

МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ РЕГУЛЯЦІ РЕДОКС-МЕТАБОЛІЗМУ В ЕРИТРОЦИТАХ

О. Доценко

*Донецький національний університет
вул. Щорса, 46, Донецьк 83050, Україна
e-mail: dots_don@ukr.net*

Розроблена математична модель для кількісної оцінки процесів регуляції редокс-метаболізму в еритроцитах. Центральний вуглецевий метаболізм, процеси окиснення та відновлення гемоглобіну і інших метаболітів змодельовані на підставі точних кінетичних рівнянь. Результати моделювання обговорюються з точки зору сучасних уявлень про механізми регуляції редокс-гомеостазу.

Ключові слова: еритроцити, редокс-гомеостаз, математична кінетична модель, метаболізм, оксидативний стрес.

Регуляторні механізми в клітині відповідальні за підтримку гомеостазу та переходи між різними фізіологічними станами метаболізму. Ці механізми зручно аналізувати за допомогою математичних моделей, для побудови яких зазвичай використовуються підходи кінетичного моделювання [5, 9]. Цей підхід дозволяє досліджувати кожен ефект окремо і зрозуміти, який з них має більший внесок у загальний побічний ефект.

Показано, що властивості ферментів клітин, в цілому, регулюються окисно-відновними реакціями, що протікають між компонентами рідкої фази в клітині і внутрішньоклітинними білками [2, 3]. Підвищення або зниження внутрішньоклітинної концентрації донорів або акцепторів електронів може приводити до зміни швидкостей і напряму протікання окисно-відновних процесів в клітинах і, внаслідок цього, до зміни їхньої функціональної активності. У клітині функціонують механізми, спрямовані на підтримку певного характерного для даної клітини балансу процесів накопичення та утилізації донорів і акцепторів електронів. В результаті роботи цих механізмів підтримується редокс-гомеостаз клітин, тобто при дії зовнішніх факторів величина співвідношення між внутрішньоклітинними концентраціями донорів і акцепторів електронів (або відновниками і окисниками) змінюється в певних межах.

У роботі, на основі літературних даних та математичного моделювання, розглянуті основні механізми регуляції редокс-гомеостазу, його зв'язок з клітинними процесами і діапазон можливих значень параметрів редокс-гомеостазу.

Матеріали та методи

Схема метаболізму еритроцитів, на підставі якої була побудована математична модель, показана на рис. 1. Центральний вуглецевий метаболізм змодельований з використанням моделі Holzhütter [6], в якій 38 диференціальних рівнянь побудовані на основі точних кінетичних рівнянь, що характеризують швидкості реакцій гліколізу, пентозофосфатного шляху, реакцій аденілатного метаболізму (аденілаткінази і фосфорибозилпірофосфатсинтази реакції) і процесів гідролізу АТФ. В модель були додані диференціальні рівняння, що характеризують процес відновлення metHb, а саме Rb5R – реакцію, що каталізується NADH-залежною cytb5-редуктазою, Rb5-metHb і RFMN-metHb реакції, у яких відбувається неферментативне відновлення metHb, за участю відновленого cytb5 і відновленого мононуклеотиду флавіну, відповідно. Окислений мононуклеотид флавін відновлюється у NADPH-залежній флавін-редуктазній реакції, позначеній як RFR (рис. 1).

Ступінь окисного навантаження на еритроцит характеризували швидкістю окиснення гемоглобіну. Вміст гемоглобіну в еритроцитах становить понад 99 % від сумарної білкової фракції і його стан визначає особливості функціонування клітини. Окиснення гемоглобіну представляли реакцією першого порядку щодо оксигемоглобіну, використовуючи k_{ox} у якості константи швидкості:

$$v_{Hbox} = k_{ox} [oxyHb] \quad (1)$$

У моделі не враховували пряме відновлення MetHb малими молекулами, такими як аскорбінова кислота або GSH. За даними [7] вони можуть не враховуватися, бо їхній внесок у загальну швидкість відновлення незначний в нормальних еритроцитах, у порівнянні з двома способами відновлення MetHb, включеними в модель.

