

## СВЕТОРАССЕЯНИЕ РАСТВОРОВ ГЕМОГЛОБИНА А И ФЕТАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ-1500

М. П. Евстигнеев<sup>1</sup>, Н. Н. Тимченко<sup>2</sup>, В. А. Рубакина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

<sup>2</sup>Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко

Поступила в редакцию 25.02.2016 г.

**Аннотация.** Светорассеяние растворов гемоглобина А увеличивается в присутствии 10-40% растворов полиэтиленгликоля-1500, что свидетельствует об агрегации белка. Светорассеяние растворов фетального гемоглобина в 10-20% растворах полиэтиленгликоля-1500 изменилось не значительно, а в 30-40% оно значительно меньше, чем светорассеяние растворов гемоглобина А в 30-40% растворах полиэтиленгликоля-1500.

**Ключевые слова:** гемоглобин А, фетальный гемоглобин, полиэтиленгликоль-1500, светорассеяние

**Abstract.** Light scattering of hemoglobin A solutions in the presence of 10-40% solutions of polyethylene glycol 1500 increases, which evidences protein aggregation. Light scattering of fetal hemoglobin solutions in the 10-20% solutions of polyethylene glycol 1500 is insignificantly altered, however in 30-40% solutions it becomes significantly lower than the light scattering of hemoglobin A solutions in the 30-40% solutions of polyethylene glycol 1500.

**Keywords:** hemoglobin A, fetal hemoglobin, polyethylene glycol 1500, light scattering

Растворы гемоглобина являются предметом изучения в экспериментальной медицине, в связи с чем исследуются условия его хранения при низких температурах. В литературе имеются данные о том, что повышенные уровни фетального гемоглобина (гемоглобина F) предотвращают осложнения серповидно-клеточного заболевания [1, 2]. В связи с этим представляет интерес исследовать свойства растворов фетального гемоглобина.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) используется как криопротектор при замораживании биологических систем. Также есть данные об использовании его для образования ПЭГ-гемоглобиновых конъюгатов в целях создания переносчика кислорода [3, 4]. Концентрации ПЭГ, применяемые для образования ПЭГ-гемоглобиновых конъюгатов [3-5], отличаются от тех концентраций ПЭГ-1500, которые применяются при использовании его в качестве криопротектора для биообъектов (они находятся в пределах 5-40%) [6-8].

Мы исследовали возможность выбора ПЭГ-1500 для использования в качестве криопротектора при замораживании растворов гемоглобина А (Hb A) и гемоглобина F (Hb F) (содержание оксигемоглобина в которых составляло около 90%). Эту возможность мы оценивали по светорассеянию растворов Hb A и Hb F в присутствии растворов ПЭГ-1500. Увеличение светорассеяния этих растворов означает агрегацию белка [9], что делает нежелательным использование ПЭГ-1500 в качестве криопротектора.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Hb A человека выделяли из красных кровяных клеток свежей цельной донорской крови путём трёхкратного центрифугирования при 1500 г в течение 10 мин и отмывания физиологическим раствором. Далее эритроциты гемолизовали 0.01 М Трис-HCl буфером (pH 8). Hb A отделяли от теней эритроцитов центрифугированием при 15000 г и очищали, используя гель-фильтрацию на колонке 1 см x 27 см с сефадексом G-75. Hb F человека вы-

деляли из красных кровяных клеток пуповинной крови, как описано выше для Hb А донорской крови, до стадии очищения. После отделения гемоглобина от теней эритроцитов центрифугированием при 15000 g, Hb А, содержащийся в надосадке, денатурировали 1.12 М раствором КОН и осаждали насыщенным раствором сульфата аммония. Далее Hb F очищали, как описано выше для Hb А донорской крови. В экспериментах использовали фракции с молекулярной массой 65 кДа.

Растворы ПЭГ-1500 (содержащие 0.15М NaCl) готовили концентрациями 10, 20, 30 и 40 %. В кювете содержалось 3.3 мл жидкости (в кювете с 0% ПЭГ-1500: 0.1 мл раствора белка; 0.1 мл 30% NaCl; 3.1 мл воды; в кювете с 10% раствором ПЭГ-1500: 0.1 мл раствора белка; 0.1 мл 30% NaCl; 0.775 мл 42.58% ПЭГ-1500; 2.325 мл воды; в кювете с 20% ПЭГ-1500: 0.1 мл раствора белка; 0.1 мл 30% NaCl; 1.55 мл 42.58% ПЭГ-1500; 1.55 мл воды; в кювете с 30% ПЭГ-1500: 0.1 мл раствора белка; 0.1 мл 30% NaCl; 2.325 мл 42.58% ПЭГ-1500; 0.775 мл воды; в кювете с 40% ПЭГ-1500: 0.1 мл раствора белка; 0.1 мл 30% NaCl; 3.1 мл 42,58% ПЭГ-1500). Концентрация добавляемого раствора белка в разных сериях экспериментов была в пределах  $1.0 \cdot 10^{-5} \text{M} \div 1.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ , внутри одной серии была одинаковой. Светорассеяние растворов измеряли на спектрофотометре по их мнимому поглощению при длине волны 700 нм и нормировали на величину оптической плотности при 577 нм.

Использовали сефадекс G-75 (Sigma-Aldrich, Германия); ПЭГ-1500, синтезированный в ИП-КиК НАН Украины; остальные реактивы отечественного производства марки «хч» или «чда».

Математическую обработку результатов исследования проводили, используя методы вариационной статистики. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Различие между величинами считали достоверным при величине  $p < 0.05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование показало, что светорассеяние растворов Hb А в присутствии 10-40% растворов

ПЭГ-1500 увеличивается (табл. 1). Светорассеяние растворов Hb F в 10-20% ПЭГ-1500 изменяется незначительно, а в 30-40% ПЭГ-1500 оно значительно меньше, чем светорассеяние растворов Hb А в 30-40% ПЭГ-1500. Величина мутности раствора оценивается по мнимому поглощению света препаратом в области, где специфическое поглощение отсутствует [9]. Мы измеряли мнимое поглощение растворов Hb А и Hb F в присутствии ПЭГ-1500, в этой области. Основной вклад в величину мутности белковых растворов вносят агрегаты макромолекул белковой и небелковой природы [9]. Поскольку светорассеяние растворов Hb А в 10-40% растворах ПЭГ-1500 увеличивается, а значит, происходит агрегация белка, то нежелательно использовать растворы ПЭГ-1500 этих концентраций для криоконсервирования Hb А. Возможно, в дальнейшем следует изучить криозащиту Hb F с использованием криопротектора ПЭГ-1500 концентрациями 10-20%, так как светорассеяние растворов Hb F в присутствии этих концентраций ПЭГ-1500 изменяется незначительно.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atweh G.F. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising barin sickle cell disease. / G.F. Atweh, A.N. Schechter // *Curr. Opin. Hematol.* — 2001. — Vol. 8, № 2. — P. 123-130.
2. Akinsheye I. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia / I. Akinsheye [et al.] // *Blood.* — 2011. — Vol. 118, № 1. — P. 19-27.
3. Sakai H. Polyethylene glycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state / H. Sakai [et al.] // *Bioconjug. Chem.* — 2000. — Vol. 11, № 3. — P. 425-432.
4. Ajisaka K. Modification of human hemoglobin with polyethylene glycol: a new candidate for blood substitute / K. Ajisaka, Yu. Iwashita // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 1980. — Vol. 97, № 3. — P. 1076-1081.
5. Abuchowski A. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol / A. Abuchowski [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1977. — Vol. 252, № 11. — P. 3578-3581.

Таблица 1

Светорассеяние растворов Hb А и Hb F, нормированное на величину оптической плотности при 577 нм, в присутствии ПЭГ-1500

Белок	Концентрация ПЭГ-1500, %				
	0	10	20	30	40
HbA	0.072±0.008	0.082±0.008	0.105±0.007	0.136±0.008	0.188±0.009
HbF	0.071±0.009	0.075±0.009	0.079±0.008	0.083±0.008	0.087±0.007

6. Кучеренко Ю.В. Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов, консервированных с глицерином, 1,2-пропандиолом и ПЭГ-1500 / Ю.В. Кучеренко, А.В. Зинченко, В.Д. Зинченко // Проблемы криобиологии. — 1999. — № 1. — С. 3-8.

7. Кучеренко Ю.В. Элиминация белков мембран эритроцитов человека, индуцированная ПЭГ-1500 / Ю.В. Кучеренко, Е.Д. Розанова // Проблемы криобиологии. — 1999. — № 4. — С. 21-23.

8. Леонов Б.Н. Влияние замораживания и полиэтиленгликоля молекулярной массы 600 на структуру бычьего сывороточного альбумина / Б.Н. Леонов // Проблемы криобиологии. — 1993. — № 1. — С. 27-32.

9. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия белков / А.П. Демченко. — Киев: Наукова думка, 1981. — 208 с.

*Севастопольский Государственный Университет*

*Евстигнеев М. П., доктор физико-математических наук, Заведующий кафедрой физики*

*Тел.: +7 8692 43-51-10*

*E-mail: max\_evstigneev@mail.ru*

*Sevastopol State University*

*Evstigneev M. P., Sc.D. in biophysics, Head of the Physics Department*

*E-mail: max\_evstigneev@mail.ru*

*Ph.: +7 8692 43-51-10*

*Рубакина В. А., студентка*

*Тел: +7 8692 43-51-10*

*E-mail: valenru93@mail.ru*

*Rubakina Valentina A., Student*

*Ph.: +7 8692 43-51-10*

*E-mail: valenru93@mail.ru*

*Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко, Украина*

*Тимченко Н. Н., кандидат биологических наук, Доцент кафедры технологий перерабатывающих и пищевых производств*

*Тел.: +38 099 088 12 99*

*E-mail: timchenko\_n@list.ru*

*Kharkiv Petro Vasylenko National Technical University of Agriculture, Ukraine*

*Timchenko N. N., PhD in biology, Associate Professor, Department of Processing and Food Technologies*

*Ph.: +38 099 088 12 99*

*E-mail: timchenko\_n@list.ru*