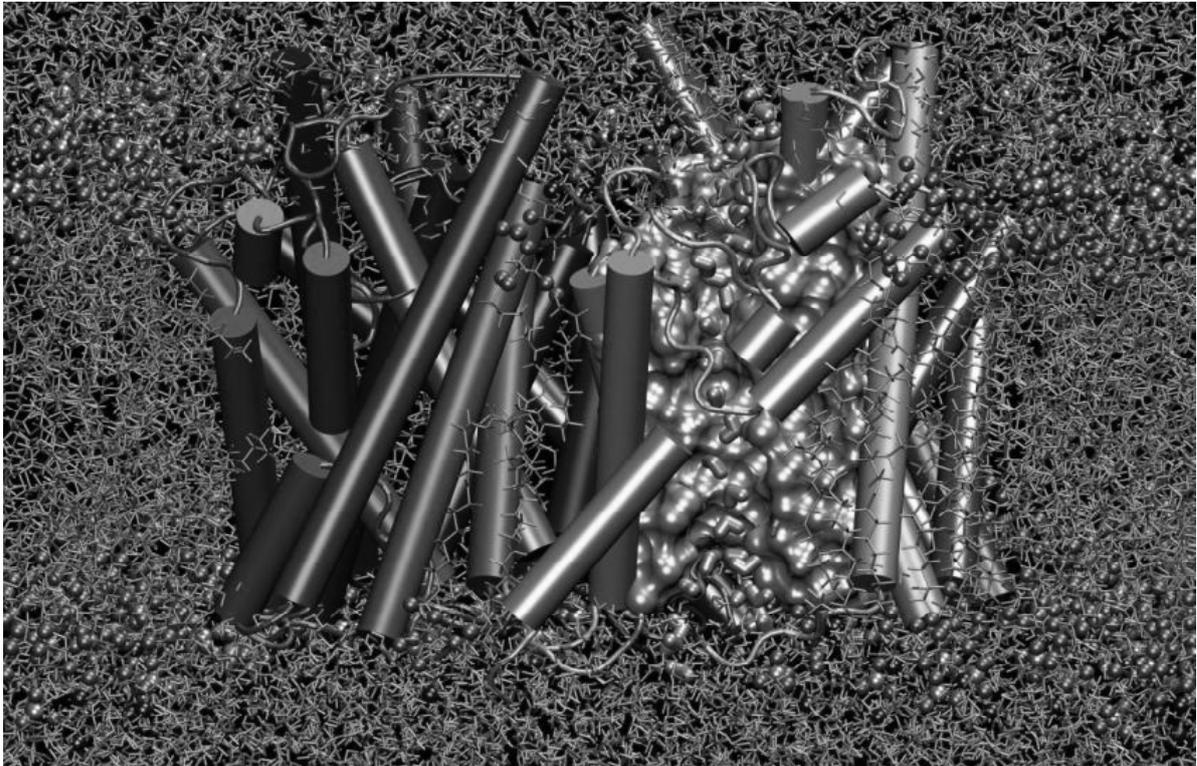


Рисунок 5 – Аквапорин.

Для всех белков семейства аквапоринов характерна сходная пространственная структура. Аквапорины образуют в мембране гомотетрамеры. Каждый из мономеров содержит водную пору. Кроме того, в центре тетрамера также имеется пора, функция которой окончательно не установлена.

Водная пора AQP1 имеет гантелевидную форму с двумя широкими устьями на внеклеточной и цитоплазматической сторонах. Более узкая селективная часть поры имеет минимальный диаметр 2,8 Å. Минимальный диаметр центральной поры близок к диаметру водной поры и составляет около 3 Å. Исходя только из эффективного диаметра молекулы O₂ (около 2,6 Å), теоретически можно предположить, что транспорт кислорода возможен через оба типа пор.

Аквапорин 1 в большом количестве (около $2 \cdot 10^5$ молекул/кл.) представлен в мембране эритроцитов человека. Известно, что AQP1 обеспечивает очень высокую проницаемость эритроцитарной мембраны для воды.

Недавно участие аквапорина 1 в трансмембранном транспорте кислорода было подтверждено в экспериментах на культуре клеток с повышенным уровнем экспрессии этого белка [11].

