

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 сродство 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., Mickevich, 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 Сорe (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 Сорe 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 Сорe 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