



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 612.014

БЕЛКИ МЕМБРАН И СИСТЕМЫ ПАССИВНОГО ТРАНСПОРТА НЕЭЛЕКТРОЛИТОВ

1. КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПАССИВНОГО ТРАНСПОРТА МОНОСАХАРИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ

Вайсберг Е. Ф., Антонов В. К.

*Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова;*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Кратко рассматриваются общие принципы классификации мембранного транспорта. Обсуждаются основные типы кинетических экспериментов для систем пассивного транспорта и методики измерения кинетических параметров в эритроцитах. В исторической последовательности анализируются на стационарном уровне пять классов кинетических моделей пассивного транспорта неэлектролитов в эритроцитах: 1) модели моновалентных переносчиков, 2) модели составных мембранных барьеров, 3) модели бивалентных переносчиков, 4) модели моновалентных пор, 5) модели бивалентных пор. Для каждой из указанных моделей приводятся кинетические схемы, на основе которых обсуждаются фундаментальные параметры, входящие в основные уравнения однонаправленных потоков. Рассматривается связь фундаментальных параметров моделей с экспериментальными кинетическими параметрами, определенными с помощью различных транспортных методик. Адекватность моделей оценивается в свете экспериментальных данных по кинетике пассивного транспорта мопосахаридов в эритроцитах человека. В заключение обсуждаются возможности и ограничения стационарно-кинетического подхода к решению проблемы механизма пассивного транспорта.

С о д е р ж а н и е о б з о р а

Введение	301
I. Основные методы кинетических измерений	304
II. Модели моновалентных переносчиков	304
II. 1. Симметричные модели моновалентных переносчиков	304
II. 2. Асимметричные модели моновалентных переносчиков	309
III. Модели составных мембранных барьеров	314
IV. Модели бивалентных переносчиков	319
IV. 1. Модель антипараллельных переносчиков	321
IV. 2. Модель различных переносчиков	323
V. Модели моновалентных пор	324
VI. Модели бивалентных пор	326
Заключение	331

ВВЕДЕНИЕ

Проявление биологической активности химических соединений в большинстве случаев зависит от их способности проникать через плазматические мембраны и цитомембраны клеток. Механизмы, с помощью кото-

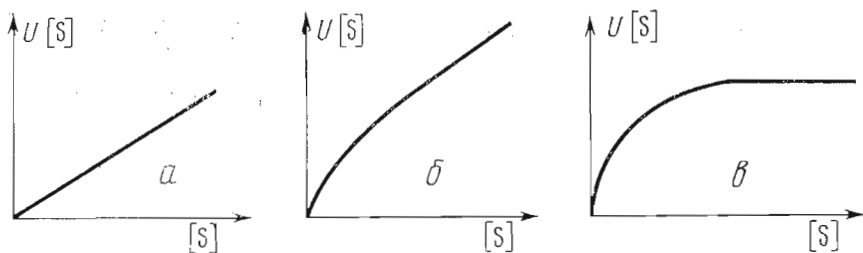


Рис. 7. Вид транспортных функций для трех различных типов трансмембранного движения: *a* — простой диффузии, *б* — облегченной диффузии, *в* — пассивного транспорта. Однонаправленные потоки (U) субстрата (S) отложены против его концентраций на одной из сторон мембраны. Концентрация субстрата на другой стороне мембраны предполагается равной нулю

рых клетки животных обмениваются различными метаболитами с омывающими растворами, отличаются большим разнообразием, и в настоящее время можно выделить следующие наиболее общие способы прохождения химических соединений через биологические мембраны.

Простая диффузия. При простой диффузии вещества проходят через мембрану в результате случайного молекулярного движения, а величина диффузионного потока линейно зависит от разности концентраций и коэффициента проницаемости мембраны для данного вещества, согласно уравнению Фика:

$$U = P\Omega(S_1 - S_2), \quad (1)$$

где $U = dn/d\tau$ — поток (количество вещества n , проходящее за время τ через поверхность Ω); P — коэффициент проницаемости мембраны, равный D/x (D — коэффициент диффузии в мембране, x — толщина мембраны); S_1 и S_2 — соответственно наружная и внутренняя концентрации переносимого вещества (рис. 1, *a*).

Простая диффузия химических соединений через биомембрану может осуществляться по двум основным путям: через гидрофобные участки для липофильных соединений и через гидрофильные поры (радиусом 3—4 Å) для полярных молекул небольших размеров. В первом случае коэффициент проницаемости зависит от молекулярного веса вещества, размеров молекулы, коэффициента распределения в системе углеводород — вода, а также от липидного состава самой мембраны [1—3]. Во втором случае проницаемость ограничивается только размером молекул и характерна для таких веществ, как вода, мочевины и некоторые другие, радиус молекул которых меньше 3 Å [4, 5].

Облегченная диффузия. Термин «облегченная диффузия» часто применяется для обозначения любого типа транспорта, протекающего по электрохимическому градиенту переносимого субстрата с помощью специфических транспортных систем (переносчиков в широком смысле). Однако понятие «транспорт» шире понятия «диффузия» и в общем случае не отождествляется с ним, так как не ограничивает все возможные механизмы переноса лишь хаотическим тепловым движением субстрата и его комплекса с переносчиком, а также не подчиняется принципу независимости диффузионных потоков [2, 6, 7]. Поэтому, очевидно, более корректным будет рассматривать облегченную диффузию как частный случай пассивного транспорта и определять ее как свободное и совместное движение и взаимодействие вещества и переносчика путем истинной молекулярной диффузии через осмотический барьер. Кинетически такая система будет характеризоваться отсутствием конечной максимальной скорости транспорта за счет способности свободного вещества диффундировать независимо от переносчика при полном насыщении последнего [8] (рис. 1, *б*).

Пассивный транспорт (вторичные реакции транслокации) — это селективный перенос веществ через осмотический барьер, опосредованный специфической транспортной системой и не зависящий от внешних (метаболических) источников энергии в любой форме. Для простейшей несопряженной системы пассивного транспорта направление суммарного потока переносимого вещества определяется в общем случае его трансмембранным электрохимическим градиентом. Обычно с помощью систем пассивного транспорта в клетку поступают полярные вещества или ионы, простой диффузией которых через липидную фазу мембраны можно пренебречь. В этом случае однонаправленный поток субстрата нелинеен и стремится к максимальному значению при концентрациях, обеспечивающих полное насыщение всех транспортных систем [8—10] (рис. 1, в).

Активный транспорт. В ряде случаев термин «активный транспорт» трактуется весьма широко, охватывая все типы аккумуляирования и интенсивного вывода веществ из клеток. Однако иногда накопление вещества может обеспечиваться его связыванием с внутриклеточными компонентами [11, 12], а также быстрой утилизацией внутри клетки, и поэтому более правильным будет определить активный транспорт как селективный перенос вещества через осмотический барьер против его электрохимического градиента, опосредованный специфической транспортной системой и происходящий за счет прямой затраты метаболической энергии (первичный активный транспорт, первичные реакции транслокации) или за счет сопряжения (симпорта или антипорта) с другим первичным активным процессом (вторичный активный транспорт) [13, 14].

Транспорт, включающий химическую модификацию субстрата при переносе через мембрану [9, 15].

Эндоцитоз, характерный для макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) [16].

В клетках животных главную роль в переносе таких функциональных метаболитов, как моносахариды, аминокислоты и органические анионы, играют системы пассивного транспорта. Важность изучения этого типа трансмембранного переноса очевидна еще и потому, что здесь мы имеем дело со специфической автономно функционирующей транспортной системой в чистом виде, а не в совокупности с факторами энергетического сопряжения, как в случае активного транспорта.

Классической, наиболее изученной системой пассивного транспорта у животных является система транспорта моносахаридов в эритроцитах. Эта система не нуждается в сопряжении с какими-либо энергодонорными процессами, что в сочетании с относительной простотой самих клеток эритроцитов и методов работы с ними делает ее прекрасным экспериментальным объектом и пробным камнем для проверки различных теорий пассивного транспорта. Поэтому в последние десятилетия при работе на этой системе был накоплен огромный экспериментальный материал, стимулировавший развитие теоретических представлений общеприкладного значения.

Однако с момента написания существующих обзоров по этой теме [5, 13, 17—20, 41] появились важные новые данные, заставившие пересмотреть некоторые ранние представления в этой области.

Цель нашего обзора, в котором использована литература до середины 1976 г., — анализ развития теоретических представлений в области кинетики пассивного транспорта неэлектролитов на примере системы переноса сахаров в эритроцитах человека. В обзоре обсуждается только формально-кинетическая сторона приведенных моделей и соответственно адекватность этих гипотез оценивается лишь на основе чисто кинетических экспериментов. Однако возможности применяемых макрокинетических стационарных методов ограничены, и для истинного познания молекулярных механизмов пассивного транспорта необходим комплексный подход, включающий в себя изучение различных свойств транспортных

систем с использованием всей совокупности имеющихся в энзимологии и мембранной биологии методов исследования.

Поскольку эти вопросы представляют особый интерес, им посвящены наши последующие обзоры, где будут рассмотрены свойства белков транспортных систем бактерий (II) и эритроцитов человека (III).

I. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ КИНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

Наиболее распространенными методами измерения кинетических параметров транспорта являются изотопный [21], фотометрический (при котором скорость транспорта регистрируется по изменению светорассеяния суспензии при увеличении или уменьшении объема эритроцитов) [22, 23], а также химический [24]. Кроме того, недавно был предложен новый способ определения скоростей транспорта моносахаридов с помощью газовой хроматографии [25]. Этот метод более чувствителен, чем фотометрический, и сравним по чувствительности с изотопными методами определения транспортных характеристик.

Указанные подходы обычно применяются при работе с интактными эритроцитами, однако в последние годы ряд интересных экспериментов был проведен на клетках, частично или полностью освобожденных с помощью гемолиза от внутриклеточного гемоглобина, называемых соответственно «розовыми» и «белыми» теньями эритроцитов [26—29]. Для работы с теньями эритроцитов классические кинетические методы не всегда пригодны, и поэтому недавно был разработан специальный способ определения скорости поступления глюкозы в тени эритроцитов, а также в мембранные пузырьки. Он основан на введении во внутреннее пространство теней ферментов глюкозооксидазы и каталазы, быстро метаболизирующих поступающую глюкозу, и измерении с помощью кислородного электрода скорости убыли кислорода о соответствующих реакциях [30].

Скорость транспорта сахаров в эритроцитах разных животных существенно различна, и если в эритроцитах кролика она достаточно мала и измеряется обычными методами [31], то в эритроцитах человека при физиологических температурах она достигает настолько значительных величин, что приходится применять специальные методы быстрого внесения сахара в раствор [24, 32], а при анализе клеток на содержание сахара в момент окончания опыта производится быстрое охлаждение до 0° и высшие стабилизаторы [33].

II. МОДЕЛИ МОНОВАЛЕНТНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ

II. 1. Симметричные модели моновалентных переносчиков

Около 30 лет назад впервые было обнаружено, что кинетика транспорта моносахаридов в эритроцитах не подчиняется простому закону Фика для диффузии [34, 35]. Дальнейшее накопление фактов в этой области привело к появлению концепции переносчика, т. е. вещества, обладающего определенным сродством к данной (обычно полярной) молекуле или к ряду подобных молекул и способного осуществить их транслокацию через липидный диффузионный барьер. В современной форме гипотеза подвижного переносчика была сформулирована в 1952 г. Уиддасом первоначально как рабочая модель для изучения кинетики транспорта глюкозы через плаценту овец [36], а вскоре как количественная основа для интерпретации различных аспектов транспорта сахаров в эритроцитах человека [37]. Уиддас, в рамках стационарного подхода, постулировал быстрое обратимое адсорбционно-десорбционное равновесие между субстратами (сахарами) и мембранными переносчиками, симметричное на обеих поверхностях мембраны, а также определяющую

скорость всего процесса трансмембранную миграцию комплексов субстрат—переносчик и свободных переносчиков, протекающую с равными скоростями и симметричную в отношении направления переноса (рис. 2). Таким образом, по первоначальной схеме перенос субстрата при данных условиях полностью определялся двумя основными константами: константой скорости трансмембранной миграции, зависящей от подвижности переносчиков и их комплексов внутри транспортного барьера, и константой сродства для каждого специфического субстрата.

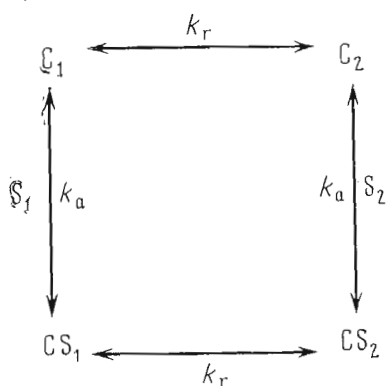


Рис. 2. Простейшая симметричная модель переносчика. k_r — константа скорости движения переносчика или его комплекса в мембране, k_a — константа сродства к субстрату

Следующий шаг в развитии представлений в этой области был сделан Розенбергом и Уилбрандтом [38]. На основе ряда модельных экспериментов, а также учитывая отмеченную большинством авторов стереоспецифичность транспорта, они пришли к выводу о белковой природе переносчика и связали пассивный транспорт со специфической ферментативной активностью, рассматривая транспортный белок как «катализатор» переноса молекулы субстрата через осмотический барьер. Это привело к появлению ряда новых экспериментальных и теоретических подходов.

Во-первых, стали предприниматься попытки идентификации, изучения и изоляции участвующих в транспорте белков из бактериальных и животных объектов (см. обзоры [39—42], также II и III данной серии).

Во-вторых, с развитием представлений о белковой природе транспортной системы первоначальное понятие внутримембранного теплового движения переносчика (механизм подвижного переносчика) в ряде работ было заменено на идею конформационных изменений в белковой молекуле [43, 44]. Так, Видавером [45] была предложена модель (рис. 3), в которой аллостерические конформационные переходы приводят к периодическим изменениям в доступности связывающего участка для внутренней и внешней примыкающих сред (модель «шлагбаума»), и доказана полная кинетическая эквивалентность подобной схемы и модели подвижного переносчика. Поэтому на уровне кинетического анализа все эти гипотезы можно объединить в одну «классическую модель переносчика», подразумевая под самим переносчиком молекулу, способную экспонировать свой связывающий участок попеременно то на одну, то на другую сторону мембраны.

Наконец, третьим важнейшим следствием указанного подхода явилось применение к транспортным процессам основных понятий ферментативной кинетики и сопоставление приведенных выше транспортных констант с обычными параметрами Михаэлиса — Ментен: максимальной скоростью и константой Михаэлиса. Сейчас стало привычным обсуждать кинетику транспорта сахаров и пассивного транспорта вообще главным образом в терминах V и K_m ; был предложен ряд методов определения этих параметров для глюкозотранспортной системы эритроцитов (табл. 1).

Рассмотрим основные приведенные в табл. 1 методики, каждая из которых использует предельную кинетическую ситуацию.

