

ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГЕМОЛИЗЕ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЯМИ

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.

Белорусский государственный университет

пр. Независимости 4, г. Минск, Республика Беларусь; e-mail: voynarovskiy197@mail.ru

Поступила в редакцию 24.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0536

Аннотация. Пероксид водорода, образующийся при клеточном дыхании и действии физико-химических факторов, является важным участником внутриклеточных регуляторных процессов. Умеренное повышение концентрации пероксида водорода активирует механизмы, связанные с защитой и адаптацией, а при высоком уровне окислителя наблюдается повреждение клеточных структур. В работе показано, что при действии пероксида водорода в микромолярных концентрациях наблюдается повышение структурной стабильности мембран и снижение доли гемолизированных эритроцитов при разрушении хлорноватистой кислотой, наночастицами серебра и нитратом серебра. Предложен метод количественной оценки регуляции защитных свойств эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе различными факторами. Показано, что диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение доли негемолизированных клеток (область гормезиса), различается для различных факторов, приводящих к разрушению. На основе разработанной математической модели разрушения клеток при действии повреждающего фактора и гормезисных зависимостей ответа эритроцитов на действие пероксида водорода проведён расчёт параметров, характеризующих регуляцию клеточных адаптационных процессов. Предложенный метод анализа защитных свойств клеток позволяет сравнивать адаптационные свойства эритроцитов и определять оптимальные условия для их регуляции внешними факторами.

Ключевые слова: эритроциты, адаптация, резистентность, гемолиз.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов адаптации клеток к стрессу и разработка способов регуляции их резистентности к действию физических, химических и биологических повреждающих факторов является актуальной задачей медицинской биофизики. Ключевыми участниками адаптационных процессов клеток являются активные формы кислорода (АФК) – высокорекреационные продукты метаболизма кислорода, обладающие широким спектром физиологического и патофизиологического действия [1].

Согласно современным представлениям основной молекулой группы АФК, участвующей в регуляторных процессах, является пероксид водорода [2]. Умеренное повышение концентрации пероксида водорода активирует механизмы, связанные с защитой и адаптацией, а при высоком уровне окислителя наблюдается повреждение клеточных структур [1,2]. Такое свойство живых систем, описываемое изменением знака биологического эффекта при увеличении величины стрессора, называется гормезисом и объясняется наличием специфических компенсаторно-адаптационных механизмов [3].

Ключевую роль в адаптационных процессах большинства клеток млекопитающих играет фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), активность которого контролируется с участием редокс-зависимого белка Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) [4]. Однако в эритроцитах данная система поддержания редокс-гомеостаза отсутствует, и защита клеток при стрессовых воздействиях осуществляется цитоплазматическими механизмами, включающими регуляцию функционального состояния белков и их взаимодействий с мембраной и цитоскелетом клетки [5]. Ранее нами было показано, что структурная стабильность мембран эритроцитов зависит от внеклеточной концентрации пероксида водорода: повышается при низких концентрациях и снижается при высоких [6]. Установлено, что соотношение мембранных комплексов различных окисленных форм гемоглобина определяет гормезисную зависимость ответа эритроцитов на действие пероксида водорода – регуляторное при низких концентрациях и повреждающее при высоких.

