

**Аутоокисление гемоглобинов А и F после замораживания-оттаивания**

Н.Н. ТИМЧЕНКО, Е.Д. РОЗАНОВА, Ю.В. КУЧЕРЕНКО, Б.Н. ЛЕОНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Autooxidation of Hemoglobins A and F after Freeze-Thawing**

TIMCHENKO N.N., ROZANOVA E.D., KUCHERENKO YU.V., LEONOV B.N.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали влияние замораживания-оттаивания на структурно-функциональное состояние гемоглобинов А и F. Отмечено увеличение содержания метформы в растворах белков, свидетельствующее об ускорении их аутоокисления. Конформационные изменения, сопровождающие этот процесс, происходят преимущественно в полярных областях молекул.

Вивчали вплив заморожування-відтавання на структурно-функціональний стан гемоглобінів А і F. Визначено підвищення вмісту метформи в розчинах білків, яке свідчить про прискорення їх аутоокислення. Конформаційні зміни, що супроводжують цей процес, відбуваються переважно в полярних зонах молекул.

The authors studied the effect of freeze-thawing on structural and functional state of hemoglobins A and F. An increase in content of metforms in protein solutions is noted, which testifies to an acceleration of hemoglobins' auto-oxidation. Conformation changes, accompanying this process, affect mainly the polar zones of molecules.

Окисление железа в гемоглобине приводит к образованию метгемоглобина, содержащего трехвалентное железо, и потере способности связывать молекулярный кислород. Спонтанное формирование метгемоглобина (аутоокисление) идет медленно как *in vivo*, так и *in vitro*. Однако этот процесс может ускоряться при действии различных физико-химических факторов [8]. Такое влияние на молекулу гемоглобина является неблагоприятным, так как снижает ее устойчивость к окислению и приводит к потере способности выполнять основную функцию – связывать молекулы кислорода. Сохранение этой функции – одна из главных задач при низкотемпературном консервировании эритроцитов и гемоглобина.

Ранее [2] были изучены некоторые закономерности реакций обратимой оксигенации гемоглобина человека. Отмечено, что константа скорости реакции аутоокисления существенно возрастает с понижением pH среды и алифатические спирты повышают эффективность процесса аутоокисления. Несмотря на то, что низкотемпературное консервирование широко используется для хранения эритроцитов и гемоглобина, как влияет замораживание-оттаивание на способность молекулы гемоглобина к аутоокислению не изучалось. Целью настоящей работы было изучить, каким образом влияет замораживание-оттаивание на аутоокисление гемоглобинов А и F (HbA и HbF) и какими изменениями конформации белка этот процесс может сопровождаться.

В работе использовали растворы HbA и HbF в физиологическом растворе на 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2. Раствор HbA выделяли из донорской, а HbF – из пуповинной крови [4].

Iron oxidation in hemoglobin results in the formation of methemoglobin, containing three-valent iron, and the loss of the capability to bind molecular oxygen. Spontaneous formation of methemoglobin (autooxidation) proceeds slowly both *in vivo* and *in vitro*. However this process can be accelerated under the effect of various physical and chemical factors [8]. Such an effect on hemoglobin molecule is unfavourable, because it reduces its resistance to oxidation and leads to the loss of the capability to perform the main function: to bind the oxygen molecules. Keeping of this function is one of the main aims of low temperature preservation of erythrocytes and hemoglobin.

Recently some regularities in reactions of reversible oxygenation of human haemoglobin have been studied [2]. It is noted that the constant of autooxidation reaction rate increases with the decrease in medium's pH and aliphatic alcohols increase the efficiency of autooxidation process. Despite the low temperature preservation is widely used for the storage of erythrocytes and hemoglobin, the way, by which freeze-thawing affects the capability of hemoglobin molecule to oxidation has not been studied. The aim of this work was to investigate how freeze-thawing affects autooxidation of hemoglobins A and F (HbA and HbF) and what changes in protein conformation can accompany this process.