Методика «равновесного обмена». Клетки уравниваются с субстратом при различных его концентрациях, и скорость однонаправленного транспорта определяется с использованием радиоактивной метки. При этом изменения общей концентрации сахара по обе стороны мембраны не происходит, и единственное, что может быть измерено, — это дви-

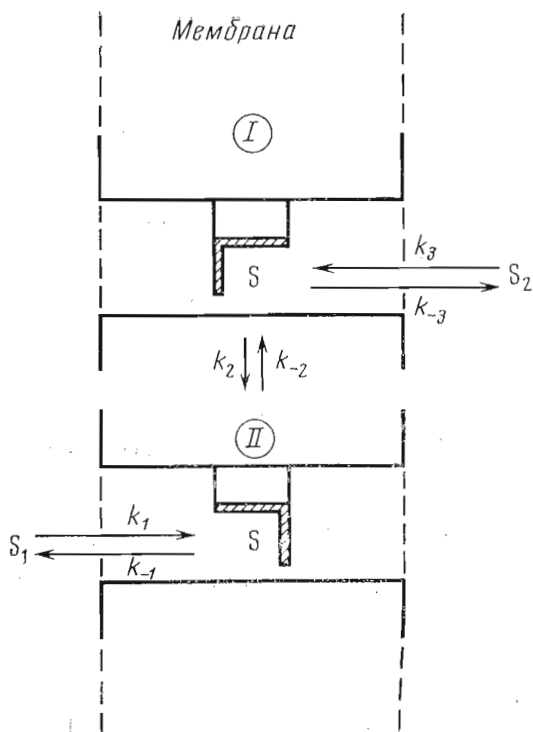


Рис. 3. Аллостерическая модель Видавера [45]. Субстрат (S) на стороне 2 мембраны обратимо связывается с рецепторным участком (k_3 , k_{-3}), находящимся в состоянии I. Затем происходит изменение конформации участка в состояние II (k_2 , k_{-2}), допускающее обратимую диссоциацию субстрата на стороне 1 (k_1 , k_{-1}). Возможны также спонтанные переходы между состояниями I и II без субстрата (k_4 , k_{-4}). Заштрихованный «шлагбаум» может, например, соответствовать полипептидным участкам, расположенным так, что они попеременно блокируют доступ субстрата к связывающему центру то с одной, то с другой стороны

жение субстрата в одном направлении. Параметры V и K_m определяются из зависимости скорости транспорта от равновесной концентрации субстрата [21, 46, 47].

Методика «цис-насыщения». По этой методике, первоначально предложенной Сенон и Уиддасом [48], концентрация субстрата в «цис»-растворе доводится до предельно высокого (насыщающего) уровня, так что ее дальнейшее повышение не влияет на скорость переноса, а в «транс»-растворе варьируется. Суммарный поток субстрата измеряется как функция «транс»-концентрации. При равенстве «транс»-концентрации нулю поток максимален и равен V , а «транс»-концентрация, при которой поток уменьшается наполовину, определяет значение K_m . Существуют две процедуры «цис-насыщения» в зависимости от того, какая сторона мембраны принимается за «цис»-поверхность.

Методика «ноль-транс». Здесь концентрация субстрата в растворе, омывающем «транс»-поверхность, стремится к нулю, а в «цис»-растворе варьируется. Кинетические параметры V и K_m получаются из зависимости начальной скорости (потока) от «цис»-концентрации. Существуют две «ноль-транс»-методики в зависимости от того, какая сторона мембраны принимается за «транс»-поверхность [49, 50].

Методика «транс-насыщения». По этой методике однонаправленный поток в «цис» → «транс»-направлении измеряется как функция «цис»-концентрации, тогда как «транс»-концентрация стремится к бесконечности.

Основные типы кинетических экспериментов

Тип эксперимента	Внутренняя концентрация (1)	Внешняя концентрация (2)	Вид измеряемого потока
«Равновесный обмен» (<i>ee</i>)	Варьируется * = Варьируется Варьируется = Варьируется *		Однонаправленный поток
«Транс-насыщение» ** (<i>it</i>) <i>it</i> (1—2) *** <i>it</i> (2—1)	Варьируется * Предельно высокая	Предельно высокая Варьируется *	То же
«Ноль-гранс» (<i>zt</i>) <i>zt</i> (1—2) <i>zt</i> (2—1)	Варьируется Нулевая	Нулевая Варьируется	Суммарный поток
«Цис-насыщение» (<i>ic</i>) <i>ic</i> (1—2) <i>ic</i> (2—1)	Предельно высокая Варьируется	Варьируется Предельно высокая	То же

* Меченый субстрат.

** Термины «цис» и «транс» обозначают различные стороны мембраны при услозии движения измеряемого потока в «цис» → «транс»-направлении.

*** В индексах (1—2) и (2—1) первая цифра показывает, какую сторону мембраны, внутреннюю (1) или внешнюю (2), мы принимаем за «цис»-поверхность и, следовательно, в каком направлении — внутрь клетки (2—1) или из нее (1—2) — движется измеряемый поток.

Таким образом, с помощью радиоактивной метки измеряется однонаправленный поток, противоположный суммарному [50, 51].

На рис. 2 приведена кинетическая схема классической модели переносчика. В рамках этой модели, полностью симметричной и определяемой параметрами V и K_m , можно было интерпретировать эффект противотока (рис. 4), т. е. возможность индуцировать поток вещества А против градиента его концентрации противоположно направленным самопроизвольным потоком другого вещества В [52], если эти два субстрата используют одну транспортную систему. Эта модель объясняла также эффекты конкурентного ингибирования [53], заключающиеся в изменении скорости входа В в присутствии А (рис. 4, е). Подобные эффекты часто рассматриваются как доказательство наличия переносчиков, так как они отражают взаимозависимость трансмембранных потоков различных частиц, обусловленную ограниченным количеством общих переносчиков. Однако надо быть осторожным в тех случаях, когда из факта отсутствия противотока делается вывод о том, что транспорт не опосредован переносчиком, так как Уилбрандт показал в своем анализе [7], что демонстрация противотока возможна лишь в определенном интервале степени насыщения транспортной системы и при низких значениях K_m .

В 1963 г. Розенберг и Уилбрандт на основании теоретического анализа пришли к заключению, что введение в первоначальную схему неравных подвижностей для свободного и нагруженного переносчиков вызывает ряд изменений в кинетике транспорта, включая зависимость однонаправленных потоков в «цис» → «транс»-направлении от «транс»-концентрации [54]. Через несколько лет Левин с соавт. [55], Маве и Хемплинг [56], а впоследствии Миллер [46] показали, что максимальная скорость обмена глюкозы в эритроцитах в 1,9—2,5 раза превосходит максимальную скорость чистого выхода, т. е. что внешняя глюкоза промотирует выход внутренней. Это было объяснено тем, что выход лимитируется возвращением переносчика на внутреннюю сторону мембраны, а пере-

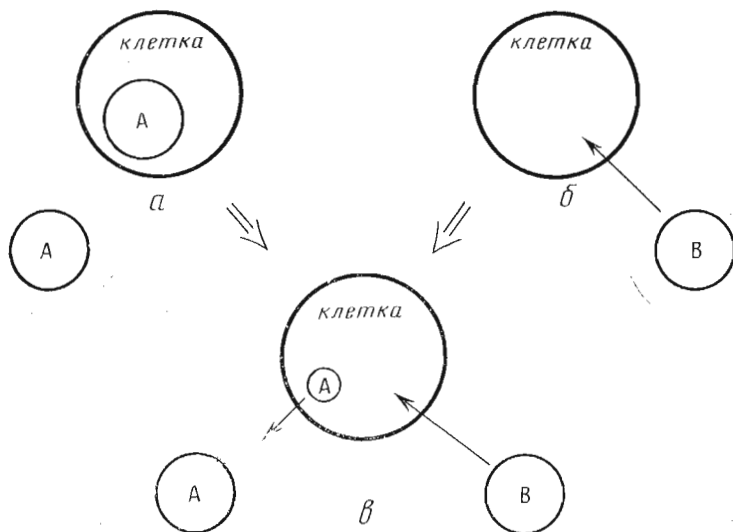


Рис. 4. Схематическое изображение эффекта противотока [7]: *а* — субстрат А уравнивается с клеткой: $A = A$ и суммарный поток равен нулю; *б* — субстрат В, находящийся только снаружи, проникает в клетку с определенной скоростью; *в* — противоток, т. е. выход субстрата А из клетки против своего градиента в присутствии снаружи В, возникающий при наложении ситуаций *а* и *б*, если оба субстрата используют одну транспортную систему. Стрелками обозначены суммарные потоки А и В, окружностями — экстра- и интрацеллюлярные пулы этих субстратов

носчик, нагруженный наружным сахаром, движется в несколько раз быстрее, чем свободный (рис. 5). Таким образом, число параметров, необходимых для полной характеристики системы, возрастает до трех: два значения константы скорости транслокации для свободного и нагруженного переносчиков и одно значение константы сродства.

Однако в простой классической схеме оставалось важное упрощение: предполагалось, что скорость реакций ассоциации-диссоциации много больше скоростей реакций транслокации, из чего следует возможность установления симметричных квазиравновесий между субстратами и переносчиками на обеих мембранных поверхностях (рис. 2, 5). Эту точку зрения отстаивал, в частности, Хоур, который на основании своих критерияльных зависимостей и данных по транспорту лейцина в эритроцитах пришел к выводу, что транслокация переносчика является лимитирующим этапом процесса [57, 58]. Однако его данные недавно были подвергнуты обоснованной критике [59], и в настоящее время большинство авторов считают, что обе стадии должны сливаться при аналитическом описании транспорта на стационарном уровне [7, 59, 60].

Учет в формализме модели того, что при достаточно большой скорости движения переносчика он не будет находиться в равновесии с субстратом при связывании на обеих сторонах мембраны, был сделан в работе Даусона и Уиддаса еще в 1964 г. [61].

При снятии этих ограничений единственным произвольным допущением классической модели переносчиков оставалась симметрия ее параметров относительно сторон мембраны и направлений движения (рис. 6). Однако и в таком виде модель переносчиков не могла объяснить появляющихся данных по кинетике глюкозотранспортной системы в эритроцитах человека. Начиная с 1962 г. стали накапливаться факты, противоречащие симметричной модели переносчика, а в 1968 г. в серии работ Миллера была окончательно показана неприменимость этой гипотезы в симметричной форме [46, 62]. Анализ противоречий между экспериментальными данными по транспорту сахаров в эритроцитах и симметричной моделью пере-

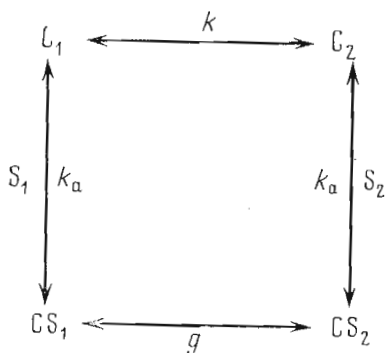


Рис. 5

Рис. 5. Симметричная модель с неравными подвижностями свободного (k) и нагруженного (g) переносчика, $g > k$; $k_a \gg g, k$

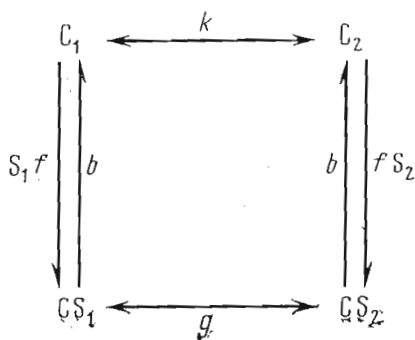


Рис. 6

Рис. 6. Обобщенная симметричная модель переносчика: k и g — константы скоростей переходов между формами 1 и 2 для свободного и нагруженного переносчика соответственно. f и b — константы скоростей соответственно прямой и обратной реакций между субстратом и переносчиком

носчика приведен в целом ряде работ [17, 63, 64, 49], и в настоящее время неадекватность этой кинетической схемы не вызывает сомнений. Тем не менее в качестве примера можно рассмотреть несоответствие между двумя основными соотношениями, вытекающими из симметричной модели переносчиков, и экспериментальными данными по транспорту глюкозы и галактозы, приведенными в табл. 2. Анализ модели переносчиков в форме рис. 6 приводит к следующим соотношениям между константами Михаэлиса для различных методов (табл. 1) [17]:

$$K_{1-2}^{ic} \geq K_{1-2}^{zl}, \quad (2)$$

$$K_{1-2}^{ic} \geq \frac{1}{2} K^{ee}. \quad (3)$$

Из табл. 2 видно, что, хотя схема предсказывает, что K_{1-2}^{ic} больше или равно K_{1-2}^{zl} и половине K^{ee} , фактическое значение K_{1-2}^{ic} всегда на порядок меньше, чем K_{1-2}^{zl} и K^{ee} . Следовательно, последняя возможность сохранения самой концепции переносчика заключалась в снятии ограничений симметрии с параметров V и K_m .

II. 2. Асимметричные модели моновалентных переносчиков

Первая асимметричная модель, использующая минимум упрощающих предположений, была предложена Регеном и Морганом [31]. В дальнейшем варианты асимметричных схем приводились в работах Миллера [65], Лако с соавт. [51], Гека [66], а также Лейба и Штейна [60, 67]. Так как в каждой из этих работ формализм моделей развивается на основе различной терминологии и символики, в качестве основы для дальнейшего обсуждения целесообразно принять наиболее общий и математически наглядный стационарный анализ Лейба и Штейна [60], в терминах которого будет рассмотрен также и ряд более сложных моделей.

