

## РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ: БИОФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И ЭКСПЕРИМЕНТ

© 2011 г. Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, С.Н. Черенкевич

Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4, Беларусь

Поступила в редакцию 20.09.10 г.

Построена модель редокс-регуляции функционального состояния клетки на основе представления процессов переноса электронов с помощью эквивалентных электрических схем. С позиций теории цепей рассмотрен механизм действия редокс-активных молекул на биосистемы. Предложен способ определения параметров клеточных редокс-сенсоров. Установлено, что основными управляющими параметрами редокс-сигналов для клетки являются концентрация и редокс-потенциал поступающих в клетку соединений. Экспериментально показано, что величина кальциевого ответа клеток глиомы крысы линии С6 и клеток амниона человека линии FL при действии пероксида водорода зависит от величины редокс-буферной емкости клеток.

*Ключевые слова:* редокс-состояние, редокс-регуляция, окислительный стресс, эффективный редокс-потенциал, редокс-буферная емкость, активные формы кислорода, 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин.

В биологических системах большое число функционально значимых процессов происходит с участием физических механизмов, обеспечивающих межмолекулярный перенос электронов. С точки зрения химии межмолекулярный перенос электрона представляет собой окислительно-восстановительную реакцию. В результате переноса электронов между низкомолекулярными компонентами цитозоля и белками регулируется функциональное состояние как белков, так и клетки в целом [1,2]. Результаты исследований последних лет указывают на то, что реакции с участием окислителей и восстановителей играют фундаментальную роль в процессах жизнедеятельности клеток [3,4]. Однако механизмы регуляторного действия окислителей и восстановителей до сих пор не установлены, так как попытки объяснить механизмы действия этих соединений в рамках традиционных представлений о природе биохимической специфичности лиганда сталкиваются с большими трудностями. В настоящее время для

описания регуляторного влияния акцепторов и доноров электронов используется концепция «редокс-регуляции», в которой совокупность эффектов редокс-активных молекул рассматривается как определенный «редокс-сигнал» [5]. Считается, что в процессах редокс-регуляции ключевую роль играют внутриклеточные тиолы [6,7]. При этом остается нерешенным вопрос, как редокс-сигнал воспринимается и обрабатывается внутри клетки [8].

В рамках концепции редокс-регуляции выдвинуты два механизма для объяснения регуляторного действия редокс-активных молекул. Согласно одному из них, редокс-активные молекулы непосредственно модифицируют определенные белки, согласно другому – изменение внутриклеточной концентрации редокс-активных молекул сопровождается изменением редокс-состояния внутриклеточной среды, в результате которого изменяется состояние белков. В рамках первой модели остается неясным механизм избирательного действия редокс-активных молекул. В рамках второй модели для объяснения регуляторного действия редокс-активных молекул предлагается рассматривать внутриклеточное редокс-состояние как своего рода преобразователь («трансдюсер»), регулирующий передачу сигналов на различные внутриклеточные эффекторы [6,9–11]. Сенсорные системы внутри клеток чувствительны к изменениям параметров внутриклеточного редокс-состояния и с помощью белков-посредников

Сокращения: GSH – глутатион восстановленный, GSSG – глутатион окисленный, CysSS – цистин, Cys – цистеин, DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин, H<sub>2</sub>DCF – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин, H<sub>2</sub>DCF-DA – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат, PSH – тиол белка, PSS – дисульфид белка, PSSG – смешанный дисульфид белка, ВЗМО – высшая занятая молекулярная орбиталь, ARE – антиоксидант-респонсивный элемент (antioxidant response element), СБСР – сбалансированный буферный солевой раствор.

формируют функциональный клеточный ответ. Ключевым моментом при данном подходе является выбор адекватного способа физико-химического описания редокс-состояния.

Количественные изменения внутриклеточного редокс-состояния часто связывают с изменением величины редокс-потенциала глутатиона ( $E_{\text{GSSH}/2\text{GSH}}$ ) [6,12]. Считается, что при изменении редокс-потенциала глутатиона изменяется редокс-состояние белковых тиолов [6]. Передача информации от глутатиона на белковые тиолы возможна при условии, что в клетке все тиолсодержащие соединения находятся в состоянии термодинамического равновесия [6,8]. Однако обнаружено, что изменение степени окисления белковых тиолов может происходить без изменения редокс-потенциала глутатиона [13]. Также установлено, что внутриклеточные и внеклеточные редокс-пары CysSS/2Cys и GSSG/2GSH не находятся в состоянии равновесия друг с другом [7,14]. Тиолсодержащие соединения участвуют в окислительно-восстановительных реакциях с различными окислителями и восстановителями в клетках. На основе ряда экспериментальных данных предполагается, что в цитоплазме с участием редокс-активных молекул формируются электрон-транспортные цепи [15]. При этом структурная организация, механизмы регуляции и функционирования клеточных электрон-транспортных цепей в цитоплазме до сих пор не изучены.