In the work we used the solutions of HbA and HbF in physiological solution on 0.05 M sodium-sulphate buffer, pH 7.2. Methemoglobin (metHb) content in the solutions was spectrophotometrically determined [9, 10]. To characterise the protein conformation we used the first derivative of absorption spectra (DAS) in UV area and the

Содержание метгемоглобина (метHb) в растворах определяли спектрофотометрически [9, 10]. Для характеристики конформации белков использовали первые производные спектров поглощения (ПСП) в УФ области и исследование гидрофобной поверхности молекул методом связывания белка с органическим красителем бромтимоловым синим (БТС) [7]. Растворы БТС концентрацией  $5 \times 10^{-4}$  М готовили на 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2.

Время контакта белков с БТС составило 20 мин. Концентрации HbA и HbF находились в пределах  $0,8 \div 1,4 \times 10^{-5}$  М и  $1,2 \div 1,5 \times 10^{-5}$  М соответственно; концентрации БТС –  $5 \div 30 \times 10^{-6}$  М. Параметры связывания красителя с белком (количество участков n на молекуле белка, сорбирующих краситель и константу диссоциации комплекса белок-краситель  $k_d$ ) рассчитывали по методу, предложенному С.В.Левиным [3]. Растворы HbA и HbF замораживали со средней скоростью 20°C/мин до температуры жидкого азота. Оттаивание осуществляли на водяной бане при 20°C. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре “PYE UNICAM SP 8000” (Велико-британия).

Содержание метгемоглобина в растворах после замораживания-оттаивания заметно увеличивается после хранения растворов в течение 1-2-х суток при 4°C, в то время как в исходных растворах изменения в содержании метгемоглобина не наблюдается (таблица).

Изучение первых ПСП в УФ области показало, что изменения в структуре спектров наблюдаются в области 272 нм, свидетельствующие о смещении максимума спектра поглощения в коротковолновую область и небольших изменениях в области тирозиновых аминокислотных остатков [1], которые обычно располагаются в полярных областях (рис.1,2).

Исследование параметров связывания БТС с белками показало, что количество участков сорбции БТС с HbF меньше по сравнению с HbA (3,2 и 5,4 соответственно), но образующаяся связь более прочная, так как константа диссоциации меньше. Замораживание-оттаивание не влияет на параметры взаимодействия гемоглобинов с БТС.

Таким образом, полученные результаты показали, что замораживание-оттаивание растворов HbA и HbF приводит к увеличению содержания в них метформы, свидетельствующее об ускорении аутоокисления белков, причем для HbF этот

Содержание метформы в растворах HbA и HbF после замораживания-оттаивания, %

Content of metform in the solutions of HbA and HbF after freeze-thawing, %

Срок хранения, ч Storage term, hrs	MetHbA MetHbA		MetHbF MetHbF	
	Контроль Control	После замораживания-оттаивания After freeze-thawing	Контроль Control	После замораживания-оттаивания After freeze-thawing
0	3,0±0,7	4,0±0,8	5,0±1,0	6,0±0,8
6	3,0±0,7	5,0±0,8	5,0±1,0	8,0±1,0
12	3,0±0,7	7,0±0,8	5,0±1,0	10,0±1,0
24	3,0±0,7	8,0±0,8	5,0±1,0	12,0±0,9

investigation of hydrophobic surface of molecules by the method of protein binding with organic dye, bromthymol blue (BTB) [7]. BTB solutions under the concentration of  $5 \times 10^{-4}$  M were prepared with 0.05M sodium-phosphate buffer, pH 7.2.

The contact time of proteins with BTB made 20 min. The concentrations of HbA and HbF were within the limits of  $0.8 \div 1.4 \times 10^{-5}$  M and  $1.2 \div 1.5 \times 10^{-5}$  M, correspondingly; BTB concentrations did  $5 \div 30 \times 10^{-6}$  M. The parameters of dye binding with protein (the number of sites on protein molecule, absorbing the dye and the constant of dissociation for the “protein-dye” complex,  $k_d$ ) were calculated according to the method proposed by S.V. Levin [3]. The solutions of HbA and HbF were frozen with an average rate of 20°C/min down to the temperature of liquid nitrogen. Thawing was carried out on water bath at 20°C. Absorption spectra were recorded with the spectrometer “PYE UNICAM SP 8000” (UK).