Схема обобщенной асимметричной модели переносчиков приведена на рис. 7. Для получения стационарных концентраций форм C и CS в работе [60] был использован диаграммный метод Кинга и Альтмана [68], а для вывода однонаправленных потоков субстрата — анализ Бриттона [69], основанный на рассмотрении потоков, втекающих и вытекающих из четырех условных субстратных пулов, два из которых относятся к омывающим растворам 1 и 2, а два — к комплексам CS_1 и CS_2 . Кроме того, был учтен принцип микроскопической обратимости, из которого следует, что

**Экспериментальные кинетические параметры пассивного транспорта сахаров
через мембраны эритроцитов человека**

Тип эксперимента	K_m , мМ	V , мМ/мин/ /клет. ед. ^{1*}	Литература
«Равновесный обмен»			
Глюкоза ^{2*}	38 ± 3	260 ± 30	Миллер, 1968 [46]
	32 ± 1	357 ± 10	Эйлам, Штейн, 1972 [93]
	20 ± 1	264 ± 42	Лако и др., 1972 [51]
	14	300	Эдвардс, 1974 [80]
Галактоза	34 ± 6	360 ± 31	Эйлам, 1975 [47]
	138 ± 57	432 ± 44	Гинзбург, Рэм, 1975 [74]
	191 ± 17	453 ± 9	Эйлам, 1975 [47]
«Цис-насыщение» (1—2)			
Глюкоза	1,7	83	Сен, Уиддас, 1962 [48]
	1,86	210	Харрис, 1964 [94]
(25°)	1,8 ± 0,3	104 ± 12	Миллер, 1968 [46]
	2,75	130	Сен, Уиддас, 1962 [48]
	3—3,5	165	Левин, Штейн, 1966 [21]
(37°)	4,0	328	Сен, Уиддас, 1962 [48]
	5,6	590	Миллер, 1965 [95]
Галактоза	12	—	Крупка, 1971 [96]
«Цис-насыщение» (2—1)			
Глюкоза	2,8 ± 0,5	85 ± 26	Ханкин и др., 1972 [67]
Галактоза	25 ± 17; 21 ^{3*}	—	Гинзбург, Штейн, 1975 [50]
«Ноль-транс» (1—2)			
Глюкоза	25 ± 3	139 ± 11	Карлиш и др., 1972 [49]
	38	180	Фурман, 1972 (цит. по [17])
Галактоза	240 ± 57	255 ± 96	Гинзбург, Рэм, 1975 [74]
«Ноль-транс» (2—1)			
Глюкоза	1,6 ± 0,2	36 ± 1,2	Лако и др., 1972 [51]
Галактоза	11 ± 6	16 ± 6 ^{4*}	Гинзбург, Штейн, 1975 [50]
	286 ± 282	21 ± 16 ^{4*}	
«Транс-насыщение» (2—1)			
Глюкоза	1,7 ± 0,3	174 ± 3	Лако и др., 1972 [51]
Галактоза	21 ± 2	239 ± 11	Гинзбург, Штейн, 1975 [50]

^{1*} Клеточная единица — количество клеток, содержащее 1 л растворенной воды при изотонических условиях. 1 мМ/мин/клет. ед. = 7·10⁻¹⁰ мМ/см²/с (в единицах СГС) [32].

^{2*} Условия экспериментов, кроме особо указанных случаев: 20°, рН 7,4.

^{3*} Значения, полученные различными методами.

^{4*} Два участка определены нелинейным методом наименьших квадратов.

$b_1 f_2 g_2 k_1 = b_2 f_1 g_1 k_2$ [70, 71]. Так как введение дополнительных промежуточных комплексов CS_1 , CS_2 , CS_3 и т. д. не изменяет кинетическое описание процесса на стационарном уровне, кроме обычной асимметричной схемы в работе [60] был рассмотрен ее упрощенный вариант, включающий два состояния свободного переносчика и одну форму комплекса субстрат—переносчик (рис. 8), и доказана полная кинетическая эквивалентность этих двух моделей при стационарном анализе.

Для обоих случаев однонаправленный поток субстрата со стороны 1 на сторону 2 задается в общем случае уравнением

$$\frac{U_{1-2}}{T} = \frac{KS_1 + S_1 S_2}{K^2 R_{00} + K R_{12} S_1 + K R_{21} S_2 + R_{ee} S_1 S_2}, \quad (4)$$

где T — полное количество переносчиков на единице площади мембраны, а члены R и K имеют различные значения для двух вариантов асимметричной модели переносчика. В дальнейшем мы будем рассматривать лишь обычную четырехчленную модель (рис. 7), параметры которой представ-

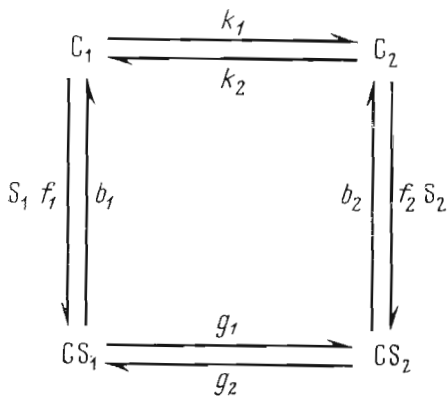


Рис. 7

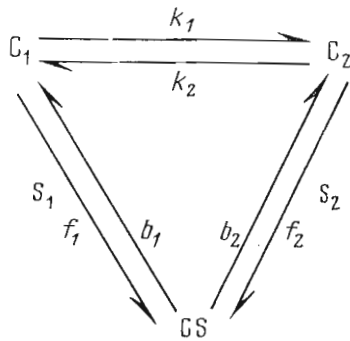


Рис. 8

Рис. 7. Обобщенная асимметричная модель переносчика: $f_1, f_2; b_1, b_2$ — константы скоростей соответственно прямой и обратной реакций между S и C на сторонах 1 и 2; $k_1, k_2; g_1, g_2$ — константы скоростей переходов между формами 1 и 2 для свободного переносчика и его комплекса соответственно

Рис. 8. Упрощенный вариант асимметричной модели переносчика с одним промежуточным комплексом субстрат—переносчик

лены в табл. 3, а соответствующий анализ упрощенной схемы можно найти в работах [60, 72]. Однонаправленный поток U_{2-1} в противоположном направлении может быть получен при замене индексов 1 и 2 в уравнении 4.

Рассмотрев уравнение 4 и табл. 3, можно прийти к выводу, что асимметричная схема, представленная на рис. 7, может быть полностью описана в терминах четырех независимых параметров: одного K и трех R , причем члены R имеют физический смысл полных сопротивлений, испытываемых транспортной системой в различных предельных экспериментальных ситуациях (табл. 1), и, следовательно, обратны соответствующим максимальным скоростям. Смысл параметра K не так очевиден, и для его интерпретации рассмотрим уравнение 4 в условиях «ноль-транс» (1—2)-эксперимента, т. е. при S_2 , равном 0. В этом случае оно имеет простую форму типа уравнения Михаэлиса — Ментен с $V = 1/R_{12}$ и $K_m = K \frac{R_{00}}{R_{12}}$. При очень низких концентрациях субстрата на «цис»-стороне, много меньших значения K_m , скорость всей реакции равна концентрации с постоянным множителем V / K_m . Так как фактически этот член представляет собой константу пропорциональности между потоком и концентрацией, он может быть условно рассмотрен как «проницаемость» и, как видно из уравнения 4, задается выражением $1/KR_{00}$. Теперь можно легко показать, что проницаемость, определенная как отношение потока к концентрации при предельно низких концентрациях субстрата, будет идентична для трех важнейших транспортных ситуаций: «ноль-транс»-процедур и эксперимента по «равновесному обмену». Следовательно, мы имеем

$$\Pi = \frac{V_{1-2}^{zt}}{K_{1-2}^{zt}} = \frac{V_{2-1}^{zt}}{K_{2-1}^{zt}} = \frac{1}{KR_{00}} = \frac{V^{00}}{K^{00}}, \quad (5)$$

где V^{00} — величина, обратная R_{00} , а $K^{00} = K$.

Таким образом, параметр K отражает гипотетическую «константу полунасыщения» для системы, не подвергающейся воздействию субстрата, а для получения реальных значений K_m он должен быть домножен на соответствующее отношение сопротивлений. В табл. 4 измеряемые величины V, K_m и Π для основных транспортных методик выражены через фунда-

Фундаментальные параметры четырехчленной обобщенной асимметричной модели переносчика

$R_{12} = \frac{1}{b_2} + \frac{1}{k_2} + \frac{1}{g_1} \left(\frac{b_2 + g_2}{b_2} \right)$ $R_{21} = \frac{1}{b_1} + \frac{1}{k_1} + \frac{1}{g_2} \left(\frac{b_1 + g_1}{b_1} \right)$ $R_{00} = \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2}$ $R_{ee} = \frac{1}{b_1} + \frac{1}{b_2} + \frac{1}{g_1} \left(\frac{b_2 + g_2}{b_2} \right) + \frac{1}{g_2} \left(\frac{b_1 + g_1}{b_1} \right)$	$R_{00} + R_{ee} = R_{12} + R_{21}$ $K = \frac{k_1}{f_1} + \frac{k_2}{f_2} \left(\frac{b_2 + g_2}{g_2} \right) = \frac{k_2}{f_2} + \frac{k_1}{f_1} \left(\frac{b_1 + g_1}{g_1} \right)$ $b_1 f_2 g_2 k_1 = b_2 f_1 g_1 k_2$
---	---

Таблица 4

Интерпретация экспериментальных данных в терминах фундаментальных параметров для асимметричной модели переносчиков [60, 72]

Тип эксперимента	K_m	V	Π
Однонаправленные потоки			
«Равновесный обмен»	$K_1^{ee} = K_2^{ee} = K \frac{R_{00}}{R_{ee}}$	$V_{1-2}^{ee} = V_{2-1}^{ee} = \frac{1}{R_{ee}}$	$\Pi_1^{ee} = \Pi_2^{ee} = \frac{1}{K R_{00}}$
«Транс-насыщение»	$K_{1-2}^{it} = K \frac{R_{21}}{R_{ee}};$ $K_{2-1}^{it} = K \frac{R_{12}}{R_{ee}}$	$V_{1-2}^{it} = V_{2-1}^{it} = \frac{1}{R_{ee}}$	$\Pi_{1-2}^{it} = \frac{1}{K R_{21}};$ $\Pi_{2-1}^{it} = \frac{1}{K R_{12}}$
Суммарные потоки			
«Цис-насыщение»	$K_{1-2}^{ic} = K \frac{R_{12}}{R_{ee}};$ $K_{2-1}^{ic} = K \frac{R_{21}}{R_{ee}}$	$V_{1-2}^{ic} = \frac{1}{R_{12}};$ $V_{2-1}^{ic} = \frac{1}{R_{21}}$	
«Ноль-транс»	$K_{1-2}^{zt} = K \frac{R_{00}}{R_{12}};$ $K_{2-1}^{zt} = K \frac{R_{00}}{R_{21}}$	$V_{1-2}^{zt} = \frac{1}{R_{12}};$ $V_{2-1}^{zt} = \frac{1}{R_{21}}$	$\Pi_{1-2}^{zt} = \Pi_{2-1}^{zt} = \frac{1}{K R_{00}}$

Таблица 5

Некоторые кинетические критерии выполнимости для асимметричной модели переносчика [67, 72]

$1 \quad \frac{V_{1-2}^{zt}}{V_{2-1}^{zt}} + 1 = \frac{K^{ee}}{K_{1-2}^{ic}} + \frac{K_{1-2}^{zt}}{K^{ee}}$	$3 \quad Q + 1 = \frac{K^{ee}}{K_{1-2}^{ic}} + \frac{K_{1-2}^{zt}}{K^{ee}}$
$2 \quad K_{1-2}^{ic} = K_{2-1}^{it}; K_{2-1}^{ic} = K_{1-2}^{it}$	$4 \quad Q + 1 \geq 2 \left[\frac{K_{1-2}^{zt}}{K_{1-2}^{ic}} \right]^{1/2}$

ментальные параметры, что указывает на различные пути экспериментальной оценки последних. К аналогичному выводу о необходимости четырех независимых констант для полной характеристики транспортной системы, а также о равенстве отношений V / K_m для чистого входа, выхода и равновесного обмена пришли в своем анализе Реген и Морган [31].

Для определения применимости асимметричной схемы переносчика группой Штейна был разработан ряд кинетических критериев выполнимости этой модели. Способ получения таких критериев следует из возможности выражения фундаментальных параметров через измеряемые параметры несколькими независимыми способами, что приводит к установлению между измеряемыми параметрами некоторых вполне определенных количественных соотношений. Так, из табл. 4 видно, что K_{1-2}^{ic} и K_{2-1}^{it} равны $K \frac{R_{12}}{R_{ee}}$, так что двумя «простейшими» критериями будут $K_{2-1}^{ic} = K_{1-2}^{it}$ и $K_{1-2}^{ic} = K_{2-1}^{it}$. Подобным образом можно получить целый ряд кинетических критериев выполнимости для модели асимметричного переносчика. Некоторые из них приведены в табл. 5 [67, 72], где в последних двух критериях используется так называемый фактор асимметрии, Q , который можно определить следующими уравнениями:

$$Q = \frac{K_{1-2}^{zt}}{K_{2-1}^{zt}}, \quad (6a)$$

$$Q = \frac{K_{2-1}^{ic}}{K_{1-2}^{ic}}, \quad (6б)$$

$$Q = \frac{V_{1-2}^{zt}}{V_{2-1}^{zt}}, \quad (6в)$$

$$Q = \frac{f_2 [k_1 (b_1 + g_1) + g_2 (b_1 + k_1)]}{f_1 [k_2 (b_2 + g_2) + g_1 (b_2 + k_2)]}. \quad (6г)$$

Таким образом, фактор Q является мерой асимметрии системы и в случае отсутствия симметрии должен отличаться от единицы.

Если мы используем значения K_m для «ноль-транс» (1—2)- и (2—1)-процедур, приведенные в работах Карлиша [49] и Лако [51] (см. табл. 2), то по уравнению 6a получим значение фактора асимметрии, Q , равное 15,5 для глюкозы при 20°. В тех же условиях критерии выполнимости 3 и 4 (табл. 5) при подстановке в них значений $K^{ec} = 32$, $K_{1-2}^{zt} = 25$ и $K_{1-2}^{ic} = 1,8$ мМ (табл. 2) дают значения фактора асимметрии соответственно 17,6 и $\geq 6,5$, что в общем согласуется с оценкой Q по уравнению 6a и не противоречит модели асимметричного переносчика (рис. 7). С другой стороны, при определении степени асимметрии системы по константам полунасыщения K_{2-1}^{ic} и K_{1-2}^{ic} (ур-е 6б) мы получим значение $Q = 1,6 \pm 0,3$, расходящееся как с критериями выполнимости 3 и 4 (табл. 5), так и с эквивалентным определением фактора асимметрии (ур-е 6a). На этом основании в работах [17, 49] был сделан вывод о неадекватности асимметричной модели переносчика.

Однако совсем недавно Фостер показал [73], что единственное существующее в литературе значение $K_{2-1}^{ic} = 2,8 \pm 0,5$, полученное Ханкин с соавт. [67] (табл. 2), не соответствует действительности и, следовательно, противоречия, возникающие при оценке фактора асимметрии, снимаются. Тем не менее в рамках асимметричной, но моновалентной (характеризуемой на каждой стороне мембраны одним значением константы сродства) модели переносчика (рис. 7) нельзя объяснить по крайней мере четыре экспериментальных факта:

1) различие между K_m для глюкозного обмена и K_i для ингибирования глюкозой сорбозного потока [62];

2) бивалентное связывание как на внутренней, так и на внешней сторонах мембраны [75];

3) различие отношений V/K_m для «ноль-транс»-поглощения и выхода, а также для «равновесного обмена» [50, 74];

4) данные «цис-транс»-теста [50].

Таким образом, в настоящее время на основании указанных противоречий между теоретическими предсказаниями модели и имеющимися кинетическими данными моновалентную модель переносчика можно полностью отвергнуть как в симметричной, так и в асимметричной формах.

