УДК 547.426:547.422:547.262:547.541.514:612.11.16 *UDC 547.426:547.422:547.262:547.541.514:612.11.16*

Сорбція БТС метгемоглобіном донорської і плацентарної крові у розчинах етиленгліколю і ПЕГ-3000

Ю.В. Кучеренко, Б.М. Леонов, К.Д. Розанова
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Sorption of Bromthymol Blue with Methaemoglobin of Donor and Placental Blood in Ethylene Glycol and PEG-3000 Solutions

Kucherenko Yu.V., Leonov B.N., Rozanova K.D.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Досліджували сорбцію бромтимолового синього (БТС) метгемоглобіном донорської і плацентарної крові у розчинах етиленгліколю (ЕГ) і ПЕГ-3000 однакової діелектричної проникності середовища ε_s. Проведені дослідження вказують, що не спостерігається чіткої взаємозалежності між ε_s і параметрами сорбції БТС донорським і плацентарним метгемоглобіном. Крім того, отримані дані свідчать про можливу сорбцію молекул ПЕГ-3000 на поверхні білка.

Ключові слова: метгемоглобін, етиленгліколь, ПЕГ-3000, сорбція барвника.

Исследовали сорбцию бромтимолового синего метгемоглобином донорской и плацентарной крови в растворах этиленгликоля и ПЭГ-3000 одинаковой диэлектрической проницаемости среды ε_s. Проведенные исследования показывают, что не наблюдается четкой взаимозависимости между ε_s и параметрами сорбции БТС донорским и плацентарным метгемоглобином. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о возможной сорбции молекул ПЭГ-3000 на поверхности белка.

Ключевые слова: метгемоглобин, этиленгликоль, ПЭГ-3000, сорбция красителя.

The authors studied the sorption of bromothymol blue (BTB) by donor and placental blood haemoglobin in ethylene glycol (EG) and PEG-3000 solutions with the same value of dielectric constant, ε_s. The performed investigations show that there is no distinct correlation between ε_s and parameters of BTB sorption by methaemoglobin from donor and placental blood. In addition, the obtained data testify to the possible sorption of PEG-3000 molecules on protein surface.

Key words: methaemoglobin, ethylene glycol, PEG-3000, dye sorption.

Відомо, що нативна конформація білкових молекул у водних розчинах підтримується балансом іонних, водневих, електростатичних і гідрофобних сил між молекулою розчинника і білком. Заміна розчинника на менш полярний призводить до змін структури розчину, його фізико-хімічних властивостей. Дані [4, 6, 8-10] вказують на важливу роль діелектричної проникності середовища у збереженні функціональних властивостей біомолекул. Нами була показана можливість гідрофобних взаємодій метильних і метиленових груп етанолу, гліцерину, ПЕГ-1500 з молекулою метгемоглобіну [3]. Але невідомо, як впливають незначні зміни діелектричної проникності середо-вища інкубації на зв'язування білком неелектролітів.

У роботі досліджували сорбцію аніонного барвника – бромтимолового синього (БТС) – метгемоглобіном донорської і плацентарної крові у розчинах ЕГ і ПЕГ-3000 однакової діелектричної проникності.

Матеріали і методи

Еритроцити донорської і плацентарної крові виділяли згідно з загальноприйнятою методикою. Для отримання гемоглобіну еритроцити лізирували у дистильованій воді (1:1, 24 год, 4°С), центри-

Адрес для корреспонденции: Кучеренко Ю. В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,ул. Переяславская,23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 772-61-41, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Native conformation of protein molecule in aqueous solutions is known to be supported by the balance of ionic, hydrogenous, electrostatic and hydrophobic strength between the solvent molecule and protein. Replacement of solvent to less polar one results in the changing of solvent structure, its physical and chemical peculiarities. The data [4, 6, 8-10] show that the role of dielectric constant in keeping the biomolecules functional properties is very important. We have shown the possibility of hydrophobic interaction of methyl and methylene groups of ethanol, glycerol, PEG-1500 with methaemoglobin molecule [3]. However the effect of slight alterations in dielectric constant of incubation environment on protein binding of non-electrolytes is unknown.

In the work we have studied similar EG and PEG-3000 dielectric constants of anion sorption on BTB donor and placental blood in solutions.