Для количественной характеристики стационарного редокс-состояния клетки нами теоретически и экспериментально обоснованы новые физико-химические параметры – «эффективный редокс-потенциал» и «редокс-буферная емкость», учитывающие вклад основных участников окислительно-восстановительных процессов в клетках. Эффективный редокс-потенциал характеризует «суммарную» способность многокомпонентной внутриклеточной среды в стандартных условиях отдавать электроны [10,11]. Параметр «редокс-буферная емкость» используется для количественной характеристики способности клеток противодействовать изменению величины эффективного редокс-потенциала внутриклеточной среды при изменении концентраций окислителей или восстановителей [16,17]. Показано, что новые параметры могут быть использованы не только для описания окислительно-восстановительных процессов, но и для характеристики функционального состояния клеток [4,18]. Теоретически и экспериментально доказана взаимосвязь параметров гомеостаза, характеризующих кислотно-основное и редокс-состояния клеток [19]. С использова-

нием разработанного нами метода измерения эффективного редокс-потенциала и редокс-буферной емкости показано, что указанные параметры редокс-состояния являются также индикаторами окислительных нарушений в клетках при разных патологиях [18]. Мы предполагаем, что эти параметры могут быть использованы также при описании механизмов редокс-сигнализации в клетках. Цель настоящей работы состояла в построении биофизической модели редокс-регуляции клеточных процессов на основе описания процессов переноса электронов с помощью эквивалентных электрических схем, позволяющей охарактеризовать изменения состояния клеточных редокс-сенсоров при переходах между стационарными редокс-состояниями.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Количественную характеристику стационарного редокс-состояния клетки осуществляли с использованием таких физико-химических параметров, как эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость. Эффективный редокс-потенциал ( $E^{\text{эфф}}$ ) определяется уравнением [10,11]:

$$E^{\text{эфф}} = \sum_{i=1}^n a_i E_i, \quad (1)$$

где коэффициент

$$a_i = \frac{c_i z_i}{\sum_{j=1}^n c_j z_j} \quad (2)$$

представляет собой «удельный вес» заряда, перенесенного в реакции  $i$ -й редокс-парой, т.е. величину отношения заряда, перенесенного  $i$ -й редокс-парой, к суммарному заряду, перенесенному во всех реакциях;  $E^{\text{эфф}}$  – эффективный редокс-потенциал клеток;  $E_i$  – редокс-потенциал  $i$ -го донора или акцептора электронов;  $c_i$  – концентрация  $i$ -й редокс-активной молекулы в биологической жидкости;  $z_i$  – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму;  $n$  – число различных типов редокс-пар, участвующих в формировании редокс-состояния. Зависимость величины редокс-буферной емкости ( $r$ ) от концентраций редокс-активных молекул выражается [16,17]:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n c_i z_i}{z_{\text{ок}}(E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}})}, \quad (3)$$

где  $z_{\text{ок}}$  – число электронов, которые присоединяет молекула окислителя, переходя в восстановленную форму.

Для определения параметров внутриклеточного редокс-состояния применяли флуоресцентный метод с использованием 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ). Значения параметров редокс-состояния клеток определяли путем редокс-титрования на основе анализа скорости окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина пероксидом водорода [17,18]. Показано, что величина изменения интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) в течение 5 мин (время перехода в новое стационарное состояние) после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  в систему ( $V_{\text{ф}}$ ) пропорциональна величине изменения эффективного редокс-потенциала  $\Delta E^{\text{эфф}}$  [17]:

$$V_{\text{ф}} = k_0 \Delta E^{\text{эфф}}. \quad (4)$$

Зависимость  $\Delta E^{\text{эфф}}$  от концентрации введенного в систему окислителя имеет вид [18]:

$$\Delta E^{\text{эфф}} = \frac{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}}{1 + k_{\text{ем}}/c_{\text{ок}}}, \quad (5)$$

где

$$\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}} = E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}} \quad \text{и} \quad k_{\text{ем}} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i z_i}{z_{\text{ок}}}. \quad (6)$$

Уравнение (5) в обратных координатах представляет собой уравнение прямой с наклоном  $k_{\text{ем}}/\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$  и пересечениями: по оси ординат в точке  $1/\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$  и по оси абсцисс в точке  $-1/k_{\text{ем}}$ :

$$\frac{1}{\Delta E^{\text{эфф}}} = \frac{1}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} + \frac{k_{\text{ем}}}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} \frac{1}{c_{\text{ок}}}. \quad (7)$$

Из выражений (3) и (6) следует, что редокс-буферную емкость можно найти, определяя тангенс угла наклона прямой, описываемой уравнением (7). Согласно равенству (4) скорость изменения интенсивности флуоресценции DCF пропорциональна изменению эффективного редокс-потенциала, поэтому  $r$  и  $E^{\text{эфф}}$  могут быть определены при анализе построенной на осно-

вании экспериментальных исследований зависимости  $1/V_{\text{ф}}$  от  $1/c_{\text{ок}}$ .

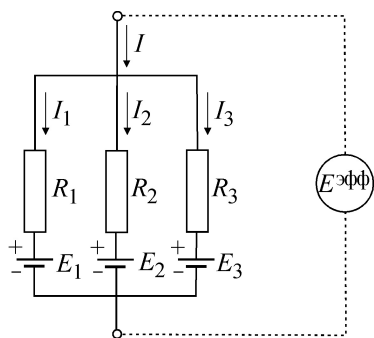
В работе использовали клетки амниона человека линии FL и клетки глиомы крысы линии C6. Культуры клеток линий FL и C6 были приобретены в научно-исследовательском центре предприятия «Диалек» (Минск, Беларусь). Клетки культивировали на среде MEM (Sigma, США) с добавлением 8–10% телячьей сыворотки в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Измерения параметров редокс-состояния и внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция проводили при температуре  $37^\circ\text{C}$  в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР), содержащем: 131 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,3 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1,3 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 0,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 мМ HEPES (pH 7,4) и 6 мМ глюкозы. Для определения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция клетки линий FL и C6 нагружали флуоресцентным зондом fura 2-AM (Sigma, США).