III. МОДЕЛИ СОСТАВНЫХ МЕМБРАННЫХ БАРЬЕРОВ

В предыдущем разделе было показано, что одним транспортным барьером с нелинейной характеристикой (в данном случае переносчиком) нельзя охватить всю совокупность данных по переносу сахаров в эритроцитах человека. Возможным выходом из этой ситуации является попытка совместить несколько слоев с различными транспортными характеристиками и исследовать поведение такого составного барьера проницаемости в свете существующего экспериментального материала.

Одной из первых моделей такого рода явилась модель Нафталина, разработанная в 1970—1972 гг. [76—78] как альтернатива не оправдавшей себя модели переносчиков. По схеме Нафталина сахара пересекают мембрану, последовательно связываясь с рядом фиксированных стереоспецифических адсорбционных участков, расположенных вдоль пронизывающего мембрану водного канала или же включающих в себя такие каналы (поры). Внутренний диаметр таких моновалентных многоцентровых пор предполагается достаточно большим, чтобы обеспечить возможность одномерной диффузии из раствора и из занятых связывающих центров на вакантные, а также свободного обмена между соседними участками или терминальными участками и растворами. При анализе такой системы с использованием метода Монте-Карло [76] было показано хорошее соответствие модели таким классическим явлениям пассивного транспорта, как насыщаемость, конкурентное ингибирование и противоток. Однако для объяснения ускоренного обменного потока [55, 56] и ряда других кинетических аномалий [46] автору модели пришлось использовать впервые введенное Миллером [62] понятие о неперемешиваемых слоях между наружной мембранной поверхностью и основным хорошо перемешанным раствором, т. е. фактически рассматривать составной транспортный барьер, состоящий из слоя с нелинейной транспортной характеристикой (селективная пора) и примыкающего к нему снаружи линейного диффузионного сопротивления. В качестве экспериментального доказательства такой модели автор приводил собственные работы [77], согласно которым скорость «ноль-транс»-выхода глюкозы из эритроцитов при 20° возрастала на 75% при сильном встряхивании клеточной суспензии, что объяснялось разрушением неперемешиваемых слоев, образованных вокруг каждой клетки частично иммобилизованной водой и налагающих диффузионные затруднения на движение растворенных веществ от поверхности мембраны в основной раствор.

Так как эти данные представляли большой интерес не только в плане проверки модели Нафталина, но и как возможный путь развития теории переносчиков, они сразу же были проверены в лабораториях Миллера [32] и Штейна [17]. В обоих случаях было убедительно показано, что эффект, найденный Нафталином, обусловлен плохой первоначальной дисперсией клеток и другими методическими погрешностями. В работе Миллера [32] возможность эффекта была проанализирована теоретически и получен эмпирический критерий, позволяющий оценить роль внешнего водного неперемешиваемого слоя в общей скорости транспорта. Применение этого критерия показало, что такого рода диффузия может оказывать лишь

незначительное влияние. Однако анализ Миллера применим лишь к водной суспензии отдельных клеток, а не к тканям, где возможно развитие широких перемешиваемых слоев. К аналогичным выводам пришли Лейб и Штейн. В своем оценочном расчете они показали: чтобы сопротивление водного перемешиваемого слоя составляло хотя бы 1% общего сопротивления составного барьера, толщина слоя должна быть 200 мкм, а это означает, что при собственном диаметре эритроцита 8,5 мкм клетка должна иммобилизовать объем внешнего раствора, в 350 раз превосходящий ее собственный [17]. Таким образом, модель Нафталина [76, 78] оказалась неадекватной, как и первоначальная гипотеза Миллера [62], в которой он пытался объяснить полученные им кинетические аномалии в терминах симметричной кинетики переносчиков с введением внешнего перемешиваемого слоя. Кроме того, Лейб и Штейн показали [79], что их критерии выполнимости симметричной модели переносчиков (см. ур-я 2, 3) не зависят от возможного присутствия внешних перемешиваемых слоев любых размеров и, следовательно, полученное ими экспериментальное опровержение этой модели [49] остается в силе.

Однако сама идея составных мембранных барьеров из нелинейного центрального слоя и примыкающих к нему фиковских сопротивлений продолжала привлекать внимание, так как существовал ряд фактов (например, различие между K_m для глюкозного обмена и K_i для ингибирования глюкозой сорбозного потока [62]), которые легко интерпретировались лишь с использованием диффузионных слоев.

Впоследствии первоначальная неадекватная трактовка диффузионных сопротивлений в виде водных перемешиваемых слоев была заменена представлениями о примыкающих к мембране или включенных в нее плотно упакованных слоях сложной химической природы, препятствующих движению сахара между основными фазами и специфическими связывающими центрами [7, 59]. А в работе Эдвардса диффузионное сопротивление сопоставлялось с энергетическим барьером, которым может быть, например, потеря гидратационной воды [80].

Первый стационарный анализ транспортной системы, состоящей из переносчика с примыкающими линейными диффузионными сопротивлениями (рис. 9), был проведен Шульцем [8], который разработал изящные графические (дифференциальный и разностный) методы, позволяющие различить кинетическую [52] и структурную асимметрию, а в последнем случае оценить сопротивления линейных граничных слоев. Еще ранее Шульцем было показано [81], что даже в простейшем случае двух смежных барьеров, один из которых проявляет нелинейную характеристику (переносчик), транспорт будет асимметричным, т. е. величина потока будет измеряться при смене направления градиента концентрации через составной барьер на противоположную. Однако Шульц использовал упрощенную кинетику переносчика по Уилбрандту и Розенбергу [82], и поэтому возникла необходимость анализа структурно асимметричной системы, включающей в себя переносчик в наиболее общей форме. Эта задача была решена в общем виде Регеном и Тарпеем [59] и Лейбом и Штейном [72].

Рассмотрим работу Лейба и Штейна [72], терминологии которых мы придерживались и ранее, упростив их анализ для случая равенства нулю трансмембранного электрического потенциала. В присутствии граничных диффузионных сопротивлений концентрации S_1 и S_2 в непосредственной близости от переносчика не равны в общем случае соответствующим концентрациям S_1^B и S_2^B в основном растворе (рис. 10). Количественно это может быть выражено следующим образом:

$$S_1 = S_1^B - \frac{NET_{1-2}}{P_1}, \quad (7)$$

$$S_2 = S_2^B + \frac{NET_{1-2}}{P_2}, \quad (8)$$

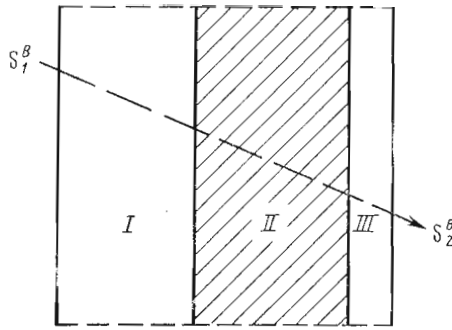


Рис. 9. Сложный трехслойный транспортный барьер. I и III — линейные диффузионные сопротивления (см. рис. 1, а), II — район с нелинейной транспортной функцией (пора, переносчик) (см. рис. 1, в)

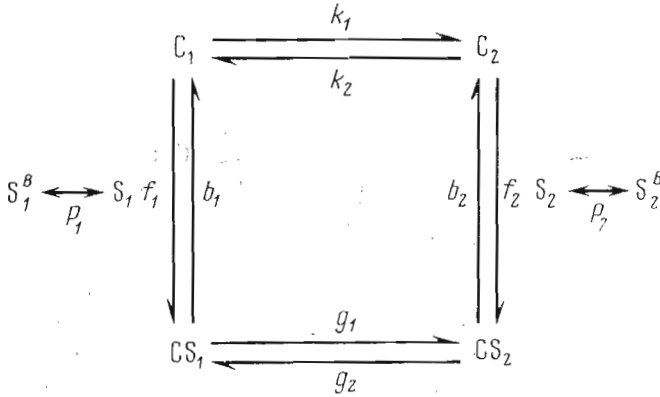


Рис. 10. Обобщенная асимметричная модель переносчика с линейными граничными сопротивлениями. P_1 и P_2 — эффективные коэффициенты проницаемости диффузионных слоев на сторонах 1 и 2 соответственно

где NET_{1-2} — полный (суммарный) поток субстрата из основного раствора 1 в основной раствор 2, а P_1 и P_2 — эффективные коэффициенты проницаемости диффузионных слоев на сторонах 1 и 2. Подставляя полученные значения S_1 и S_2 в общее уравнение 4, получим выражения для однонаправленных потоков U_{1-2} и U_{2-1} , две разности которых дадут нам общий вид полных потоков:

$$NET_{1-2} = U_{1-2} - U_{2-1} \text{ и } NET_{2-1} = U_{2-1} - U_{1-2}. \quad (9)$$

Для оценки значений P_1 и P_2 можно использовать две процедуры «чис-насыщения». Действительно, для случая предельно высокого значения S_1^B уравнение для суммарного потока будет иметь вид

$$\frac{1}{NET_{1-2}^{ic}} = R_{12} + \frac{R_{ee}}{K} \left(S_2^B + \frac{NET_{1-2}^{ic}}{P_2} \right). \quad (10)$$

Так как $NET_{1-2}^{ic} = V_{1-2}^{ic}$, когда $S_2^B = 0$, получим

$$\frac{1}{V_{1-2}^{ic}} = R_{12} + \frac{R_{ee} V_{1-2}^{ic}}{K P_2}. \quad (11)$$

Вычитая уравнение 11 из уравнения 10 и перегруппировывая члены, получим

$$\frac{1}{NET_{1-2}^{ic}} = \frac{R_{ee} V_{1-2}^{ic}}{K} \left(\frac{S_2^B}{V_{1-2}^{ic} - NET_{1-2}^{ic}} - \frac{1}{P_2} \right). \quad (12)$$

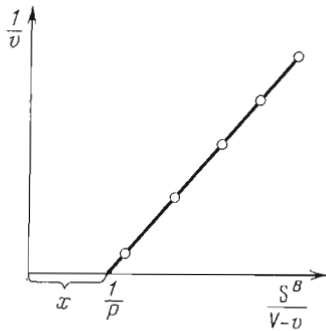


Рис. 11

Рис. 11. Экспериментальная оценка граничных диффузионных барьеров (см. ур-е 13) [72]

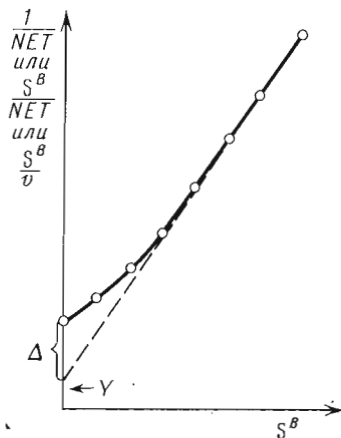


Рис. 12

Рис. 12. Экспериментальное определение параметров M , Y и Δ в присутствии внешних диффузионных сопротивлений (см. ур-е 14) [72]

Уравнение 12 можно упростить, обозначив NET_{1-2}^{ic} через v и V_{1-2}^{ic} через V :

$$\frac{1}{v} = \frac{R_{ec}V}{K} \left(\frac{S_2^B}{V-v} - \frac{1}{P_2} \right). \quad (13)$$

В этом случае V — измеряемое значение v при $S_2^B = 0$, так что, отложив $1/v$ против $S_2^B / (V - v)$, мы найдем значение $1/P_2$ как x (пересечение экстраполированной прямой с осью абсцисс, рис. 11). Величина $1/P_1$ оценивается совершенно аналогичным способом с использованием методики «цис-насыщения» в противоположном направлении. Построение графиков типа рис. 11 может быть использовано и как тест на модель переносчиков, так как если экспериментальные точки в указанных координатах не ложатся на прямую линию, поведение слоя с нелинейной транспортной функцией отличается от кинетики переносчика (рис. 10) и необходимо рассматривать другие модели. Интересно, что Шульц в своем анализе также пришел к выводу о необходимости двух процедур «цис-насыщения» для полной оценки диффузионных сопротивлений, хотя способы его расчета отличаются от приведенных [8].

Таким образом, мы имеем шесть независимых фундаментальных параметров, полностью характеризующих кинетическое поведение асимметричного переносчика с граничными диффузионными сопротивлениями: это два параметра P , один K и три из четырех параметров R [72]. Реген и Тарплей [59] тоже получили шесть независимых констант, необходимых для описания аналогичной системы, две из которых — эффективные проницаемости диффузионных барьеров, а остальные, как и в рассмотренном анализе Штейна, — сложные функции констант скорости для нескольких событий транспортного цикла.

Однако методы определения параметров, приведенные в работе Лейба и Штейна [72], более просты и изящны. После оценки граничных сопротивлений с использованием двух процедур «цис-насыщения» остальные четыре константы можно получить различными способами. Для этого запишем уравнения суммарных и однонаправленных потоков для четырех основных экспериментальных процедур в направлении 1—2 в общем виде:

$$y = MS^B + Y + f(NET), \quad (14)$$

где y равен $1/NET^{ic}$ для «цис-насыщения», S^B/NET^{2t} для «ноль-транс»

Интерпретация экспериментальных данных в терминах фундаментальных параметров для модели асимметричного переносчика в присутствии граничных диффузионных сопротивлений [72]

Тип эксперимента	M	Y	Δ
Однонаправленные потоки			
«Равновесный обмен»	$M^{ee} = R_{ee}$	$Y_1^{ee} = Y_2^{ee} =$ $= KR_{00} + \frac{1}{P_1} + \frac{1}{P_2}$	$\Delta_1^{ee} = \Delta_2^{ee} = 0$
«Транс-насыщение»	$M_{1-2}^{it} = M_{2-1}^{it} = R_{ee}$	$Y_{1-2}^{it} = KR_{21} + \frac{1}{P_1};$ $Y_{2-1}^{it} = KR_{12} + \frac{1}{P_2}$	$\Delta_{1-2}^{it} = \frac{R_{ee} V_{2-1}^{ic}}{P_1};$ $\Delta_{2-1}^{it} = \frac{R_{ee} V_{1-2}^{ic}}{P_2}$
Суммарные потоки			
«Цис-насыщение»	$M_{1-2}^{ic} = M_{2-1}^{ic} =$ $\frac{R_{ee}}{K}$	$Y_{1-2}^{ic} = R_{12};$ $Y_{2-1}^{ic} = R_{21}$	$\Delta_{1-2}^{ic} = \frac{R_{ee} V_{1-2}^{ic}}{KP_2};$ $\Delta_{2-1}^{ic} = \frac{R_{ee} V_{2-1}^{ic}}{KP_1}$
«Ноль-транс» без диффузионного сопротивления на «транс»-стороне	$M_{1-2}^{zt} = R_{12};$ $M_{2-1}^{zt} = R_{21}$	$Y_{1-2}^{zt} = Y_{2-1}^{zt} = KR_{00}$	$\Delta_{1-2}^{zt} = \frac{1}{P_1};$ $\Delta_{2-1}^{zt} = \frac{1}{P_2}$

при условии идеального перемешивания на «транс»-стороне, S^B/v^{it} для «транс-насыщения» и S^B/v^{ee} для «равновесного обмена», значения констант M и Y даны в табл. 6, а $f(NET)$ — функция полного потока со следующими свойствами:

$$\lim_{S^B \rightarrow \infty} f(NET) = 0 \quad (15)$$

и

$$\lim_{S^B \rightarrow 0} f(NET) = \Delta \quad (16)$$

(значения Δ также даны в табл. 6).