Materials and methods

Donors and placental blood erythrocytes were derived according to traditional methods. For isolating haemoglobin the erythrocytes were lysed in distilled water (1:1, 24hrs, 4°C), centrifuged (15 min, 10000g). Methaemoglobin was derived by adding 2M of

Address for correspondence: Kucherenko Yu.V., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 7726141, fax: +38 (057) 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

фугували (15 хв, 10000g). Метгемоглобін отримували додаванням 2М надлишку фериціаніду калію, очищали методом гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-100. Вихід фракцій контролювали спектрофотометрично за співвідношенням інтенсивностей при 275 і 500 нм. Концентрацію метгемоглобіну визначали спектрофотометрично при 630 нм (ε=3.7 $мМ^{-1}см^{-1}$ на 1 гем для донорського і ε=3.8 $мМ^{-1}см^{-1}$ на 1 гем для плацентарного гемоглобіну). Зв'язування БТС з метгемоглобіном визначали за зменшенням оптичної щільності розчинів при 614 нм. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі "PYE UNICAM SP8000" (Велика Британія). Тривалість інкубації гемоглобіну з 15- і 20%-ми розчинами етиленгліколю та з 6.05- і 8.42%-ми розчинами ПЕГ-3000 складала 20 хв. Дані щодо діелектричної проникності розчинів ЕГ і ПЕГ-3000 були отримані з [2]. Тривалість контакту гемоглобіну з розчинами БТС складала 15-20 хв (pH 7.4, 22°C).

Параметри сорбції зонду на поверхні білка розраховували за методом Скетчарда [5].

Результати і їх обговорення

Відомо, що БТС є слабкою кислотою з pK 7.1 при 20°C. Як зазначено в [1, 7], взаємодія БТС з гемоглобіном здійснюється за рахунок гідрофобних сил при нейтральних значеннях pH розчину і супроводжується зменшенням інтенсивності спектральної полоси з максимумом при 610-615 нм. Додавання у розчин інкубації неелектролітів призводить до зменшення діелектричної проникності ε_s і до посилення міжмолекулярних взаємодій (іонних і ван-дер-ваальсових). У досліджуваної нами системі білок-неелектроліт-зонд також слід очікувати посилення іонних і гідрофобних взаємодій між зондом і молекулою гемоглобіну.

З даних, наведених у таблиці, видно, що обробка метгемоглобіну донорської і плацентарної крові розчинами ЕГ і ПЕГ-3000 призводить до зменшення константи дисоціації K_d комп-

ferricyanides of potassium, methaemoglobin was purified by method of gel-filtration on the sephadex G-100 column. Yield of fractions was controlled spectrophotometrically according to the correlations of intensities at 275 and 500 nm. Methaemoglobin concentration was defined spectrophotometrically at 630 nm (ε=3.7$mM^{-1}cm^{-1}$ to 1 haeme for donor and ε=3.8mM cm^{-1} for 1 haeme for placental haemoglobin. BTB binding with methaemoglobin was revealed according to decrease of optical density of solutions with 614nm. Absorption spectra were recorded with spectrophotometer "PYE UNICAM SP8000" (England). The duration of haemoglobin incubation with 15 and 20% solutions of EG and with 6.05% and 8.42% solutions of PEG-3000 made 20 minutes. Data on dielectric constant of EG and PEG-3000 was obtained from the paper [2]. Duration of haemoglobin contact with BTB solutions was 15-20 min (pH 7.4, 22°C). Parameters of sorption probe on protein surface were calculated by Skφtchard method [5].

Results and discussion

It is known that BTB is a weak acid with pK 7.1 with 20°C. As it is shown in the papers [1, 7], the interaction of BTB with haemoglobin is performed at the expense of hydrophobic forces in presence of solution pH neutral values and is accompanied by

Залежність параметрів сорбції БТС донорським і плацентарним метгемоглобіном від діелектричної проникності середовища

Dependence of BTB dielectric constant with donor and placental parameters of methaemoglobin on dielectric constant

