

УДК 57.03

УРАВНЕНИЕ АРРЕНИУСА В АНАЛИЗЕ МЕХАНИЗМА ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

© 2020 г. Е.М. Соколова, Н.И. Нешев

Институт проблем химической физики РАН,
142432, Черноголовка Московской области, просп. Академика Семенова, 1
E-mail: neshev@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 12.12.2019 г.

После доработки 12.12.2019 г.

Принята к публикации 13.03.2020 г.

Изучено влияние температуры на кинетику гемолиза эритроцитов под действием *трет*-бутилгидропероксида и динитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами. В качестве оценки скорости гемолиза использовали величину, обратную времени достижения 50% гемолиза. Это позволило представить полученные экспериментальные данные в виде линейных графиков Аррениуса. Тангенс угла наклона для *трет*-бутилгидропероксида был выше в 2.4 раза. Это означает, что гемолиз эритроцитов под действием *трет*-бутилгидропероксида является более термочувствительным и, возможно, протекает по другому химическому механизму. Гемолизу эритроцитов под действием *трет*-бутилгидропероксида предшествовало концентрационнозависимое нарастание уровня тиобарбитурат-реактивных продуктов в мембранах эритроцитов, что указывало на активацию пероксидного окисления липидов. Данный эффект не наблюдался в случае динитрозильных комплексов железа с тиосульфатными лигандами. Это подтверждает различие в механизмах гемолитического действия *трет*-бутилгидропероксида и динитрозильных комплексов железа и согласуется с результатами анализа температурных зависимостей скорости гемолиза по Аррениусу.

Ключевые слова: эритроциты, химический гемолиз, уравнение Аррениуса.

DOI: 10.31857/S0006302920030126

Как известно, в основе многих сложных явлений в биологических системах лежат химические реакции. В связи с этим теоретическое описание зависимости скорости химической реакции от температуры, предложенное в конце XIX века Аррениусом, стало использоваться в биофизике для анализа сложных процессов в биосистемах [1].

Образование в мембране эритроцита разрыва или разрывов, достаточных по размеру для выхода в окружающий раствор гемоглобина, называют гемолизом эритроцита. Причиной гемолиза может быть физическое, химическое или биогенное воздействие на клетку. Предметом данного исследования является химический гемолиз, который мы рассматриваем как макроскопическое следствие химических и биохимических процессов, которые запускаются внешним химическим фактором.

Целью данной работы было исследовать влияние температуры на скорость гемолиза в рамках формализма Аррениуса и оценить возможности

данного подхода для анализа механизма гемолиза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эритроцитарной массы. В качестве источника крови были использованы мыши линии С 57 В1/6f (возраст 3 месяца, масса 18–20 г), полученные из питомника ИПХФ РАН. Забор крови проводили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декаптации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 М раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор цитрата натрия, соблюдая соотношение цитрат/кровь – 1 : 5.

Кровь центрифугировали в течение 7 мин при 1500 g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl (0,85% NaCl, 5 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.4). Центрифугирование повторяли трехкратно. После каждого центрифугирования супернатант декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl. Эритроцитарную

Сокращения: ТБК – тиобарбитуровая кислота, *t*-BuOОН – *трет*-бутилгидропероксид, ТНКЖ – динитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами.

массу, полученную после последнего центрифугирования, хранили в холодильнике при 4°C не более 36 ч.

Гемолиз эритроцитов. В гемолитических экспериментах использовали 0,2% (по объему) суспензию эритроцитов в изотоническом растворе NaCl. Эксперимент проводили при 37°C при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при длине волны 700 нм. Указанная длина волны лежит за пределами основной области электронного поглощения гемоглобина, в связи с чем ослабление светового потока практически полностью связано с рассеянием света на эритроцитах. Высокий уровень разбавления суспензии позволяет радикально уменьшить влияние эффекта многократного внутреннего отражения света на эритроцитах. Это позволяет получать зависимость степени гемолиза от оптической плотности суспензии в удовлетворительном линейном приближении [2, 3]. Степень гемолиза суспензии определяли из соотношения: $\gamma = \frac{D_0 - D}{D_0 - D_{H_2O}}$, где D_0 и D – оптические плотности контрольного и опытного образца соответственно, D_{H_2O} – оптическая плотность образца в условиях полного лизиса всех эритроцитов дистиллированной водой. Во всех экспериментах оптическая плотность контрольного образца (D_0) составляла ~ 0.8 , что соответствовало содержанию клеток $\sim 0.2\%$ по объему. Экспериментальные значения, характеризующие изменение степени гемолиза во времени, аппроксимировали в программе Origin сигмоидальной функцией Больцмана. В качестве количественной характеристики активности эффектора гемолиза использовали время достижения 50%-й степени гемолиза $t(\gamma_{50})$, которое определяли графически (рис. 1).