Одним из наиболее широко распространенных предположений в биологии было то, что газы быстро проходят клеточные мембраны и просто растворяются в липидах мембран. Первым продвижением в этой теории было наблюдение мембраны клеток гастрических желез, которые не пропускали NH_3 или CO_2 . Вторым было наблюдение того, что водный канал аквапорин 1 (AQP1) является каналом также для CO_2 , по крайней мере в искусственных клетках. В третьих обнаружилось, что DIDS (блокатор аквапоринов) значительно уменьшает проницаемость CO_2 через мембрану красных клеток крови (эритроцитов). Первым доказательством наличия газовых каналов в мембранах клеток была демонстрация того, что AQP1 играет ключевую роль в клеточном поглощении CO_2 во время фотосинтеза табачных растений.

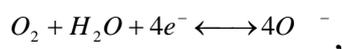
2 Материал и методика измерений

2.1 Датчик растворенного кислорода

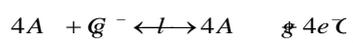
Датчик растворенного в воде кислорода состоит из серебряного анода и катода, выполненного из платины. И катод, и анод погружены в раствор электролита, отделенный от внешней среды газопроницаемой мембраной. Молекулярный кислород диффундирует через мембрану и восстанавливается на катоде.

Процессы, протекающие на аноде и катоде, описываются следующими уравнениями:

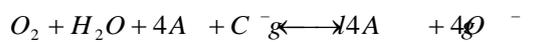
катод, восстановление:



анод, окисление:



Общее уравнение реакции:



Кислород, проникающий через мембрану, восстанавливается на катоде, на который подается постоянное напряжение. В результате возникает электрический ток, пропорциональный парциальному давлению кислорода. Принимая во внимание закон идеального газа

$$PV = nRT,$$

связывающий давление газа (P) с количеством вещества $n = \frac{m}{\mu}$, m – масса, μ – молярная масса. Результат измерения растворенного кислорода может быть выражен в единицах мг/л O₂ (при условии наличия в конструкции датчика термистора для температурной компенсации показаний).

Как известно, воздух представляет собой смесь газов, причем 21% этой смеси составляет кислород. Поскольку при нормальных условиях давление воздуха 760 мм рт. ст., то «доля кислорода» (21%) будет равна 160 мм рт. ст. При увеличении общего давления вдвое парциальное давление кислорода

также удвоится, однако датчик отреагирует на такое изменение как на увеличение концентрации растворенного кислорода. Именно по этой причине калибровка измерительной системы по воздуху (в % содержания кислорода) действительна только при общем давлении 1 атм. При ином давлении необходимо проводить настройку по образцу, так как растворимость газа пропорциональна его парциальному давлению над жидкостью.

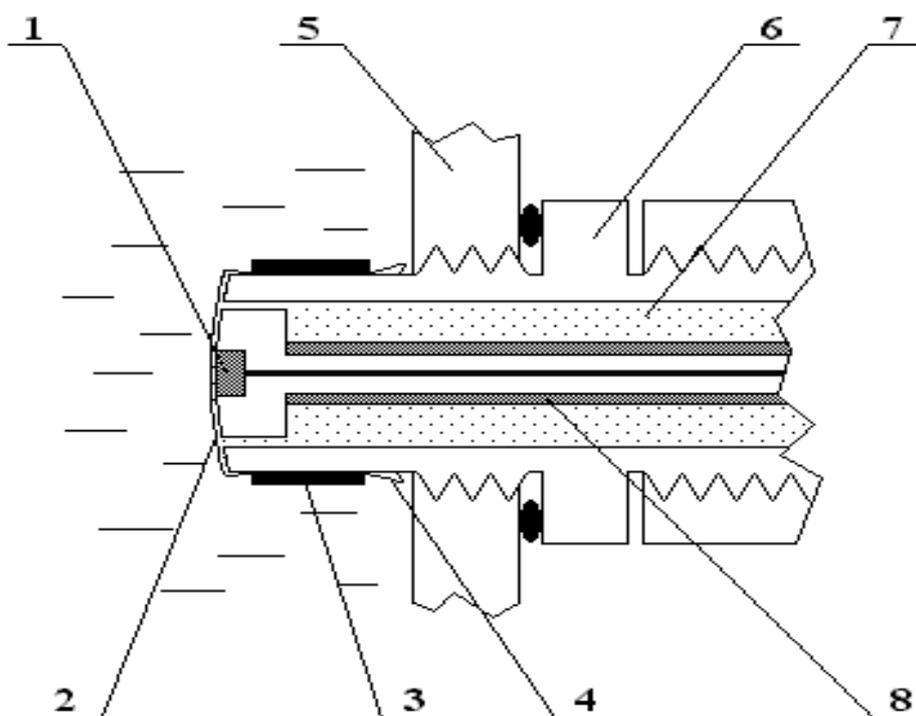


Рисунок 6 - Особенности конструкции кислородного датчика.