Діелектрична проникність середовища, $\varepsilon_s = 76$ Dielectric constant of solution, $\varepsilon_s = 76$				
	MetHb A		MetHb F	
n	1,43±0,32		0,90±0,27	
$K_d, 10^{-6}$ M	0,235±0,064		0,219±0,075	
Діелектрична проникність середовища, $\varepsilon_s = 73,6$ Dielectric constant of solution, $\varepsilon_s = 73,6$				
	MetHb A + 15% – й розчин ЕГ MetHb A + 15% EG solution	MetHb A + 6,05% – й розчин ПЕГ – 3000 MetHb A + 6,05% PEG – 3000 solution	MetHb F + 15% – й розчин ЕГ MetHb F + 15% EG solution	MetHb F + 6,05% – й розчин ПЕГ – 3000 MetHb F + 15% PEG – 3000 solution
n	1,19±0,32	2,23±0,87	0,98±0,075	1,24±0,64
$K_d, 10^{-6}$ M	0,107±0,068	0,074±0,031	0,075±0,04	0,128±0,041
Діелектрична проникність середовища, $\varepsilon_s = 71,84$ Dielectric constant of solution, $\varepsilon_s = 71,84$				
	MetHb A + 20% – й розчин ЕГ MetHb A + 20% EG solution	MetHb A + 8,42% – й розчин ПЕГ – 3000 MetHb A + 8,42% PEG – 3000 solution	MetHb F + 20% – й розчин ЕГ MetHb F + 20% EG solution	MetHb F + 8,42% – й розчин ПЕГ – 3000 MetHb F + 8,42% PEG – 3000 solution
n	1,44±0,27	2,39±0,62	2,365±0,390	2,570±0,025
$K_d, 10^{-6}$ M	0,071±0,03	0,077±0,034	0,059±0,037	0,092±0,042

лексу білок-барвник, що у свою чергу означає збільшення спорідненості БТС до метгемоглобіну.

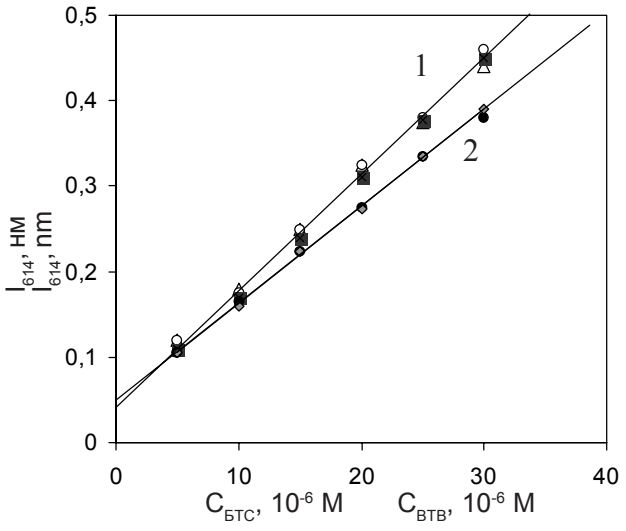
Однак посилення сорбції БТС (збільшення місць зв'язування барвника на поверхні білка n) при пониженні ε_s середовища інкубації спостерігалося лише у розчинах ПЕГ-3000. У розчинах ЕГ, ε_s яких співпадала з ε_s розчинів ПЕГ-3000, не виявлено достовірних змін параметра n у розчинах донорського метгемоглобіну. У випадку плацентарного метгемоглобіну збільшення n (у 2 рази у порівнянні з контролем) зафіксовано лише у 20%-му розчині ЕГ.

Дані таблиці не враховують можливої взаємодії молекул ЕГ і ПЕГ-3000 з молекулами БТС, яке також може змінюватися при зміні ε_s. Як показано на рисунку, на відміну від розчинів ЕГ, у розчинах ПЕГ-3000 спостерігалося зменшення кількості вільного барвника у розчині, що свідчить про сорбцію молекул БТС молекулами ПЕГ-3000.

Розрахунки вказують, що кількість сорбованого молекулами ПЕГ-3000 і метгемоглобіну барвника не підпорядковується правилу адитивності, тобто $n^{загал}_{БТС} \neq n^{ПЕГ}_{БТС} + n^{метHb}_{БТС}$, що вказує на взаємодію між молекулами ПЕГ-3000 і метгемоглобіном, внаслідок якого центри зв'язування БТС на поверхні метгемоглобіну екрановані молекулами ПЕГ-3000.

Враховуючи, що кількість місць зв'язування БТС на поверхні ПЕГ-3000 складає n~4, можна припустити, що збільшення параметра n у розчинах ПЕГ-3000 (див. таблицю) насправді пов'язано з сорбцією барвника на поверхні ПЕГ-3000.

