

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ В СИСТЕМЕ КЛЕТКА – МЕТАЛЛИЧЕСКИЙ ЭЛЕКТРОД

С.Д. Захаров, С.Н. Перов, Н.А. Панасенко

На электродах, введенных в суспензию эритроцитов, устанавливается равновесная разность потенциалов $\Delta\varphi$, отличная от $\Delta\varphi$ в растворителе. Показано, что при этом происходит перенос электронов от клеток на электрод.

При сенсibilизированном порфиринами воздействии света на живые клетки, обычно называемом фотодинамическим эффектом (ФДЭ) /1/, молекулы сенсibilизатора накапливаются в биомембранах /2, 3/. Повреждения в мембранах при достаточных дозах облучения приводят к гибели клетки, что и используется в фототерапии рака /4–6/. К сожалению, массивное клеточное разрушение приводит к интоксикации. Закономерен вопрос: существует ли ранняя стадия ФДЭ, когда облученные клетки остаются живыми, но утрачивают способность бесконтрольно делиться? В настоящем сообщении описаны выполненные на эритроцитах эксперименты, исходя из которых предлагается простой метод изучения начальных этапов ФДЭ в клеточных суспензиях. В его основе лежит регистрация изменений потенциала электрода в результате переноса электронов при взаимодействии клетка – металл.

Первоначально была выбрана методика /7/. К клеточной суспензии добавлялась малая порция окислителя $K_3Fe(CN)_6$, который восстанавливался мембранной феррицианид-редуктазой /8/: $Fe^{3+} + e \rightarrow Fe^{2+}$. В конце восстановления, определяемом по изменению разности потенциалов $\Delta\varphi$ на опущенных в суспензию электродах, добавлялась следующая порция феррицианида и т.д. Изменения средней скорости восстановления позволили обнаружить и наблюдать с временным разрешением ~ 10 с стадию ФДЭ, предшествующую гемолизу. Однако одновременно обнаружилось неустранимое влияние на процесс накапливающихся продуктов редокс-реакции. При попытках обойти эту трудность было замечено, что обратимые изменения $\Delta\varphi$ возникают на электродах при ФДЭ и без добавления окислителя (рис. 1). Облучение водного раствора сенсibilизатора без клеток не выявило каких-либо изменений $\Delta\varphi$. Это навело на мысль, что здесь имеет

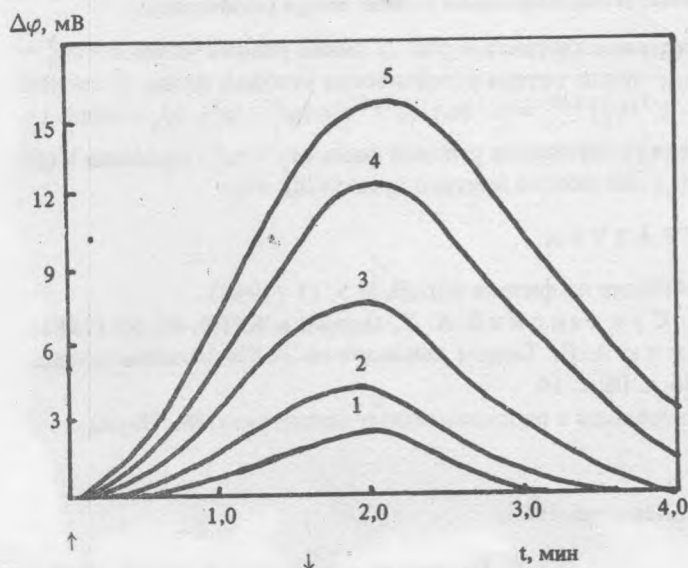


Рис. 1. Фотогальванический отклик в суспензии эритроцитов при сенсibilизированном диацетатом гематопорфирина воздействии излучением He-Ne лазера (633 нм) для различных значений плотности потока: 1 – 0,07 мВт/см², 2 – 0,16 мВт/см², 3 – 0,23 мВт/см², 4 – 0,30 мВт/см², 5 – 0,44 мВт/см². Электродная пара Pt-AgCl. Стрелками указаны моменты включения и выключения облучения.

