

shows that the trace element composition was in short supply and so this diet requires to be better balanced.

Key words: bull, minerals, iron, copper, zinc, manganese, cobalt, nutrients, diet, food.

УДК 577.352.3:612.111.3

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СОСТОЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В ПРИСУТСТВИИ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ

Тимченко Н.Н., к. биол. н., доцент, [timchenko\\_n@list.ru](mailto:timchenko_n@list.ru)

Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенка, г. Харьков

Рубакина В.А., студентка

Евстигнеев М.П., д. физ.-мат. н., зав. кафедрой

Севастопольский государственный университет, г. Севастополь

**Аннотация.** Исследованы спектроскопические характеристики гемоглобина в среде с 2,5М NaCl и 2,5М KCl в интервале температур +5-+38°C и определены температурные диапазоны, при которых происходит изменение конформации белка и содержания различных форм гемоглобина.

**Ключевые слова:** эритроциты, гемоглобин, температура, растворы солей.

**Актуальность проблемы.** Эритроциты наполнены железосодержащим белком гемоглобином, который обратимо присоединяет кислород. В последнее время возрос интерес к исследованиям кровезаменителей на основе гемоглобина. Температура является фактором, влияющим на состояние гемоглобина. Важно знать температурные диапазоны, в которых происходят перестройки белковой молекулы, что может влиять на содержание различных форм гемоглобина. Концентрированные солевые растворы являются повреждающим фактором при замораживании эритроцитов в целях хранения крови. При физиологических условиях какое-то количество внутриэритроцитарного гемоглобина может быть близким к диссоциированному состоянию. Известно, что в присутствии 2,5М NaCl и 2,5М KCl гемоглобин диссоциирует на отдельные полипептидные цепи. Было исследовано влияние ионов хлорида на эмбриональные гемоглобины человека [1]. Также показано, что в концентрированных солевых растворах гемоглобин внутри эритроцитов претерпевает конформационные изменения, которые связаны не только с влиянием концентрации солей, но и с изменением состава внутриклеточной среды [2]. Представляет интерес исследовать влияние температуры на содержание различных форм гемоглобина в присутствии растворов солей.

**Задание исследования.** Исследовать спектроскопические характеристики гемоглобина в среде с 2,5М NaCl и 2,5М KCl в интервале температур +5-+38°C и определить температурные диапазоны, при которых происходит изменение конформации белка и содержания различных форм гемоглобина.

**Материал и методы исследования.** Эритроциты осаждали путем трехкратного центрифугирования в течение 10 минут при 1500 g донорской крови и физиологического раствора в объемном соотношении 1:10. Гемолизат получали путем добавления одного объема дистиллированной воды и хранения 24 часа при +4°C, далее осаждали разрушенные клеточные мембраны при помощи ультрацентрифугирования при 15000 g в течение 15 мин. Гемоглобин очищали методом гель-проникающей хроматографии на колонке диаметром 25 мм и длиной 40 см, заполненной сефадексом G-100. Отцентрифугированный раствор гемоглобина (надосадок) наносили на колонку и проводили элюцию при +4°C. Концентрация гемоглобина в растворе контролировалась на спектрофотометре на длине волны 577 нм. Содержание окси-, дезокси- и метформ гемоглобина вычисляли по методу [3].

**Результаты исследования.** Экспериментальные данные по соотношению различных форм гемоглобина, полученные для гемоглобина донорской крови в среде с 2,5М NaCl, свидетельствуют о том, что в интервале температур +12-+37°C наблюдается резкое уменьшение содержания оксиформы гемоглобина за счет столь же резкого увеличения содержания метформы (рис. 1). Исследования мутности солевого раствора гемоглобина (в 2,5М NaCl) крови донорской крови,

інтенсивності поглинання белка і інтенсивності поглинання гемоглобіна в полосе Сорє показали, що світорассіяєня в області температур +5-+32°C змінється, по-видимому, мало, а різке збільшення мутності розчину спостерігається в інтервалі температур +32-+42°C. Інтенсивність поглинання белка в інтервалі температур +14-+27°C збільшується. Інтенсивність поглинання гемоглобіна в полосе Сорє при підвищенні температури від +6 до +44°C зменшується. Були досліджені також перші похідні спектрів поглинання гемоглобіна донорської крові в середі з 2,5М NaCl при температурі +20°C, вони мають отрицательні максимуми на довжинах волн 285, 288, 292, 294 і 298 нм і плече на 281-282 нм.