Швидкість протікання відновлення MetHb у шляху cytb5-НАДН описували наступними рівняннями [7]:

$$v_{b5R} = k_{cat} [b5R] \cdot \left(\frac{[NADH^+]}{K_{mNADH^+} + [NADH^+]} \right) \left(\frac{[b5ox]}{K_{mb5} + [b5ox]} \right); \quad (2)$$

$$v_{b5-metHb} = k_1 [b5red] \cdot [metHb] - k_{-1} [b5ox] \cdot [oxyHb], \quad (3)$$

де реакції і аббревіатура відповідає позначенням на рис. 1.

Процес неферментативного відновлення описували за допомогою рівняння швидкості другого порядку. Вважали, що відновлення cytb5 NADH-залежною cytb5-редуктазою здійснюється за допомогою простого механізму реакції, запропонованого Abe & Sugita [7].

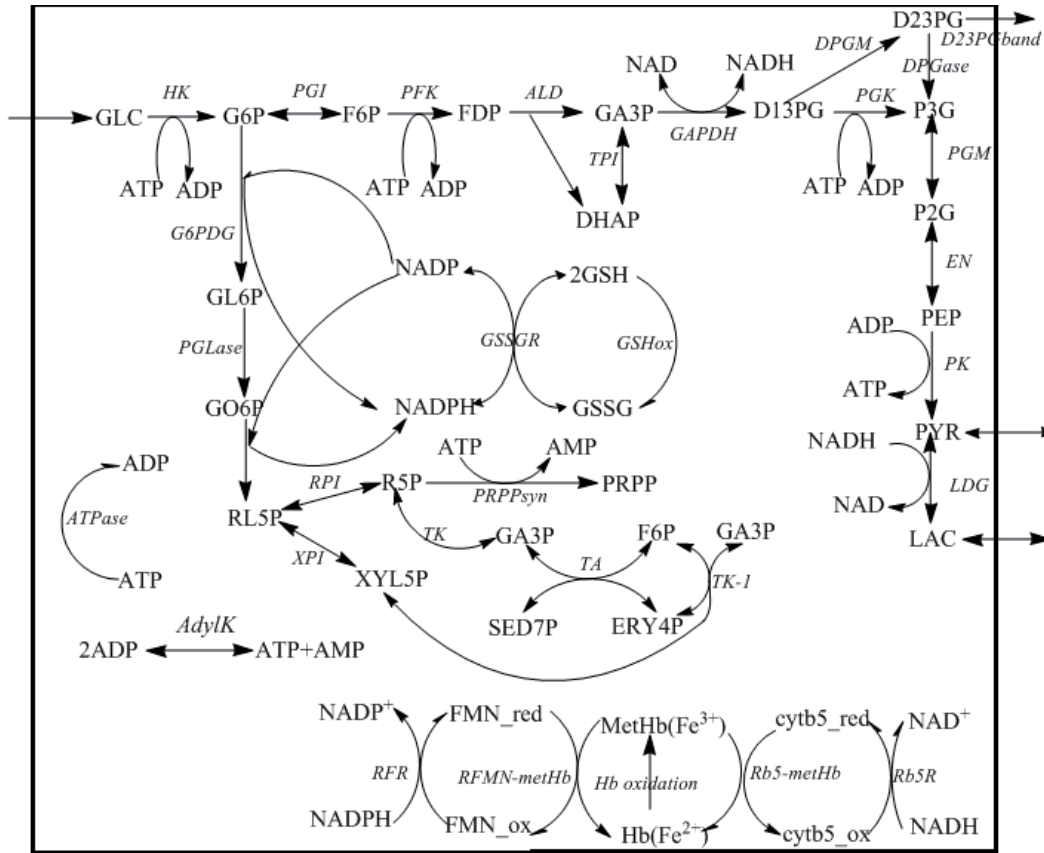


Рис. 1. Схематичне представлення процесів, долучених до моделі метаболізму еритроцитів: GLC-глюкоза; G6P-глюкозо-6-фосфат; F6P-фруктозо-6-фосфат; FDP-фруктозо-1,6-дифосфат; DHAP-дигідроксіацетон фосфат; GA3P-гліцеральдегід-3-фосфат; GL6P-глюконолактон-6-фосфат; GO6P-глюконат-6-фосфат; RL5P-рибулозо-5-фосфат; R5P-рибозо-5-фосфат; X5P-ксилозо-5-фосфат; S7P-седогептулозо-7-фосфат; E4P-еритрозо-4-фосфат; PYR-піруват; LAC-лактат, cyt**5**- цитохром b5; b5R- цитохром b5-редуктаза; FR-флавін-редуктаза, GAPDH - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; G6PDG - глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, GSSG- окиснений глутатіон; GSH-відновлений глутатіон; LDG - лактатдегідрогеназа, MetHb- метгемоглобін, FMN- флавін.