Графически уравнение 14 представлено на рис. 12. При больших значениях S^B график стремится к прямой линии (так как $f(NET) = 0$) с наклоном M и y — пересечением Y . С уменьшением S^B кривая отклоняется вверх и при концентрации $S^B = 0$ показывает на оси y значение $Y + \Delta$. Таким образом, все три параметра (M , Y и Δ) легко определяются графическим путем. Из табл. 6 видно, что если система ведет себя как асимметричный переносчик с граничными диффузионными сопротивлениями (рис. 10), то каждый из ее фундаментальных параметров может быть определен через экспериментальные константы M , Y и Δ более чем одним независимым способом, что, так же как и в случае одного переносчика, дает возможность построения кинетических критериев выполнимости такой модели [72]. В работе Лейба и Штейна приведен целый ряд таких критериев, число которых можно при желании легко увеличить, однако строгого экспериментального исследования на основе этих критериев

применимости рассмотренной модели группой Штейна проведено не было, и поэтому мы воспользуемся данными других авторов.

Основной вывод, к которому пришли в своих работах Уилбрандт [7], Реген и Таршлей [59] и Эдвардс [80], сводится к тому, что все известные к тому времени кинетические данные по транспорту сахаров в эритроцитах человека могут быть интерпретированы в рамках асимметричной модели переносчика с граничными диффузионными или активационными сопротивлениями, причем внутренний барьер значительно больше наружного и может достигать 30% общего сопротивления системы потоку субстрата.

IV. МОДЕЛИ БИВАЛЕНТНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ

В 1975 г. было проведено полное исследование транспорта галактозы в эритроцитах человека с использованием всех существующих экспериментальных методик [50, 74]. Галактоза применялась в качестве субстрата, так как она имеет относительно низкое сродство к транспортной системе и, следовательно, начальные скорости могут быть измерены прямо, без применения интегральных уравнений скорости. В этих работах было продемонстрировано наличие на внутренней и наружной сторонах мембраны эритроцитов как участников с низким сродством для галактозы с K_m 100—240 мМ, так и сильно связывающих центров с $K_m = 11—25$ мМ (см. табл. 2). Из табл. 2 видно, что совокупность имеющихся данных по транспорту глюкозы в эритроцитах человека также показывает существование двух значений K_m на каждой стороне мембраны, различающихся на порядок величины и выявляемых в различных экспериментальных процедурах, одно из которых лежит между 20 и 38, а другое между 1,6 и 3,0 мМ. Анализ кинетических параметров транспорта глюкозы и галактозы, представленных в табл. 2, позволяет сделать вывод о неадекватности моновалентного переносчика даже при наличии внешних диффузионных сопротивлений и предположить наличие на обеих сторонах мембраны двух типов специфических связывающих участков с высоким (H) и низким (L) сродством.

Впервые такая гипотеза бивалентного сродства была сформулирована в моделях «внутренней передачи», предложенных Лейбом и Штейном [83—85], однако эти схемы относятся к классу моделей пор и будут рассмотрены ниже, здесь же мы обсудим возможность интерпретации полученных данных в терминах моделей двух параллельных переносчиков. Классифицировав наблюдаемые значения K_m по низко- (L) и высокоаффинитивному (H) типу, экспериментальные данные можно представить в виде табл. 7 [75], из которой видно, что для обоих субстратов на внутренней стороне мембраны высокоаффинитивные участки проявляются в процедуре «цис-насыщения»(2—1), а низкоаффинитивные — при «ноль-

Таблица 7

Наблюдаемые значения K_m для глюкозы и галактозы, классифицированные в соответствии с H - и L -связывающими участками [75]

Тип эксперимента	Сторона, на которой определяется K_m	Значения K_m для	
		глюкозы	галактозы
ee	—	L	L
$it(1-2)$	Внутренняя	—	—
$it(2-1)$	Наружная	H	H
$ic(1-2)$	»	H	H
$ic(2-1)$	Внутренняя	H	H
$zt(1-2)$	»	L	L
$zt(2-1)$	Наружная	H	$H + L$

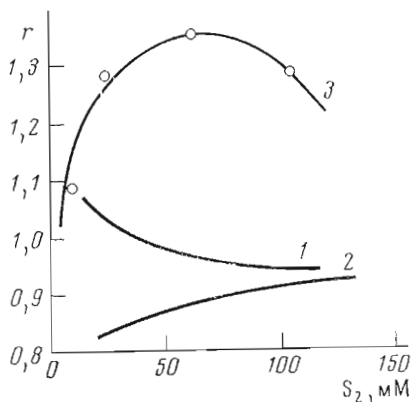


Рис. 13

Рис. 13. Кривые «цис-транс»-теста для различных транспортных моделей: 1—ур-е 17, 2—ур-е 18, 3—ур-е 19 [50]. Точки соответствуют экспериментальным значениям

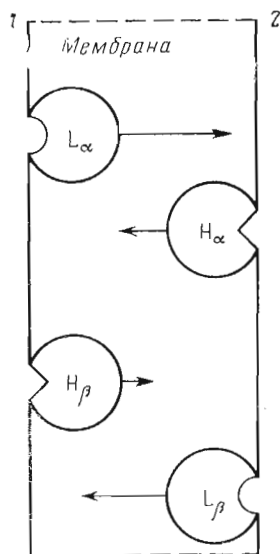


Рис. 14

Рис. 14. Модель антипараллельных переносчиков. Связывающие участки каждого из переносчиков попеременно экспонируются на внешнюю и внутреннюю стороны мембраны. H и L — соответственно участки с высоким и низким средством. Стрелки выражают различие максимальных скоростей [75]

транс»(1—2)-методике. На наружной стороне мембраны в процедурах «цис-насыщения»(1—2) и «транс-насыщения»(2—1) выявляются участки с высоким средством. При «ноль-транс»(2—1)-поглощении галактозы обнаружены оба типа участков [50], тогда как для глюкозы проявляются лишь сильно связывающие центры. Однако последнее, вероятно, объясняется тем, что в работе [51] использовались низкие концентрации глюкозы (0,1—18 мМ), при которых участки с малым средством могли остаться незамеченными. Кроме того, в работах [50, 74] представлены еще два факта, позволяющие полностью отвергнуть моновалентные модели переносчиков.

Во-первых, анализ таких моделей показывает, что отношения V / K_m для «ноль-транс»-поглощения и выхода, а также для «равновесного обмена» будут одинаковыми [59, 60] (см. табл. 4). Однако, как видно из табл. 2, для галактозы значения V / K_m (в мин⁻¹) составляют для этих процедур соответственно 1,4 и 0,75; 1,01; 3,19, что противоречит предсказаниям моновалентных моделей переносчика [50, 74].

Во-вторых, Гинзбургом и Штейном [50] была разработана аналитическая процедура, названная «цис-транс»-тестом и позволяющая различить три модели: моновалентную модель переносчика, описываемую простым одночленным уравнением типа Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{VS}{K+S}, \quad (17)$$

модель моновалентного переносчика с параллельной простой диффузией:

$$v = \frac{VS}{K+S} + PS \quad (18)$$

и бивалентную модель двух параллельных переносчиков, описываемую

двучленным уравнением

$$v = \frac{V_1 S}{K_1 + S} + \frac{V_2 S}{K_2 + S}. \quad (19)$$

В «цис-транс»-тесте производятся экспериментальные измерения скорости «ноль-транс»-поглощения при концентрациях S_1 и S_2 , где $S_1 > S_2$ и $S_1 \gg K_m$, с получением значений $v_{S_1}^{zt}$ и $v_{S_2}^{zt}$, а также измерение суммарного поглощения с S_1 на «цис-» и S_2 на «транс»-сторонах мембраны v_{S_1/S_2}^{ic} . Затем параметр r , определяемый по уравнению

$$r = \frac{v_{S_1}^{zt} - v_{S_1/S_2}^{ic}}{v_{S_2}^{zt}}, \quad (20)$$

откладывается как функция концентрации субстрата на «транс»-стороне. На рис. 13 представлены кривые «цис-транс»-теста, теоретически полученные для трех указанных моделей в работе [50], и экспериментальные значения, которые полностью ложатся на кривую, соответствующую двум параллельным переносчикам с различным сродством. Таким образом, стало ясно, что моделями моновалентных переносчиков и моделями составных барьеров рассмотренного вида нельзя интерпретировать появившиеся данные и возникла необходимость в теоретическом анализе более сложных систем.

Такой обобщенный анализ четырех различных вариантов бивалентной транспортной системы, состоящей из различных комбинаций двух типов переносчиков с разным сродством, был проведен Эйлам [75]. Две из четырех этих моделей формально относятся к моделям без участия переносчиков (модели пор) и будут рассмотрены ниже, а оставшиеся две, которые можно назвать моделями антипараллельных и различных переносчиков, будут описаны в следующих подразделах.

IV. 1. Модель антипараллельных переносчиков

На рис. 14 представлена бивалентная модель антипараллельных переносчиков. Здесь два одинаковых асимметричных по K_m и V переносчика α и β расположены антипараллельным образом. Это означает, что если переносчик α проявляет на одной из сторон мембраны низкое сродство (L), то переносчик β будет характеризоваться на этой стороне высоким сродством (H), и наоборот, причем $L^\alpha = L^\beta$ и $H^\alpha = H^\beta$. Соотношение максимальных скоростей переносчиков α и β по направлениям переноса аналогично. При анализе этой модели используется уже рассмотренный нами ранее формализм Лейба и Штейна [60].

Рассмотрим общее уравнение однонаправленного потока для моновалентного переносчика (см. ур-е 4). Так как переносчики α и β антипараллельны, параметры K , R_{00} , R_{ee} (не зависящие от стороны измерений) будут одинаковы для обоих переносчиков, тогда как R_{12} для α (R_{12}^α) будет равен R_{21} для β (R_{21}^β) и аналогично $R_{21}^\alpha = R_{12}^\beta$.

Возьмем случай, когда $R_{21} > R_{12}$, и обозначим R_{21}/R_{12} через m . Отношение числа переносчиков α -типа к числу переносчиков β -типа будет равно n . Таким образом, параметр m может быть рассмотрен как степень асимметрии каждого переносчика, тогда как значение n отражает асимметрию всей системы. Используя введенные определения и суммируя потоки через α - и β -переносчики, получим общее уравнение однонаправленного потока для антипараллельных переносчиков:

$$\frac{U_{1 \rightarrow 2}}{T} = \frac{KS_1 + S_1 S_2}{K^2 R_{00} + KR_{12} S_1 + KR_{21} S_2 + R_{ee} S_1 S_2} + \frac{KS_1 + S_1 S_2}{n(K^2 R_{00} + KR_{21} S_1 + KR_{12} S_2 + R_{ee} S_1 S_2)}. \quad (21)$$

Однонаправленный поток в направлении (2—1) может быть получен при обращении индексов 1 и 2.

Значения кинетических параметров в модели антипараллельных переносчиков

Тип эксперимента	K_m	V
«Равновесный обмен» (ee)	$K_{ee}^{\alpha=\beta} = \frac{K R_{00}}{R_{ee}}$	$V_{ee}^{\alpha+\beta} = \frac{(n+1)T}{nR_{ee}}$
«Ноль-транс»		
$zt(1-2)$	$K_{zt(1-2)}^{\alpha} = K_{zt(2-1)}^{\beta} = \frac{K R_{00}}{R_{12}}$	$V_{zt(1-2)}^{\alpha} = \frac{T}{R_{12}}; V_{zt(1-2)}^{\beta} = \frac{T}{nmR_{12}}$
$zt(2-1)$	$K_{zt(2-1)}^{\alpha} = K_{zt(1-2)}^{\beta} = \frac{K R_{00}}{mR_{12}}$	$V_{zt(2-1)}^{\alpha} = \frac{T}{mR_{12}}; V_{zt(2-1)}^{\beta} = \frac{T}{nR_{12}}$
«Цис-насыщение»		
$ic(1-2)$	$K_{ic(1-2)}^{\alpha} = K_{ic(2-1)}^{\beta} = \frac{K R_{12}}{R_{ee}}$	$V_{ic(1-2)}^{\alpha} = \frac{T}{R_{12}}; V_{ic(1-2)}^{\beta} = \frac{T}{nmR_{12}}$
$ic(2-1)$	$K_{ic(2-1)}^{\alpha} = K_{ic(1-2)}^{\beta} = \frac{K R_{12} m}{R_{ec}}$	$V_{ic(2-1)}^{\alpha} = \frac{T}{mR_{12}}; V_{ic(2-1)}^{\beta} = \frac{T}{nR_{12}}$
«Транс-насыщение»		
$it(1-2)$	$K_{it(1-2)}^{\alpha} = K_{it(2-1)}^{\beta} = \frac{K R_{12} m}{R_{ee}}$	$V_{it(1-2)}^{\alpha} = V_{it(2-1)}^{\alpha} = \frac{T}{R_{ee}}$
$it(2-1)$	$K_{it(2-1)}^{\alpha} = K_{it(1-2)}^{\beta} = \frac{K R_{12}}{R_{ee}}$	$V_{it(1-2)}^{\beta} = V_{it(2-1)}^{\beta} = \frac{T}{nR_{ee}}$

Из уравнения 21 легко найти частные выражения потоков для всех экспериментальных процедур. В общем случае это уравнения двухчленного Михаэлисовского типа, значения параметров V и K_m которых суммированы в табл. 8. Из анализа табл. 8 можно сделать некоторые важные выводы относительно кинетического поведения рассматриваемой системы.

Во-первых, можно показать, что двух «ноль-транс»-процедур достаточно для определения параметров m и n :

$$m = \frac{K_{zt(1-2)}^{\alpha}}{K_{zt(2-1)}^{\alpha}}; \quad n = \frac{V_{zt(1-2)}^{\alpha}}{V_{zt(2-1)}^{\beta}}. \quad (22)$$

Во-вторых, на основании анализа соотношений максимальных скоростей для обоих переносчиков в методиках «ноль-транс»(1—2) и «ноль-транс»(2—1) можно прийти к заключению о возможности выявления обоих типов связывающих участков в $zt(2-1)$ -процедуре и в общем случае только слабо связывающих участков в $zt(1-2)$ -методике, что полностью соответствует данным, полученным Гинзбургом и Рэмом для транспорта галактозы [74] (см. табл. 2).