Измерение интенсивности флуоресценции проводили с использованием спектрофлуориметра LSF 1211A научно-производственного центра «СОЛАР» (Минск, Беларусь). При измерении редокс-параметров длина волны возбуждения составляла 488 нм, длина волны флуоресценции – 530 нм. При измерении концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  длины волн возбуждения составляли 340 и 380 нм, длина волны флуоресценции – 510 нм. Все полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

## ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

В рамках термодинамического описания клетка является открытой системой, не находящейся в состоянии термодинамического равновесия. Однако, если клетка находится в стационарном состоянии, можно выделить ряд параметров, величина которых поддерживается на постоянном уровне в течение длительного времени. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что в клетке в состоянии покоя может также поддерживаться стационарное редокс-состояние, при котором концентрации основных редокс-активных молекул не изменяются [7,17,20]. При активации клетки редокс-активными молекулами изменяются скорость и направление протекания редокс-процессов, в результате чего клетка переходит в новое стационарное редокс-состояние.

Направленное движение электронов в клеточных окислительно-восстановительных процессах можно рассматривать как аналог электрического тока, что позволяет использовать



**Рис. 1.** Эквивалентная электрическая схема для расчета параметров редокс-состояния среды, содержащей три восстановителя.

ряд моделей и схем, разработанных в теории цепей. Аналоговые схемы используются для модельного описания ряда биофизических процессов, в том числе токов через ионные каналы в мембране [21].

В клеточных окислительно-восстановительных процессах электроны переносятся между различными редокс-активными молекулами (элементами цепи), но при этом количество электронов, необходимых для восстановления (окисления)  $n$  молекул, не изменяется. Например, пероксид водорода может восстанавливаться различными типами молекул в клетке (аскорбатом, глутатионом, цистеином и т.д.), но общее число электронов, которые необходимы для восстановления  $n$  молекул окислителя, является величиной постоянной: число электронов, присоединяемых молекулами пероксида водорода, равно числу электронов, теряемых молекулами восстановителей. Аналогичную ситуацию можно наблюдать и в узле электрической цепи. Согласно первому закону Кирхгофа алгебраическая сумма токов в узле цепи равна нулю, т.е. число входящих в узел электронов будет равно числу выходящих из узла электронов. В этом случае одновременное присутствие нескольких типов редокс-активных молекул можно представить в виде электрической цепи с параллельно соединенными проводниками.

Направление движения электронов в электрической цепи задается напряжением (разностью электрических потенциалов). Направление движения электронов в редокс-реакциях задается разностью редокс-потенциалов, которая характеризует энергию, необходимую для перемещения заряда между молекулами. Электрические цепи – это совокупности соединенных определенным образом элементов и устройств, образующих пути прохождения электрического тока (пути прохождения электронов). Совокупность редокс-молекул, взаимодействующих ме-

жду собой с помощью редокс-реакций, также образует пути переноса электронов. Таким образом, для расчета параметров стационарного редокс-состояния (концентрации редокс-молекул сохраняются постоянными) может быть использована эквивалентная электрическая схема, изображенная на рис. 1, где источники ЭДС задаются редокс-потенциалами участников реакций ( $E_i$ ).

При применении к указанной схеме (рис. 1) первого закона Кирхгофа следует:

$$I = I_1 + I_2 + I_3. \quad (8)$$

Согласно второму закону Кирхгофа для данной схемы можно записать следующие равенства:

$$\begin{aligned} E^{\text{эфф}} - IR_{\text{сум}} &= 0, \quad E_1 - I_1 R_1 = 0, \\ E_2 - I_2 R_2 &= 0, \quad E_3 - I_3 R_3 = 0, \end{aligned} \quad (9)$$

где  $R_i$  – сопротивление  $i$ -го элемента цепи,  $R_{\text{сум}}$  – суммарное сопротивление цепи. Из выражений (8) и (9) следует, что

$$\frac{E^{\text{эфф}}}{R_{\text{сум}}} = \frac{E_1}{R_1} + \frac{E_2}{R_2} + \frac{E_3}{R_3}, \quad (10)$$

или

$$E^{\text{эфф}} = \sum_{i=1}^n \frac{G_i}{G_{\text{сум}}} E_i, \quad (11)$$

где  $G_i$  – проводимость  $i$ -го элемента цепи,

$G_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^n G_i$  – суммарная проводимость цепи.

Выражение (11) является следствием выполнения законов Кирхгофа для данной схемы и преобразуется в выражение (1), в котором коэффициент

$$a_i = \frac{G_i}{G_{\text{сум}}} \quad (12)$$

представляет собой «удельную проводимость»  $i$ -го элемента цепи. Из (2) и (12) следует, что проводимость  $i$ -го элемента цепи связана с концентрацией редокс-активной молекулы  $c_i$  следующим соотношением:

$$G_i \sim z_i c_i$$

Таким образом, приведенная выше эквивалентная электрическая схема иллюстрирует связь между эффективным редокс-потенциалом

и редокс-потенциалами окислительно-восстановительных участников в клетке и может быть использована для описания стационарного редокс-состояния.