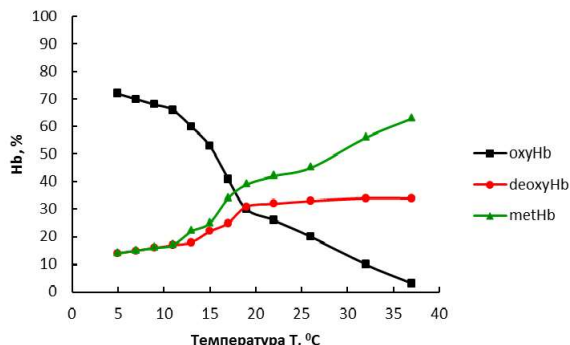


Рис. 1. Влияние температуры на содержание различных форм гемоглобина в среде с 2,5М NaCl

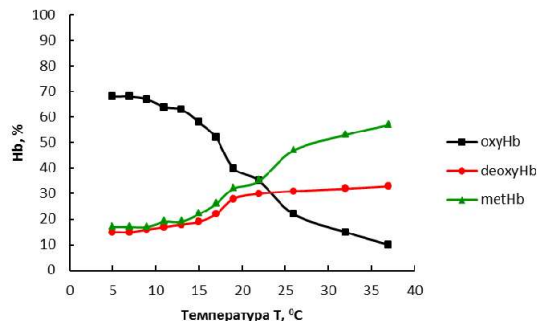


Рис. 2. Влияние температуры на содержание различных форм гемоглобина в среде с 2,5М KCl

Експериментальні дані по співвідношенню різних форм гемоглобіна, отримані для гемоглобіна донорської крові в середі з 2,5М KCl, свідчать про те, що в інтервалі температур +14-+30°C спостерігається різке зменшення вмісту оксидованої форми гемоглобіна за рахунок стільки ж різкого збільшення вмісту метформуваної форми (рис. 2). Визначення мутності солового розчину гемоглобіна (в 2,5М KCl) донорської крові, інтенсивності поглинання белкової частини гемоглобіна і інтенсивності поглинання в полосе Сорє показали, що в інтервалі температур +6-+24°C мутність розчину змінється, по-видимому, мало. При підвищенні температури від +24°C до +38°C спостерігається різке збільшення світорассіяєня. Інтенсивність поглинання белка в інтервалі температур +16-+27°C збільшується. Інтенсивність поглинання гемоглобіна в полосе Сорє зменшується при підвищенні температури від +6 до +38°C. Досліджені перші похідні спектрів поглинання гемоглобіна донорської крові в середі з 2,5М KCl при температурі +20°C, вони мають отрицательні максимуми на довжинах волн 286, 291-292 нм і плечі на довжинах волн 287-288 і 297-298 нм.

### Выводы

1. В концентрированных солевых растворах NaCl и KCl при нагревании от +5 до +38°C наблюдается в интервале температур +12-+37°C для растворов NaCl и в интервале температур +14-+30°C для растворов KCl резкое уменьшение содержания оксигемоглобина и резкое увеличение количества метформы гемоглобина.

2. Интенсивность светорассеяния раствора гемоглобина в среде с 2,5М NaCl и 2,5М KCl резко увеличивается при температурах +25-+30°C, это говорит о том, что происходит агрегация продиссоциированного гемоглобина.