Шлях флавін-NADPH включає аналогічні послідовні процеси: перенесення електронів від NADPH до окисненої форми флавіну, що каталізує FR, і неензиматичне відновлення MetHb відновленою формою флавіну (рис. 1). Ці реакції були описані рівняннями, наведеними нижче:

$$v_{FR} = \frac{k_{cat} [FR] \cdot [NADPH] \cdot [FMNOx]}{K_{iNADPH} \cdot K_{mFMN} + K_{mNADPH} \cdot \left(1 + \frac{[NADP]}{K_{iNADP^+}}\right) [FMNOx] + K_{mFMN} [NADPH] + [FMNOx] \cdot [NADPH]} \quad (4)$$

$$v_{flavin-metHb} = k \cdot [FMN_{red}] \cdot [metHb] \quad \dots \quad (5)$$

Реакція, що каталізується флавінредуктазою, підкоряється впорядкованому механізму ВіВі, і конкурентно гальмується $NADP^+$ [7].

Крім того, в моделі було враховано, що всі форми пиридиннуклеотидів зворотно зв'язуються з білками і цей процес можна охарактеризувати константою рівноваги.

Диференціально-алгебраїчні рівняння, що описують швидкості змінення концентрацій компонентів, що беруть участь у окислювально-відновлювальних реакціях, наступні:

$$\frac{d[metHb]}{dt} = -\frac{d[oxyHb]}{dt} = v_{Hbox} - v_{b5-metHb} - v_{flavin-metHb};$$

$$\frac{d[b5red]}{dt} = -\frac{d[b5ox]}{dt} = v_{b5R} - v_{b5-metHb};$$

$$\frac{d[FMNred]}{dt} = -\frac{d[FMNox]}{dt} = v_{FR} - v_{flavin-metHb};$$

$$\frac{d[NADH]}{dt} = -\frac{d[NAD^+]}{dt} = v_{GAPDH} - v_{LDG} - v_{b5R};$$

$$\frac{d[NADPH]}{dt} = -\frac{d[NADP^+]}{dt} = 2v_{PPP} - v_{GSSGR} - v_{FR};$$

$$\frac{d[GSSG]}{dt} = v_{GSH_{ox}} - v_{GSSGR};$$

$$NADP^+ + NADP^+_{bound} + NADPH + NADPH_{bound} = NADP_{tot};$$

$$NAD^+ + NAD^+_{bound} + NADH + NADH_{bound} = NAD_{tot};$$

$$GSH + 2GSSH = GSH_{tot};$$

$$K_{NADP^+} = \frac{NADP^+_{bound}}{NADP^+}, K_{NADPH} = \frac{NADPH_{bound}}{NADPH}, K_{NAD^+} = \frac{NAD^+_{bound}}{NAD^+}, K_{NADH} = \frac{NADH_{bound}}{NADH};$$

де v_{PPP} – це потік через пентозофосфатний шлях, в якому беруть участь дві реакції, що виробляють NADPH і каталізуються G6PDH і 6-фосфоглюконатдегідрогеназою;

v_{GSSGR} – потік відновленого глутатіону, що каталізує глутатіонредуктаза, необхідний для захисту ферментів і мембранних білків від окиснювального пошкодження;

v_{GAPDH} – це потік реакції, що каталізується GAPDH;

$v_{GSH_{ox}}$ – потік окисненого глутатіону.

Значення параметрів моделі, у тому числі кінетичні параметри і початкові концентрації гемоглобіну або інших компонентів, використані з робіт [6 - 8, 10, 13].

Остаточна модель включає 43 реакції і 53 метаболіти, і складається з шляхів відновлення MetHb, гліколізу, 2,3 - біфосфогліцератного шунта, пентозофосфатного шляху, і

деяких обов'язкових процесів взаємодії гемоглобіну з метаболітами (наприклад, АТФ, 2,3 - біфосфогліцератом).

Кінетична модель метаболізму еритроцитів була реалізована програмою COPASI. Процедура «Parameter Scan», що реалізується в цій програмі, використовувалася для дослідження чутливості потоків реакцій та концентрацій метаболітів моделі до величини k_{ox} , що відображає інтенсивність окисного навантаження на клітину.

