

## ВИВЧЕННЯ ЕНЕРГІЇ АКТИВАЦІЇ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ВПЛИВУ НА НЕЇ ІОНІВ $Fe^{2+}$

І.Я. Олійник, З.Ю. Готра

Національний університет "Львівська політехніка", Україна, 790013, м. Львів, вул. С. Бандери 12.

Надійшла до редакції 26 грудня 2005 р.

Вивчено енергію активації хемілюмінесценції сироватки крові (СК) за допомогою зміни температури зразків. Досліджено вплив на енергію активації сироватки крові іонів  $Fe^{2+}$ . Отримані результати засвідчили зменшення енергій активації під впливом  $Fe^{2+}$ . Проведені експерименти по встановленню зв'язку між енергією активації та концентрацією  $FeSO_4$ . Введено поняття експериментальної та реальної енергії активації. Пояснено отримані результати за рахунок збільшення центрів реакції.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** сироватка крові, енергія активації, рівняння Арреніуса, хемілюмінесценція, радикальні реакції.

В 90 рр. минулого століття цікавість до вивчення радикальних реакцій та до перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в цілому і до явища хемілюмінесценції (ХЛ) зокрема значно зросла [1]. Вона обумовлена тими фактами, що окислювальний стрес асоціюється з появою руйнівних процесів в клітині [2,3] і апоптозом [4]. Метою роботи було вивчення енергії активації ХЛ СК та дослідження впливу на неї  $FeSO_4$ . Вплив  $FeSO_4$  на арреніусівські криві СК досі не вивчений. І тому представляє значний інтерес оскільки  $FeSO_4$  використовують у вивченні ініційованої ХЛ.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Оскільки для квадратичного обриву ланцюга інтенсивність ХЛ визначається:

$$I = \eta_{ХЛ} k_0 [RO_2]^2 = \eta_{ХЛ} w_i \sim \eta_{ХЛ} k_0 [Y] \quad (1)$$

де  $\eta_{ХЛ}$  - квантовий вихід ХЛ;

$w_i$  - швидкість ініціювання хімічних реакцій

$k_0$  - константа швидкості розпаду окислювальної речовини  $Y$ .

Як відомо, константа розпаду  $k_0$  змінюється з температурою по закону Арреніуса:

$$k_0 = z e^{-E/RT} \quad (2)$$

де  $E$  - енергія активації, а  $z$  множник пропорційності.

Запишемо рівняння у вигляді

$$\ln I = \text{const} - \frac{E}{RT} \quad (3)$$

Отже вивчення зміни інтенсивності ХЛ від температури дасть змогу визначити енергію активації хемілюмінесценції. Ефект дії  $FeSO_4$  на окислювальні реакції вказує на прискорення швидкості окисних процесів оскільки явно збільшує інтенсивність ХЛ, а безпосередньої участі  $FeSO_4$  в реакціях окиснення не приймає. При вивченні дії іонів  $Fe^{2+}$  в роботі [5] при вивченні гідрокселування бензпірена в мікросомах дослідники отримали декілька прямих з різними кутами нахилу на одному й тому самому інтервалі температур. Це вказує на наявність при фіксованій температурі декількох констант швидкостей для однієї й тої самої реакції відповідно кількох енергій активації. Тобто  $FeSO_4$  прискорює реакції які протікають в мікросомах.

Методика виконання експерименту була наступною: досліджувалася СК (2мМ) з додаванням фосфатного буфера (4мМ) та бідистильованої води (4мМ), а потім з додаванням  $FeSO_4$  різної концентрації замість бідистильованої води. На кожному зразку СК проводилося не менше 3 експериментів. Всього було досліджено 49 зразків СК розведеної в фосфатному буфері з додаванням  $FeSO_4$  різної концентрації (мМ).

В кюветне відділення водилися всі компоненти у вказаній послідовності, а потім очікувалося досягнення зразком необхідної температури. Температура в кюветному відділенні змінювалася від 20°C до 42°C з кроком 2°C при точності 0,1°C.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Температурні залежності дійсно носять логарифмічний характер.  $FeSO_4$  впливає як на інтенсивність ХЛ СК, так вносить зміни і в характер температурних кривих. Отримані результати вказують на існування зламу на логарифмічному графіку при температурі 25-26 °С, як при відсутності  $FeSO_4$  так і при додаванні  $FeSO_4$ .

Для нас представляло цікавість вивчення енергії активації на проміжках температур від 20 до 25°C, а також від 25 до 42°C при усіх концентраціях  $FeSO_4$ . На кожному з проміжків є суттєве зменшення енергії активації при додаванні  $FeSO_4$ . Зокрема на проміжку 20-26°C енергія активації в 100 р. є меншою в присутності  $FeSO_4$ . Для іншого проміжку вона зменшується в 8 р при додаванні  $FeSO_4$ .