1 - катод; 2 - мембрана; 3 - резиновая манжета; 4 - складки мембраны; 5 - стенка измерительной ячейки; 6 - корпус; 7 - электролит; 8 - анод.

В основу измерения концентрации кислорода в воде положен амперометрический метод. Измерения производятся с помощью амперометрического датчика растворенного в воде кислорода.

Молекулы растворенного в воде кислорода диффундируют через газопроницаемую мембрану датчика и восстанавливаются на катоде. На аноде происходит реакция окисления. Генерируемый при этом электрический ток пропорционален концентрации кислорода в воде при условии постоянства температуры.

2.2 Хлорортугьбензол

Белковые каналы AQP1 могут быть обратимо блокированы с помощью ионов ртути Hg^{2+} . Этот эффект объясняется наличием специфического аминокислотного остатка в узкой части канала белка аквапорина – цистеина, содержащего SH-группу. Ртутьорганические вещества реагируют с этой группой, какой бы молекуле она не принадлежала, водному каналу или другому белку. Ингибирование аквапорина очень специфично к Hg^{2+} и некоторым небольшим ртутьорганическим SH-реагентам, таким как п-хлормеркурибензол и п-хлормеркурибензолсульфонат, которые широко используются в экспериментах.

3 Экспериментальная часть

3.1 Объекты и методы

Объектом исследования в данной работе являются эритроциты, выделенные из венозной крови человека. В качестве антикоагулянта, для предотвращения свертывания, использовать гепарин в концентрации 50 ед/мл.

Все измерения проводить при температуре 20° С.

Для экспериментов использовать:

- 1) Эритроциты в физрастворе;
- 2) эритроциты, обработанные блокатором РСМВ (1 мкл РСМВ, 1мл эритроцитов в плазме).

Проницаемость мембран эритроцитов для кислорода определять на основе измерений с помощью датчика растворенного кислорода кинетики концентрации кислорода в физрастворе при продувании образца воздухом. Из образца кислород удалять продуванием азотом.

Эксперименты с РСМВ проводить аналогичным образом.

Эксперименты проводить в физиологическом растворе (140 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, pH = 7.4).

3.2 Модель

Для анализа экспериментальных результатов использовать математическую модель, которая описывает кинетику изменения концентрации кислорода в эритроцитах и физрастворе при продувании образца атмосферным кислородом.

V — объем образца без кислорода;

N — суммарное количество эритроцитов;

V_E — объём одного эритроцита;

O^r — концентрация кислорода в физрастворе;

S_E — площадь поверхности эритроцита;

p — проницаемость для кислорода мембран эритроцитов;

p_v — константа кюветы;

k_1 — константа связывания гемоглобина с кислородом эффективная;

k_2 — константа диссоциации гемоглобина с кислородом эффективная;

O^e — концентрация кислорода в эритроцитах;

O^v — концентрация кислорода в пузырьках воздуха;

GOO — общая концентрация всех форм гемоглобина в эритроците;

$G1$ — концентрации свободной формы гемоглобина

$$(V - N \cdot V_E) \frac{d O^v}{dt} = -p \cdot S_E \cdot N \cdot (O^v - O^e) + p_v \cdot (O^v - O^r),$$

$$V_E \cdot \frac{d O^e}{dt} = p \cdot S_E \cdot (O^v - O^e) - V_E \cdot (k_1 \cdot G1 \cdot O^e - k_2 \cdot (GOO - G1)), \quad (1)$$

$$\frac{d G1}{dt} = -k_1 \cdot G1 \cdot O^e + k_2 \cdot (GOO - G1),$$

В безразмерной форме будет:

$$\frac{d o}{dt} = -p \cdot b_1 \cdot (o - o^e + p_v) \cdot (o - o^r),$$

$$\frac{d b}{dt} = p \cdot \alpha \cdot (o - o^e - G) - k_1 \cdot g \cdot b + k_2 \cdot c \cdot (1 - g), \quad (2)$$