Результати і їхнє обговорення

Загальний потік відновлення MetHb і вклади шляхів відновлення флавін-NADPH і cytb5-NADH в загальний потік, показані на рис. 2, А. Ці залежності узгоджуються з даними, отриманими раніше в [7]. При k_{ox} нижче за 10^{-2} h^{-1} , більша частина відновлення MetHb відбувається в шляху флавін-NADPH, і концентрація MetHb в цьому випадку значно нижче $1 \text{ }\mu\text{M}$. В експериментах *in vitro* було показано, що шлях флавін-NADPH досягає своєї межі швидкості при концентрації MetHb $1 \text{ }\mu\text{M}$ при фізіологічних концентраціях ферменту і флавіну [15]. При k_{ox} вище за 10^{-2} h^{-1} відбувається різкий перехід від шляху флавін NADPH до cytb5-NADH шляху (рис. 2, А). Визначена раніше [7] швидкість відновлення MetHb в шляху cytb5-NADH ($1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$) була в тричі вища, від отриманої в експериментах *in vivo* ($\approx 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$). У нашій моделі вона склала $1,72 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ ($4,78 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$) і практично збігається з експериментальними даними. Відносний внесок потоку через шлях флавін-NADPH при високій концентрації MetHb, в кінцевому рахунку становить лише, приблизно, 2% від загального потоку. Ці результати підтверджуються з думкою про те [7], що два шляхи відновлення активні в різних умовах окиснення гемоглобіну, і мають різний внесок у стійкість до окиснювального стресу. Флавін-NADPH шлях може функціонувати в основному для забезпечення відновлення в нормальних умовах, в той час як cytb5-NADH шлях функціонує як основна рушійна сила для відновлення MetHb в умовах надмірного окиснення, наприклад, під час прийому лікарських препаратів, які активізують окислювальні процеси в організмі.

Відомо, що NADPH і NADH є учасниками метаболічних процесів, що регулюють редокс-стан еритроцитів. На рис. 2, Б аналізуються розраховані потоки реакцій, що використовують як коферменти піридинуклеотиди. За результатами математичного моделювання, в умовах надмірного окиснення, підвищений попит на NADH пов'язаний з домінуванням зворотної реакції лактатдегідрогенази (LDG), а не зі збільшенням потоку гліколізу (рис. 2, Б). Видно, що гліколітичний потік через GAPDG залишається незмінним (залежність 1), в той час як потік через LDG, що йде в бік утворення лактату значно знижується (залежність 2). NADH постачається в еритроцитах за нормальних умов, в першу чергу, через гліколіз, але в моделі передбачено, що виробництво NADH пов'язано з

функціонуванням човника лактат/піруват, в зв'язку з тим, що реакція $\text{NADH} + \text{Pyruvate} = \text{NAD}^+ + \text{Lactate}$ -оборотна. Можна припустити, що збільшення швидкості окиснення гемоглобіну призводить до перемикання основного продукту гліколізу з лактату до пірувату, який потім може бути транспортований в плазму.

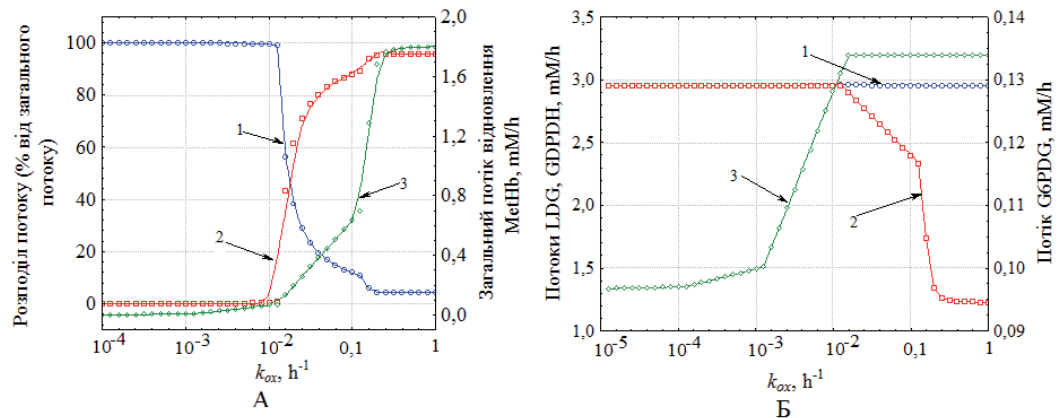


Рис. 2. А - Сумарний стаціонарний потік відновлення MetHb (3) і розподіл потоків (у % від загального потоку) залежно від ступеню окисного навантаження. 1 – Вклад шляху FMN-NADPH і 2- cytb5-NADH в загальний потік відновлення. Б - Зміна ферментативної активності в стаціонарному стані. 1 GDPDH, 2- LDG, 3 - G6PDG.