В методике «транс-насыщения» для каждого направления измерений предсказываются участки с высоким и низким сродством, а отношение между значениями K_m равно m . Значения K_m , установленные в этой процедуре, не обязательно должны быть равны величинам, получаемым в «ноль-транс»-экспериментах, так как $K R_{12} m / R_{ee}$ может быть не равно $K R_{00} / R_{12}$ и аналогично $K R_{12} / R_{ee}$ не равно в общем случае $K R_{00} / m R_{12}$.

Соотношения максимальных скоростей для обоих переносчиков в этой процедуре будут выглядеть следующим образом:

$$\frac{V_{it(1-2)}^{\alpha}}{V_{it(1-2)}^{\beta}} = \frac{V_{it(2-1)}^{\alpha}}{V_{it(2-1)}^{\beta}} = n. \quad (23)$$

Следовательно, для сильно асимметричной системы при большом n будут проявляться лишь преимущественно α -переносчики и можно ожидать определения участков с низким средством в $it(1-2)$ - и с высоким — в $it(2-1)$ -методиках. В экспериментах «дис-насыщения», как и в «ноль-транс»-процедурах, для больших значений m и n предсказываются участки с высоким средством в $ic(1-2)$ - и оба типа участков в $ic(2-1)$ -опытах, когда m и n имеют сходные величины.

В качестве теста на модель антипараллельных переносчиков может быть использована последняя методика — «равновесный обмен». Из табл. 8 видно, что для этой процедуры модель предсказывает простую кинетику типа Михаэлиса — Ментен с одним значением K_m и V . Любой другой результат будет противоречить рассматриваемой модели. Если данные по «равновесному обмену» не отвергают модели антипараллельных переносчиков, то для дальнейшего анализа проводится сравнение отношений V и K_m , полученных в методиках «равновесного обмена» и «ноль-транс»-параметров. Используя уравнения, приведенные в табл. 8, можно получить следующие соотношения:

$$\frac{V_{z(1-2)}^\alpha}{K_{z(1-2)}^\alpha} + \frac{V_{z(1-2)}^\beta}{K_{z(1-2)}^\beta} = \frac{V_{z(1-2)}^\alpha}{K_{z(1-2)}^\alpha} \left(1 + \frac{1}{n} \right) = \frac{n+1}{nKR_{00}} = \frac{V_{ee}}{K_{ee}}. \quad (24)$$

Таким образом, модель предсказывает, что сумма значений V/K_m для α - и β -переносчиков в обеих «ноль-транс»-процедурах должна быть равна V/K_m для «равновесного обмена». Так как β -участок иногда не проявляется в $zt(1-2)$ -методике, уравнение 24 может быть использовано как тест на эту модель, только если предварительно рассчитано значение n .

IV. 2. Модель различных переносчиков

В этом случае переносчики не равны по всем своим параметрам, т. е. $L^\alpha \neq L^\beta$; $H^\alpha \neq H^\beta$; и параметрам K и R α -переносчиков соответствуют параметры Q и Z β -переносчиков, причем $K \neq Q$, $R_{00} \neq Z_{00}$ и $R_{ee} \neq Z_{ee}$. В реальных условиях это может соответствовать существованию двух независимых, различных по всем своим параметрам асимметричных моновалентных транспортных систем, параллельно переносящих один и тот же субстрат. Различить две альтернативные бивалентные модели переносчиков можно, используя методику «равновесного обмена». Ранее было показано, что модель антипараллельных переносчиков предсказывает одно значение $K_m^{z\beta}$ для «равновесного обмена»: $K_{ee} = KR_{00} / R_{ee}$. С другой стороны, модель различных переносчиков дает двучленную кинетику для «равновесного обмена», так как в общем случае $K \frac{R_{00}}{R_{ee}} \neq \frac{QZ_{00}}{Z_{ee}}$, $R_{00} \neq R_{ee}$ и $Z_{00} \neq Z_{ee}$.

В экспериментальной части своей работы [47] Эйлам показывает, что кинетика «равновесного обмена» глюкозы и галактозы при 20° следует одночленному уравнению типа Михаэлиса — Ментен (см. табл. 2), и на этом основании отвергает модель различных переносчиков. Однако этими работами было положено только начало теоретическому и экспериментальному кинетическому анализу бивалентных моделей переносчиков, и многие важнейшие проблемы, в частности возможность существования внешних неравных диффузионных слоев, еще ждут своего разрешения.

Таким образом, с момента своего появления модель переносчиков была основой для теоретического и экспериментального кинетического изучения проблем пассивного транспорта и за 25 лет существования прошла следующие основные этапы развития: 1) формулировка классической модели переносчиков (1952—1963 гг.); 2) усложнение моновалентных моделей переносчиков путем увеличения числа кинетически независимых

параметров (1964—1971 гг.); 3) создание и анализ моновалентных моделей переносчиков с линейными граничными сопротивлениями (1972—1974 гг.); 4) начало разработки поливалентных (бивалентных) моделей переносчиков (1975—1976 гг.).

V. МОДЕЛИ МОНОВАЛЕНТНЫХ ПОР

В последние годы наряду с моделями переносчиков получили развитие альтернативные гипотезы транспорта сахаров в эритроцитах, которые, несмотря на их сильное внешнее разнообразие, можно объединить в группу моделей пор. Представление о порах как о трансмембранных каналах, в которых происходит движение собственно транспортируемых частиц, а не их комплексов, имеет не менее широкое распространение, чем идея мембранных переносчиков [86—88]. В общем виде понятие «пора» распадается на два предельных случая: 1) пора — диффузионный канал со слабым взаимодействием; 2) пора — система взаимодействующих центров. Для случая селективного мембранного транспорта используется второе определение, т. е. под порой понимается система (обычно линейная) взаимодействующих связывающих центров, между которыми осуществляется эстафетная передача транспортируемого вещества.

В настоящее время все существующие модели селективного (как пассивного, так и активного) транспорта веществ или ионов через биологические мембраны можно отнести либо к классу моделей переносчиков, либо к классу моделей пор. Основное различие между этими двумя классами кинетических моделей, очевидно, состоит в том, что в моделях переносчиков каждый специфический связывающий центр в течение транспортного цикла бывает попеременно доступен то одному, то другому омывающему раствору, тогда как в моделях пор каждый специфический центр либо одновременно доступен обоим омывающим растворам (одноцентровые модели пор), либо только одному из них (терминальные участки многоцентровых моделей пор), либо вообще недоступен для внешних растворов (внутренние связывающие участки многоцентровых моделей пор).

Обобщенный стационарный анализ простейших вариантов одноцентральной и двухцентральной элементарной поры (рис. 15), учитывающий распределение электрического потенциала и возможность присутствия внешних линейных сопротивлений, был проведен Лейбом и Штейном в 1974 г. [89]. Выводы этой работы и предложенные в ней кинетические критерии выполнимости обладают широким спектром применения и могут

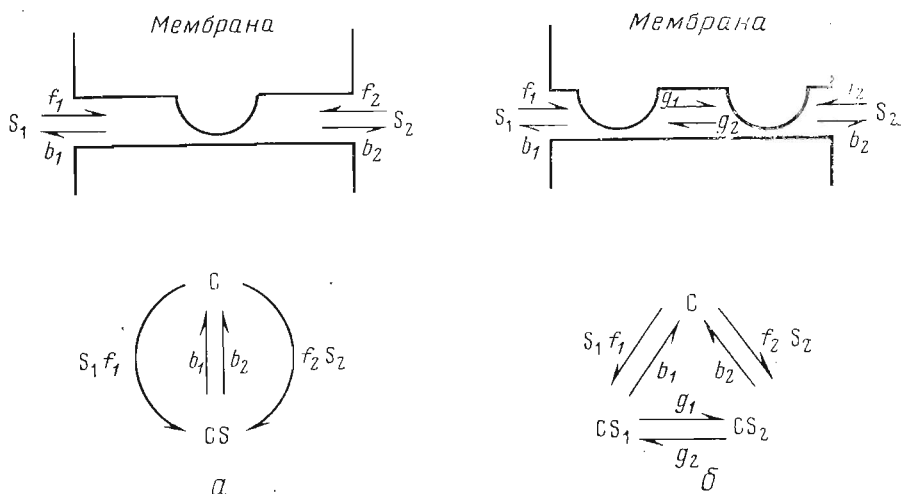


Рис. 15. Кинетические схемы одноцентральной (а) и двухцентральной (б) элементарных пор [89]

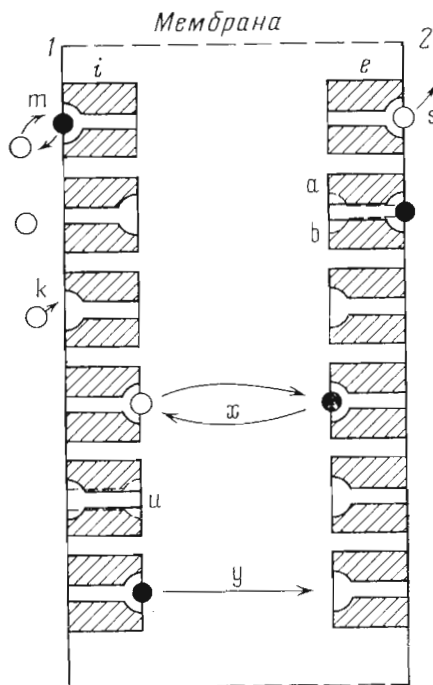


Рис. 16

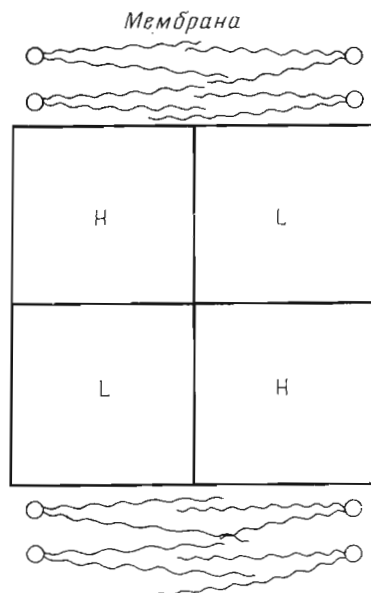


Рис. 17

Рис. 16. Интroversионная модель Ле-Февра [63]. Два субстрата (сахара) обозначены черным и белым кружками. Индексы i и e относятся соответственно к внутреннему и наружному слою связывающих участков, а индексы 1 и 2 — к внутриклеточному и внешнему водным пулам. Интroversионные характеристики (от 0 до 1) отражают вероятность того, что участок может быть найден в интroversионном состоянии, π обозначаются a для участков, занятых веществом А, b для участков, занятых веществом В, и u для свободных участков. Для такой системы определяются пять типов событий: k — фиксация субстрата из пула поверхностным участком, s — спонтанное отщепление субстрата в примыкающий пул, m — замещение субстрата из поверхностного участка, x — обмен субстратов между слоями, y — простая миграция через слой на вакантный участок

Рис. 17. Схематическое изображение обобщенной тетрамерной модели мембранного транспорта [83]. Н и L — белковые субъединицы соответственно с высоким и низким сродством к субстрату. Тетрамер пронизывает мембрану и окружен липидными молекулами

быть использованы для тестирования на простейшие модели пор любых мембранных транспортных систем. Однако исторически первой моделью пор, предложенной специально для системы транспорта сахаров в эритроцитах человека, явилась разработанная в 1970—1972 гг. модель Нафталина [76—78], в которой статистическими методами анализировались различные комбинации абстрактных многоцентровых пор с значительным наружным неперемешиваемым слоем. Однако, как уже обсуждалось в разделе III, эта модель была признана неадекватной, в первую очередь из-за нереальной величины необходимого внешнего неперемешиваемого слоя.

Следующим шагом в развитии моновалентных моделей пор была «интroversионная» модель Ле-Февра [63], в которой была сделана попытка предельно упростить кинетический анализ и в то же время совместить некоторые положения моделей Нафталина [76—78], Видавера [45], а также моделей «внутренней передачи» [17, 83—85], которые будут обсуждаться ниже.

В модели Ле-Февра рассматривается мембрана, состоящая из двух слоев фиксированных связывающих участков, разделенных внутренней

полостью, т. е. фактически совокупность моновалентных двухцентровых пор (рис. 16). Каждый связывающий участок находится в конформационном равновесии между внешне ориентированным состоянием (допускающим взаимодействие с примыкающим водным пулом) и «интроверсионным» состоянием, при котором возможны лишь трансмембранные контакты между относящимися к одной поре связывающими центрами. Основным постулатом этой схемы является существование лишь одного параметра — «интроверсионности» (степени обращенности внутрь мембраны), выражающего равновесные характеристики каждого занятого участка, так как связывание данного специфического субстрата строго определенным образом сдвигает положение его «интра-экстраверсионного равновесия». Таким образом, в модели Ле-Февра формально отпадает необходимость анализа разницы сродства и других различий между субстратами. Однако каждый субстрат характеризуется одним значением параметра интроверсионности, что противоречит данным о бивалентности связывания (см. раздел IV), и поэтому в настоящее время эту модель также можно считать неадекватной.

В 1974 г. в работе Блоха обсуждалась сильно асимметричная модель моновалентной двухцентровой поры, транслокация в которой рассматривалась как конформационное изменение в фиксированной белковой молекуле, сопровождающееся передачей субстрата с внешнего связывающего участка на внутренний или наоборот [90]. Очевидно, эта модель в силу своей моновалентности наталкивается на те же трудности, что и модель Ле-Февра, и, кроме того, как показал недавно Миллер [91], экспериментальные выводы Блоха о степени асимметрии транспортной системы не вполне коррекны.

VI. МОДЕЛИ БИВАЛЕНТНЫХ ПОР

Первой моделью типа пор, в которой данные по бивалентной кинетике нашли естественное объяснение, явилась предложенная группой Штейна модель тетрамера.

Появление этой модели стало важным принципиальным этапом развития представлений в области пассивного транспорта, так как здесь впервые была сделана попытка связать полуабстрактные кинетические схемы с известными данными о структуре и функции мембран и ферментов, рассматривая транспортную систему как пронизывающий мембрану гетерологический олигомерный белок.

Структурно-физические аспекты функционирования такой системы и ее частных вариантов (моделей «внутренней передачи») представляют особый интерес, здесь же хотелось бы остановиться лишь на чисто кинетических выводах из этой модели.

Еще в 1968 г. появились первые указания на то, что для характеристики системы транспорта сахаров в эритроцитах необходимы две различные константы Михаэлиса, что выражалось в первую очередь в разнице значений K_m , получаемых в разработанных к тому времени процедуре «цис-насыщения» и методике «равновесного обмена» (см. табл. 2).