Добавление окислителя (или восстановителя) в клетку вызывает переход из одного стационарного состояния в другое. В теории цепей процесс изменения электрических величин в цепи при ее переходе из одного установившегося режима в другой называется переходным. При анализе переходных процессов ток, напряжение или заряд в некоторой точке цепи обычно представляют в виде функции от времени. Переходный процесс, индуцированный в клетке окислителем, может быть промоделирован замыканием ключа в эквивалентной электрической схеме, изображенной на рис. 2, где  $C_0$  – электрическая емкость конденсатора, равная:

$$C_0 = \frac{q}{U} = \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}}.$$

С учетом (3) электрическая емкость связана с редокс-буферной емкостью системы соотношением:

$$C_0 = z_{\text{ок}} r.$$

После замыкания ключа мгновенные значения напряжения на резисторе ( $iR_{\text{ок}}$ ) и конденсаторе ( $u_c$ ) связаны соотношением:

$$iR_{\text{ок}} = -u_c. \quad (13)$$

Поскольку  $i = C_0 du_c / dt$ , выражение (13) можно переписать в виде дифференциального уравнения

$$R_{\text{ок}} C_0 \frac{du_c}{dt} = -u_c,$$

решение которого с учетом начальных условий (при разрядке конденсатора  $u(0) = E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}$ ) имеет вид:

$$u_c = (E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}) e^{-t/R_{\text{ок}} C_0}.$$

Соответственно ток равен:

$$i = C_0 \frac{du_c}{dt} = -\frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}}{R_{\text{ок}}} e^{-t/R_{\text{ок}} C_0}.$$

Заряд на конденсаторе изменяется по закону:

$$q = C_0 (E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}) e^{-t/R_{\text{ок}} C_0}.$$

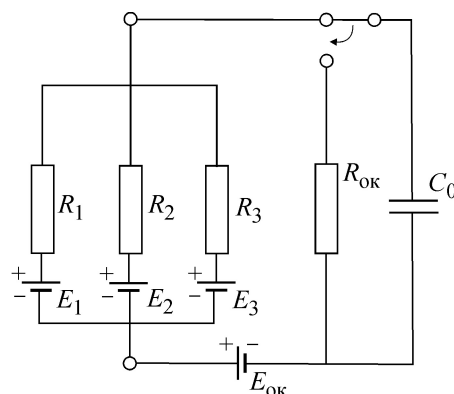


Рис. 2. Эквивалентная электрическая схема для описания переходных процессов между различными редокс-состояниями.

В начальный момент времени ( $t = 0$ ) величина заряда пропорциональна разности напряжений

$$q = C_0 (E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}).$$

Изменение интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина вследствие его окисления фактически характеризует изменение заряда (происходит перенос электронов). В рамках используемой модели предположим, что скорость окисления  $\text{H}_2\text{DCF}$  пропорциональна силе тока в боковой цепи. В начальный момент времени сила тока в боковой цепи была равна нулю (цепь разомкнута). После подключения и зарядки конденсатора сила тока в цепи изменилась (ток течет только через нагрузку, рис. 2):

$$I = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}}{R_{\text{ок}}}.$$

С другой стороны, входящий в цепь ток равен:

$$I = \frac{\Delta E^{\text{эфф}}}{R},$$

где  $R = \frac{R_{\text{ок}} R_{\text{сум}}}{R_{\text{ок}} + R_{\text{сум}}}$  – общее сопротивление цепи,

$R_{\text{ок}}$  – сопротивление на боковом резисторе,  $R_{\text{сум}}$  – сопротивление остальной части (см. схему на рис. 1). Согласно первому закону Кирхгофа, входящий и выходящий токи в цепи должны быть равны:

$$\frac{\Delta E^{\text{эфф}}}{R} = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}}{R_{\text{ок}}}.$$

Используя обратную сопротивлению величину – проводимость, можем записать:

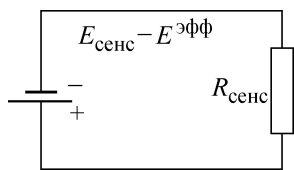


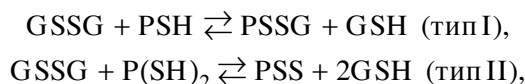
Рис. 3. Эквивалентная электрическая схема внутриклеточного редокс-сенсора.

$$\Delta E^{\text{эфф}} = \frac{E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}}{1 + (G_{\text{сум}}/G_{\text{ок}})}, \quad (14)$$

где  $G_{\text{ок}}$  – проводимость бокового резистора. С учетом (2) и (6) выражение (14) может быть преобразовано в выражение (5), линейризованную форму которого (7) мы использовали при определении редокс-буферной емкости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках модели редокс-регуляции, использующей редокс-потенциал глутатиона для количественного описания изменений редокс-состояния, предполагается, что белковые тиолы являются нанопереклещателями в процессах трансдукции сигналов [6]. Нанопереклещатели могут быть двух типов и их взаимодействие с глутатионом описывается следующими реакциями:



где PSH – тиол белка, PSSG – смешанный дисульфид белка (глутатиолированный белок), PSS – дисульфид белка. При изменении редокс-потенциала глутатиона величина изменения отношения  $[\text{PSSH}]/[\text{PSH}]$  для переключателя типа I будет в два раза меньше, чем величина изменения отношения  $[\text{PSS}]/[\text{P}(\text{SH})_2]$  для переключателя типа II [6]. Предполагается, что в разных клеточных состояниях активируются различные наборы нанопереклещателей [6]. Данный подход основывается на предположении о химическом равновесии между белковыми тиолами и клеточным глутатионом. Однако многочисленные экспериментальные исследования не подтвердили данного предположения. Например, в клетках линии HT29 значение редокс-потенциала для редокс-пары GSSH/2GSH ( $E_{\text{GSSH}/2\text{GSH}}$ ) составляет –250 мВ (3,2 мМ GSH), а для редокс-пары CysSS/2Cys ( $E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}$ ) составляет –140 мВ (0,15 мМ Cys) [14]. В плазме крови значение  $E_{\text{GSSH}/2\text{GSH}}$  равно –140 мВ (0,003 мМ GSH), а  $E_{\text{CysSS}/2\text{Cys}}$  составляет –80 мВ (0,03 мМ Cys) [22].

В рамках предлагаемого нами подхода внутриклеточные белковые нанопереклещатели рассматриваются как сенсоры интегральных изменений редокс-состояния клетки ( $E^{\text{эфф}}$ ), а не как сенсоры изменений редокс-состояния одной редокс-пары ( $E_{\text{GSSH}/2\text{GSH}}$ ), т.е. предполагается, что тиолсодержащие редокс-пары стремятся к равновесию со средой, а не к равновесию с другими тиолсодержащими редокс-парами. Редокс-сенсоры, в качестве которых могут рассматриваться внутриклеточные редокс-пары и тиолы белка, являются сенсорами изменений величины эффективного редокс-потенциала («сенсоры напряжения»). Отдельный редокс-сенсор клетки характеризуется более высоким сопротивлением ( $R_{\text{сенс}}$ ) по сравнению с суммарным сопротивлением цитоплазмы ( $R_{\text{сум}}$ ), поскольку его концентрация значительно ниже, чем концентрации редокс-активных молекул в цитоплазме. Поскольку  $R_{\text{сенс}} \gg R_{\text{сум}}$ , собственное сопротивление источника ЭДС можно не учитывать. Тогда для определения параметров состояния конкретного редокс-сенсора можно использовать эквивалентную электрическую схему, изображенную на рис. 3.

При заданном эффективном редокс-потенциале сила тока, текущего через сенсор, является величиной постоянной и определяется как:

$$I = G_{\text{сенс}}(E_{\text{сенс}} - E^{\text{эфф}}) = G_{\text{сенс}}\Delta E_{\text{сенс}}, \quad (15)$$

где  $G_{\text{сенс}}$  – проводимость сенсора,  $E_{\text{сенс}}$  – редокс-потенциал (ЭДС) сенсора.

Из соотношения (15) следует, что для каждого сенсора при одинаковом  $E^{\text{эфф}}$  величина изменения  $\Delta E_{\text{сенс}}$  зависит от  $G_{\text{сенс}}$ . Чем больше  $G_{\text{сенс}}$ , тем меньше  $\Delta E_{\text{сенс}}$ . Для клеточных и внеклеточных тиолов, концентрации которых различаются, величины  $\Delta E_{\text{сенс}}$  также будут различаться. Таким образом, величина ответа (реакции) редокс-системы на изменение величины эффективного редокс-потенциала при действии редокс-активных молекул определяется величиной передаваемого (принимаемого) заряда (количеством электронов).

Предложенная выше модель позволяет рассчитывать величины изменений редокс-потенциалов для любых редокс-пар, если известно значение эффективного редокс-потенциала системы. Например, рассмотрим клетку, в цитоплазме которой содержатся следующие редокс-активные молекулы: 3,2 мМ GSH; 0,15 мМ Cys; 0,05 мМ НАД(Ф)Н и 0,1 мМ аскорбиновой кислоты (АК). Содержание редокс-активных молекул во внеклеточной среде составляет: 0,003 мМ GSH; 0,03 мМ Cys; 0,005 мМ НАД(Ф)Н; 0,1 мМ АК. Тогда эффективный

редокс-потенциал в клетке при pH 7,2 ( $E_{\text{цит}}^{\text{эфф}}$ ) равен  $-245$  мВ. Эффективный редокс-потенциал внеклеточной среды ( $E_{\text{вн}}^{\text{эфф}}$ ) при pH 7,4 равен  $-55$  мВ. Если редокс-потенциал глутатиона ( $E_{\text{сенси}}$ ) в клетке равен  $-240$  мВ, то, согласно (15), редокс-потенциал для CysSS/2Cys отличается от  $E_{\text{цит}}^{\text{эфф}}$  на 106 мВ и равен  $-139$  мВ. Во внеклеточной среде, наоборот, если редокс-потенциал  $E_{\text{CysSS/2Cys}} = -65$  мВ, то  $E_{\text{GSSH/2GSN}}$  отличается от  $E_{\text{вн}}^{\text{эфф}}$  на 100 мВ и равен  $-155$  мВ. Таким образом, результаты численного эксперимента показывают, что величины редокс-потенциалов тиолсодержащих соединений в клетке и во внеклеточной среде будут различаться, если их концентрации различны.