### Литература

1. Hoffman O. The chloride effect in the human embryonic haemoglobins / O. Hoffman, G. Carrucan, N. Robson, T. Brittain // Biochem. J. - 1995. - Aug. 1; 309 (Pt. 1). - P. 959-962.
2. Межидов С. Х. Влияние различных концентраций натрия хлорида на состояние гемоглобина внутри эритроцитов / С. Х. Межидов, Е. Д. Розанова // Проблемы криобиологии. – 1999. - № 1. – С. 14-18.
3. Стусь Л. Н. Осцилляция форм гемоглобина в процессе хранения крови / Л. Н. Стусь, Е. Д. Розанова // Биофизика. – 1992. – Т.37, № 2. – С. 387-388.

### ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА СТАН ГЕМОГЛОБІНУ В ПРИСУТНОСТІ РОЗЧИНІВ СОЛЕЙ

Тимченко Н.М., к. біол. н., доцент, [timchenko\\_n@list.ru](mailto:timchenko_n@list.ru)

Харківський національний технічний університет сільського господарства ім. П. Василенка, м. Харків  
Рубакіна В.О., студентка, Євстїгнєєв М.П., д. фіз.-мат. н., зав. кафедрою

Севастопольський державний університет, м. Севастополь

Анотація. Досліджені спектроскопічні характеристики гемоглобіну в середовищі з 2,5 М NaCl і 2,5М KCl в інтервалі температур +5-+38°C та визначені температурні діапазони, при яких відбувається зміна конформації білка і вмісту різних форм гемоглобіну.

Ключові слова: еритроцити, гемоглобін, температура, розчини солей

**INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE HEMOGLOBIN STATE IN THE PRESENCE OF DISSOLVED SALTS**

Timchenko N.N., [timchenko\\_n@list.ru](mailto:timchenko_n@list.ru)

Kharkov National Technical University of Agriculture named P. Vasilenko, Kharkov

Rubakina V.A., Evstigneev M.P.

Sevastopol State University, Sevastopol

Summary. Erythrocytes are filled ferrum-containing protein hemoglobin which reversely binds oxygen. During the past time the interest to hemoglobin-based blood substitute has been increasing. Temperature is a factor which effects to hemoglobin state. It is important to know the temperature intervals in which rebuilding of protein molecule occurs. It may have effect on the contents of different hemoglobin forms. Concentrated salt solutions are a damaging factor during freezing of erythrocytes used for blood storage purposes. Some quantity of erythrocyte hemoglobin can be in near dissociating state at physiological conditions. It is known that in the presence of 2,5M NaCl and 2,5M KCl hemoglobin dissociates on separate polypeptide chains. The effect of chloride ions on the embryonic human hemoglobin was investigated. Also it was found that in concentrated salt solutions hemoglobin inside erythrocytes undergoes conformational changing which is not only connected with the concentration of salts but also with changing of medium composition inside cell. It is interesting to study temperature influence on the contents of different hemoglobin forms in the presence of salt solutions. In this work spectroscopic characteristics of hemoglobin in medium with 2,5M NaCl and 2,5M KCl were investigated in the range of +5-+38°C and the temperature intervals were determined at which the alteration of protein conformation and the content of different hemoglobin forms occur. In concentrated salt solutions of NaCl and KCl on heating from +5 to +38°C in the temperature interval +12-+37°C for NaCl solutions and in temperature interval +14-+30°C for KCl solutions the decreasing of the fraction of oxyhemoglobin and increasing of the fraction of methemoglobin occurs. First derivatives of absorption spectra of protein part of hemoglobin were investigated in the medium with 2,5M NaCl at 20°C. It was found that these spectra have negative maximums at wave lengths 285, 288, 292, 294 and 298 nm and shoulder at 281-282 nm. The same investigation was carried out for 2,5M KCl medium at 20°C, yielding negative maximums at wave lengths 286, 291-292 nm and shoulders at 287-288 and 297-298 nm. The intensity of light scattering of hemoglobin solution in medium with 2,5M NaCl and 2,5M KCl increases at the temperatures +25-+30°C which evidences aggregation of dissociating hemoglobin.

Key words: erythrocytes, hemoglobin, temperature, salt solutions