В данной работе предложен метод количественной оценки защитных свойств клеток и способности стрессовых факторов регулировать защитные свойства эритроцитов на основе анализа гормезисных зависимостей ответа эритроцитов на действие пероксида водорода. Изучено влияние предварительного инкубирования клеток с пероксидом водорода и в средах с различным рН на структурную стабильность при гемолизе. Показано, что диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение доли негемолизированных клеток, различается для различных факторов, приводящих к разрушению. В качестве таких факторов использовались наночастицы серебра, нитрат серебра и хлорноватистая кислота. Численная оценка параметров изменения защитных свойств клеток при действии пероксида водорода проводилась на основе разработанной математической модели разрушения клеток при действии повреждающего фактора.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Повышение структурной стабильности мембран эритроцитов, индуцируемое пероксидом водорода, усиливает защитные свойства клеток и, следовательно, уменьшает количество разрушенных при гемолизе клеток. В предложенной модели гемолиза эритроцитов считается, что скорость разрушения клеток пропорциональна количеству клеток в суспензии (n) и концентрации повреждающего фактора в активном состоянии (c_a). Действие защитных систем клеток в модели учитывается изменением скорости перехода повреждающего фактора из неактивного состояния (c_n) в активное (c_a). Такой процесс, например, может быть обусловлен скоростью трансмембранного переноса или в случае наночастиц, скоростью высвобождения ими токсичных соединений. Повышение защитных свойств клеток, индуцированное окислителями в концентрации $c_{ок}$ приводит к уменьшению коэффициента активации k_a , что снижает вероятность перехода повреждающего фактора из неактивного состояния (c_n) в активное (c_a). Максимум обусловленного окислителем изменения защитных свойств клеток учитывается путём введения коэффициента защиты k_3 . Скорость достижения максимума определяется коэффициентом k_n , который численно равен концентрации окислителя, при которой эффект достигает половины от максимума. Скорость изменения количества клеток в суспензии регулируется двумя конкурирующими процессами (защиты и разрушения) и описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -k_p \cdot n \cdot c_a \\ \frac{dc_a}{dt} = \left(k_a - \frac{k_3 \cdot c_{ок}}{k_n + c_{ок}}\right) \cdot c_n \\ \frac{dc_n}{dt} = -\left(k_a - \frac{k_3 \cdot c_{ок}}{k_n + c_{ок}}\right) \cdot c_n \end{cases},$$

где k_p – коэффициент разрушения, k_a – коэффициент активации.

Построенная математическая модель является нелинейной, численное решение системы выполнялось в программе Wolfram Mathematica.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали нитрат серебра (AgNO_3) (ЛенРеактив, Россия), пероксид водорода (H_2O_2) (РУП Белмедпрепараты, Беларусь) и гипохлорит натрия (NaOCl) (Sigma-Aldrich).

Концентрацию раствора NaOCl определяли спектрофотометрически, как концентрацию OCl^- при pH 12,0, коэффициент молярной экстинкции (ϵ_{292}) равен $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Поскольку pK_a для HOCl $\sim 7,5$ при физиологических pH, половина соединения присутствует в протонированной форме HOCl и половина в депротонированной форме OCl^- . Таким образом, под термином HOCl понимается смесь HOCl/OCl^- . Рабочий раствор HOCl готовили непосредственно перед анализом путем растворения препарата в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 137 мМ NaCl .

Кровь здоровых доноров получали в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Беларусь). Лейкоцитарный слой и плазму крови отделяли после двукратного центрифугирования при 1500 об/мин. Спектрофотометрические исследования эритроцитов проводили в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , 5 мМ D-глюкозы (pH 7,4). Количество эритроцитов оценивалось по спектрам поглощения с использованием спектрофлуориметра CM-2203 и спектрофотометра UV-VIS PB 2201 на длине волны 680 нм (Solar, Республика Беларусь).

Получение наночастиц проводили с применением методов “зелёной химии” [7]. Раствор нитрата серебра в концентрации 1 мМ смешивали с водным яблочным экстрактом в соотношении 9:1 при pH 8,0 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Окончание синтеза регистрировали по появлению пика на длине волны 400 нм, обусловленного поверхностным плазмонным резонансом. Количественные изменения наночастиц в экспериментах выражали через концентрацию ионов серебра, необходимую для их синтеза.

Гемолиз предварительно проинкубированных (10 минут) с пероксидом водорода эритроцитов проводили путём добавления наночастиц серебра, нитрата серебра и хлорноватистой кислоты. Через 50 минут (для наночастиц) и 20 минут (для нитрата серебра) после начала разрушения измеряли спектры поглощения суспензий. Изменение количества клеток оценивали по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 680 нм. Защитный эффект определяли по увеличению доли негемолизированных эритроцитов. Гемолиз хлорноватистой кислотой проводили при предварительном инкубировании клеток с пероксидом водорода и в буферах со значением pH в диапазоне от 5 до 7,4.

