

Галстян, Г.А. Катализ реакции рідкофазного окиснення ароматичних сполук озонном. *Монографія* [Текст] / Галстян Г.А., Тюпало М.Ф., Галстян А.Г.. – Луганськ: вид-во СНУ ім. в. Даля, 2007. – 415 с. 3. Разумовський, С. Д. Озон и его реакции с органическими соединениями [Текст] / С. Д. Разумовський, Г. Е. Заиков – М.: Наука, 1974. – 322 с. 4. Калверт, Дж. Фотохимия [Текст] / Дж. Калверт, Дж. Питсс – М.: Мир, 1968. – 672с. 5. Барышников, С.В. Вычислительная математика в химии и химической технологии [Текст] / С.В. Барышников, Р.Б. Медведев, Ю.Я. Фиалков. – Киев.: Вища школа, 1986. – 387с. 6. Галстян, А. Г. Окиснення этилбензену озонном в оцтовій кислоті [Текст] / А. Г. Галстян, О. О. Колбасюк, Г. А. Галстян, А. С. Бушуев // Східно-Європейський журнал передових технологій. – 2013. – Т. 66, №6/6. – С. 8 – 11. 7. Веденеев, В. И. Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и средство к электрону. Справочник. [Текст] / В. И. Веденеев, Л. В. Гурвич, В. Н. Кондратьев, и др. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. - 215 с. 8. Эмануэль, Н. М. Окисление этилбензола (модельная реакция) [Текст] / Н. М. Эмануэль, Д. Гал – М.: Наука. 1984. - 376 с. 9. Денисов, Е. Т. Механизм жидкофазного окисления кислород-содержащих соединений [Текст] / Е. Т. Денисов, Н. И. Мицкевич, В. Е. Агабеков – Минск: Наука и техника, 1975. – 334 с. 10. Эмануэль, Н. М. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе [Текст] / Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов, З. К. Майзус – М.: Наука, 1965. – 365с.

**Bibliography (transliterated):** 1. Galstyan, G. A., Tyupalo, N. F., Razumovskiy, S. D. (2004). Ozon i ego reakcii s aromatcheskimi soedineniyami v zhidkoy faze. Lugansk, VUNU, 272. 2. Galstyan, S. G., Tyupalo, N. F., Galstyan, A. G. (2007). Kataliz reakcii ridkofaznogo okisnennya aromatchnyh spoluk ozonom. Monographiya. Lugansk, SNU im. V. Dalya, 415. 3. Razumovs'kiy, S. D., Zaikov, G. E. (1974). Ozon i ego reakcii s organicheskimi soedineniyami. M., Nauka, 322. 4. Kalvert, Dzh. Pitss, Dzh. (1968). Fotohimiya. M., Mir, 672. 5. Barishnikov, S. V., Medvedev, R. B., Fialkov, Yu. A. (1987). Vichislitel'naya matematika v himii i himicheskoy tehnologii. Kiev, Vishha shkola, 387. 6. Galstyan, A. G., Kolbasiuk, O. O., Galstyan, G. A., Bushuev, A. S. (2013). Okisnennya etilbenzenu ozonom v octoviy kisloti Shidno-Evropeys'kiy zhurnal peredovih tehnologiy. Vol. 66, №6/6, 8 – 11. 7. Vedeneev, V. I., Gurvich, L. V., Kondrat'ev, V. N., i dr. (1962). Energiya razryva himicheskikh svyazey. Potencialy ionizacii i srodstvo k elektronu. Spravochnik. M., AN SSSR, 215. 8. Emanuyel', N. M., Gal, D. (1984). Okislenie etilbenzola (model'naya reakciya). M., Nauka, 376. 9. Denisov, E. T., Micevich, N. I., Agabekov, V. E. (1975). Mehanizm zhidkofaznogo okisleniya kislorodsoderzhashhih soedineniy. Minsk, Nauka i tehnika, 334. 10. Emanuyel', N. M., Denisov, E. T., Mayzus, Z. K. (1965). Cepnye reakcii okisleniya uglevodorodov v zhidkoy faze. M., Nauka, 365.