The content of methemoglobin in the solutions after freeze-thawing considerably increases after

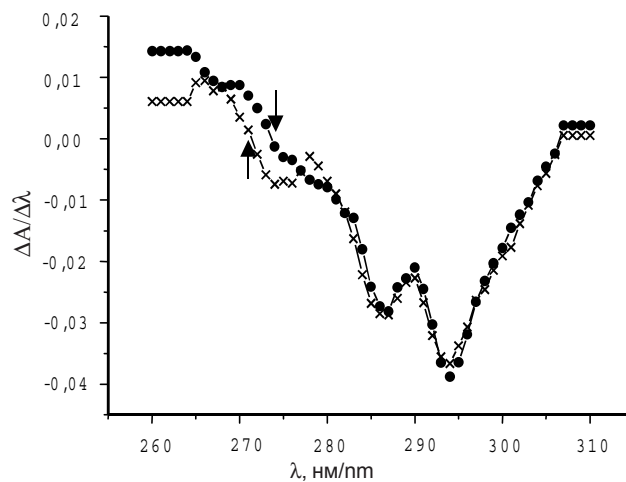
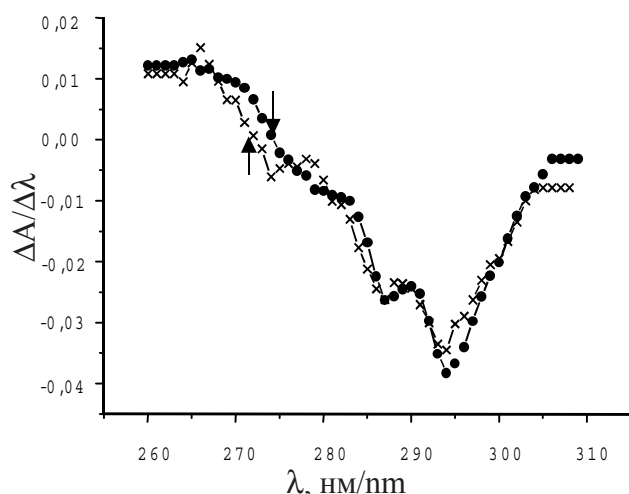


Рис. 1. Первые ПСП раствора HbA : ● – до; × – после замораживания-оттаивания.

Fig. 1. The first DAS of the HbA solution: ● – before; × – after freeze-thawing



**Рис. 2.** Первые ПСП раствора HbF: ● – до; × – после замораживания-оттаивания.

**Fig. 2.** The first DAS of the HbF solution: ● – before; × – after freeze-thawing

процесс более выражен. Изученные структурные параметры показали, что замораживание-оттаивание приводит к конформационным изменениям, затрагивающим преимущественно полярные области белковой глобулы. Более выраженное действие замораживания-оттаивания на HbF по сравнению с HbA, по-видимому, обусловлено тем, что в его состав входит большее количество полярных аминокислот [5], и, как показали наши эксперименты, меньшее количество гидрофобных областей, которые вносят наибольший вклад в стабилизацию белковых молекул [6]. Для подтверждения высказанных предложений необходимо исследовать структурно-функциональное состояние белков другими методами, определить, какие факторы (состав растворителя, скорость охлаждения) вносят наиболее существенный вклад в наблюдаемые изменения. Результаты таких исследований позволят предложить пути стабилизации белков в процессе замораживания-оттаивания.

## Литература

1. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия белков. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.
2. Заводник И.Б., Пилецкая Т.П., Степура И.И. Аутоокисление и оксигенация гемоглобина человека // Молекулярная биология. – 1992. – Т. 26, №2. – С. 321-327.
3. Левин С.В. Структурные изменения клеточных мембран. – Л.: Наука, 1976. – 224 с.
4. Тимченко Н.Н., Розанова Е.Д., Моисеев В.А., Хромешкин К.Н. Изучение влияния концентрированных растворов натрия хлорида на состояние фетального гемоглобина и гемоглобина А // Біофіз. вісник. – 2001. – №2. – С. 62-66.
5. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р. Основы биохимии. Т.3. – М.: Мир, 1981. – 726 с.
6. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 354 с.

storage of the solutions during 1-2 days at 4°C, meanwhile in initial solutions the changes in the methemoglobin content were not observed (Table).

The investigation of the first DAS in UV area has shown that the changes in the spectra structure are observed in the area of 242 nm, testifying to a shift of the absorption spectrum maximum to a short wave region and slight changes in the area of tyrosine amino acids residua [7], which usually are located in polar areas (Fig. 1,2).

The studying of the parameters of BTB binding with proteins has demonstrated that the number of BTB absorption sites with HbF is less in comparison with HbA (3.2 and 5.4, correspondingly), but the forming binding is more tight, because the dissociation constant is lower (0.2 for HbF and 0.7 for HbA). Freeze-thawing does not affect the parameters of interaction of hemoglobins with BTB.

Thus obtained results have shown that freeze-thawing of the HbA and HbF solutions results in the increase of the content in them of metform, testifying to an acceleration of protein autooxidation, moreover for HbF this process is more manifested. Studied structural parameters have demonstrated that freeze-thawing results in conformational changes, affecting predominantly the polar areas of protein globule. More manifested effect of freeze-thawing on HbF in comparison with HbA, probably, is stipulated by the fact that it comprises a big number of polar amino acids [5] and as our experiments showed less number of hydrophobic areas, which contributed most of all to stabilisation of protein molecules [6]. To confirm these statements it is necessary to continue the investigation of structural and functional state of protein by other methods, and to determine the factors (solvent composition, cooling rate), which essentially contribute to the observed changes. Results of these investigations will allow to propose the ways of proteins' stabilisation in process of freeze-thawing.

## References

1. Demchenko A.P. Ultraviolet spectrophotometry of proteins. – Kiev: Naukova Dumka, 1981. – 201p.
2. Zavodnik I.B., Piletskaya T.P., Stepuro I.I. Autooxidation and oxidation of human hemoglobin // Moleculyarnaya biologiya. – 1992. – Vol. 26, N2. – P. 321-327.
3. Levin S.V. Structural changes in cellular membranes. – Leningrad: Nauka, 1976. – 224p.
4. Timchenko N.N., Rozanova E.D., Moiseyev V.A., Khromushkin K.N. Studying of the effect of concentrated solutions of sodium chloride on the state of fetal hemoglobin and hemoglobin A // Biophysical Bulletin. – 2001. – N2. – P. 62-66.
5. White A., Handler F., Smith E., Hill R. Grounds of Biochemistry. Vol. 3. – Moscow: Mir, 1981. – 726 p.
6. Schultz G., Schirmer R. Principles of structural organization of proteins. – Moscow: Mir, 1982. – 354 p.

7. *Antonini E., Wyman J., Moretti R.* The interaction of bromthymol blue with hemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1963. – Vol. 71. – P. 12-138.
  8. *Erust R., Joffe M.* Methemoglobin pathophysiology. In: *The function of the red blood cells. Erythrocyte pathology.* – N.Y, 1981.– P. 133-151.
  9. *Fogh-Andersen N., Siggard-Andersen O.* Spectrophotometric determination of hemoglobin pigments in neonatal blood // *Clin. Chim. Acta.* – 1987.– Vol. 166. – P. 291-296.
  10. *Zwart A., Buursma A., Van Kampen E.* A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*– 1981.– Vol. 19.– P. 457-463.
7. *Antonini E., Wyman J., Moretti R.* The interaction of bromthymol blue with hemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1963. – Vol. 71. – P. 12-138.
  8. *Erust R., Joffe M.* Methemoglobin pathophysiology. In: *The function of the red blood cells. Erythrocyte pathology.* – N.Y, 1981.– P. 133-151.
  9. *Fogh-Andersen N., Siggard-Andersen O.* Spectrophotometric determination of hemoglobin pigments in neonatal blood // *Clin. Chim. Acta.* – 1987.– Vol. 166. – P. 291-296.
  10. *Zwart A., Buursma A., Van Kampen E.* A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*– 1981.– Vol. 19.– P. 457-463.

*Поступила 01.10.2002*

*Accepted in 01.10.2002*