В зв'язку з цим були розраховані залежності співвідношень NADH/NAD^+ та Lac/Pyg від окисного навантаження (рис. 3, А). В фізіологічному стані величина співвідношення NADH/NAD^+ в тканинах $(10-20) \cdot 10^{-4}$, і зміна цієї величини, в основному, визначається зміненням концентрації NADH. Відомо, що між співвідношенням NADH/NAD^+ та Lac/Pyg в цитозолі існує рівновага, яка підтримується ферментом LDG. З отриманих даних видно, що зниження активності LDG приводить до зниження співвідношень NADH/NAD^+ та Lac/Pyg . На мал. 3, Б показано змінену величин і напрямків потоків обміну Lac та Pyg з зовнішнім середовищем. Видно, що за фізіологічних умов відбувається відтік Lac та надходження Pyg. За умов окисного навантаження величина потоку Lac ззовні значно знижується, а потік Pyg – змінює напрям. Накопичення пірувату в плазмі, в результаті роботи човника піруват/лактат в еритроцитах в умовах надмірного окиснення і підвищення MetHb, співпадає з експериментальними даними [14]. Таким чином, зниження активності LDG та перемикання вихідного кінцевого потоку гліколізу з лактату на піруват, можна вважати специфічною реакцією еритроцитів на окислювальний стрес.

З отриманих розрахунків видно (рис. 2, Б), що в умовах окисного навантаження суттєво зростає потік через G6PDG (залежність 3), що пов'язано з необхідністю підтримувати рівень NADPH як еквіваленту відновлення. Те, що гліколітичний потік переорієнтується в

пентозофосфатний шлях при збільшенні окисного навантаження, також підтверджено експериментально [1]. За отриманими даними потік через G6PDG збільшується на 38,5% при максимальному значенні k_{ox} , яке використовували в моделі. Активність G6PDG надлишкова [10], що дає можливість підтримувати кількість NADPH та GSH, при надмірному окисному навантаженні у клітині.

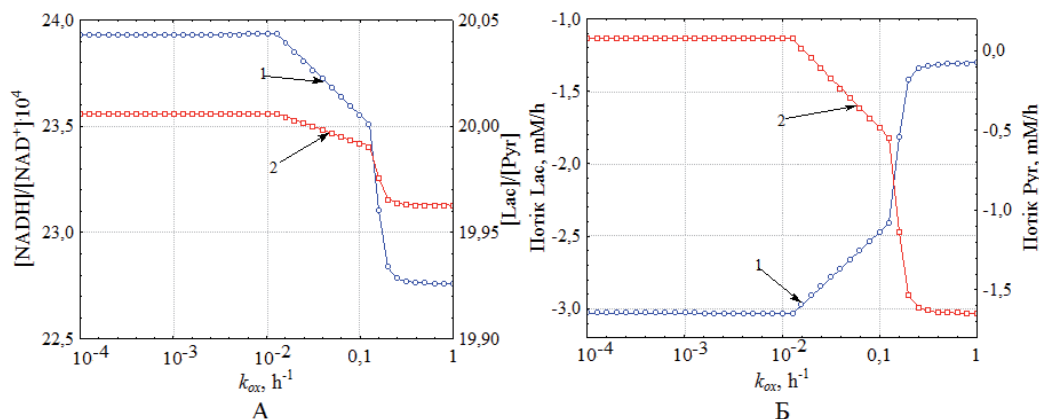


Рис. 3. А- Співвідношення NADH/NAD⁺ (1) та Lac/Пуг (2) як функція від k_{ox} , Б- Зміна потоків обміну Lac (1) і Пуг (2) залежно від окисного навантаження.

