

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА ТЕМПЕРАТУРНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

Тимченко Н.Н., Головченко И.В.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: timchenko_n@list.ru

Поступила в редакцию 07.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0557

Аннотация. Использование в медицинской практике методов консервирования крови при низких температурах обуславливает необходимость исследований влияния температуры на гемоглобин. Исследовано влияние замораживания-оттаивания до температуры жидкого азота -196°C и последующего оттаивания на гемоглобин А, при этом использовали методы температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа первых производных спектров поглощения. После замораживания-оттаивания раствора гемоглобина А наблюдается сглаживание изломов на S-образной температурной зависимости интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров при 286 нм. Вероятно, это означает, что сглаживаются, становятся менее заметны температурно-зависимые конформационные изменения в молекуле гемоглобина А. Следует отметить, что после замораживания-оттаивания сохраняется S-образная форма этой зависимости, т.е. конформационные изменения имеют место, но они менее выражены, чем до замораживания-оттаивания. С одной стороны, замораживание раствора гемоглобина А приводит к конформационным изменениям молекулы гемоглобина А, затрагивающим полярные области, а именно, к увеличению доступности растворителю полярных областей, что согласуется с данными о частичном разворачивании глобулы белка, сопровождающемся экспонированием ароматических аминокислот глобина в растворитель и с данными о том, что процесс замораживания-оттаивания ведёт в большинстве случаев к конформационным изменениям белка, которые состоят в ослаблении молекулы и увеличении доступности активных участков белка. С другой стороны, замораживание растворов гемоглобина А приводит к компактизации субъединиц молекулы гемоглобина А. Вероятно, это можно объяснить тем, что предположительно, увеличение доступности растворителю поглощающих хромофоров молекулы гемоглобина А, располагающихся в полярных областях, приводит к тому, что компактизуются другие части молекулы гемоглобина А, не участвующие в увеличении доступности аминокислотных остатков растворителю. То есть одни части молекулы гемоглобина А становятся более доступными растворителю, а другие при этом компактизуются.

Ключевые слова: гемоглобин, конформационные изменения, температура.

Температурное поведение Hb можно рассматривать в отдельных температурных областях, при отрицательных и низких и высоких положительных температурах. При низкотемпературном воздействии одним из повреждающих факторов является концентрирование солей. Имеются данные о том, что белки диссоциируют в растворах солей. В литературе описаны результаты исследования влияния солей на состояние выделенного и внутриэритроцитарного гемоглобина. В работе при исследовании раствора выделенного гемоглобина методами светорассеяния и седиментации было обнаружено, что в концентрированных растворах солей (2М цитрат натрия, К-фосфатный буфер, хлорид калия, хлорид натрия, pH 6,8) молекула гемоглобина человека диссоциирует – распадается на димеры. Этими же авторами в работе было изучено (при pH 6,9, исходной ионной силе растворов гемоглобина $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$) влияние солей на сродство гемоглобина к кислороду и степень кооперативности взаимодействия субъединиц тетрамера гемоглобина (n). Показано, что при всех исследованных концентрациях различных солей ($1 \cdot 10^{-4}$ -2М) n увеличивалось и не зависело от ионного состава среды. Определено, что при концентрациях от меньших до сравнительно близких к физиологической ($1 \cdot 10^{-4}$ - $3 \cdot 10^{-1}\text{M}$), сродство гемоглобина к кислороду уменьшается с увеличением концентрации соли и зависит от ионного состава соли. Расположение в ряду цитрат натрия > хлорид калия – К-фосфатный буфер > сульфат натрия > хлорид натрия > трис-HCl буфер означает, что трис-HCl буфер меньше всех, а цитрат натрия наиболее уменьшает сродство гемоглобина к кислороду при увеличении концентрации солей в указанном диапазоне. При концентрациях, больших, чем $3 \cdot 10^{-4}$ сродство гемоглобина к кислороду еще сильнее зависит от ионного состава соли и может либо увеличиваться, либо уменьшаться с увеличением ионной силы. Так, например, при увеличении концентрации К-фосфатного буфера от 0,3 до 2М сродство гемоглобина к кислороду увеличивается. Авторами делается предположение, что эти результаты связаны с данными работы о диссоциации гемоглобина на димеры в концентрированных растворах солей и поэтому считают, что явление диссоциации гемоглобина на димеры может существовать и при низких концентрациях соли, хотя при этом ситуация осложняется различными факторами.