$$\frac{d g}{dt} = -k_1 \cdot O_2^e \cdot g \cdot b + k_2 \cdot (1 - g),$$

где O_2^e значение концентрации кислорода в растворе при насыщении его

воздухом, $o^r = \frac{O^r}{O_2^e}$, $o^e = \frac{O^e}{O_2^e}$, $\alpha = \frac{S_E}{V_E}$, $\frac{V}{N \cdot V_E} = \frac{1}{GEM}$, $g1 = \frac{G1}{GOO}$,

$$b = \frac{\alpha}{\left(\frac{1}{GEM} - 1\right)}, c = \frac{G00}{O_2^v}.$$

Система уравнений (2) использовать для определения проницаемости эритроцитов на основе экспериментальных измерений кинетики концентрации кислорода при продувании образца кислородом (см. выше). Этот анализ проводить с помощью программы, написанной в SciLab.

3.3 Экспериментальная установка

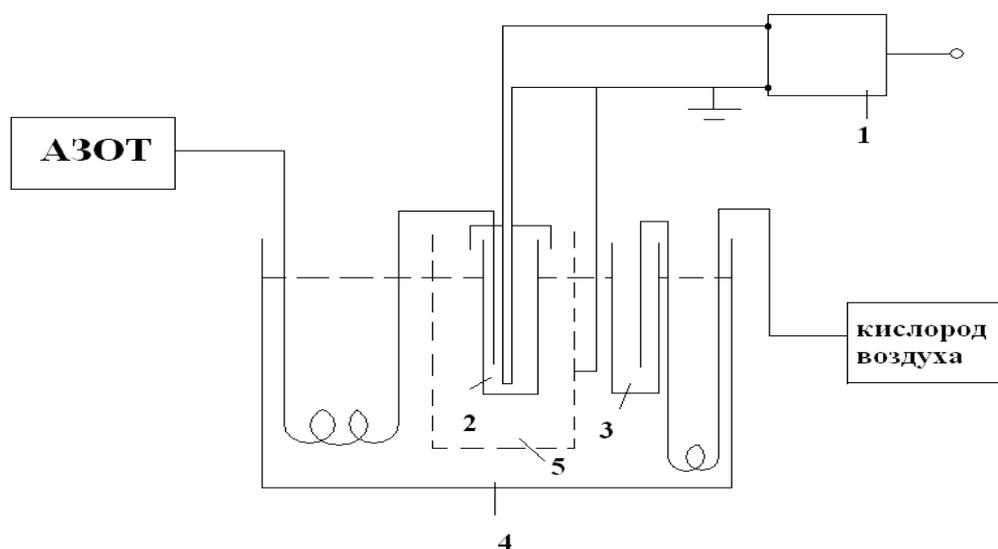


Рисунок 7 - Схема экспериментальной установки.

1. Оксиметр – измеритель растворенного кислорода.
2. Первая пробирка с образцом, из которого кислород выдувается азотом.
3. Вторая пробирка с образцом, который насыщается кислородом воздуха.
4. Термостат.
5. Экранирующая камера, блокирующая электромагнитное излучение посторонних приборов.

Эксперименты проводить при температуре 20°C , поддерживаемой при помощи термостата с точностью до 0.01°C .

4. Задание на исследования

4.1 Измерения кинетики концентрации кислорода при продувании образца воздухом (физиологический раствор)

Провести серию контрольных экспериментов на физрастворе (5 экспериментов).

На рисунке 11 представлена кинетика изменения концентрации кислорода в физрастворе, которая была нормирована по концентрации кислорода в атмосфере.