Результаты представлены как средние значения плюс–минус стандартное отклонение среднего для трёх–пяти независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность значений определяли с помощью t-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования показано, что при действии пероксида водорода в микромолярных концентрациях наблюдается повышение структурной стабильности мембран и снижение доли гемолизированных эритроцитов для всех исследуемых факторов, приводящих к разрушению. Зависимости доли негемолизированных клеток от концентрации пероксида водорода при гемолизе наночастицами серебра, нитратом серебра и хлорноватистой кислотой представлены на рисунке 1 (а-в). Максимум защитного эффекта при разрушении наночастицами серебра наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ, при разрушении нитратом серебра – 700 мкМ, при разрушении хлорноватистой кислотой – 150 мкМ.

На основе анализа экспериментально полученных гормональных зависимостей доли негемолизированных эритроцитов от концентрации пероксида водорода методом наименьших квадратов определены значения параметров модели и коэффициенты детерминированности, представленные в таблице 1.

Из представленных данных следует, что гемолиз эритроцитов нитратом серебра характеризуется более высокими значениями коэффициентов k_p и k_a и вызывает более быстрое разрушение клеток, чем наночастицы серебра. Наиболее быстро осуществляется гемолиз хлорноватистой кислотой, для которой определены самые высокие значения коэффициентов k_p и k_a . Различия в скорости разрушения клеток при действии разных факторов обуславливают различия в значениях коэффициента защиты, свидетельствуя о том, что уровень активации защитных систем при действии пероксида водорода зависит от времени. Максимум защитного эффекта для хлорноватистой кислоты, имеющей самое высокое значение коэффициента k_3 и самое низкое значение коэффициента k_n , наблюдается при самой низкой концентрации пероксида водорода из всех исследуемых факторов.

Количественной характеристикой защитного эффекта является отношение коэффициентов защиты и активации, т.е. величина, характеризующая снижение способности повреждающего фактора к переходу в токсическое (активное) состояние. Как видно из таблицы величина отношения стремится к единице, т.е. пероксид водорода способен активировать адаптационные механизмы эритроцитов максимально эффективно для заданных условий. Схожесть коэффициентов k_n для наночастиц и нитрата серебра свидетельствует о сходном механизме защиты при адаптации клеток.