На рис. 4 показано зміну концентрацій метаболітів, що беруть участь в шляху відновлення флавін-NADPH. Концентрація відновленого FMN і співвідношення NADPH/NADP⁺ починають знижуватися значно раніше, при значеннях $k_{ox} > 10^{-4}$ h⁻¹, що обумовлено особливостями функціонування системи флавін-NADPH. При $k_{ox} > 10^{-3}$ h⁻¹ спостерігається різкий перехід відновленого FMN в окиснену форму (рис. 4, Б) та зниження NADPH/NADP⁺ (рис. 4, А). На відміну від NADH/NAD⁺, зміна співвідношення NADPH/NADP⁺ визначається концентрацією NADP. За даними моделі, при максимальних значеннях окисного навантаження концентрація NADP зростає на 28%, а NADPH знижується на 0,7%. Незначне зниження концентрації NADPH пояснюється високою активністю в еритроцитах G6PDG, причому, як було показано вище, потік через цю реакцію зростає при окиснювальному навантаженні. Приріст концентрації NADP можна пояснити інтенсивним використанням її відновленої форми в інших реакціях, зокрема, для відновлення окисненого глутатіону глутатіонредуктазою, концентрація якого також збільшується при окисному навантаженні. При зростанні k_{ox} концентрація GSH практично не змінюється, а зниження співвідношення GSH/GSSG (рис. 4, А) обумовлено підвищенням концентрації окисненого глутатіону (однак це підвищення складає не більше 1%).

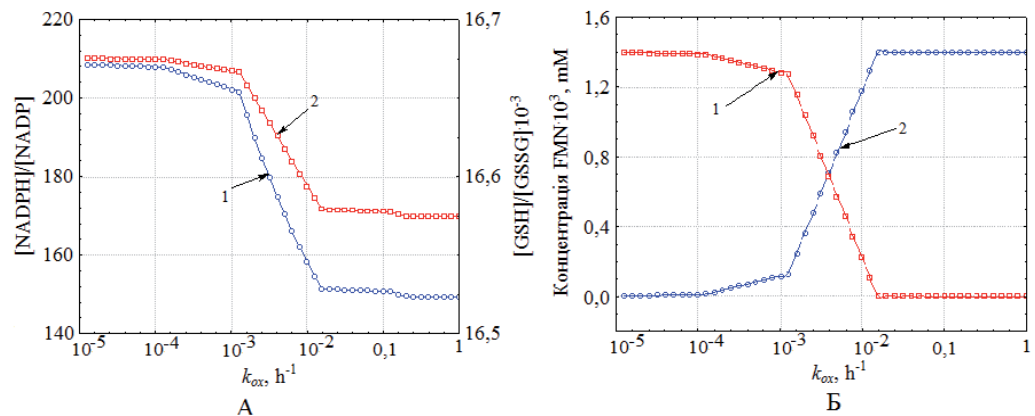


Рис. 4. А- Співвідношення $[NADPH]/[NADP^+]$ (1) та $[GSH]/[GSSG]$ (2) як функції від k_{ox} , Б- Стационарні концентрації відновленої (1) та окисненої (2) форм FMN як функції від k_{ox} .

Захист еритроциту від окисного навантаження, мабуть, відіграє особливу роль в житті цієї клітини. Тому система виробництва відновлювальних еквівалентів має практично порогову поведінку при зростанні окисного навантаження [1]. Це означає, що до деяких значень окисного навантаження, система по ступеню відновленості GSH та NADPH знаходиться практично у фізіологічному стані і може існувати в ньому досить тривалий час. GSH необхідний для того, щоб уникнути незворотного окиснення внутрішньоклітинних білків, включаючи мембранні білки і ферменти, в той час як накопичення GSSG викликає дисфункцію білка, в результаті утворення дисульфідних зв'язків між SH- групами цистеїну і залишками метіоніну [4]. Тому високі активності G6PDH і глутатіонредуктази в еритроцитах людини визначені еволюційно, для того, щоб уникнути сильного виснаження NADPH і GSH, та накопичення GSSG при окисному навантаженні [11, 12].