Надійшла (received) 10.10.2014

## УДК 577.3

**Л. А. ПИХ**, ст. преп., Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенка;

**Н. Н. ТИМЧЕНКО**, канд. биол. наук, доц., Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенка;

**В. Е. НОВИКОВА**, ст. преп., Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенка

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОТРОПНЫХ ПЕРЕСТРОЕК ГЕМОГЛОБИНА

Проведены исследования спектроскопических характеристик гемоглобина в интервале температур +5-+38°C. Рассмотрены температурные диапазоны, при которых происходит изменение конформации белка и содержания различных форм гемоглобина. При повышении

© Л. А. ПИХ, Н. Н. ТИМЧЕНКО, В. Е. НОВИКОВА 2014

температуры в эритроцитах и гемолизате наблюдается тенденция к уменьшению содержания оксиформы гемоглобина и увеличению содержания дезокси- и метформ гемоглобина, в гемолизате эта тенденция более выражена. Процесс перехода оксиформы в другие формы гемоглобина наблюдается при температурах выше  $+30^{\circ}\text{C}$  для суспензии эритроцитов, выше  $+20^{\circ}\text{C}$  для гемолизата и после  $+30$ - $+35^{\circ}\text{C}$  для гемоглобина. Библиогр.: 10 назв.

**Ключевые слова:** спектрофотометрия, эритроциты, гемоглобин, глобин, первые производные спектров поглощения, конформация, температура, термотропные перестройки.

**Введение.** Эритроциты — наиболее простые элементы организма. Хотя они и лишены ядра и цитоплазмы органоидов, тем не менее это клетки ограниченной и строго специализированной активности [1-6]. Красные кровяные тельца составляют одну из наиболее многочисленных клеточных разновидностей человеческого организма. Так, их число составляет примерно 25 триллионов или около 1:40 к общему количеству клеток взрослого человека. При нормальных условиях эритроциты находятся в кровообращении примерно 4 месяца (около 120 дней). На первой фазе (ретикулоцитов), хотя они крупнее, тем не менее, несут не полную нагрузку гемоглобина; созревание завершается за 1-3 дня, в течение которых клетки выполняют функцию переноса кислорода. На второй фазе (зрелых эритроцитов), полностью выполняющих свою функцию, они переносят кислород в одном направлении, а углекислый газ в обратном. На третьей фазе (дефицитных эритроцитов) с уменьшенной эффективностью по причине сокращения процессов обмена веществ, их подбирают макрофаги, тем самым открывая путь молодым клеткам, вступающим в функциональный цикл.

Для практической медицины очень важно знать, какое соотношение между формами гемоглобина (окси-, дезокси- и метформ) реализуется в экстремальных условиях. К числу таких экстремальных условий могут быть причислены как повышенные, так и пониженные температуры относительно нормы [7-9]. Чрезвычайно важным является определение содержания оксигенированной формы гемоглобина в этих условиях, так как оно определяет функциональную способность эритроцита переносить кислород.

**Цель работы.** Целью работы является исследование спектроскопических характеристик эритроцитарного белка в интервале температур  $+5$ - $+38^{\circ}\text{C}$  и определение температурных диапазонов, при которых происходит изменение конформации белка и содержания различных форм гемоглобина. Исследовали эритромассу, гемолизат, гемоглобин, глобин.

**Методика экспериментов.** 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  $+4^{\circ}\text{C}$ , 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 [10]. Готовили для исследований продажный выделенный глобин.