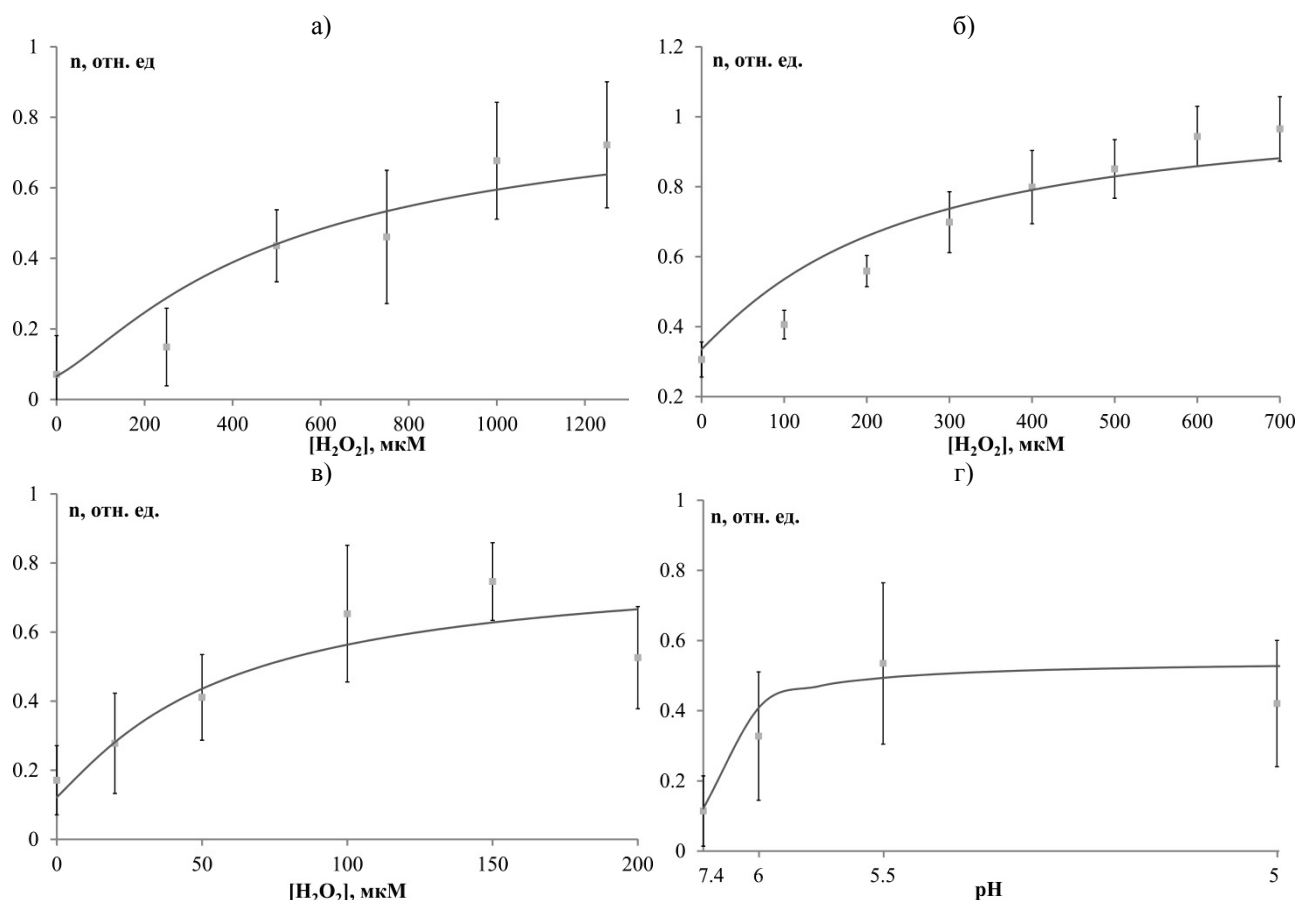


Рисунок 1. Зависимости доли негемолизированных клеток от концентрации пероксида водорода (а – при гемолизе наночастицами серебра, б – при гемолизе нитратом серебра, в – при гемолизе хлорноватистой кислотой), и от величины pH буфера (г – при гемолизе хлорноватистой кислотой). Кривая – расчёт, точки – экспериментальный данные

Таблица 1. Значения коэффициентов для различных разрушителей клеток

Разрушитель	$k_p, \text{нМ}^{-1}\text{с}^{-1}$	$k_a, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$	k_2/k_a	$k_n, \text{мкМ}$	R^2
Наночастицы серебра	0,802	0,166	0,164	0,99	45,4	0,98
Нитрат серебра	1,001	0,231	0,224	0,97	55,2	0,99
Гипохлорит натрия	4,12	0,515	0,494	0,96	13,4	0,98
Гипохлорит натрия (адаптация к изменению pH)	4,27	0,491	0,406	0,83	0,119	0,98

Обнаружено, что предварительное инкубирование клеток в среде с низким значением pH также приводит к повышению структурной стабильности мембран эритроцитов и уменьшает число гемолизированных клеток. На рисунке 1г представлены экспериментальная и рассчитанная в модели зависимости доли негемолизированных эритроцитов при предварительном инкубировании в растворах с pH от 7,4 до 5. Максимальное увеличение структурной стабильности, что соответствовало росту доли неразрушенных эритроцитов на 40 %, наблюдалось при pH 5,5. Активация адаптационных механизмов, в этом случае, может быть обусловлена ростом внутриклеточной концентрации окислителей. Показано, что снижение внеклеточного pH вызывает в эритроцитах уменьшение внутриклеточного pH и усиление окислительного стресса [8]. В случае регуляции адаптационных механизмов кислотным стрессом в сравнении с действием пероксида водорода наблюдается снижение отношения коэффициента защиты к коэффициенту активации, что позволяет предположить, что при снижении pH образуется недостаточно АФК для полной активации защитных систем.

Таким образом, пероксид водорода является эффективным фактором, активирующим адаптацию эритроцитов и вызывающим усиление их резистентности. Предложенный метод анализа защитных свойств клеток позволяет сравнивать адаптационные свойства эритроцитов и определять оптимальные условия для их регуляции внешними факторами.