Таким чином, дані отримані в роботі вказують на те, що функціонування клітин залежить від редокс-властивостей внутрішньоклітинного середовища. В процесі функціонування клітини величини параметрів редокс-стану змінюються в визначеному діапазоні для клітин даного типу. Вихід значень параметрів за межі цього діапазону буде викликати порушення функціонування метаболізму клітини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Жаботинский А. М. и др. Регуляторные характеристики метаболических систем и стабилизация относительных концентраций АТФ и восстановленного глутатиона в эритроцитах человека // Сер. биол. 1983. № 3. С. 406–418.
2. Мартинович Г. Г., Черенкевич С. Н. Редокс-гомеостаз клеток // Успехи физиологических наук. 2008. Т. 39. С. 29–44.

3. *Мартинович Г. Г., Мартинович І. В., Черенкевич С. Н.* Количественная характеристика редокс-состояния эритроцитов // *Биофизика*. 2008. Т. 53. С. 618-623.
4. *Biswas S., Chida A. S., Rahman I.* Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling // *Biochem. Pharmacol.* 2006. Vol. 71. P. 551–564.
5. *Demin O. V., Lebedeva G. V., Kolupaev A. G.* et al. Kinetic modelling as a modern technology to explore and modify living cells // *Modelling in Molecular Biology. Natural Computing Series.* Springer, 2004. P. 59–103.
6. *Holzhütter H. G.* The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks // *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271. P. 2905–2922.
7. *Kinoshita A., Nakayama Y., Kitayama T., Tomita M.* Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress // *FEBS J.* 2007. Vol. 274. P. 1449–1458.
8. *Kinoshita A., Tsukada K., Soga T.* et al. Roles of hemoglobin allosterity in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes. Simulation and its verification by metabolome analysis. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. N 14. P. 10731-10741.
9. *Kuchel P. W.* Current status and challenges in connecting models of erythrocyte metabolism to experimental reality // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004. Vol. 85. P. 325–342.
10. *Salvador A., Savageau M. A.* Quantitative evolutionary design of glucose 6-phosphate dehydrogenase expression in human erythrocytes // *PNAS.* 2003. Vol. 100. P. 14463-14468.
11. *Salvador A., Savageau M. A.* Quantitative evolutionary design of glucose 6-phosphate dehydrogenase expression in human erythrocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. P. 14463–14468.
12. *Salvador A., Savageau M. A.* Evolution of enzymes in a series is driven by dissimilar functional demands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 2226–2231.
13. *Shimo H., Nishino T., Tomita M.* Predicting the kinetic properties associated with redox imbalance after oxidative crisis in G6PD-deficient erythrocytes: a simulation study // *Advances in hematology.* 2011.
14. *Sullivan S. G., Stern A.* Glucose metabolism of oxidatively stressed human red blood cells incubated in plasma or medium containing physiologic concentrations of lactate, pyruvate and ascorbate // *Biochem. Pharmacol.* 1984. Vol. 33. P. 1417–1421.
15. *Yubisui T., Murakami K., Shirabe K.* et al. Structural analysis of NADH-cytochrome b5 reductase in relation to hereditary methemoglobinemia // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989. Vol. 319. P 107–121.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 21.09.14

прийнята до друку 22.09.14

**MATHEMATICAL MODEL FOR SIMULATING THE PROCESSES OF REGULATION
REDOX METABOLISM IN ERYTHROCYTES**

O. Dotsenko

*Donetsk National University
46, Cshorsa St., Donetsk 83050, Ukraine
e-mail: dots_don@ukr.net*

A mathematical model for quantification the regulation processes of the redox metabolism in erythrocytes was developed. The central carbon metabolism, hemoglobin oxidation and reduction processes and other metabolites was modeled on base of accurate kinetic equations. The simulation results are discussed from the point of view of modern ideas about the mechanism of redox homeostasis .

Keywords: red blood cells, redox homeostasis, mathematical kinetic model, metabolism, oxidative stress.

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ РЕГУЛЯЦИИ
РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА В ЭРИТРОЦИТАХ**

О. Доценко

*Донецкий национальный университет
ул. Щорса, 46, Донецк 83050, Украина
e-mail: dots_don@ukr.net*

Разработана математическая модель для количественной оценки процессов регуляции редокс-метаболизма в эритроцитах. Центральный углеродный метаболизм, процессы окисления и восстановления гемоглобина и других метаболитов смоделированы на основании точных кинетических уравнений. Результаты моделирования обговариваются с точки зрения современных представлений о механизмах регуляции редокс-гомеостаза.

Ключевые слова: эритроциты, редокс-гомеостаз, математическая кинетическая модель, метаболизм, окислительный стресс.