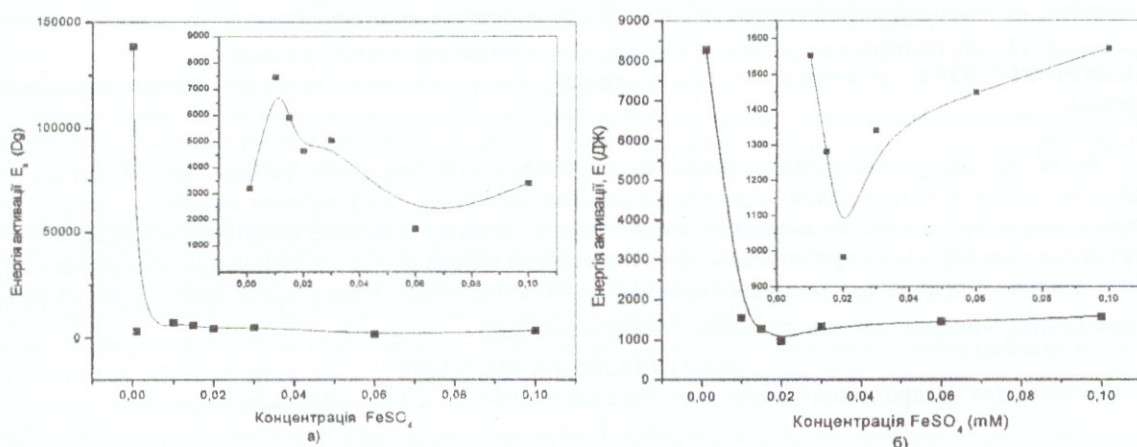


Рис. 1. Залежність енергії активації від концентрації  $FeSO_4$  для проміжку температур а) 20-25°C, б) 25-42°C.

Енергія активації СК без іонів  $Fe^{2+}$  становила  $455,6 \pm 18,9$  кДж. Можна констатувати, що на даному проміжку енергія активації залежить від величини концентрації  $FeSO_4$  і знаходиться у відповідності з інтенсивністю ХЛ піки на графіку енергії активації відповідають пікам на графіку інтенсивності. Для проміжку температур 25-42°C ситуація виявилася подібною. Результати представлені на Рис.1б. Найнижчу енергію активації ми маємо при 0,02 мМ  $FeSO_4$ . Зазначена енергія активації відповідає

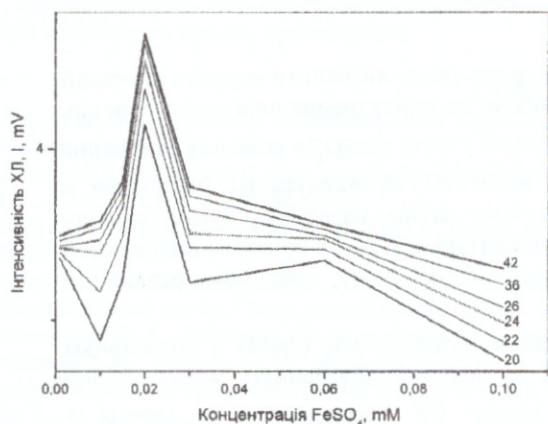


Рис. 2 Залежність інтенсивності ХЛ СК від концентрації  $FeSO_4$  для різних температур.

В даному випадку у вказаному інтервалі температур від 20 до 42°C видима зміна фазового стану мембран є відсутньою. Це означає, що крім температури або ліпідного складу мембран на мембранні

максимуму єдиному на рис. 2 (всі криві, що знаходяться вище температури 24°C). Оскільки ми маємо зміну енергії активації, то відповідно відбувається зміна лімітуючої стадії, що вносить найбільший внесок у процес ХЛ. Відмінність графічного вигляду енергії активації та інтенсивності ХЛ на рис.1 та рис. 2. це вказує що поряд з хімічними механізмами випромінювання існують фізичні механізми дезактивації збуджених станів та поглинання світлення. Існування зламу арреніусівських кривих при температурі 25 °С спостерігалось в роботі [6]. Хід ПОЛ, переважно залежить від фізичного стану мембрани. Зміна фазового стану, пов'язаного з зміною температури, або з зміною ліпідного складу призводить до зміни констант швидкості реакції.

## Вивчення енергії активації хемілюмінесценції сироватки крові ...

процеси можуть впливати і інші фактори. Зокрема це може вказувати, що при цій температурі відбуваються зміни електронних трансформацій які не враховані в класичному рівнянні Арреніуса.