Анализ продуктов перекисного окисления липидов. Пероксидное окисление липидов мембран эритроцитов характеризовали по уровню образования ТБК-реактивных продуктов (продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) по методу, описанному в работе [4] с модификациями. К 2 мл суспензии эритроцитов добавляли 1 мл 30%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Затем центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин. Отбирали по 2 мл супернатанта и переносили в стеклянные пробирки объемом 20 мл. В каждую пробирку добавляли по 0.5 мл раствора 0.8% ТБК в 0.05 М NaOH. Пробирки инкубировали 30 мин на кипящей водяной бане. После инкубации образцы охлаждали проточной водопроводной водой и определяли оптическое поглощение при длине волны 532 нм.

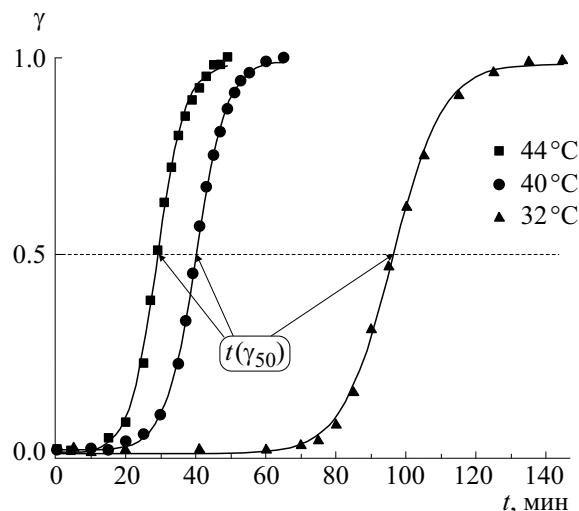


Рис. 1. Кинетика гемолиза эритроцитов под действием t -BuOOH. Содержание эритроцитов – 0.2 об. %; $[t\text{-BuOOH}]_0 = 10^{-4}$ М.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве гемолитических агентов использовали известный инициатор пероксидного окисления липидов мембран *трет*-бутилгидропероксид (t -BuOOH) и биядерный динитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами (ТНКЖ), синтезированный в ИПХФ РАН [5]. На рис. 1 показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием t -BuOOH, полученные при трех различных температурах. Проведение эксперимента при температурах ниже 32°C оказалось невозможным из-за резкого увеличения периода индукции гемолиза до предела гемолитической устойчивости контрольного образца. Стрелками показано графическое определение величины $t(\gamma_{50})$, которой мы характеризовали гемолитическую активность эффектора гемолиза. На рис. 2 показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием ТНКЖ. В этом случае влияние температуры на кинетику гемолиза было менее выраженным, и эксперимент удалось провести в более широком диапазоне температур.

Для построения графиков Аррениуса было необходимо оценить скорость гемолиза. Используемая нами характеристика $t(\gamma_{50})$ – это время в минутах от смешивания реагентов до достижения 50%-го гемолиза. Важно отметить, что этот промежуток времени включает, не только видимый процесс гемолиза, но и предшествующий ему период индукции. Таким образом, данная характеристика может служить оценкой длительности протекания химических процессов внутри клетки, приводящих к гемолизу. Соответственно обратная ей величина, $1/t(\gamma_{50})$, будет служить

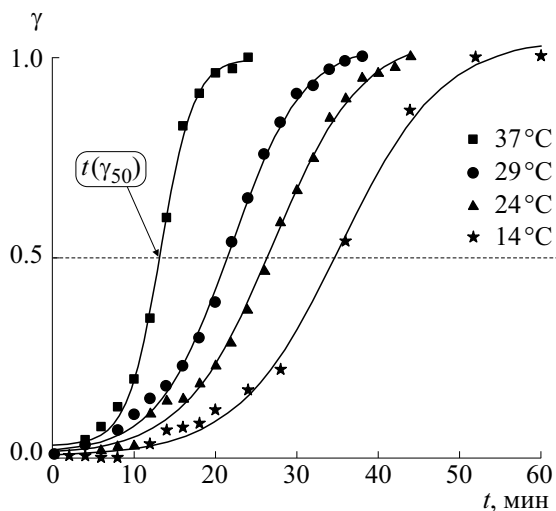


Рис. 2. Кинетика гемолиза эритроцитов под действием ТНКЖ. Содержание эритроцитов – 0.2 об. %; $[ТНКЖ]_0 = 10^{-4}$ М.