**Обсуждение результатов.** Экспериментальные данные по соотношению различных форм гемоглобина, полученные для эритромаcсы донорской крови свидетельствуют, что при повышении температуры от +7°C до +30°C содержание различных форм гемоглобина остается примерно на одном уровне. При дальнейшем увеличении температуры до +38°C наблюдается переход оксиформы гемоглобина в дезокси- и метформы гемоглобина (уменьшается содержание оксиформы и увеличивается содержание мет- и дезоксиформы). Флуктуации (большое отклонение содержания формы гемоглобина от плавного хода температурной зависимости) наблюдаются в области +8°C и +18-+20°C. Исследования мутности суспензии эритроцитов донорской крови (на длине волны 700 нм, где считается, что объект специфически не поглощает свет, а только рассеивает) и интенсивности поглощения гема гемоглобина в полосе Соре (на длине волны 400 нм) за вычетом величины оптической плотности, измеренной на длине волны 700 нм (светорассеяние объекта), показали, что светорассеяние изменяется при температурах +6-+12°C, +15-+25°C, +29-+33°C. Наблюдается увеличение интенсивности поглощения в полосе Соре около +12-+18°C, +21-+29°C, +32-+37°C. Были также исследованы первые производные спектров поглощения суммарных белков эритроцитов донорской крови при +20°C (интенсивность поглощения суммарных белков измеряли в максимуме полосы поглощения, длина волны 275 нм, и вычитали интенсивность полосы поглощения суммарных белков в минимуме, длина волны 325 нм, где специфическое поглощение отсутствует). Показано, что они имеют отрицательные максимумы на следующих длинах волн: 283, 286, 292, 298 нм и плохоразрешенные – максимум на длинах волн 288-298 нм и плечо на 293-294 нм.

Экспериментальные данные по соотношению различных форм гемоглобина, полученные для гемолизата крови донорской крови показали, что при нагреве от +6°C до +38°C наблюдается уменьшение содержания оксиформы гемоглобина и увеличение содержания дезокси- и метформ. В диапазоне температур +20-+38°C наблюдается более резкое уменьшение содержания оксиформы по сравнению с уменьшением в диапазоне температур +6-+20°C. Также наблюдается более резкое увеличение содержания метформы гемоглобина в интервале температур +20-+38°C по сравнению с увеличением содержания дезоксигемоглобина. Исследования мутности гемолизата донорской крови, интенсивности поглощения белка и интенсивности поглощения гемоглобина в полосе Соре позволили показать, что

светорассеяние изменяется при температурах  $+8-+10^{\circ}\text{C}$ ,  $+16-+20^{\circ}\text{C}$ ,  $+23-+27^{\circ}\text{C}$ ,  $+32-+38^{\circ}\text{C}$ . Интенсивность поглощения белка резко увеличивается в интервале температур  $+20-+32^{\circ}\text{C}$ . Зависимость интенсивности поглощения гемоглобина в полосе *Soret* от температуры имеет максимумы при температурах  $+12^{\circ}\text{C}$ ,  $+28-+32^{\circ}\text{C}$  и  $+37^{\circ}\text{C}$ . Были исследованы также первые производные спектров поглощения суммарных белков гемолизата донорской крови при  $+20^{\circ}\text{C}$ , показано, что они имеют отрицательные максимумы на следующих длинах волн: 286, 288, 292-293, 296-297 нм и плечо на 282-283 нм. Основные максимумы на 286 и 292-293 нм.