Зміна тангенсу кута нахилу арреніусівських прямих при додаванні  $FeSO_4$  вказує на збільшення швидкості окисних реакцій, що протікають в ПК. Але враховуючи, що фермент-субстратний комплекс в усіх випадках однаковий є необхідність стверджувати, що  $FeSO_4$  змінює умови реакції. Тобто виникає необхідність додаткового аналізу рівняння Арреніуса.

Переважно, механізм дії іонів  $Fe^{2+}$  пов'язаний з активацією таких реакцій, як:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^-$  та  $ROOH + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + RO^-$ .

$FeSO_4$  підсилює утворення кисневих та ліпідних радикалів в нашій системі, а також стимулює певні ліпідно-радикальні процеси. Безпосередньо в окисненні  $FeSO_4$  участі не приймає. Але в той самий час кількість центрів реакції в системі збільшується. Тому є можливість стверджувати, що  $FeSO_4$  не вносить зміни у енергію активації, а зміну у швидкість реакцій вносить передекспоненційний множник. Спрямлення температурних залежностей при логарифмуванні вказує на логарифмічну залежність цього множника від енергії активації. Тобто вигляд цього множника є  $z = B \exp(\tilde{A}E_a)$ , де чисельник степеня експоненти становить енергію активації,  $\tilde{A}$  - енергетичний параметр,  $z$  - величина що безпосередньо залежить від кількості центрів реакції. Залежність  $z$  від  $E_a$  можна пояснити наступним чином: кожний наступний центр вступає в реакцію з більшою енергією активації. Тобто прологарифмоване рівняння (2) матиме вигляд:

$$\ln I = \text{const} + \tilde{A}E_a - \frac{E_a}{RT} = \text{const} - \frac{A}{RT}, \quad (4)$$

де  $A$  - експериментально отримана енергія активації,  $E_a$  - реальна енергія активації.

$$E_a \left( \tilde{A} - \frac{1}{RT} \right) = -\frac{A}{RT}, \quad \text{або} \quad E_a (1 - \tilde{A} RT) = A \quad (5)$$

Для всіх випадків реальна енергія запишеться у вигляді

$$E_a = A / (1 - \tilde{A} RT). \quad (6)$$

$\tilde{A} < 1/RT$  можливість параметра приймати як додатні так і від'ємні значення вказує на те що присутність деяких речовин в системі може збільшувати експериментальну енергію активації. Цими речовинами можуть бути зокрема інгібітори, які навпаки сприяють обриву ланцюга і отже зменшенню центрів реакції. Отже іони  $Fe^{2+}$  призводять до розгалуження хімічної реакції окиснення, збільшення центрів реакції та зменшення експериментальної енергії активації.

### ВИСНОВКИ

Метали змінної валентності ( $FeSO_4$ ) при усіх температурах зменшують експериментально визначену енергію активації не зважаючи на відсутність їхнього впливу на швидкість окиснення. Угальнена енергія активації зменшувалася в кілька сотень разів. Відмічається також злам арреніусівських прямих при температурі 25-26°C. Для проміжку 20-25°C при зміні концентрації  $FeSO_4$  нарельованого впливу на енергію активації не спостерігалось. Зменшення експериментальної енергії активації від концентрації  $FeSO_4$  є лінійним до 0,6 мМ на температурному проміжку 25-42°C, потім вона зростає при збільшенні концентрації  $FeSO_4$ . Кількість центрів окиснення залежить від енергії активації оскільки в біосистемах окислюються достатньо великі поверхні (мембрани клітин, макромолекули тощо) то для збереження цілісності цієї системи кожний наступний центр вступає в реакцію з більшою енергією активації. Зміна експериментальної енергії активації пояснюється зміною кількості центрів реакції окиснення. Це дає можливість вважати реальну енергію активації ХЛ СК незмінною та рівною 455,6±18,9 кДж.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Іванків О.Л., Андрусик І.Я., Настасюк О.В. // Фізичний збірник НТШ 2001. 2001. С. 394-399
2. Data B., Tufnell-Barrett T., Bleasdale R.A. et al. // Circulation. 2004. V. 109, N. 11. P. 1339-1342.
3. Андрусик І.Я. // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона: Межведомственный сборник научных работ. - Донецк: Дон НУ. 2002. Вып 1. С. 193-197.
4. Пайкуш В.А., Іванків О.Л., Андрусик І.Я. // Практична медицина. 2003. Т. 9. С.133-135.
5. Доктриев Л.Ф. // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 60-68.
6. Nishino H. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 339. P. 298-304.