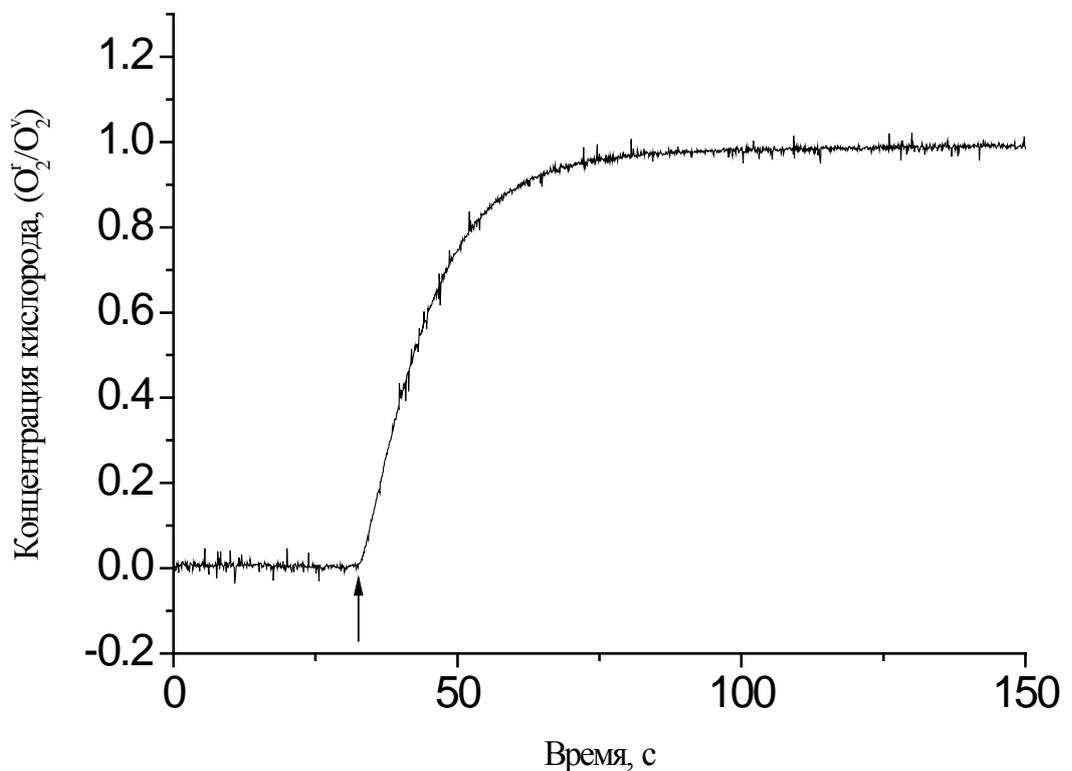


Рисунок 8 - Кинетика изменения концентрации растворенного кислорода в физрастворе при продувании воздухом.

На основе этих кривых с помощью модели при $G_{OO} = 0$, получить константу кюветы. Найти среднее значение и дисперсию.

4.2 Определение проницаемости мембран эритроцитов для кислорода

Провести серию экспериментов для определения проницаемости мембран интактных эритроцитов для кислорода (5 экспериментов).

Кровь с помощью центрифугирования отмыть от плазмы физраствором, далее приготовленный образец крови (4 мл) поместит в пробирку. Кислород удаляется из раствора крови азотом. Далее бескислородный раствор продуть атмосферным воздухом и регистрировать динамику изменения концентрации кислорода в растворе крови. На рисунке 9 представлена образцовая кривая динамики насыщения раствора крови кислородом.