Список литературы / References:

1. Мартинович Г.Г. *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы*. Минск: БГУ, 2021, 239 с. [Martinovich G.G. *Reactive oxygen species in the regulation of cell functions and properties: phenomena and mechanisms*. Minsk: BSU, 2021, 239 p. (In Russ.)]
2. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 1-21, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
3. Merry T.L., Ristow M. Mitohormesis in exercise training. *Free radical biology and medicine*, 2015, vol. 11, pp. 955-964, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.032.
4. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Кандалинцева Н.В., Мартинович Г.Г., Меньщикова Е.Б. Лабиринты регуляции Nrf2. *Биохимия*, 2017, т. 82, № 5, с. 749. [Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kandalintseva N.V., Martinovich G.G., Menshchikova E.B. Mazes of Nrf2 Regulation. *Biochemistry*, 2017, vol. 82, no. 5, pp. 556-564, doi: 10.1134/S0006297917050030. (In Russ.)]
5. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2019, т. 55, № 2, с. 107-123. [Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Blindar V.N., Topunov A.F. Binding of Erythrocyte Hemoglobin to the Membrane to Realize Signal-Regulatory Function. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, vol. 55, pp. 83-98, doi: 10.1134/S0003683819020091. (In Russ.)]
6. Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г. Регуляция структурной устойчивости эритроцитов пероксидом водорода: математическая модель и эксперимент. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 28-43. [Voianrouski V.V., Martinovich G.G., Regulation of the Structural Stability of Erythrocytes by Hydrogen Peroxide: Mathematical Model and Experiment. *Biochemistry Supplement Series A*, 2022, vol. 16, pp. 91-105, doi: 10.1134/S1990747822010093. (In Russ.)]
7. He D., Jones A.M., Garg S., Pham A.N., Waite T.D., Silver nanoparticle–reactive oxygen species interactions: application of a charging–discharging model. *Journal of Physical Chemistry*, 2011, vol. 115, pp. 5461-5468, doi: 10.1021/jp111275a. (In Russ.)]
8. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Голубева Е.Н., Черенкевич С.Н., Роль ионов водорода в регуляции редокс-состояния эритроцитов. *Биофизика*, 2009, т. 54, № 5, с. 846-851. [Martinovich G.G., Martinovich I.V., Golubeva E.N., Cherenkevich S.N., Role of hydrogen ions in the regulation of the redox state of erythrocytes. *Biofizika*, 2009, vol. 54, pp. 846-851. (In Russ.)]

PROTECTIVE PROPERTIES OF ERYTHROCYTES DURING HEMOLYSIS AND THEIR REGULATION BY OXIDANTS**Voynarovski V.V., Martinovich G.G.**

Belarusian State University

Nezavisimosti Ave. 4, Minsk, Republic of Belarus, e-mail: voynarovskiy197@mail.ru

Received 24.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbp.2022.0536

Abstract. Hydrogen peroxide, which is formed during cellular respiration and the action of physicochemical factors, is an important participant in intracellular regulatory processes. A moderate increase in the concentration of hydrogen peroxide activates the mechanisms associated with protection and adaptation, and at a high level of the oxidant, damage to cellular structures is observed. The work shows that under the action of hydrogen peroxide in micromolar concentrations, an increase in the structural stability of membranes and a decrease in the proportion of hemolyzed erythrocytes are observed upon destruction by hypochlorous acid, silver nanoparticles, and silver nitrate. A method for quantitative assessment of the regulation of the erythrocyte protective properties by hydrogen peroxide during hemolysis by various factors is proposed. It has been shown that the range of hydrogen peroxide concentrations at which an increase in the proportion of non-hemolyzed cells (the region of hormesis) is observed differs for various factors leading to destruction. Based on the developed mathematical model of cell destruction under the action of a damaging factor and hormesis dependences of the erythrocyte response to the action of hydrogen peroxide, the parameters characterizing the regulation of cellular adaptation processes were calculated. The proposed method for analyzing the protective properties of cells makes it possible to compare the adaptive properties of erythrocytes and determine the optimal conditions for their regulation by external factors.

Key words: *erythrocytes, adaptation, resistance, hemolysis.*