В работе показано, что степень кооперативности взаимодействия субъединиц эмбриональных гемоглобинов Portland, Gower I (zeta 2 gamma) и Gower II (alpha 2 epsilon 2) существенно не зависит от концентрации ионов хлора. Каждый из этих трех эмбриональных гемоглобинов имеют индивидуальную зависимость сродства к кислороду от концентрации ионов хлора. Гемоглобин Portland полностью не чувствителен к концентрации ионов хлора, гемоглобин Gower I проявляет небольшую концентрационную зависимость, в то время как гемоглобин

Gower II проявляет зависимость от концентрации ионов хлора близкую к той, что имеет гемоглобин А. В работе даны сведения о том, что при концентрациях, меньших физиологической, фетальный гемоглобин по сравнению с гемоглобином А обладает сниженным сродством к ионам хлора.

Авторы работы изучали влияние натрия хлорида на свойства гемоглобина в эритроцитах кошек, кроликов и крыс. Было обнаружено, что даже при использовании для отмывки эритроцитов изотонической 0,85% концентрации натрия хлорида уменьшается величина рН гемолизата и сродства гемоглобина к кислороду, отмечены непараллельность этих изменений, повышение эффекта Бора. Показано, что сила влияния ионов хлора на сродство гемоглобина к кислороду почти на порядок больше силы влияния на рН. Высказано предположение, что к стандартному влиянию рН дополняется действие ионов хлора. В работе было продолжено изучение влияния ионов на свойства гемоглобина крыс и показано, что при отмывке эритроцитов растворами хлорида кальция, сульфата магния и глюкозы изменяется рН, а в растворе глюкозы снижается сродство гемоглобина к кислороду до уровня, близкого к полученному в эксперименте с натрием хлоридом. Авторами делается вывод об опосредованном и неспецифическом влиянии электролитов через мембрану эритроцитов на кислородсвязывающую способность гемоглобина путем изменения его буферных свойств.

В работе при исследовании спектров ЭПР гемоглобина, ковалентно меченого радикалом I, показано, что добавление соли Na_2CO_3 к раствору гемоглобина при комнатной температуре приводит к значительному увеличению подвижности спиновой метки, что связано с расхождением субъединиц при крайне щелочных значениях рН раствора; при добавлении NaCl и NaH_2PO_4 происходит заметная иммобилизация метки (связанная, по-видимому, с электростатическими эффектами), что говорит о компактизации субъединиц белка при таком солевом составе.

В процессе определения влияния различных концентраций натрия хлорида на состояние внутриэритроцитарного гемоглобина человека методом дифференциальной спектроскопии установлено, что в концентрированных растворах натрия хлорида изменяется конформация гемоглобина в результате как влияния концентрации солей, так и изменения состава внутриклеточной среды, и, вероятно, концентрирования самих молекул гемоглобина. Вследствие этого при определенных концентрациях натрия хлорида происходят длинноволновые или коротковолновые сдвиги отрицательных максимумов первых производных спектров поглощения внутриэритроцитарного гемоглобина и структурирование этих максимумов в гипертонических растворах.

Исследовано действие температуры на структуру молекулы гемоглобина мышей. Гемоглобин выделяли в 0,1M NaCl , рН 6,4 и методом гель-фильтрации получали одни фракции гемоглобина, близкие по структуре к димерам, другие - к тетрамерам. Этот факт может иметь отношение к высказанному в работе предположению, что не только в концентрированных солях гемоглобин диссоциирует на димеры, но и низкие концентрации соли могут приводить к расхождению субъединиц гемоглобина. Показано, что замораживание до -8°C полученных димеров гемоглобина приводит к разворачиванию молекулы белка (увеличивается оптическая плотность в максимумах спектров поглощения в ультрафиолетовой области и уменьшается оптическая плотность в видимой области спектра, и при этом увеличивается "кажущаяся" молекулярная масса после гель-фильтрации), обусловленному, как и предполагают авторы, ослаблением гидрофобных взаимодействий и разрывом водородных связей и экспонированием ароматических аминокислот в растворитель. Авторы считают, что замораживание до -8°C тетрамеров гемоглобинов приводит к образованию более компактных по размерам белковых молекул. Это происходит в результате появления дополнительных связей между аминокислотными остатками полипептидной цепи и этим объясняется то, что объем выхода элюата оказался больше, чем у контрольных растворов, и соответственно, в элюате получены молекулы гемоглобина с меньшей "кажущейся" молекулярной массой. При этом уменьшается поглощение и в ультрафиолетовой, и в видимой области спектра. Замораживание до -8°C приводит также к структурным изменениям отдельных фракций гемоглобина мышей (изменению соотношения полуосей молекулы, характерного для нативного гемоглобина). В данной работе также отмечено, что в целом действие температурных факторов (в диапазоне от -8°C до $+50^\circ\text{C}$) на исходный раствор оксигемоглобина приводило к постепенному нарастанию величин молекулярных масс выделенных фракций. Увеличение молекулярных масс фракций оксигемоглобина наблюдалось и после воздействия ультрафиолетового облучения на растворы кристаллического гемоглобина из крови крупного рогатого скота. Авторы делают вывод о том, что это подтверждает предположение о стереотипности изменений в структуре гемоглобина при воздействии на него разных по своей природе физических и химических факторов.