В рамках предложенного выше подхода трансдукция внешнего редокс-сигнала на белковый редокс-сенсор происходит с участием цитоплазматического «рецептора-трансдюсера». Редокс-сигнал (в рассматриваемом случае окислитель) характеризуется  $G_{\text{ок}}$  и  $E_{\text{ок}}$ , а цитоплазматический рецептор-трансдюсер –  $G_{\text{сум}}$  и  $E^{\text{эфф}}$  (для переходных процессов – емкостью  $C_0 = f(G_{\text{сум}})$ ). Цитоплазматический рецептор-трансдюсер представляет собой разветвленную цепь взаимосвязанных редокс-активных молекул (рис. 1). Поступление нового типа редокс-активных молекул в клетку («рецепция») описывается через подключение дополнительной ветви (см. рис. 2) или изменением проводимости для присутствующих в клетке редокс-активных молекул. Согласно выражению (15), изменение величины  $E^{\text{эфф}}$  вызовет изменение величины редокс-потенциала внутриклеточного сенсора  $\Delta E_{\text{сенси}}$ , что приведет к формированию определенного биологического ответа.

Чем выше проводимость для цитоплазматического рецептора-трансдюсера  $G_{\text{сум}}$  (емкость  $C_0$ ), тем меньше изменения величины  $E^{\text{эфф}}$  при действии редокс-сигнала. С другой стороны, для более сильного окислителя (более высокое значение  $E_{\text{ок}}$ ) характерно меньшее значение  $G_{\text{ок}}$ , т.е. меньшая концентрация агента [17]. Из выражения (14) следует, что при  $G_{\text{сум}} \gg G_{\text{ок}}$

$$G_{\text{сум}} \Delta E^{\text{эфф}} \approx G_{\text{ок}} (E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}). \quad (16)$$

Согласно предложенной модели ответ клетки запускается, когда величина редокс-потенциала сенсора достигает некоторого порогового значения  $E_{\text{сенси}}$ . Из (15) и (16) следует, что величина биологического ответа ( $E_{\text{сенси}}$ ) является линейной функцией  $G_{\text{ок}}$  и  $E_{\text{ок}}$ :

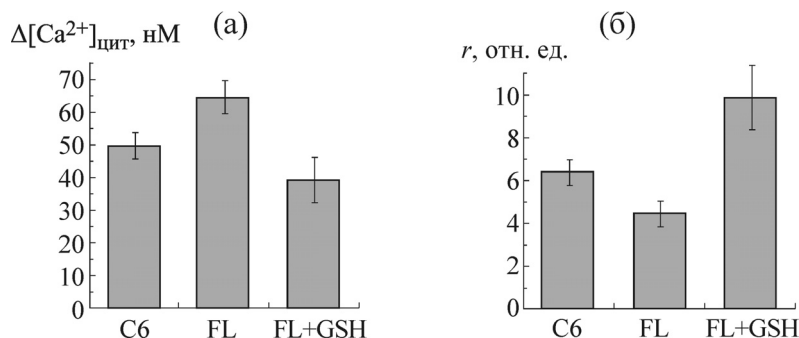
$$E_{\text{сенси}} = \alpha + \beta G_{\text{ок}} (E_{\text{ок}} - E^{\text{эфф}}), \quad (17)$$

где  $\alpha$  и  $\beta$  – константы для определенного типа клеток. Таким образом, один и тот же результат может быть достигнут добавлением различных компонентов, обладающих одним и тем же свойством, – способностью отдавать электроны, количественной характеристикой которой является величина редокс-потенциала. Из выражения (17) следует, что при одинаковом клеточном ответе на действие двух различных веществ должна наблюдаться обратно пропорциональная зависимость между концентрациями агента и разностью редокс-потенциалов агента и клетки:

$$\frac{G_{\text{ок}}^1}{G_{\text{ок}}^2} = \frac{E_{\text{ок}}^2 - E^{\text{эфф}}}{E_{\text{ок}}^1 - E^{\text{эфф}}}.$$

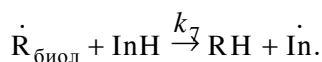
Для ряда синтетических и природных веществ обнаружена взаимосвязь между их физико-химическими свойствами и биологической активностью. Для описания способности веществ отдавать электроны используются различные параметры, такие как окислительный потенциал [23], константа скорости реакции второго порядка для тушения синглетного кислорода фотосенсибилизаторами  $k_{\Delta}$  [24], энергия высшей занятой молекулярной орбитали  $E_{\text{ВЗМО}}$  [25] и др. Обнаружена линейная корреляция между способностью флавонов ингибировать рост клеток карциномы (IC<sub>50</sub>) и значением их  $k_{\Delta}$ : более высокое значение  $k_{\Delta}$  (более отрицательное значение редокс-потенциала) соответствует агенту с более высокой токсичностью [24]. Исследование большой группы растительных фенилпропеноидов и их синтетических аналогов выявило наличие обратно пропорциональной зависимости между способностью соединений (CD<sub>50</sub>) индуцировать синтез НАД(Ф)Н:хинооксидоредуктазы (NQO1, EC 1.6.99.2) и вычисленного для них  $E_{\text{ВЗМО}}$  [26]. Запуском экспрессии фермента NQO1, который играет важную роль в защите клетки от токсичности окислителей и ксенобиотиков, служит связывание фактора транскрипции Nrf2 с антиоксидант-респонсивным элементом ARE после диссоциации комплекса Keap1-Nrf2 в результате образования дисульфидных связей в сенсорном белке Keap1 [27]. Показано, что индуцируемая дифенолами и флавоноидами активность NQO1 также линейно зависит от их способности отдавать электроны [28]. Противовоспалительная активность и способность тритерпеноидов индуцировать синтез NQO1 определяется величиной их индекса электрофильности  $\omega$  [29].