место прямая реакция клетка – платиновый электрод с переносом электрона. В [9] отмечалась зависимость $\Delta\varphi$ от объемной доли клеток ρ в суспензии. Однако она объяснялась выходом из клеток неких "восстановительных эквивалентов" и последующим их взаимодействием с электродами. Чтобы уточнить этот вопрос, был проведен ряд опытов.

1. После центрифугирования пробирка с суспензией в виде разделенных фракций надосадочной жидкости и уплотненных клеток была перенесена к измерительному стенду. Сначала в нее был введен и зафиксирован электрод сравнения (AgCl), а затем медленно вводился измерительный Pt электрод (рис. 2). Опыты делались без облучения. Пока Pt электрод проходит свободный от клеток раствор, $\Delta\varphi = \Delta\varphi_0$, но в момент касания клеточного слоя $\Delta\varphi$ начинает уменьшаться, выходя при дальнейшем погружении на стационарный уровень $\Delta\varphi_c$.

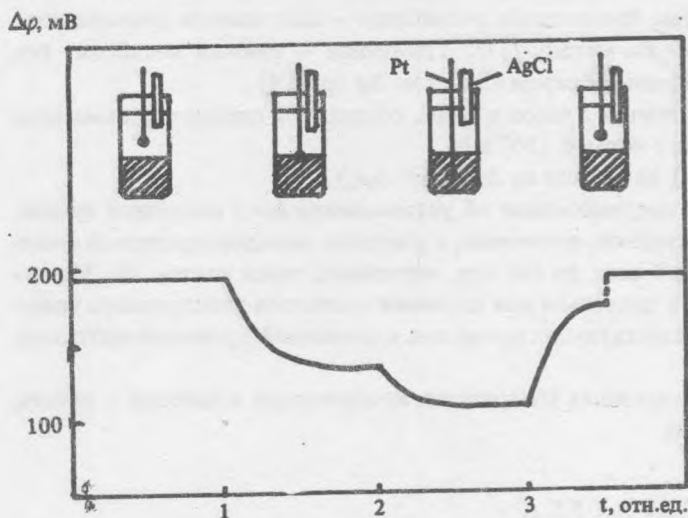


Рис. 2. Изменение разности потенциалов по мере опускания Pt электрода в суспензию, фракционированную центрифугированием ($2 \cdot 10^3$ г, 10 мин).

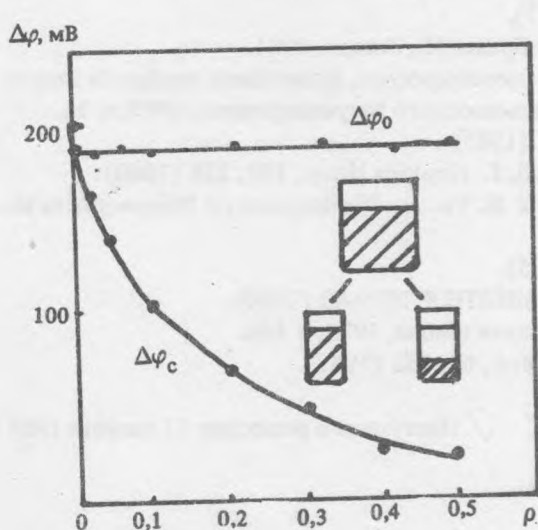


Рис. 3. Зависимость равновесных значений $\Delta\varphi_0$ и $\Delta\varphi_c$ от объемной доли эритроцитов в суспензии. Условия те же, что и для рис. 2.

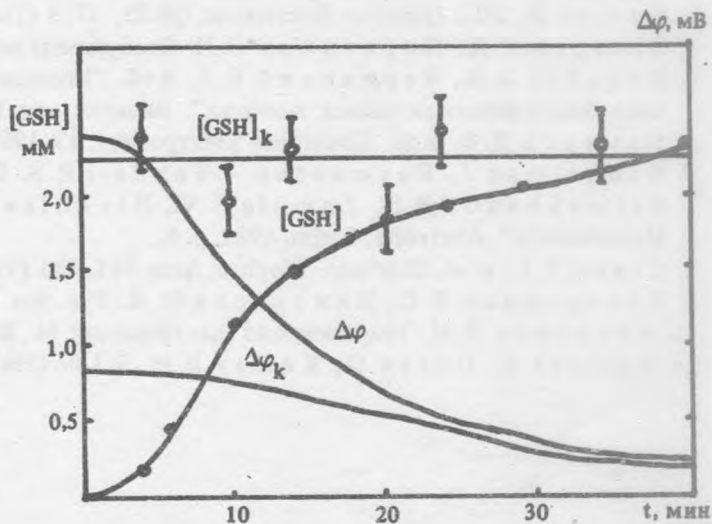


Рис. 4. Зависимость концентрации восстановленного глутатиона от времени и связанное с ним изменение разности потенциалов.