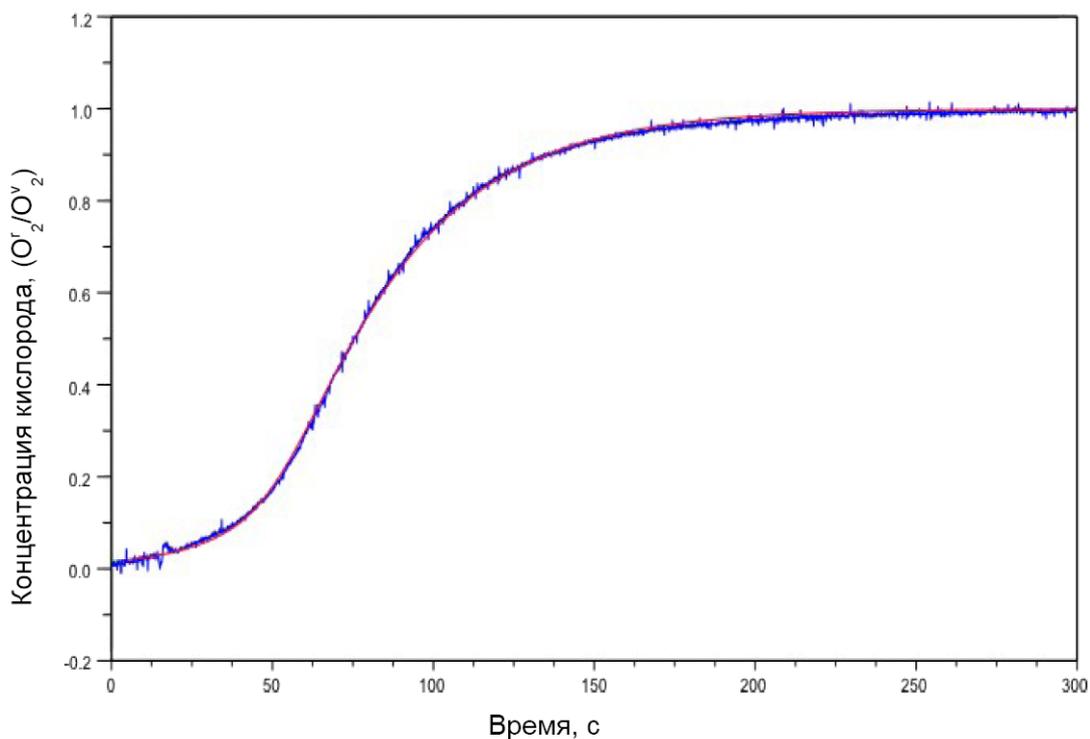


Рисунок 9 - Изменение концентрации растворенного кислорода в растворе крови при насыщении бескислородного раствора крови кислородом.

По этим кривым с помощью математической модели ($GOO = 0.04$) найти значения проницаемости мембран эритроцитов. Найти среднее значение и дисперсию.

4.3 Влияние блокатора аквапорина на проницаемость мембран эритроцитов

Измерить проницаемость мембран эритроцитов в случае ингибирования аквапоринов. Для этого провести серию экспериментов с блокатором (5 экспериментов).

После отмывания эритроцитов к суспензии эритроцитов добавить блокатор аквапоринов РСМВ в концентрации 0.01 мл. (суспензия выдерживать 20 минут). Далее раствор эритроцитов с блокатором продувать атмосферным кислородом и регистрировать динамику изменения концентрации кислорода.

На рисунке 10 представлена примерная кривая.