Биологическая активность антиоксидантов также определяется их физико-химическими ха-



**Рис. 4.** Изменение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрации 1 мМ (а) и редокс-буферная емкость (б) исследованных типов клеток. Данные представлены как средние  $\pm$  ошибка среднего по крайней мере трех экспериментов.

рактическими. Например, показано, что биологическая активность антиоксидантов зависит от антирадикальной активности ( $k_7$ ), которая определяется как константа обменной реакции радикалов и свободнорадикальных ингибиторов [30]:



Установлена следующая закономерность: вводимые в организм антиоксиданты должны обладать такой антирадикальной активностью  $k_7$ , чтобы произведение  $k_7[\text{S}]$  для вводимого экзогенного ингибитора было сравнимо с величиной  $k_7[\text{S}]$  для природного, эндогенного ингибитора ( $[\text{S}]$  – концентрация антиоксиданта) [31]. Если  $k_7[\text{S}]$  экзогенного антиоксиданта ниже  $k_7[\text{S}]$  эндогенного, то в свободнорадикальных реакциях, протекающих как *in vitro*, так и *in vivo*, в первую очередь, расходуется собственный, а не вводимый антиоксидант. Таким образом, значения параметров редокс-свойств молекул могут выступать в качестве дескрипторов молекулярной структуры, которые можно использовать для поиска количественного соотношения между заданным видом активности органических соединений и их структурой.

Возможность реализации биологической активности соединения посредством редокс-зависимого механизма указывает на наличие нового типа информационного сигнала для клетки. В представленной модели биологический эффект редокс-активных молекул определяется произведением величин концентрации и редокс-потенциала соединения, а не концентрацией лиганда, как принято в рамках традиционных представлений о природе биохимической специфичности. В качестве рецептора-преобразователя такого сигнала выступает набор внутриклеточных редокс-активных молекул, состояние которого количественно характеризуется с

помощью параметров  $E^{\text{эфф}}$  и  $r$ . Следствием данного подхода является закономерность: для одного и того же вещества, действующего на разные клетки (разные значения  $r$  и  $E^{\text{эфф}}$ ) или на одни и те же клетки, но различающиеся по  $r$ , биологический ответ будет разным.

Нами было исследовано влияние пероксида водорода на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз эпителиальных клеток амниона человека линии FL и клеток глиомы крысы линии C6 (рис. 4). Результаты представленных здесь и более ранних наших исследований [4,32], а также литературные данные [33–36] позволяют предположить, что повышение внутриклеточной концентрации несвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  является одним из ранних ответов внутриклеточных сигнальных систем на воздействие окислителей во многих типах клеток.

Увеличение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывает смещение величины  $E^{\text{эфф}}$ , которое сопровождается увеличением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Согласно нашей модели, предполагается, что изменение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ ) зависит от изменения величины  $E^{\text{эфф}}$ , т.е. одинаковые по величине изменения  $E^{\text{эфф}}$ , вызванные различными агентами, должны сопровождаться одинаковыми по величине изменениями внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Следует отметить, что эффект окислителя зависит также от редокс-буферной емкости клетки. Одинаковая по величине концентрация окислителя при одном и том же значении  $E^{\text{эфф}}$  и разных значениях  $r$  должна оказывать различные эффекты на активность белков и образование дисульфидных связей в тиолатах.

Значения эффективного редокс-потенциала в клетках линий C6 и FL не различаются, так как для обоих типов клеток экспериментально измеренная величина  $\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$  составляла  $4,5 \pm 0,1$  отн. ед. При индуцированном  $\text{H}_2\text{O}_2$  переходе клеток в новое стационарное редокс-состояние

происходит повышение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ). Показано, что величина клеточного ответа  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  зависит от редокс-буферной емкости клеток (рис. 4). Видно, что эта величина обратно пропорциональна величине  $r$ . В клетках линии С6 редокс-буферная емкость выше, чем в клетках линии FL, в результате величина  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в клетках линии С6 меньше, чем в клетках линии FL. Увеличение редокс-буферной емкости клеток линии FL путем инкубирования с 5 мМ GSH приводит к снижению изменения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Вход глутатиона в клетки из внеклеточной среды наблюдается только при концентрациях GSH выше физиологических [37]. Инкубирование клеток с GSH в концентрациях выше 2 мМ приводит к изменению направления градиента концентраций глутатиона и способствует увеличению внутриклеточной концентрации глутатиона и внутриклеточной редокс-буферной емкости. Увеличение редокс-буферной емкости клеток приводит к тому, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  в той же концентрации вызывает уже меньшее смещение величины  $E^{\text{эфф}}$  и, следовательно, меньшее увеличение цитозольной концентрации кальция. Инкубирование клеток линии FL с GSH не вызывает изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ . Однако повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированное  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетках после инкубирования с GSH (после инкубирования клетки дважды отмывали в сбалансированном буферном растворе), значительно меньше, чем в контрольных клетках (рис. 4). Таким образом, использование параметров, характеризующих клеточное редокс-состояние (эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость), позволяет предсказать величину клеточных ответов при действии редокс-активных молекул. Следует также отметить, что введенные параметры являются важными характеристиками многоклеточных организмов, тканей, клеток и клеточных оргanelл [4]. С использованием собственных и литературных данных мы показали, что изменения параметров редокс-состояния происходят в течение жизненного цикла клеток (пролиферация, дифференцировка, апоптоз) [4,10].