Экспериментальные данные по соотношению различных форм гемоглобина, полученные для гемоглобина донорской крови показали, что в области температур  $+8^{\circ}\text{C}$  и  $+23-+26^{\circ}\text{C}$  наблюдаются флуктуации содержания окси- и дезоксиформ гемоглобина. После температуры  $+30-+35^{\circ}\text{C}$  уменьшается содержание окси- и увеличивается содержание дезокси- и метформы гемоглобина. Исследование температурных зависимостей мутности раствора гемоглобина донорской крови, интенсивности поглощения гемоглобина в полосе *Soret* и интенсивности поглощения белка гемоглобина показали, что светорассеяние изменяется в области температур  $+26-+28^{\circ}\text{C}$ . Температурная зависимость мутности раствора гемоглобина имеет уменьшение мутности при  $+26-+28^{\circ}\text{C}$ . Температурная зависимость интенсивности поглощения гемоглобина в полосе *Soret* имеет максимумы при температурах  $+8-+10^{\circ}\text{C}$ ,  $+20^{\circ}\text{C}$ ,  $+28-+30^{\circ}\text{C}$  и минимум при температуре  $+24^{\circ}\text{C}$ . Интенсивность поглощения белка гемоглобина увеличивается в интервале температур  $+14-+23^{\circ}\text{C}$  и  $+30-+38^{\circ}\text{C}$ , при температурах  $+8-+12^{\circ}\text{C}$  и  $+22-+30^{\circ}\text{C}$  температурная зависимость интенсивности поглощения белка гемоглобина не изменяется. Были исследованы первые производные спектров поглощения белка гемоглобина донорской крови при температуре  $+20^{\circ}\text{C}$ . Показано, что они имеют отрицательные максимумы на длинах волн 286, 293 и 298 нм и плечо на 291-292 нм. Максимум на 298 нм плохо разрешен.

Исследования спектров поглощения гемоглобина показали, что интенсивность поглощения гемоглобина изменяется в интервале температур от  $+18-+20^{\circ}\text{C}$  до  $+37^{\circ}\text{C}$ . Интенсивность светорассеяния изменяется при температурах  $+5-+10^{\circ}\text{C}$   $+28-+30^{\circ}\text{C}$ . Отрицательные максимумы первых производных спектров поглощения гемоглобина при  $+20^{\circ}\text{C}$  наблюдаются при следующих длинах волн: 286, 293, 295 и 299 нм и плечо на длинах волн 283-284 нм. Анализ первых производных спектров поглощения гемоглобина в интервале температур  $+6-+38^{\circ}\text{C}$  показал, что положение максимумов первых производных спектров поглощения гемоглобина в зависимости от температуры остается практически постоянным. Исследование интенсивностей максимумов первых производных спектров поглощения гемоглобина показало, что для максимума на 283 нм наблюдается изменение интенсивности при температурах  $+6-+8^{\circ}\text{C}$  и  $+24-+27^{\circ}\text{C}$ . Для максимума на 286 нм наблюдается изменение интенсивности при  $+26-+28^{\circ}\text{C}$ ; на 292 нм — при

температуре +26-+28°C; на 295 нм — при +6-+8°C; на 298 нм — при температуре +8-+10°C и +32-+35°C.

Исследования показали, что при повышении температуры в эритроmasсе (эритроцитах) и гемолизате наблюдается тенденция к уменьшению содержания оксиформы гемоглобина и увеличению содержания дезокси- и метформ гемоглобина, причем в гемолизате она более выражена, по-видимому, это связано с наличием разрушенных мембран эритроцитов в гемолизате. Процесс перехода оксиформы в другие формы гемоглобина наблюдается при температурах выше +30°C для суспензии эритроцитов, выше +20°C для гемолизата и после +30-+35°C для гемоглобина. Большие отклонения содержания различных форм гемоглобина от плавного хода температурной зависимости наблюдаются для эритроmasсы в области температур +10 и +18-+20°C, для гемоглобина — в области температур +5-+10°C и +20-+23°C, а в гемолизате подобного не наблюдается. При температурах около +10 и +30°C изменяется интенсивность светорассеяния гемоглобина и при этих же температурах изменяются интенсивности максимумов первых производных спектров поглощения гемоглобина. В гемоглобине же при температурах +30-+35°C происходит изменение способности гемоглобина переносить кислород — переход окси- в метформу. Кроме этого, в гемоглобине в ходе нагрева мало изменяется количество оксиформы, а в эритроmasсе и гемолизате (где имеются мембраны эритроцитов), наблюдается переход оксиформы в дезокси- и метформу. Это говорит о том, что мембраны эритроцитов являются решающим фактором для перехода оксиформы в дезокси- и метформу гемоглобина.