Збільшення n у розчинах плацентарного метгемоглобіну, обробленого 20%-м ЕГ, очевидно, пов'язане зі зміною конформації білка у розчині неелект-



Залежності оптичної щільності при 614 нм від концентрації БТС: 1 – 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4), 15- і 20%-ві розчини ЕГ; 2 – 6,05- і 8,42%-ві розчини ПЕГ-3000.

Optic density dependence (614nm) on BTB concentration: 1 – 10mM phosphate buffer (pH 7.4), 15-20% EG solutions;2 – 6.05-8.42% PEG-3000 solutions.

reduction of the intensity of spectral band with maximum at 610-615 nm. Adding of non-electrolytes to the incubation solution results in the decrease of dielectric constant ε_s and in the reinforcement of molecular interactions (ionic and Van der Waals ones). In our protein-non-electrolyte-probe research system, there is supposed the reinforcement of ionic and hydrophobic interactions between the probe and haemoglobin molecule.

The table data demonstrate that, the treatment of methaemoglobin of donor and placental blood by EG and PEG-3000 solutions leads to the decrease of dissociation constant (Cd) of the protein-dye complex, that, in its turn, means the increase of affinity of BTB with haemoglobin.

However the reinforcement of BTB sorption (the increase of sites of dye binding on the protein surface, n) with the decrease in es of the incubation medium were observed only in PEG-3000 solutions. In EG solutions, ε_s of which, coincides with ε_s of PEG-3000 solutions there is no statistically true changes of the n parameter in the solutions of donor methaemoglobin. In the case of placental methaemoglobin increase of n (in comparison with the control in 2 times) is found only in 20% EG solution.

The Table data do not take into account a probable molecule interaction of EG and PEG-3000 with BTB molecules, which also can alter in the case of ε_s changing. As it is shown in the figure in contrast to EG solutions there is a decrease of free dye in PEG-3000 solution, this testifies to the sorption of BTB molecules by PEG-3000 ones.

Calculations show that the amount of dye, which was sorbed by PEG-3000 molecules and those of methaemoglobin, does not depend on additivity that is $n^{MetHb+PEG}_{BTB} \neq n^{PEG}_{BTB} + n^{MetHb}_{BTB,}$ that shows the interaction between PEG-3000 molecules with methaemoglobin, due to which the centres of BTB binding on methaemoglobin surface are screened by PEG-3000 molecules.

Taking into account that the number of sites of BTB binding on PEG-3000 surface is n~4, it can be assumed that the increase of n parameters in PEG-3000 solutions (see the Table) is really related to the sorption of dye on PEG-3000 surface.

The increase of n in placental methaemoglobin solutions, which was treated by 20% EG, is apparently connected with the changes of protein conformation in non-electrolyte solution. So long as, according to the data [8], EG and alcohols under the concentrations, which are lower than 30%, do not affect considerably on size, shape and molecular mass of haemoglobin molecule and the denaturation of protein begins when the concentration is 50-60%, it is possible to consider that conformational changes of protein are linked with the increase of non-polar surroundings of charged

роліта. Оскільки, згідно з даними [8], ЕГ і спирти у концентраціях нижче 30% значно не впливають на розмір, форму і молекулярну масу молекули гемоглобіну, а денатурація білка починається при концентраціях 50-60%, можна вважати, що конформаційні зміни білка пов'язані зі збільшенням неполярного оточення заряджених груп на поверхні білка, що полегчує сорбцію аніонних барвників. Відсутність ефекту 20%-го ЕГ на конформацію донорського метгемоглобіну свідчить про більш легку структурну альтерацію молекул плацентарного метгемоглобіну у порівнянні з донорським.

Висновок

Таким чином, проведені дослідження вказують, що не спостерігається чіткої взаємозалежності між ε_s і параметрами сорбції аніонного барвника БТС донорським і плацентарним метгемоглобіном. Крім того, отримані дані свідчать про можливу сорбцію молекул ПЕГ-3000 на поверхні білка.