оценкой скорости этих процессов и может быть использована для построения графиков Аррениуса. На рис. 3 показаны графики Аррениуса для *t*-BuOOH и ТНКЖ, построенные на основе данных, представленных на рис. 1 и 2. Как видно из рис. 3, логарифмы характеристик $1/t(\gamma_{50})$ для каждой из гемолитических кривых для *t*-BuOOH и ТНКЖ линейно зависели от обратной абсолютной температуры. Тот факт, что данные гемолитических экспериментов удается представить в указанных координатах, свидетельствует о том, что гемолиз эритроцитов в обоих случаях имеет химическую природу. При этом величина $1/t(\gamma_{50})$ адекватно характеризует скорость предгемолитического процесса в каждом случае.

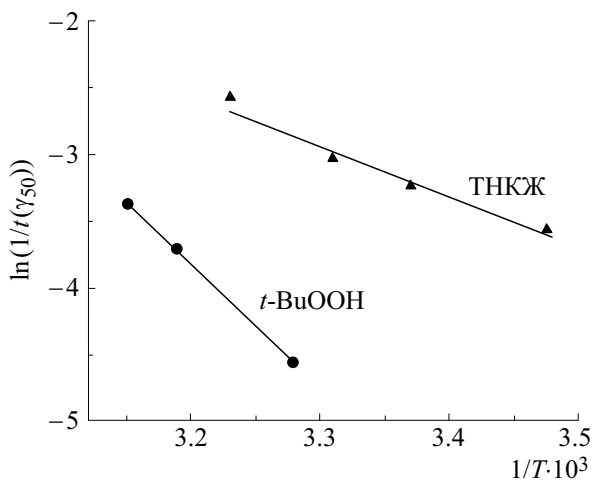


Рис. 3. Взаимосвязь между скоростью гемолиза и обратной абсолютной температурой.

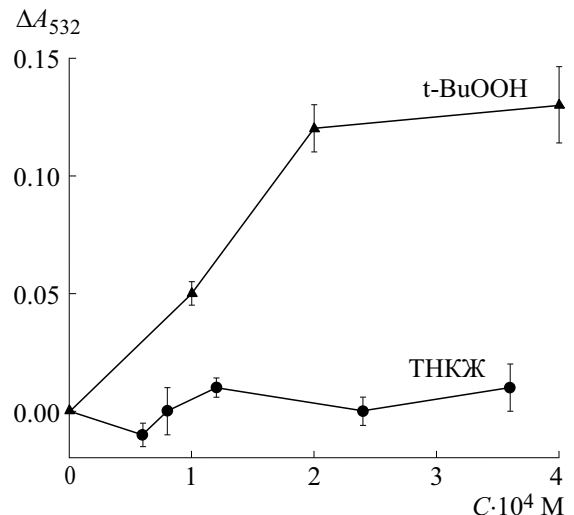


Рис. 4. Образование ТБК-реактивных продуктов в мембранах эритроцитов под действием *t*-BuOOH и ТНКЖ. Содержание эритроцитов – 1.6 об. %; время инкубации – 20 мин; $t = 37^\circ\text{C}$.

Как известно, тангенс угла наклона графика Аррениуса характеризует величину энергии активации изучаемой химической реакции. В нашем случае эту характеристику можно с определенной степенью условности назвать энергией активации гемолиза. При этом тангенс угла наклона для *t*-BuOOH в 2.4 раза выше, чем для ТНКЖ (рис. 3). Это означает, что гемолиз эритроцитов под действием *t*-BuOOH является более термочувствительным и, вероятно, протекает по другому химическому механизму.