При исследовании температурных параметров вращательной диффузии спиновых меток I и II, ковалентно присоединенных к макромолекуле гемоглобина, в диапазоне температур от $+33^\circ\text{C}$ до -20°C было определено, что понижение температуры приводит к монотонному уменьшению значения экспериментального параметра R, связанного с подвижностью меток. Это свидетельствует о компактизации субъединиц макромолекулы белка в процессе охлаждения. Эти данные, возможно, связаны с результатами, полученными в упомянутой выше работе, и, вероятно, компактизация, относится к тетрамерной структуре гемоглобина. В работе также отмечено, что в процессе медленного понижения температуры обнаруживаются структурные переходы в связанной с гемоглобином воде - при -60°C , свидетельствующие об уменьшении жесткости системы в результате плавления некоторых слоев связанной с белком воды, и при -110°C , обусловленные изменением диффузионных свойств связанной с белком воды. При температуре -120°C и ниже происходит замерзание прочно связанной с белком воды. Также в работе показано, что добавление концентрированных растворов солей к предварительно охлажденному до 0°C и -10°C раствору гемоглобина не приводит к существенным изменениям в спектре ЭПР, и

сделан вывод о том, что температура в качестве физического фактора оказывает стабилизирующее влияние на гемоглобин, повышая его устойчивость к действию гиперконцентраций солей.