Література

1. *Горбенко Г.П.* Влияние фосфолипидов на связывание бромтимолового синего метгемоглобином // Биополимеры и клетка.– 1990.– Т.6, №5.– С. 103-105.
2. *Жилякова Т.А.* Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах: Дис...канд. биол. наук.- Харьков, 1991.– 170 с.
3. *Кучеренко Ю.В., Розанова Е.Д.* Влияние криопротекторов на связывание бромтимолового синего метгемоглобином быка // Укр. биохим. журн.– 2001.– Т.73, №1.– С. 64-67.
4. *Лапшина Е.А., Заводник И.Б., Игнатенко В.А., Степуро И.И.* Термостабильность и функциональные свойства гемоглобинов человека в присутствии алифатических спиртов // Молекулярная биол.– 1992.– Т.26, №2.– С. 315-320.
5. *Левин С.В.* Структурные изменения клеточных мембран.– Л.: Наука, 1976.– 223 с.
6. *Леонов Б.Н.* Влияние состава растворителя и замораживания-отогрева на конформацию сывороточного альбумина в растворе: Дис....канд. биол. наук.– Харьков, 1985.– 133 с.
7. *Antonini E., Wyman J., Morretti R., Flanelli R.* The interaction of bromthymol blue with haemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium // Biochim. Biophys. Acta.– 1963.– Vol.71.– P.124-138.
8. *Herskovits T.T., Greenblatt J.* Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins II. On the environment and location of the tryptophyl residues in hemoglobin // Arch. Biochem. Biophys.– 1969.– Vol.130.– P. 30-38.
9. *Hui Bon Hon C., Douson P.* Ionic strength and protonic activity of supercooled solutions used in experiments with enzyme system // J. Biol. Chem.– 1973.– Vol.248, N13.– P. 4649-4654.
10. *Soltysik Rasek M., Lubas B.* Interaction of haemoglobin and cytochrome C with aliphatic alcohols as studied by ^{1}H-NMR spectroscopy // Acta Biochim. Pol.– 1986.– Vol.33, N4.– P. 259-267.

Надійшла 8.10.2002

groups on the protein surface, that facilitates the sorption of anion dye. The absence of effect on conformation of donor methaemoglobin in case of 20% EG solution testifies to slighter structural alteration of molecules of placental methaemoglobin in comparison with donor one.

Conclusion

Thus the performed investigations show the absence of a distinct relationship between ε_s and the sorption parameters of BTB anion dye by donor and placental methaemoglobin. In addition, the received data testify to the possible sorption of PEG-3000 molecules on protein surface.

References

1. *Gorbenko G.P.* The influence of phospholipids on the interaction of bromthymol blue with haemoglobin // Biopolimery i kletka.– 1990.– Vol.6,N5.– P. 103-105.
2. *Zilyakova T. A.* Temperature-depending changes of water state in biological membrane: Thesis... Cand. Biol.Sci.– 1991, Kharkov.– 170 p.
3. *Kucherenko Yu. V., Rozanova E.D.* The influence of cryoprotectants on the oxygen equilibrium with the help of bromthymol blue with methaemoglobin // Ukr. Biohim. Zhurnal.– 2001.– Vol.73, N1.– P.64-67.
4. *Lapshina E. A., Zavodnik I.B., Ignatenko V.A., Stepuro I.I.* Thermostability and functional characteristics of human hemoglobin in aliphatic alcohols presence// Molekulyarnaya Biologiya.– 1992.– Vol.26, N2.– P. 315-320.
5. *Levin S.V.* Structural changes of cellular membrane.–- Leningrad: Nauka, 1976.– P. 223.
6. *Leonov B.N.* The influence of both solvent structure and freezing warming on serum albumin conformation in the solution : Thesis...Cand.Biol.Sci.– Kharkov, 1985.– P. 133.
7. *Antonini E., Wyman J., Morretti R., Flanelli R.* The interaction of bromthymol blue with haemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium // Biochim. Biophys. Acta.– 1963.– Vol.71.– P.124-138.
8. *Herskovits T.T., Greenblatt J.* Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins II. On the environment and location of the tryptophyl residues in hemoglobin // Arch. Biochem. Biophys.– 1969.– Vol.130.– P. 30-38.
9. *Hui Bon Hon C., Douson P.* Ionic strength and protonic activity of supercooled solutions used in experiments with enzyme system // J. Biol. Chem.– 1973.– Vol.248, N13.– P. 4649-4654.
10. *Soltysik Rasek M., Lubas B.* Interaction of haemoglobin and cytochrome C with aliphatic alcohols as studied by ^{1}H-NMR spectroscopy // Acta Biochim. Pol.– 1986.– Vol.33, N4.– P. 259-267.

Accepted in 8.10.2002