Общеизвестным маркером пероксидного окисления в мембране считается образование ТБК-реактивных продуктов, главным из которых является малоновый диальдегид. Анализ образования ТБК-реактивных продуктов в мембранах эритроцитов под действием *t*-BuOOH и ТНКЖ (рис. 4) показал характерное для *t*-BuOOH концентрационнозависимое нарастание уровня ТБК-реактивных продуктов. Это согласуется с известными литературными данными, согласно которым в основе гемолиза, инициируемого *t*-BuOOH, лежит процесс пероксидного окисления липидов эритроцитарной мембраны, приводящий к нарушению ее барьерных свойств [6, 7]. В то же время, как видно из рис. 4, в случае ТНКЖ образование ТБК-реактивных продуктов в мембране эритроцита не обнаружено. Это подтверждает различие в механизмах гемолитического действия *t*-BuOOH и ТНКЖ, что согласуется с предположением, высказанным выше на основе анализа механизмов гемолиза по Аррениусу.

Исследования показали, что источником гемолитической активности сера-нитрозильных комплексов железа, к классу которых относится

ТНКЖ, является выделяемый ими в среду оксид азота, а непосредственным химическим индуктором гемолиза выступает продукт биохимической трансформации оксида азота – пероксинитрит [8]. Предполагается, что гемолитическое действие данной группы доноров NO реализуется через известный для пероксинитрита механизм окисления сульфгидрильных групп в белках [9]. Среди потенциальных внутриклеточных мишеней пероксинитрита в эритроците обращает на себя внимание сульфгидрильная группа цистеина в активном центре Na^+/K^+ -АТФазы, окислительная модификация которой под действием пероксинитрита, приводящая к ингибированию фермента, была ранее продемонстрирована *in vitro* [10]. Последнее может приводить к нарушению коллоидно-осмотического равновесия в эритроците и, следовательно, к гемолизу. Как известно, процессы, связанные с работой ферментов характеризуются низкими энергиями активации в сравнении с обычными химическими реакциями, что согласуется с данными настоящей работы.

Таким образом, полученные результаты показывают эффективность предложенного нами подхода к анализу механизма химического гемолиза эритроцитов на основе анализа температурных зависимостей с использованием уравнения Аррениуса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания (Регистрационный № 0089-2019-0014).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Блюмефельд, *Проблемы биологической физики* (Наука, М., 1977).
2. J. D. Young, L. G. Leong, M. A. DiNome, and Z. A. Gohn, *Anal. Biochem.* **154** (2), 649 (1986).
3. A. Pani and R. Granth, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* **1027** (2), 199 (1990).
4. J. Stocks and T. L. Dormandy, *Br. J. Haematol.* **20** (1), 95 (1971).
5. Н. А. Санина, О. А. Ракова, С. М. Алдошин и др., *Координац. химия* **27** (3), 198 (2001).
6. B. Deuticke, K. B. Heller, and C. W. Haest, *Biochim. Biophys. Acta* **899** (1), 113 (1987).
7. B. Deuticke, K. B. Heller, and C. W. Haest, *Biochim. Biophys. Acta* **854** (2), 169 (1986).
8. Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Е. М. Соколова и др., *Изв. РАН. Сер. хим., № 12*, 2160 (2010).
9. R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman., *J. Biol. Chem.* **266**, 4244 (1991).
10. P. Muriel, G. Castaneda, M. Ortega, and F. Noel, *J. Appl. Toxicol.* **23** (4), 275 (2003).

Arrhenius Equation in Analysis of the Mechanism of Erythrocyte Hemolysis

E.M. Sokolova and N.I. Neshev

*Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

The effect of temperature on the kinetics of erythrocyte hemolysis induced by *tert*-butyl hydroperoxide and dinitrosyl iron complex with thiosulfate ligands was studied. The inverse of the time needed to achieve 50% hemolysis was used as an estimate of the rate of hemolysis. This has afforded us an opportunity to present the obtained experimental data in the form of linear graphs of Arrhenius. The slope for *tert*-butyl hydroperoxide was 2.4 times higher. This means that erythrocyte hemolysis induced by *tert*-butyl hydroperoxide is more thermosensitive and, probably, proceeds through a different chemical mechanism. The hemolysis of red blood cells induced by *tert*-butyl hydroperoxide was preceded by a concentration-dependent increase in the level of thiobarbiturates-reactive products in the erythrocyte membranes, indicating the activation of lipid peroxidation. This effect was not observed in the case of dinitrosyl iron complexes with thiosulfate ligands. This confirms the difference in the mechanisms of hemolytic action of *tert*-butyl hydroperoxide and dinitrosyl iron complexes and is consistent with the results of the analysis of the temperature dependences of the rate of hemolysis according to the Arrhenius equation.

Keywords: erythrocytes, chemical hemolysis, Arrhenius equation