По нашим экспериментальным данным, полученным с помощью метода спектрофотометрии, в результате замораживания до температуры жидкого азота (-196°C) и последующего оттаивания растворов HbA, максимум спектра поглощения («ноль» первой производной спектра поглощения) смещается в коротковолновую область, что свидетельствует об увеличении полярности окружения поглощающих хромофоров, т.е. увеличении их доступности растворителю [1], а именно, тирозиновых аминокислотных остатков, т.к. изменения в первой производной спектра поглощения происходят в области 277 нм, соответствующей поглощению тирозиновых аминокислотных остатков, располагающихся в полярных областях [1]. Таким образом, замораживание-оттаивание растворов HbA приводит к конформационным изменениям, затрагивающим полярные области белковых глобул. С помощью метода сканирующей микрокалориметрии получены данные о действии температуры -196°C на процесс тепловой денатурации гемоглобина из донорской крови (содержащей HbA) [2]. Деконволюция кривых теплопоглощения показала, что процесс термоденатурации Hb из донорской крови в нативном состоянии может быть представлен в виде двух гауссовых составляющих с максимумами при температурах 71.3°C и 74.5°C . Низкотемпературное воздействие приводит к уменьшению термостабильности Hb из донорской крови [2]. Кроме того, из параметров процесса термоденатурации Hb из донорской крови до и после охлаждения-нагрева видно, что после низкотемпературного воздействия термостабильность Hb из донорской крови уменьшается (T_{max} до охлаждения 72.7°C , после охлаждения 72.2°C ; ΔH_{cal} до охлаждения 238.0 кДж/моль, после охлаждения 183.4 кДж/моль – уменьшение температуры составило 0.5°C и уменьшение ΔH_{cal} составило 54.6 кДж/моль) [2]. Наличие изменений в температурном поведении Hb человека (HbA) было обнаружено с помощью метода некогерентного нейтронного рассеяния при исследовании конфигурационных движений и внутренних сил Hb человека (HbA) при охлаждении до -263°C (10 K) [3]. При различных температурах белковую гибкость определяли среднеквадратичным отклонением (MSD), $\langle u^2 \rangle$, зависящим от измеренной эластичной интенсивности $I(q)$ и модуля вектора рассеяния q ; при различных температурах белковую эластичность (упругость) определяли константой эффективной средней силы, $\langle k \rangle$, зависящей от среднеквадратичного отклонения. В соответствие с представленными табличными данными констант силы и корня MSD, полученных из нейтронного рассеяния, константа эффективной средней силы при температурах 10-100 K, $6,8 \pm 1,2$ Н/м; при 100-200 K, $1,0 \pm 0,1$ Н/м; при 252-292 K, $0,21 \pm 0,02$ Н/м; при температуре тела, $0,15 \pm 0,02$ Н/м [3]. Таким образом, константа эффективной средней силы уменьшается с ростом температуры, это свидетельствует, что молекула HbA становится менее жёсткой. В соответствие с представленными графическими данными зависимости MSD от температуры для гидратированных порошковых образцов Hb, MSD увеличивается с ростом температуры от 10 K до 292 K [3], следовательно, молекула HbA становится при этом более гибкой. Таким образом, с увеличением температуры от 10 K до 292 K, молекула HbA становится менее жёсткой и более гибкой. Хотя, исходя из полученных данных о том, что более жёсткие Hb солёноводного крокодила и курицы более гибкие, чем более мягкий Hb человека, авторы [3] отмечают, что упругость и гибкость – это независимые параметры и общее предположение, что более жёсткий белок всегда менее гибкий, чем мягкий белок, недействительно. Также наличие изменений в молекуле Hb при действии низкой температуры обнаружено и при исследовании спектров электронного парамагнитного резонанса гемоглобина, ковалентно меченого радикалом, по изменению температурных параметров вращательной диффузии спиновых меток I и II, ковалентно присоединённых к макромолекуле Hb, в области температур от 33°C до -20°C [4]. Было определено, что понижение температуры приводит к монотонному уменьшению значения экспериментального параметра R, связанного с подвижностью меток, что свидетельствует о компактизации субъединиц макромолекулы белка в процессе охлаждения [4]. Также для Hb мышей методом гель-фильтрации на сефадексе обнаружено изменение пространственной организации молекулы Hb после замораживания до -8°C ; были получены результаты для двух фракций Hb: кажущаяся молекулярная масса Hb первой фракции уменьшилась, вероятно, замораживание растворов Hb этой фракции приводит к образованию дополнительных связей между аминокислотными остатками полипептидных цепей, что может сопровождаться экранированием гема и части ароматических аминокислот глобина, образованием более компактных по размерам белковых глобул, тогда как кажущаяся молекулярная масса Hb второй фракции, наоборот увеличилась, что вероятно, связано с ослаблением и разрывом нековалентных связей (гидрофобные взаимодействия и водородные связи) и с частичным разворачиванием глобулы белка, сопровождающимся экспонированием ароматических аминокислот глобина в растворитель [5], что согласуется с нашими данными об увеличении доступности растворителю поглощающих хромофоров HbA после замораживания до температуры жидкого азота. Также об изменениях в молекуле HbA после замораживания свидетельствуют и данные, полученные нами при замораживании альгинатных микросфер, нагруженных Hb человека (HbA): после замораживания их до -20°C они частично теряли гемоглобин, что может быть связано с изменением неионных взаимодействий между Hb и Ca^{2+} -альгинатным матриксом; после замораживания до -20°C Hb-нагруженных альгинатных микросфер уменьшалась антирадикальная активность Hb, что регистрировалось по обесцвечиванию АБТС⁺-радикала, что может быть результатом либо частичного освобождения Hb из микросфер, либо потери белковой стабильности из-за конформационных изменений [6] т.к. известно, что процесс замораживания-оттаивания ведёт в большинстве случаев к конформационным изменениям белка, которые состоят в ослаблении молекулы и увеличении доступности активных участков белка, что может способствовать последующей агрегации и понижению активности [7].