2. В ходе обратного выведения электрода $\Delta\varphi$ возрастает, но обычно не достигает $\Delta\varphi_0$. При этом визуаль-но и под микроскопом на электроде обнаруживаются налипшие клетки. После механической очистки элек-трода значение $\Delta\varphi$ в надосадке вновь возвращается к $\Delta\varphi_0$.

3. В серии опытов с различными начальными ρ установлено, что $\Delta\varphi_0$ не зависит от ρ , а $\Delta\varphi_c$ в исходных суспензиях зависит от ρ экспоненциально (рис. 3). Последнее согласуется с /9/.

Таким образом, равновесная $\Delta\varphi$ в клеточной суспензии формируется только при непосредственном контакте электрод-клетки. Принимая во внимание то, что Pt электрод не вступает в какие-либо химические реакции, а участвует лишь в переносе электронов /10/, следует заключить, что в эритроцитарной суспен-зии происходит перенос электронов из клетки на электрод. Метаболический контроль такого процесса продемонстрирован в следующих опытах.

4. В суспензию клеток вводилась порция третбутилгидроперекиси, достаточная для окисления всего восстановленного глутатиона ($GSH \rightarrow GSS$). Затем происходила релаксация — постепенное ферментатив-ное восстановление $GSS \rightarrow GSH$, контролируемое по методу /11/. Глутатион — важный метаболит так называемого пентозофосфатного пути — определяющим образом влияет на $\Delta\varphi$ (рис. 4).

5. Эритроциты ($\rho = 0,25$), инкубированные в течение 5 часов в среде, обедненной глюкозой, проявляют более высокое значение $\Delta\varphi = 177$ мВ по сравнению с нормой (167 мВ).

6. Отмытые "тени" (эритроцитарные мембраны) не влияют на $\Delta\varphi$ ($\Delta\varphi = \Delta\varphi_0$).

Полученные результаты позволяют высказать предположение об установлении $\Delta\varphi$ в клеточной суспен-зии в результате трансмембранного переноса электронов, возможно, с участием оксидоредуктазной систе-мы плазматической мембраны, присутствующей во всех до сих пор изученных типах клеток /8/. Можно ожидать, что применение данного метода окажется полезным для изучения процессов электронного транс-порта в интактной клетке, отличающихся от соответствующих процессов в клеточной органелле-митохонд-рии.

Авторы благодарны М.Я. Николаевой за предоставление аппаратуры, консультации и помощь в работе, А.Ф. Миронову за предоставление гематопорфирина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Porphyrin photosensitization; ed Kessel D., Dougherty T. J.; New York, Plenum, 1983.
2. Kessel D. IEEE Quantum Electronics, QE-23, 1718 (1987).
3. Захаров С. Д., Поротиков В. И. Возбудимые мембраны. М., Знание, 1981.
4. Воробей А. В., Черницкий Е. А. В сб. "Исследование структуры, физических свойств и энерге-тики биологически активных молекул". Вильнюс, изд. Вильнюсского госуниверситета, 1985, с. 71.
5. Камалов В. Ф. и др. Квантовая электроника, 12, 1997 (1985).
6. Winkelmann J., Rasmussen — Taxdall R. S. Bull. J. Hopkins Hosp., 107, 228 (1960).
7. Balmukhanov B. S., Zamula S. V., Nikolaeva M. Ya. Jn. "Colloquium on Bioenergetics and Mitochondria", Abstracts, Berlin, 1981, p. 4.
8. Crane F. L. et al. Biochem. Biophys. Acta, 811, 233 (1985).
9. Балмуханов В. С., Николаева М. Я., Рук. деп. ВИНТИ № 2679-80 (1980).
10. Антропов Л. И. Теоретическая электрохимия. М., Высшая школа, 1975, с. 568.
11. Beutler E., Duran O., Kelley V. M. J. Lab. Clin. Med., 61, 882 (1963).

Поступила в редакцию 11 августа 1988 г.