**Выводы.** При повышении температуры оксигемоглобин в эритроцитах и гемолизате переходит в дезокси- и метформу, причем в гемолизате он в основном переходит в метформу. Изменение содержания различных форм гемоглобина около +10°C и +30°C связано с конформационными изменениями белковой части гемоглобина.

**Список литературы:** 1. *Denniston, Katherine J. General, organic and biochemistry [Text] / Katherine J. Denniston, Joseph J. Topping, Robert L. Caret - Towson University, 2007. - 801 P.* 2. *Kagawa, Yasuo. Биомембраны [Текст] / Yasuo Kagawa – М.: Высшая школа, 1985. - 303 С.* 3. *Green, N. Биология [Текст] / N. Green, W. Stowt, D. Taylor – М.: Мир, 1990. - Т.1. - 368 С.* 4. *Eckert, R. Физиология животных [Текст] / R. Eckert, D. Randell, J. Augustin – М.: Мир, 1992. - Т.1. - 424 С.* 5. *Fairbanks, G. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane [Text] / G. Fairbanks, Theodore L. Steck, D.F.H. Wallach // Biochemistry. - 1971. - Vol. 10, № 13. - P. 2606-2624.* 6. *Fischer, Siegmund. The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocytes [Text] / Siegmund Fischer, Ronald L. Nagel // Biochimica et biophysica acta. - 1975. - № 375. - P. 422-433.* 7. *Бабийчук, Л. А. Конформационные и объемные изменения эритроцитов в процессе замораживания-отогрева в зависимости от условий эквilibрации их с криопротектором ПЭО-1500 [Текст] / Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. - 1997. - № 3. - С. 8-15.* 8. *Kruszyna, Harriet. Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulphhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin [Text] / Harriet Kruszyna, Robert Kruszyna // Biochemical pharmacology. - 1993. - Vol. 46, № 1. - P.*

95-102. **9.** Морозова, Т. Ф. Влияние температуры на состояние внутриэритроцитарного гемоглобина [Текст] / Т. Ф. Морозова, Е. Д. Розанова, Н. Н. Тимченко // Вестник НТУ «ХПИ». - 2007. - № 30. - С. 69-73. **10.** Стусь, Л. Н. Осцилляция форм гемоглобина в процессе хранения крови [Текст] / Л. Н. Стусь, Е. Д. Розанова // Биофизика. - 1992. - Т.37, №2. - С. 387-388.

**Bibliography (transliterated):** **1.** Denniston, K. J. (2007). General, organic and biochemistry. Towson University, 801. **2.** Kagawa, Y. (1985). Biomembranes. Moscow, 303. **3.** Green, N. (1990). Biology. Moscow, Vol. 1, 368. **4.** Eckert, R. (1992). Physiology of animals. Moscow, Vol. 1, 424. **5.** Fairbanks, G. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, Vol. 10, 13, 2606-2624. **6.** Fischer, Siegmund. (1975). The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocytes. Biochimica et biophysica acta, 375, 422-433. **7.** Babiychuk, L.A. (1997). Conformational and volumetric changes in red cells in the process of freeze-thawing depending on the conditions of their equilibration with a PEO-1500 cryoprotectant. Problems of cryobiology, 3, 8-15. **8.** Kruszyna, Harriet. (1993). Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulphhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin. Biochemical pharmacology, Vol. 46, 1, 95-102. **9.** Morozova, T. F. (2007). Temperature influence on the state of hemoglobin inside erythrocyte. Vestik NTU «HPI», 30, 69-73. **10.** Stus, L. N. (1992). The oscillation of hemoglobins forms during blood storage. Biophysics. Vol.37, 2, 387-388.

*Надійшла (received) 02.10.2014*