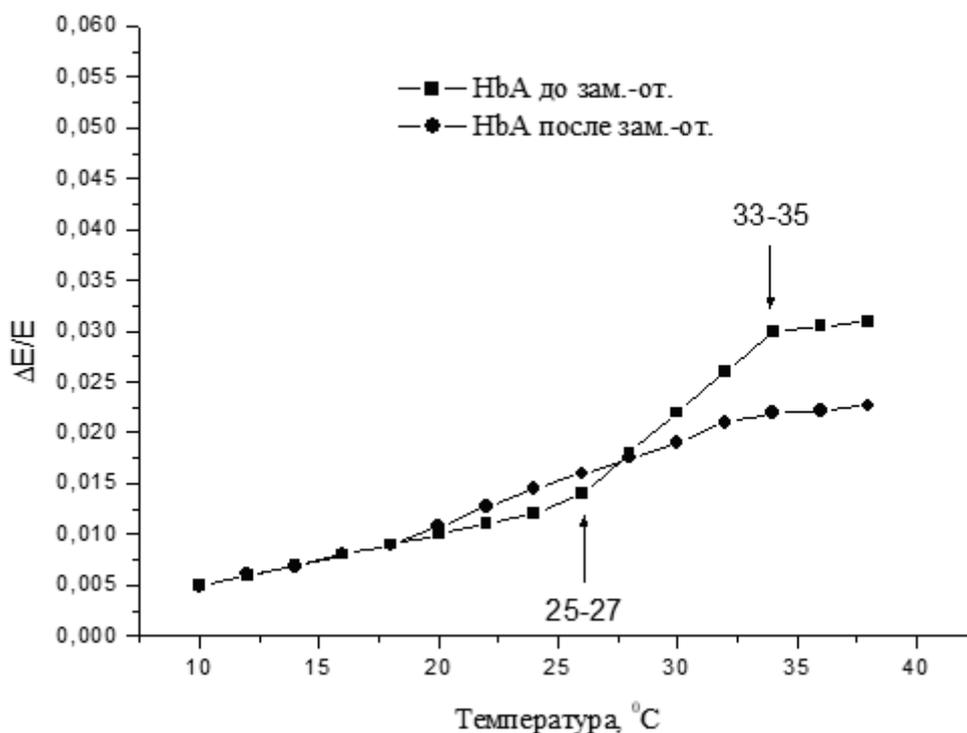


Рисунок 1. Зависимость интенсивности в максимуме ТПДС при 286 нм раствора HbA (температура сравнения +10°C), пронормированной на интенсивность СП при +10°C, от температуры; ■ – до, • – после замораживания-оттаивания

Было также исследовано влияние замораживания до -196°C и последующее влияние температур в области 6-38°C на раствор HbA методом температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии. После замораживания-оттаивания раствора HbA наблюдается сглаживание изломов на S-образной температурной зависимости интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров при 286 нм (рис. 1), вероятно, это означает, что сглаживаются, становятся менее заметны температурно-зависимые конформационные изменения в молекуле HbA. Следует отметить, что после замораживания-оттаивания сохраняется S-образная форма этой зависимости, т.е. конформационные изменения имеют место, но они менее выражены, чем до замораживания-оттаивания. При изучении методом ультрафиолетовой спектрофотометрии и гель-фильтрации влияния различных режимов замораживания на структуру бычьего сывороточного альбумина (БСА), было определено, что низкие температуры сами делают вклад в изменение структуры БСА, который может быть обусловлен ослаблением гидрофобных взаимодействий.

Таким образом, с одной стороны, замораживание раствора HbA приводит к конформационным изменениям молекулы HbA, затрагивающим полярные области, а именно, к увеличению доступности растворителю полярных областей, что согласуется с данными о частичном разворачивании глобулы белка, сопровождающемся экспонированием ароматических аминокислот глобина в растворитель [5] и с данными [7] о том, что процесс замораживания-оттаивания ведёт в большинстве случаев к конформационным изменениям белка, которые состоят в ослаблении молекулы и увеличении доступности активных участков белка. С другой стороны, замораживание растворов HbA приводит к компактизации субъединиц молекулы HbA [2,4,5]. Вероятно, это можно объяснить тем, что предположительно, увеличение доступности растворителю поглощающих хромофоров молекулы HbA, располагающихся в полярных областях, приводит к тому, что компактизуются другие части молекулы HbA, не участвующие в увеличении доступности аминокислотных остатков растворителю. То есть одни части молекулы HbA становятся более доступными растворителю, а другие при этом компактизуются. Это наше предположение, вероятно, можно рассматривать совместно с данными исследования конфигурационных движений и внутренних сил Hb человека (HbA) методом некогерентного нейтронного рассеяния, которое показало, что уменьшается константа эффективной средней силы с ростом температуры от 10 К до 292 К [3], это свидетельствует, что молекула HbA становится менее жёсткой, также увеличивается среднеквадратичное отклонение для гидратированных порошковых образцов Hb с ростом температуры от 10 К до 292 К [3], что указывает на то, что молекула HbA становится при этом более гибкой. Таким образом, при увеличении температуры от 10 К и выше уменьшается жёсткость и увеличивается гибкость молекулы HbA, что может быть в согласии с тем, что после замораживания до -196°C одни части молекулы HbA становятся более доступными растворителю, а другие при этом компактизуются, что возможно при нежёсткой и гибкой структуре молекулы гемоглобина А.