В 1970 г. Лейб и Штейн предположили, что белок, участвующий в транспорте, обладает двумя типами связывающих участков с различным сродством к глюкозе, причем каждый из этих участков ограничен только одной мембранной поверхностью. Но тогда, исходя из соображений симметрии, каждая мембранная поверхность должна обладать связывающими участками обоого типа, а каждая транспортная единица — по крайней мере четырьмя связывающими центрами (рис. 17) [83]. Если теперь связать участки с высоким и низким сродством ($K_m = H$ и $K_m = L$ соответственно) с различными субъединицами белка, то полная система, возможно, будет тетрамером вида H_2L_2 . Причем, чтобы пересечь мембрану и появиться на ее «транс»-стороне, субстрат должен первоначально связаться с субъединицей на «цис»-стороне мембраны.

Из схемы, приведенной на рис. 17, видно, что подобный тетрамер можно рассматривать как две эквивалентные конформационно связанные двухцентровые асимметричные поры, ориентированные антипараллельным образом. В работе [83] было показано, что с обобщенными H_2L_2 -тетрамерами можно легко получить формальное решение всех известных к тому времени кинетических аномалий, а одна частная модель была развита в количественном аспекте.

В этой двухполостной модели внутренней передачи, предусматривающей существование двух независимых внутренних полостей (пулов) внутри каждого HL -димера, транспортный тетрамер может существовать в двух конформационных состояниях: F и G . В конформации F (рис. 18) все четыре связывающих участка обращены наружу мембраны и доступны субстратам из одного и другого омывающих растворов. В конформации G каждая пара гетерологических связывающих участков обращена друг к другу внутри белка, так что сахар может быть перенесен с одного связывающего центра на другой через внутренние полости.

Последовательные субстрат-индуцированные переходы из одной конформации в другую приводят к осуществлению транспортного процесса. Через год после появления первого варианта модели тетрамера была предложена однополостная внутритранспортная модель [84], которая более естественно удовлетворяла требованиям об идентичности энергий обеих конформаций, а также данным о положении внутренних полостей в олигомерных белках (рис. 19).

На макроуровне кинетического анализа эти модели полностью эквивалентны, а разница между ними на молекулярном уровне заключается в том, как (одновременно или попеременно) экспонируются на каждую сторону мембраны сильно- и слабосвязывающие участки каждого тетрамера.

Вероятно, такой кинетической модели могут отвечать не только тетрамеры, но и любые другие молекулярные структуры, образованные различными комбинациями двухцентровых асимметричных HL -пор (димеров), при условии равенства суммарных (по всей мембране) количеств димеров HL - и LH -ориентаций.

Введя упрощающее предположение о сильном различии сродства между H - и L -субъединицами ($H \ll L$), т. е. приняв, что субстрат как из внешних растворов, так и из внутренних пулов связывается с H -субъединицей с преобладающей вероятностью, можно проанализировать в терминах этой модели ряд известных транспортных ситуаций. На рис. 20 схематически представлены некоторые возможные транспортные ситуации, которые отвечают разработанным ко времени появления модели процедурам «ноль-транс» и «цис-насыщения», а также методике «равновесного обмена» [17]. В «ноль-транс»-процедуре при очень низких концентрациях на «цис»-стороне связывание осуществляется лишь с H -субъединицей и выполняется последовательность a , в результате которой субстрат возвращается в первоначальный раствор и транспорта не происходит. Возможность переноса появляется лишь при высоких концентрациях субстрата, когда связывание происходит по обоим H - и L -центрам и осуществляется $L \rightarrow H$ -передача субстрата, и, следовательно, K_m для «ноль-транс»-процедуры определяется сродством L -субъединицы.

Аналогично в методике «равновесного обмена» при низких концентрациях (последовательность a , ее симметричный аналог и последовательность b) никаких изменений в распределении субстрата не происходит, а обмен начинает происходить лишь при высоких концентрациях субстрата, в результате чего K_m для этой процедуры также определяется сродством L -субъединицы, однако здесь обмен будет осуществляться лишь в определенной части транспортных циклов (см. последовательности g и d).

В процедуре «цис-насыщения» наиболее вероятно последовательность g , при которой происходит транспорт меченого субстрата только через

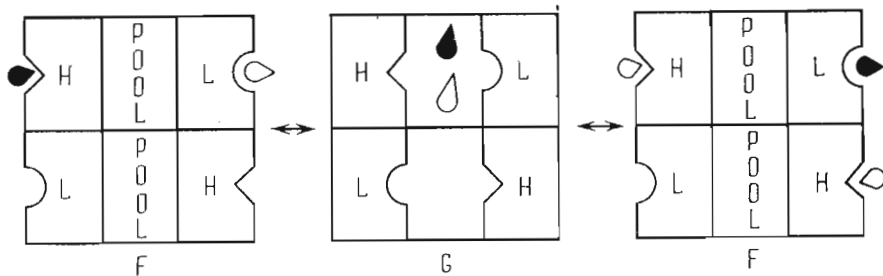


Рис. 18. Двухфазной вариант модели внутренней передачи [83]. Предполагается, что K_m H-субъединицы (H) много меньше K_m L-субъединицы (L). Субстрат, первоначально связывающийся на левой «цис»-стороне мембраны, обозначен черным цветом

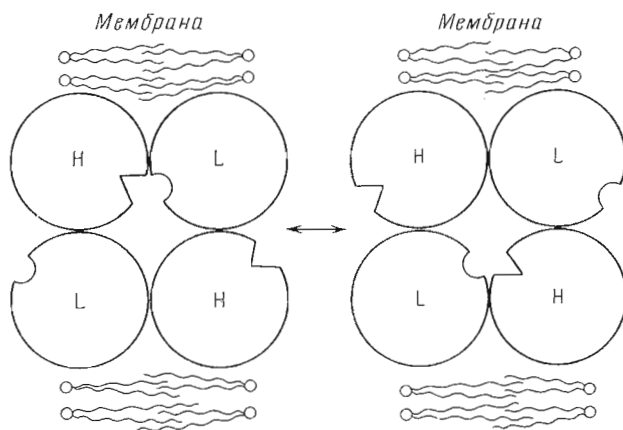


Рис. 19. Однофазная модель внутренней передачи. Относительные сдвиги субъединиц для наглядности преувеличены [84]

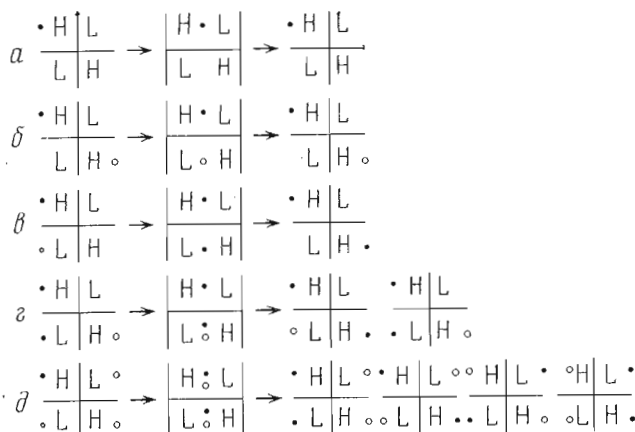


Рис. 20. Схематическое изображение некоторых транспортных последовательностей для двухфазной модели тетрамера или однофазной модели при условии сдвига относительных фаз верхнего и нижнего каналов на половину периода. Черными кружками обозначены молекулы субстрата из левого («цис») раствора, белыми — из правого («транс») раствора [85]

нижний канал и, следовательно, K_m для этой методики определяется средством Н-связывающего участка. В поглощении при «транс-насыщении», по предсказанию симметричной модели тетрамера, основную роль должны играть участки с низким средством [85].

Таким образом, в симметричных моделях внутренней передачи методики «ноль-транс», «транс-насыщение» и «равновесный обмен» должны характеризоваться низким средством, тогда как в процедурах «дис-насыщения» должны обнаруживаться участки с высоким средством. Однако в этом случае невозможно интерпретировать недавно полученные данные [50] о разнице в измеряемом средстве в «ноль-транс»(1—2)- и «ноль-транс»(2—1)-процедурах, а также низкие значения K_m , полученные в опытах по поглощению при «транс-насыщении» для обоих субстратов (см. табл. 2). Кроме данных по средству, проявляемому в различных экспериментальных условиях, модель тетрамера позволяла интерпретировать различие максимальных скоростей некоторых транспортных процедур, и в первую очередь «ноль-транс»-методики и «равновесного обмена». В рамках модели предполагалось, что переходы между конформациями F и G являются субстрат-индуцированными [92], так как эти конформационные состояния разделены существенным энергетическим барьером, вероятность преодоления которого в отсутствие субстрата ничтожна. При анализе увеличения вероятностей переходов при связывании более чем одного субстрата можно было рассматривать ряд правил активации, однако Лейб и Штейн остановились на простейшем из них, приняв, что вклад каждой из субъединиц эквивалентен и независим и, следовательно, частота конформационного перехода прямо пропорциональна числу связанных субстратных молекул. Отсюда делался вывод, что максимальная скорость при «равновесном обмене» должна быть в 2 раза выше, чем в «ноль-транс»-методике, так как в первом случае максимально возможное число связанных молекул субстрата равно четырем, а во втором — двум.

Аналогичный анализ других возможных транспортных последовательностей позволил авторам работ [17, 83] прийти к заключению о необходимости лишь трех основных определяющих параметров для описания системы: двух значений константы диссоциации для Н- и L-связывающих центров и максимальной скорости транспорта в «ноль-транс»-процедурах.

Однако эти предсказания симметричных моделей внутренней передачи не согласуются с недавно полученными результатами, из которых следует, что максимальные скорости для «ноль-транс»(1—2)- и «ноль-транс»(2—1)-процедур различаются как для глюкозы, так и для галактозы почти на порядок (см. табл. 2). Таким образом, на основании существующих кинетических данных как по K_m , так и по V модели внутренней передачи в своей первоначальной форме можно в настоящее время считать неадекватными.

В 1975 г. в работе [75] был проведен обобщенный стационарный анализ системы, состоящей из двух независимых асимметричных двухцентровых пор, в каждой из которых оба гетерологических связывающих участка могут быть одновременно доступны обоим омывающим раствором (рис. 21).

Такие поры могут быть либо антипараллельными ($L^a = L^b$, $H^a = H^b$), либо различными ($L^a \neq L^b$; $H^a \neq H^b$). В наиболее общем случае кинетическое поведение такой системы можно выразить схемой, представленной на рис. 22. Однако полный анализ такой системы очень сложен, и поэтому вводится упрощающее предположение о равновесии реакций ассоциации-диссоциации, так как принимается, что их скорость много больше скорости реакций транслокации субстрата (k_3 , k_4). Тогда получим общее выражение для однонаправленного потока субстрата:

$$\frac{U_{1-2}}{T} = \frac{S_1 K_2 K_{21} k_3 + S_1 S_2 k_4 K_1}{K_1 K_2 K_{21} + S_1 K_2 K_{21} + S_2 K_1 K_{21} + S_1} \quad (25)$$

Это выражение интересно сравнить с уравнением скорости для частной

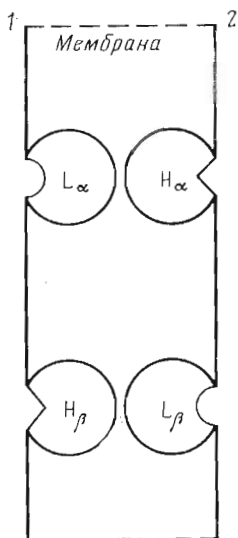


Рис. 21

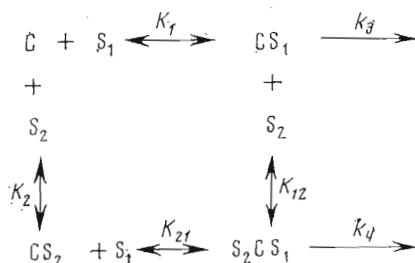


Рис. 22

Рис. 21. Одна из возможных бивалентных моделей пор. Связывающие участки H и L в каждом димере могут быть обращены попеременно к омывающим растворам или внутренним полостям [75]

Рис. 22. Обобщенная кинетическая схема асимметричной поры. K_1, K_2, K_{12}, K_{21} — константы диссоциации; k_3 — константа скорости транспорта S_1 на другую сторону мембраны, когда связана лишь одна молекула S_1 ; k_4 — константа скорости транспорта S_1 при связывании S_2 на другой стороне мембраны [75]

модели димера с внутренней полостью. Уравнение будет складываться из двух членов, один из которых отражает скорость транспорта в случае свободного противоположного участка, а другой — в случае занятого [75]. Предположим, что L — константа диссоциации на стороне 1 мембраны, а H — на стороне 2. Для получения первого компонента вероятность заполнения участка на стороне 1 ($S_1 / (S_1 + L)$) умножается на вероятность того, что противоположный участок будет незаполнен ($H / (S_2 + H)$), и на вероятность перехода молекулы со связывающего участка 1 на связывающий участок 2 ($L / (L + H)$), а также на скорость цикла (пропорциональную 1). Второй компонент получается при умножении вероятности одновременного заполнения обоих участков на вероятность того, что молекула с участка 1 свяжется во внутренней полости с участком 2 ($1/2$) и на скорость цикла (теперь пропорциональную W). В этом случае после преобразования можно получить следующее уравнение для однонаправленного потока:

$$\frac{U_{1-2}}{T} = \frac{S_1HL \frac{L}{L+H} + S_1S_2 \frac{W}{2} L}{L^2H + L^2S_2 + S_1HL + S_1S_2L}, \quad (26)$$

где T — фактор, пропорциональный числу единиц.

Уравнения 25 и 26 идентичны, если $L = K_1 = K_{21}$; $H = K_2$; $L/(L + H) = k_3$ и $W/2 = k_4$.

Отсюда следует важный вывод о невозможности различить модель димеров с внутренними полостями и другие модели, отвечающие общей схеме типа рис. 22 на уровне стационарного кинетического анализа, без дополнительных биохимических или биофизических исследований. Однако в работе [75] дан кинетический критерий, позволяющий различить модели антипараллельных и различных двухцентровых асимметричных пор (димеров) (рис. 24). В модели антипараллельных димеров одна транспортная единица

(α) имеет низкоаффинитивный участок (L^α) на внутренней поверхности мембраны и высокоаффинитивный (H^α) — на наружной. Другая транспортная единица (β) обладает точно такими же значениями K_m , но ориентирована антипараллельным образом по отношению к первой (см. рис. 21). Число α - и β -единиц может быть неравно, и их отношение $\alpha/\beta = n$ отражает степень асимметрии системы.