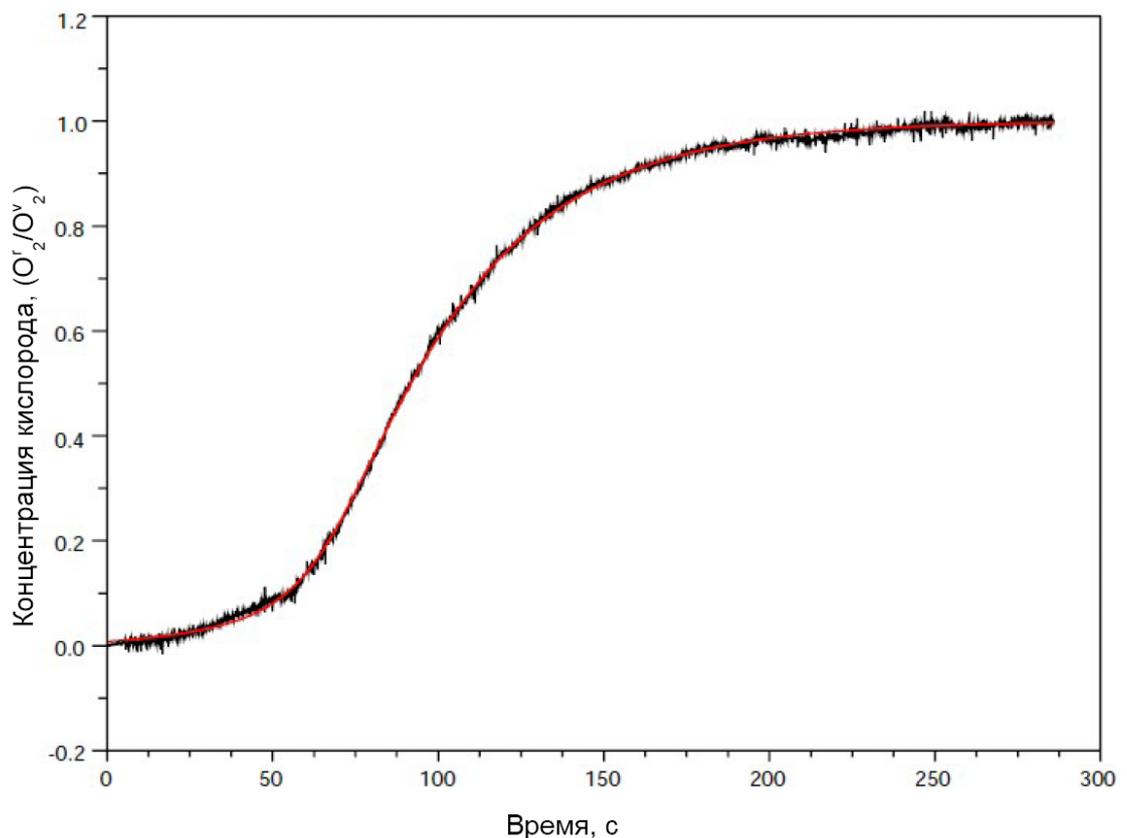


Рисунок 10 - Кинетика изменения концентрации растворенного кислорода в растворе крови с ингибированными эритроцитами.

По экспериментальным результатам с помощью математической модели построить таблицу численных значений проницаемостей для

кислорода интактных мембран эритроцитов и мембран обработанных блокатором аквопоринов.

Оценить вклад транспорта кислорода через аквопорины.

Система уравнений (2) использовать для определения проницаемости эритроцитов на основе экспериментальных измерений кинетики концентрации кислорода при продувании образца кислородом (см. выше). Этот анализ проводить с помощью программы, написанной в SciLab.

По полученным результатам сделать выводы.

Контрольные вопросы

- 1) Какова роль AQP1 в транспорте газов через мембрану эритроцитов?
- 2) Какие существуют блокаторы AQP1 каналов.
- 3) Какова константа диффузии O_2 в липидах?
- 4) На каком принципе работает датчик измерения концентрации кислорода в растворе?
- 5) Как можно удалить кислород из раствора?
- 6)

Список литературы

1. Антонов, В.Ф. Биофизика мембран / В.Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. - №6. - С. 4 – 12.
4. Kreuzer, I. Influence of red cell membrane on diffusion of oxygen / Kreuzer, Yahr // J. Appl. Physiol. – 1960. – V. 15. – P. 1117 – 1122.
5. Hartridge, H. The rate of distribution of dissolved gases between the red blood corpuscle and its fluid environment. Part I. Preliminary experiments on the rate of uptake of oxygen and carbon monoxide by sheep's corpuscles / H. Hartridge, F. J. W. Roughton // J. Physiol. – 1927. – V. 62. – P. 232 – 242.
6. Huxley, V.H. The effect of the red cell membrane and a diffusion boundary layer on the rate of oxygen uptake by human erythrocytes / V. H. Huxley, H. Kutchai // J. Physiol. – 1981. – V. 316. – P. 75 – 83.
7. Coin, J.T. The rate of oxygen uptake by human red blood cells / J.T. Coin, J.S. Olson // J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254. – P. 1178 – 1190.
8. Fischkoff, S. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene / S. Fischkoff, J.M. Vanderkooi // J. Gen. Physiol. – 1975. – V. 65. – P. 663 – 676.
9. Локтюшкин, А.В. Особенности транспорта кислорода через мембрану эритроцитов / А.В. Локтюшкин // http://www.ceninauku.ru/info/page_10788.htm
10. Rubin, A.B. Oxygen channels of erythrocyte membrane / A.B. Rubin, I.I. Ivanov, A.V. Loktyushkin, R.A. Gus'kova, N.S. Vasil'ev, G.E. Fedorov // Doklady Akademii Nauk. – 2007. – V. 414. – P. 697 – 700.
11. Echevarría, M. Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression / M. Echevarría, A.M. Muñoz-Cabello, R. Sánchez-Silva, J.J. Toledo-Aral, J. López-Barneo // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – P. 207-215.

12. Ashley, D. Time dependence of the effect of p-chloromercuribenzoate on erythrocyte water permeability: a pulsed nuclear magnetic resonance study / D. Ashley, J. Goldstein // *J. Membrane Biol.* – 1981. – V. 61. – P. 199 – 207.

13. Ivanov, I. I. Oxygen Channels of Erythrocyte Membrane / I.I. Ivanov, A.V. Loktyushkin, R.A. Gus'kova, N.S. Vasil'ev, G.E. Fedorov, A.B. Rubin // – 2007. – *Doklady Akademii Nauk.* – 2007. – V. 414, No. 5. – P. 697–700.

14. Borgnia, M. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels / M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, P. Agre // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – V. 68. – P. 425-458.

15. Kyama, Y. Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver / Y. Kyama, T. Yamamoto, D. Kondo // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 329 - 333.