Список литературы / References:

1. Демченко А.П. *Ультрафиолетовая спектрофотометрия белков*. К.: Наукова думка, 1981, 208 с. [Demchenko A.P. *Ultra-violet spectrophotometry of proteins*. K.: Naukova dumka, 1981, 208 p. (In Russ.)]
2. Соловьёва А.С., Зинченко А.В. Сравнительное микрокалориметрическое исследование плавления гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия. *Проблемы криобиологии*, 2000, № 1, с. 32-35. [Solov'yova A.S., Zinchenko A.V. Comparative microcalorimetric investigation of melting of hemoglobin from donor and cord blood before and after low-temperature influence. *Problemy criobiologii*, 2000, no. 1, pp. 32-35. (In Russ.)]
3. Stadler A.M., Garvey C.J., Bocahut A., Sacquin-Mora S., Digel I., Schneider G.J., Natali F., Artmann G.M., Zaccai G. Thermal fluctuations of haemoglobin from different species: adaptation to temperature via conformational dynamics. *Journal of the royal society interface*, 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0364.
4. Гаврилова И.И. *Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно-конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов*. Дис. канд. биол. наук, Харьков, 1982, 146 с. [Gavrilova I.I. *The study of influence of low temperature and cryoprotectors on the structure-conformational transitions in some proteins and erythrocyte membrane*. Dis. doct. phyl. in biology, Kharkov, 1982, 146 p. (In Russ.)]
5. Артюхов В.Г., Путинцева О.В. Влияние температуры на структуру молекулы гемоглобина и его функции. *Известия АН Молдавской ССР. Серия биол. и хим. наук*, 1981, № 1, с. 56-61. [Artyuhov V.G., Putintseva O.V. Influence of temperature on the structure of hemoglobin molecule and its functions. *Izvestiya AN Moldavskoj SSR. Seriya biol. i him. nauk*, 1981, no. 1, pp. 56-61. (In Russ.)]
6. Rozanova S., Timchenko N., Rozanova K., Nardid O. Freezing of hemoglobin-loaded sodium alginate microspheres. *Journal of experimental and integrative medicine*, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 81-84.
7. Cao E., Foster P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of protein in aqueous solutions. *Biotechnol bioeng.*, 2003, vol. 82, no. 6, pp. 684-690.

INFLUENCE OF FREEZING-THAWING ON THE HEMOGLOBIN TEMPERATURE BEHAVIOR**Timchenko N.N., Golovchenko I.V.**

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: timchenko_n@list.ru

Received 07.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0557

Abstract. The use of blood preservation at low temperatures methods in medical practice makes it necessary to study the temperature effect on hemoglobin. The effect of freezing-thawing to a liquid nitrogen temperature of -196°C and subsequent thawing on hemoglobin A was studied, using the methods of temperature-perturbation differential spectrophotometry and analysis of absorption spectra first derivatives. After the hemoglobin A solution freezing-thawing, a smoothing of the breaks in the S-shaped temperature intensity dependence at the maximum of the temperature-perturbation differential spectra at 286 nm is noted. This probably means that temperature-dependent conformational changes in the hemoglobin A molecule are smoothed out and become less noticeable. It should be noted that after freezing-thawing, this dependence S-shaped form is preserved, i.e. conformational changes take place, but they are less pronounced than before freezing-thawing. Thus, on the one hand, freezing the hemoglobin A solution leads to conformational changes in the hemoglobin A molecule affecting the polar regions, namely, to an increase in the polar regions availability to the solvent, which is consistent with the data on the protein globule partial unfolding, accompanied by the globin aromatic amino acids exposure to the solvent, and with the data that the freezing-thawing process leads in most cases to conformational changes in the protein, which consist in the molecule weakening and increasing the protein active sites accessibility. On the other hand, freezing of hemoglobin A solutions leads to compaction of the hemoglobin A molecule subunits. This can probably be explained by the fact that, presumably, an increase in the availability of the hemoglobin A molecule absorbing chromophores located in the polar regions to the solvent leads to the compaction of the hemoglobin molecule A other parts, not involved in increasing the amino acid residues availability to the solvent. That is, some parts of the hemoglobin A molecule become more accessible to the solvent, while others become compact.

Key words: hemoglobin, conformational changes, temperature.