Уравнения для однонаправленных потоков в случае антипараллельных димеров будут иметь следующий общий вид:

$$\frac{U_{1 \rightarrow 2}}{T} = \frac{S_1 n}{L + S_1} \left(\frac{H}{H + S_2} \frac{L}{L + H} + \frac{S_2}{H + S_2} \frac{W}{2} \right) + \frac{S_1}{H + S_1} \left(\frac{L}{L + S_2} \frac{H}{L + H} + \frac{S_2}{L + S_2} \frac{W}{2} \right), \quad (27)$$

$$\frac{U_{2 \rightarrow 1}}{T} = \frac{S_2 n}{H + S_2} \left(\frac{L}{L + S_1} \frac{H}{L + H} + \frac{S_1}{L + S_1} \frac{W}{2} \right) + \frac{S_2}{L + S_2} \left(\frac{H}{H + S_1} \frac{L}{L + H} + \frac{S_1}{H + S_1} \frac{W}{2} \right), \quad (28)$$

где T — фактор, пропорциональный числу единиц, так что

$$T = V_{z1(1-2)}^\beta + V_{z1(2-1)}^\beta \text{ и } nT = V_{z1(1-2)}^\alpha + V_{z1(2-1)}^\alpha. \quad (29)$$

Анализ потока в условиях процедур «ноль-транс», «транс-насыщения» и «дис-насыщения» [75] показал, что в этих методиках рассматриваемая система будет проявлять кинетику, сходную с полученной для модели антипараллельных переносчиков (см. раздел IV). Однако для случая «равновесного обмена» модель антипараллельных пор (димеров) предсказывает сложное двучленное уравнение

$$\frac{U^{ee}}{T} = \frac{SLH(n+1)}{(S+H)(L+S)(L+H)} + \frac{S^2W(n+1)}{(S+L)(S+H)2}, \quad (30)$$

которое стремится к выражению типа Михаэлиса — Ментен лишь при $S \gg H$:

$$\frac{U_{S \gg H}^{ee}}{T} = \frac{S}{S+L} \frac{W(n+1)}{2}. \quad (31)$$

Поэтому эта модель будет противоречить данным об одночленной кинетике «равновесного обмена» глюкозы [47] при 20°. Что касается моделей различных пор, соответствующих наличию двух параллельных и независимых транспортных систем, то в этом случае получить какие-либо конкретные теоретические предсказания очень трудно, так как разработка моделей этого типа — дело будущего, и поэтому судить о выполнимости подобных схем на основании одного теста [47, 75] представляется преждевременным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный за последние десятилетия теоретический и экспериментальный стационарно-кинетический анализ систем пассивного транспорта сахаров в эритроцитах человека позволил сформулировать целый ряд плодотворных гипотез, а в некоторых случаях и оценить их выполнимость. Так, в настоящее время можно считать доказанным, что любыми моновалентными моделями переносчиков или пор невозможно охватить всю совокупность экспериментальных данных и необходимо развитие бивалентных кинетических моделей. Однако сейчас можно предложить по меньшей мере четыре альтернативные трактовки бивалентности средства на каждой из сторон мембраны:

1) моновалентный асимметричный переносчик, существующий в 1—2- и 2—1-ориентациях поперек мембраны. Такая схема будет соответствовать общей кинетической модели антипараллельных переносчиков. Нап-

более вероятным вариантом такой системы является, по-видимому, модифицированная модель Видавера (см. рис. 3) при условии асимметрии пронизывающей мембрану белка-переносчика по V и K_m и близких вероятностей его антипараллельных ориентаций в мембране;

2) две различные по всем своим параметрам независимые транспортные системы типа «моновалентный, односторонне ориентированный асимметричный переносчик», параллельно работающие на один и тот же субстрат. Этот случай будет отвечать модели различных переносчиков;

3) моновалентная асимметричная по средству терминальных связывающих участков трансмембранная пора, распределенная между 1—2- и 2—1-ориентациями (модель антипараллельных пор). В случае двухцентровых пор, при условии равной вероятности альтернативных ориентаций асимметричных димеров в мембране, такая модель будет включать в себя все возможные варианты моделей тетрамера;

4) две различные по всем параметрам моновалентные, односторонне ориентированные асимметричные поры, параллельно и независимо переносящие один и тот же субстрат (модель различных пор).

В настоящее время сделаны первые попытки различить эти альтернативные бивалентные модели на макрокинетическом уровне, однако при теоретическом анализе подобных схем пока вводится слишком много неоправданных упрощающих предположений, а некоторые модели (например, модель различных пор) еще ждут своей разработки.

Таким образом, первой важнейшей задачей дальнейших кинетических исследований на стационарном уровне должна быть выработка четких, теоретически обоснованных количественных критериев, доступных экспериментальной проверке и позволяющих однозначно выбрать адекватную трактовку бивалентности средства.

Второй задачей, стоящей перед кинетическим анализом, является дальнейшая разработка моделей составных мембранных барьеров в применении к бивалентным переносчикам или порам для ответа на вопрос о роли неперемещиваемых слоев (диффузионных сопротивлений) и их размерах внутри и снаружи клеточной мембраны.

Однако возможности стационарного кинетического подхода существенно ограничены. Так, например, на стационарном уровне нельзя решить вопрос о числе промежуточных комплексов субстрат—переносчик в моделях переносчиков и о числе центров связывания в моделях пор, причем это относится как к моновалентным, так и к бивалентным схемам. Также невозможно при стационарном анализе различить альтернативные гипотезы, описываемые общими кинетическими схемами антипараллельных или различных переносчиков и пор. Поэтому для ответа на вопрос о молекулярных механизмах пассивного транспорта необходимо сочетание традиционных кинетических методов с методами анализа предстационарных состояний и со всей совокупностью имеющихся в энзимологии и мембранной биологии подходов.

Авторы выражают глубокую благодарность А. Ф. Миронову, М. А. Таршису и А. М. Шкробу за интерес к работе и ценные критические замечания при обсуждении рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bolis I. (1975) in *Advances in chemical physics*, vol. XXIX, 301—308.
2. Wang J., Rich T., Gaby W. R., Solomon A. R. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 255, 691.
3. Hingson D. J., Diamond J. M. (1972) *J. Membran. Biol.*, 10, 93.
4. Diamond J. M., Wright E. M. (1969) *Annu. Rev. Physiol.*, 31, 581—646.
5. Никольский Н. Н., Трошин А. С. (1973) Транспорт сахаров через клеточные мембраны, «Наука», Л.
6. Хиллман Г. (1975) Определенность и неопределенность в биологических методах, с. 149, «Мир», М.

7. Wilbrandt W. (1972) in *Biomembranes*, 3, 79—99.
8. Schultz J. S. (1972) in *Biomembranes*, 3, 57—78.
9. Kaback H. R. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 265, 367.
10. Mitchell P. (1967) *Adv. Enzymol.*, 29, 33—87.
11. Ling G. N. (1969) *Int. Rev. Cytol.*, 26, 1.
12. Neville M. L. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 291, 287.
13. Kotyk A. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 300, 183—210.
14. Stein W. D. (1967) *The movement of molecules across cell membranes*, N. Y.—London.
15. Kaback H. R. (1970) *Annu. Rev. Biochem.*, 39, 561.
16. Поликар А. (1975) *Поверхность клетки и ее микросреда*, «Мир», М.
17. Leib W. R., Stein W. D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 265, 187—207.
18. Eilam Y., Stein W. D. (1974) in *Methods in Membrane Biology*, 2, 283—354.
19. Wilbrandt W. (1975) in *Biomembranes*, 7, 11—30.
20. LeFevre P. G. (1975) in *Current Topics in Membranes and Transport* (Bonner F., Keinzeller A., eds.), vol. 7, pp. 109—216, Acad. Press, N. Y.
21. Levin M., Stein W. D. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, 127, 179—193.
22. LeFevre P. G. (1948) *J. Gen. Physiol.*, 31, 505—527.
23. Widdas W. F. (1953) *J. Physiol. (Engl.)*, 120, 20—21.
24. LeFevre P. G., McGinnis G. F. (1960) *J. Gen. Physiol.*, 44, 87—103.
25. Menlen T., Vander Hudson R. A. (1973) *Anal. Biochem.*, 53, 639—649.
26. Lacko L. (1966) *J. Cell. and Compar. Physiol.*, 67, 501—506.
27. Jung C. Y., Carlson B. M., Whally D. S. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 246, 613—627.
28. Jung C. Y., Carlson L. M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 3217—3220.
29. Taverna R. D., Langdon R. G. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 298, 422—428.
30. Taverna R. D., Langdon R. G. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 298, 412—421.
31. Regen D. M., Morgau H. E. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, 79, 151—166.
32. Miller D. M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 266, 85—90.
33. Britton H. G. (1964) *J. Physiol. (Engl.)*, 170, 1—20.
34. LeFevre P. G. (1948) *J. Gen. Physiol.*, 31, 505—527.
35. LeFevre P. G., LeFevre M. E. (1952) *J. Gen. Physiol.*, 35, 891—906.
36. Widdas W. F. (1952) *J. Physiol. (Engl.)*, 118, 23—39.
37. Widdas W. F. (1954) *J. Physiol. (Engl.)*, 125, 163—180.
38. Rosenberg Th., Wilbrandt W. (1952) *Int. Rev. Cytol.*, 1, 65—92.
39. Антонов В. К. (1970) *Изв. АН СССР*, 6, 823—837.
40. Oxender D. L. (1974) in *Biomembranes*, 5, 25—79.
41. Jung C. Y. (1975) in *The Red Blood Cell*, 2, 702—751.
42. Гершанович В. Н. (1973) *Биохимические основы переноса углеводов в бактериальную клетку*, «Медицина», М.
43. Katchalsky A., Spangler R. (1968) *Quart. Rev. Biophys.*, 1, 127—175.
44. Katchalsky A., Blumenthal R. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, 173, 357—369.
45. Vidaver G. A. (1966) *J. Theor. Biol.*, 10, 301—306.
46. Miller D. M. (1968) *Biophys. J.*, 8, 1329—1338.
47. Eilam Y. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 401, 364—369.
48. Sen A. K., Widdas W. F. (1962) *J. Physiol. (Engl.)*, 160, 392—403.
49. Karlsh S. J. D., Leib W. R., Ram D., Stein W. D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 255, 126—132.
50. Ginsburg H., Stein W. D. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 382, 353—388.
51. Lacko L., Wittke B., Kromphardt H. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 25, 447—454.
52. Rosenberg Th., Wilbrandt W. (1957) *J. Gen. Physiol.*, 41, 289—296.
53. LeFevre P. G., Davies R. J. (1951) *J. Gen. Physiol.*, 34, 515—524.
54. Rosenberg Th., Wilbrandt W. (1963) *J. Theor. Biol.*, 5, 288—305.
55. Levine M., Oxender D. L., Stein W. D. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, 109, 151—163.
56. Mawe R. C., Hempling H. G. (1965) *J. Cell. and Compar. Physiol.*, 72, 77—79.
57. Hoare D. G. (1972) *J. Physiol. (Engl.)*, 221, 311—329.
58. Hoare D. G. (1972) in *Biomembranes*, 3, 107—116.
59. Regen D. M., Tarpley H. L. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 339, 218—233.
60. Stein W. D., Leib W. R. (1973) *Isr. J. Chem.*, 11, 325—339.
61. Dawson A. C., Widdas W. F. (1964) *J. Physiol. (Engl.)*, 172, 107.
62. Miller D. M. (1968) *Biophys. J.*, 8, 1339—1352.
63. LeFevre P. G. (1973) *J. Membr. Biol.*, 11, 1—19.
64. Lieb W. R.; Stein W. D. (1971) *J. Theor. Biol.*, 30, 219—222.
65. Miller D. M. (1971) *Biophys. J.*, 11, 915—923.
66. Geck P. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 241, 462—472.
67. Hankin B. L., Leib W. R., Stein W. D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 288, 114—126.
68. King E. L., Altman C. (1956) *J. Phys. Chem.*, 60, 1375.
69. Britton H. G. (1964) *J. Physiol. (Engl.)*, 170, 1—20.
70. Britton H. G. (1965) *J. Theor. Biol.*, 10, 28—52.
71. Hill T. (1966) *J. Theor. Biol.*, 10, 442.

72. Leib W. R., Stein W. D. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 373, 178—196.
73. Foster D. M., Jacquez I. A. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, 436, 210—221.
74. Ginsburg H., Ram D. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 382, 369—376.
75. Eilam Y. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 401, 349—363.
76. Naftalin R. J. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, 211, 65—78.
77. Naftalin R. J. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 233, 635—643.
78. Naftalin R. J. (1972) in *Biomembranes*, 3, 100—106.
79. Leib W. R., Stein W. D. (1972) *J. Theor. Biol.*, 36, 641—645.
80. Edwards P. A. W. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 345, 373—386.
81. Shultz J. S. (1971) *Biophys. J.*, 11, 924.
82. Wilbrandt W., Rosenberg Th. (1961) *Pharmacol. Revs.*, 13, 109.
83. Leib W. R., Stein W. D. (1970) *Biophys. J.*, 10, 585—609.
84. Leib W. R., Stein W. D. (1971) *Nature New Biol.*, 230, 108—109.
85. Stein W. D. (1972) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 195, 412—428.
86. Stein W. D., Danielli J. F. (1956) *Disc. Faraday Soc.*, 21, 238.
87. Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. (1974) в сб. *Электробиология (Итоги науки и техники)*, 10, 5—44.
88. Solomon A. K. (1968) *J. Gen. Physiol.*, 51, 335—364.
89. Leib W. R., Stein W. D. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 373, 165—177.
90. Bloch R. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 3543—3550.
91. Miller D. M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 3637—3638.
92. Koshland D. E., Neet K. E. (1968) *Annu. Rev. Biochem.*, 37, 359.
93. Eilam Y., Stein W. D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 266, 161—173.
94. Harris E. I. (1964) *J. Physiol. (Engl.)*, 173, 344.
95. Miller D. M. (1965) *Biophys. J.*, 5, 417—423.
96. Krupka R. M. (1971) *Biochemistry*, 10, 1143.

Поступила в редакцию
16.VIII.1976

MEMBRANE PROTEINS AND SYSTEMS OF NON-ELECTROLYTE PASSIVE TRANSPORT.

I. KINETIC MODELS FOR PASSIVE TRANSPORT OF SUGARS IN ERYTHROCYTES

VAISBERG E. F., ANTONOV V. K.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

In the review, general principles of the membrane transport classification are briefly considered. The main types of kinetic experiments relevant to the passive transfer systems and procedures for measuring kinetic parameters in red blood cells are discussed. Analysis at the steady-state level is presented for the five classes of kinetic models that have been suggested, in chronological order, for non-electrolyte passive transport: 1) monovalent carrier models, 2) models of the composite membrane barriers, 3) bivalent carrier models, 4) monovalent porous models, 5) bivalent porous models. For all the above models, the kinetic schemes are given which provide a basis for discussing the fundamental parameters of unidirectional flux equations. The relation of fundamental parameters to the measurable kinetic parameters, determined with the aid of different transport procedures, is examined. The adequacy of the models is assessed in the light of experimental kinetic data on monosaccharide transfer in human erythrocytes. The perspectives and limitations of the steady-state kinetic approach to the mechanistic problems of passive transport are dealt with in the concluding part of the survey. The present review embraces the literature from 1952 up to 1976.