Таким образом, в представленной работе построена модель редокс-регуляции клеточных процессов на основе описания процессов переноса электронов с помощью эквивалентных электрических схем. Теоретические предсказания модели экспериментально подтверждены для процессов регуляции кальциевого гомеостаза пероксидом водорода в клетках линий С6 и FL.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского

фонда фундаментальных исследований, гранты № Б09-067 и № Б11-027.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Rusnak and T. Reiter, *TIBS* **25**, 527 (2000).
2. C. Cooper, R. P. Patel, P. S. Brookes, and V. M. Darley-Usmar, *Trends Biochem. Sci.* **27**, 489 (2002).
3. H. Sauer, M. Wartenberg, and J. Hescheler, *Cell Physiol. Biochem.* **11**, 173 (2001).
4. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Окислительно-восстановительные процессы в клетках* (БГУ, Минск, 2008).
5. J. Y. M. Janssen-Heininger, B. T. Mossman, N. H. Heintz, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 1 (2008).
6. F. Q. Schafer and G. R. Buettner, *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 1191 (2001).
7. M. Kemp, Y. M. Go, and D. P. Jones, *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 921(2008).
8. C. C. Winterbourn and M. B. Hampton, *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 549 (2008).
9. J. Smith, E. Ladi, M. Mayer-Proschel, and M. Noble, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10032 (2000).
10. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 1.* № 1, 28 (2004).
11. G. G. Martinovich, S. N. Cherenkevich, and H. Sauer, *Eur. Biophys. J.* **34** (7), 937 (2005).
12. D. P. Jones, *Methods Enzymol.* **348**, 93 (2002).
13. Y. M. Go, J. J. Gipp, R. T. Mulcahy, and D. P. Jones, *J. Biol. Chem.* **279**, 5837 (2004).
14. D. P. Jones, Y. M. Go, C. L. Anderson, et al., *FASEB J.* **18** (11), 1246 (2004).
15. D. P. Jones, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C849 (2008).
16. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 1.* № 3, 14 (2004).
17. G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, S. N. Cherenkevich, and H. Sauer, *Cell Biochem. Biophys.* **58** (2), 75 (2010).
18. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биофизика* **53** (4), 618 (2008).
19. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Н. Голубева и С. Н. Черенкевич, *Биофизика* **54** (5), 846 (2009).
20. D. P. Jones, *J. Intern. Med.* **268**, 432 (2010).
21. С. Н. Черенкевич и А. И. Хмельницкий, *Транспорт веществ через биологические мембраны* (БГУ, Минск, 2007).
22. D. P. Jones, J. L. Carlson, V. C. Mody, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 625 (2000).
23. B. Yang, A. Kotani, K. Arai, and F. Kusu, *Anal. Sci.* **17** (5), 599 (2001).
24. R.V. Bensasson, A. Jossang, A. Zahir, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1–2), 95 (1999).
25. V. Zoete, F. Bailly, F. Maglia, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **26** (9–10), 1261 (1999).

26. V. Zoete, M. Rougee, A. T. Dinkova-Kostova, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **36** (11), 1418 (2004).
27. M. Kobayashi and M. Yamamoto, *Antioxid. Redox Signaling* **7** (3–4), 385 (2005).
28. R. V. Bensasson, V. Zoete, A. T. Dinkova-Kostova, and P. Talalay, *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 805 (2008).
29. R. V. Bensasson, V. Zoete, G. Berthier, et al., *Chem. Biol. Interact.* **186** (2), 118 (2010).
30. Е. Б. Бурлакова, *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева)* **LI** (1), 3 (2007).
31. Е. Н. Кухтина, Н. Г. Храпова, Е. Б. Бурлакова и др., *Докл. АН СССР* **272** (3), 729 (1983).
32. Г. Г. Мартинович, С. С. Черенкевич, А. А. Денисов и др., *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук*, № 4, 70 (2002).
33. M. Wartenberg, H. Deidershagen, J. Hescheler, and H. Sauer, *J. Biol. Chem.* **274** (39), 27759 (1999).
34. K. Bielefeldt, C. Whiteis, R. Sharma, et al., *Am. J. Physiol.* **272**, G1439 (1997).
35. M. Smith, P. Herson, K. Lee, et al., *J. Physiol.* **547**, 417 (2003).
36. S. Nam, S. Jung, C. Yoo, et al., *Yonsei Med. J.* **43** (2), 229 (2002).
37. R. J. Van Klaveren, P. H. Hoet, M. Demedts, and B. Nemery, *Free Radic. Res.* **30**, 371 (1999).

## **Redox Regulation of Cellular Processes: A Biophysical Model and Experiment**

**G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, and S.N. Cherenkevich**

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus*

A model for the redox regulation of the functional state of the cell has been constructed on the basis of representation of electron transfer processes by equivalent electric circuits. The mechanism of action of redox active molecules on biosystems has been discussed in terms of circuit theory. A method for determining the parameters of cellular redox sensors has been proposed. It has been established that the concentration and redox potential of compounds entering the cell are the main regulatory parameters of redox signals for the cell. It has been experimentally shown that the calcium response to hydrogen peroxide in rat C6 glioma cells and human FL amnion cells depends on the redox buffer capacity of cells.

*Key words: redox state, redox regulation, oxidative stress, effective redox potential, redox buffer capacity, reactive oxygen species, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein*