

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 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0532

Аннотация. Широкое применение методов низкотемпературного хранения биологических объектов требует изучения механизмов влияния температуры на молекулярном уровне. Исследовано влияние температуры в диапазоне $+10\div+38^\circ\text{C}$ на гемоглобин А, при этом использовали методы температурно-пертурбационной дифференциальной спектроскопии и анализа первых производных спектров поглощения. Зависимость $\Delta E/E$ от температуры для раствора гемоглобина А имеет S-образный вид. На зависимости $\Delta E/E$ от температуры для гемоглобина А наблюдаются изломы: первый в области температуры $+25\div+27^\circ\text{C}$ и второй излом в области температур $+33\div+35^\circ\text{C}$. В эксперименте, проведенном на миеломном иммуноглобулине G, получена S-образная зависимость интенсивности температурно-пертурбационных дифференциальных спектров от температуры, которая имеет изломы при $+25$ и $+35^\circ\text{C}$. Авторы данную S-образную зависимость связывают с наличием конформационного перехода в области температур $+25\div+35^\circ\text{C}$. По-видимому, можно предположить, что в молекуле гемоглобина А конформационные изменения происходят в области температур $+25\div+35^\circ\text{C}$. По данным спектроскопии конформационное состояние глбина изменяется при температурах около $+26\div+30^\circ\text{C}$. Данные наших исследований свидетельствуют о наличии конформационных перестроек в молекуле гемоглобина при $+25$ и $+35^\circ\text{C}$. Наши данные, предположительно свидетельствующие об изменении структуры гемоглобина А человека при температуре около $+25^\circ\text{C}$, вероятно, подтверждаются и другими исследованиями с помощью динамического светорассеяния, некогерентного светорассеяния, ИР-спектроскопии, исследованиями для внутриэритроцитарного гемоглобина А донорской крови 5-ти дней хранения о содержании оксигемоглобина А, согласно которому, так как уменьшение содержания оксигемоглобина А и оксигенация молекулы гемоглобина связана с её конформационным состоянием, то, возможно, при $+25^\circ\text{C}$ начинает проявляться изменение конформационного состояния молекулы гемоглобина А, которое может способствовать более выраженному уменьшению содержания оксигемоглобина А. Особенности свойства HbA, определяющие наличие специальной температуры около $+25^\circ\text{C}$ на температурных зависимостях различных параметров гемоглобина, требует дальнейшего исследования в сравнении в различных температурных интервалах.

Ключевые слова: гемоглобин, конформационные изменения, температура.

С расширением задач медицины в настоящее время гемоглобин продолжают изучать, в том числе и в медицинских биофизических исследованиях [1-3]. Основной функцией гемоглобина, входящего в состав эритроцитов, является транспорт кислорода из легких животного во внутренние органы и обратный – углекислого газа. Гемоглобин состоит из двух пар миоглобин-подобных субъединиц. Четыре субъединицы вместе образуют почти правильный тетраэдр. Молекула кислорода присоединяется к гемам, используя шестую координационную связь Fe^{2+} так-же как и в случае миоглобина. В связывании углекислого газа участвуют свободные α -аминогруппы N-концов гемоглобина [4]. Методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения идентифицировано расположение молекул воды, наиболее прочно связанных с деокси- и метформой гемоглобина [5]. Некоторое количество молекул воды локализовано в области контактов между субъединицами и образует мостиковые связи, дополнительно стабилизируя тетрамер. Много молекул воды на поверхности субъединиц зарегистрировано вблизи полярных групп субъединиц гемоглобина [6]. На картах электронной плотности гемоглобина всего зарегистрировано только 90 молекул воды. Это составляет 10% от гидратной оболочки гемоглобина. Остальная часть обладает большей подвижностью и не может быть зарегистрирована рентгеноструктурным методом. Процесс присоединения кислорода тетрамером гемоглобина носит кооперативный характер. Кооперативность в данном случае означает, что присоединение первых молекул кислорода к гемоглобину облегчает присоединение остальных молекул кислорода. Гемоглобин можно рассматривать как белок, моделирующий аллостерические свойства ферментов. В результате подведения итогов серии рентгеноструктурных исследований предложен стереохимический механизм гем-гемового взаимодействия [7]. При переходе гемоглобина из окси- в деоксиформу наиболее значительно изменяется четвертичная структура белка. Пусковым механизмом этих изменений является перемещение атома железа на 0,075 нм относительно плоскости порфиринового кольца одной из субъединиц при связывании в шестом положении Fe (II) молекулы O_2 . Fe (II) при этом переходит из высоко- в низкоспиновое состояние и располагается в плоскости гема. Атом железа, как бы “подтягивает” к гему проксимальный остаток гистидина. Это вызывает перемещение спирали к центру молекулы и вытеснение ТирС2(140) из полости между спиралями. Дальнейшие события приводят к поэтапному разрыву солевых мостиков, стабилизирующих четвертичную структуру деоксиформы гемоглобина, и переходу гемоглобина в оксиформу. Переход гемоглобина из деокси- в оксиформу сопровождается разрывом

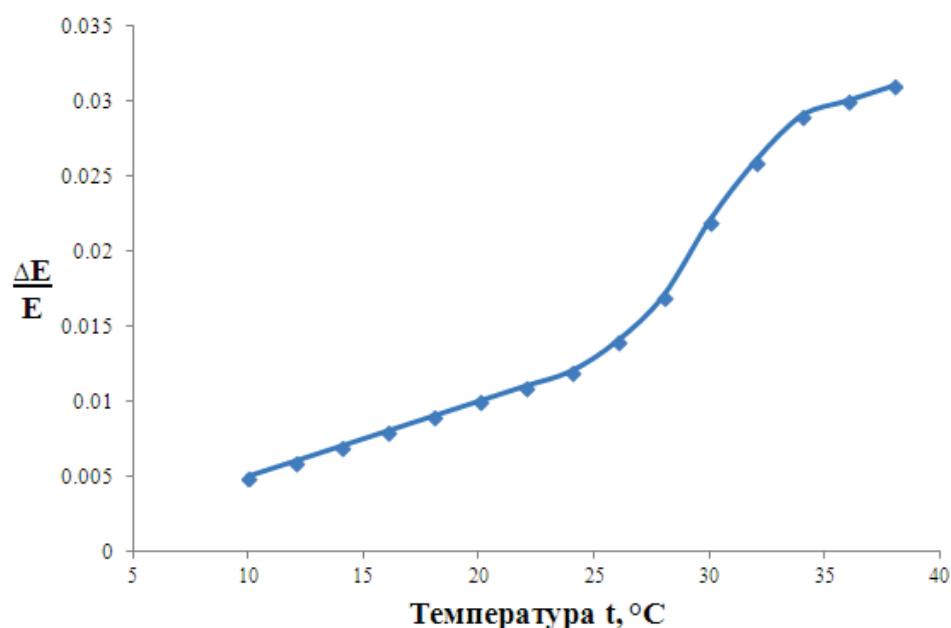


Рисунок 1. Зависимость интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров (ТПДС) при 286 нм раствора HbA (температура сравнения +10°C), пронормированной на интенсивность спектра поглощения (СП) при +10°C, от температуры

шести солевых мостиков и освобождением протонов (эффект Бора). Широкое применение методов низкотемпературного хранения биологических объектов требует изучения механизмов влияния температуры на молекулярном уровне. Исследовано влияние температуры в диапазоне +10÷+38°C на оксиформу гемоглобина А, при этом использовали методы температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа первых производных спектров поглощения. Зависимость $\Delta E/E$ от температуры для раствора гемоглобина А имеет S-образный вид (рис. 1). На зависимости $\Delta E/E$ от температуры для гемоглобина А (рис. 1) видны изломы: первый в области температуры +25÷+27°C и второй излом в области температур +33÷+35°C. В эксперименте [8], проведённом на миеломном иммуноглобулине G получена S-образная зависимость интенсивности температурно-пертурбационных дифференциальных спектров от температуры, которая имеет изломы при +25 и +35°C. Авторы [8] данную S-образную зависимость связывают с наличием конформационного перехода в области температур +25÷+35°C. По-видимому, можно предположить, что в молекуле гемоглобина А конформационные изменения происходят в области температур +25÷+35°C. По данным спектрофотометрии конформационное состояние глыбина изменяется при температурах около +26-+30°C. Для растворов гемоглобина А при +10 и +18°C структуры первых производных спектров поглощения сходны между собой (рис. 2). Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм при температуре +18°C

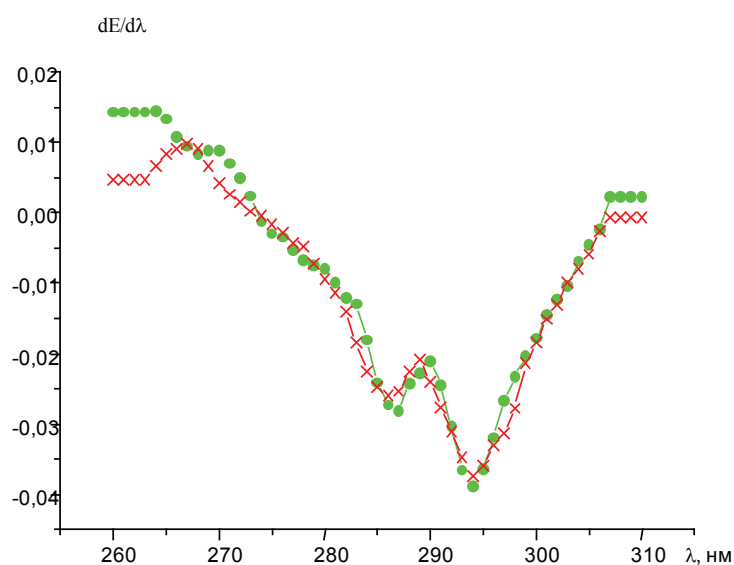


Рисунок 2. ППСП раствора HbA; • - при +10°C, × - при +18°C

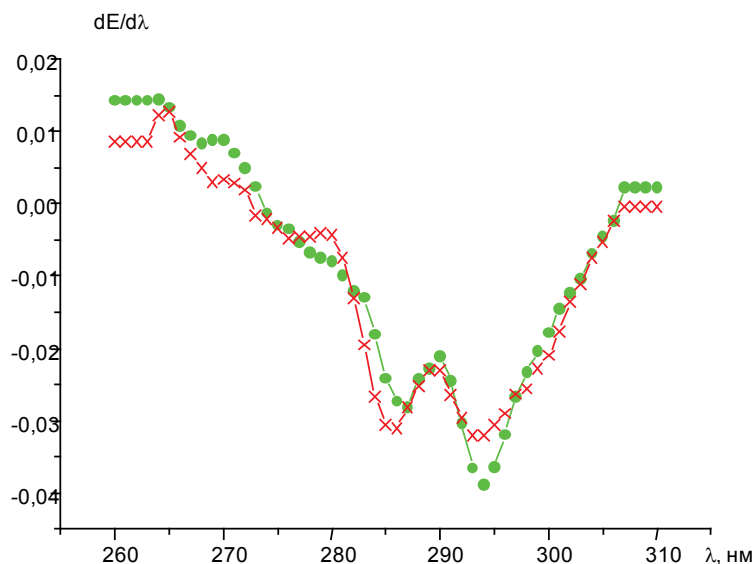


Рисунок 3. ПСП раствора HbA; • - при +10°C, x - при +36°C

практически не отличаются от соответствующих интенсивностей при температуре сравнения +10°C. Для растворов гемоглобина А при +10 С и +36°C структуры первых производных спектров поглощения отличаются между собой (рис. 3). Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм при температуре +36°C отличаются от соответствующих интенсивностей при температуре сравнения +10°C. Из данных (рис. 3) можно заключить, что, поскольку для растворов гемоглобина А на первых производных спектров поглощения изменяется интенсивность отрицательного максимума в области 284-286 нм (соответствующего суммарному поглощению полярных тирозиновых и гидрофобных триптофановых аминокислотных остатков) и отрицательного максимума в области 292 нм (соответствующего поглощению гидрофобных триптофановых аминокислотных остатков), то это свидетельствует о конформационных изменениях, происходящих в молекуле гемоглобина А. Наши данные, предположительно свидетельствующие об изменении структуры гемоглобина А человека при температуре около +25°C, вероятно, подтверждаются и другими исследованиями, согласно которым наблюдается изменение коэффициента трансляционной диффузии при +27°C и времени местожительства между прыжками в прыжковой диффузии при +26,9°C HbA человека в красных кровяных клетках, определённые с помощью метода динамического светорассеяния [9]. Согласно данным авторов, можно предположить, что до +27°C трансляционное движение больше и до +26,9°C прыжковое движение меньше, а после +27°C трансляционное движение меньше и после +26,9°C прыжковое движение больше, возможно, после +26,9°C движение более локализовано. Вероятно, на трансляционное и прыжковое движение гемоглобина человека в красных кровяных клетках может влиять пространственная организация молекул гемоглобина, способствуя им, или наоборот, мешая им. Например, более компактные молекулы могли бы двигаться более свободно, чем молекулы в более разрыхлённом состоянии, если это действительно так, то можно сделать вывод, что после +26,9÷+27°C пространственное устройство молекулы гемоглобина А изменяется. Кроме того, изменяется характер увеличения среднеквадратичного отклонения, т.е. гибкости HbA человека при +26°C, что определено авторами с помощью метода некогерентного нейтронного рассеяния [10]. Также увеличивается изменение энтальпии во время конформационных переходов, демаскирующих внутренние пептидные атомы водорода (PHs) HbA человека между температурами +10÷+30°C и +30÷+40°C в исследованиях авторов с помощью ИР-спектроскопии [11]. Наблюдается изменение аккумуляции общего глобина в синтезе гHb1.1 в *Escherichia coli*. при +24°C в исследованиях авторов [12]. Также определено изменение структуры гемоглобина земляных червей HbGr между +25°C и +38°C для pH 9,0 и 9,3 [13]. Для внутриэритроцитарного гемоглобина А донорской крови 5-ти дней хранения нами получены данные о том, что уменьшение содержания оксигемоглобина А менее выражено в интервале температур +6÷+25°C, чем в интервале температур +25÷+43°C, другими авторами получены результаты об уменьшении содержания оксигемоглобина А при +55°C по сравнению с +37°C [14]. Так как после 25°C происходит более выраженное уменьшение содержания оксигемоглобина А и оксигенация молекулы гемоглобина связана с её конформационным состоянием, то, возможно, при +25°C начинает проявляться изменение конформационного состояния молекулы гемоглобина А, которое может способствовать более выраженному уменьшению содержания оксигемоглобина А. Необходимо отметить, что исходя из данных литературы следует, что множественным набором методических способов возможно определить составляющие компоненты, характеризующие изменение конформации, которые мы определили с помощью ультрафиолетовой спектрофотометрии. Особенности свойства HbA, определяющие наличие специальной температуры около +25°C на температурных зависимостях различных параметров

гемоглобина, вероятно, связаны с электронной конфигурацией атомов, составляющих молекулу гемоглобина и с их энергией активации. Свойства гемоглобина вблизи этой температуры требуют дальнейшего исследования, возможно, в сопоставлении с изучением сродства гемоглобина к кислороду [15], в том числе и в сравнении в различных температурных интервалах.

Список литературы / References:

1. Stadler R.R., Soyka M.B. A prospective pilot study comparing nasal blood sampling and venipuncture for the assessment of hemoglobin levels and INR. *Laryngoscope*, 2017, vol. 127, no. 3, pp. 577-581.
2. Michnik A., Drzazga Z., Kluchewska A., Michalik K. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin. *Biophys. Chem.*, 2005, vol. 118, no. 2-3, pp. 93-101, doi: 10.1016/j.bpc.2005.06.012.
3. Mauer J., Peltomaki M., Poblete S., Gompper G., Fedosov D.A. Static and dynamic light scattering by red blood cells: A numerical study. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 5, e0176799, doi: 10.1371/journal.pone.0176799.
4. Rossi-Bernardi L., Roughton F.J. The specific influence of carbon dioxide and carbonate compounds on butter power and Bohr effects in human haemoglobin solutions. *J. physiol*, 1967, vol. 189, pp. 1-29.
5. Fermi G. Three-dimensional Fourier syntess of human deoxyhaemoglobin at 2,5 Å resolution: refinement of the atomic model. *J. mol. biol.*, 1975, vol. 97, pp. 237-256.
6. Takano T. Structure of myoglobin refinsd at 2,0 Å resolution. *J. mol. biol.*, 1977, vol. 110, pp. 533-584.
7. Perutz M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, 1970, vol. 228, pp. 726-739.
8. Zavialov V.P., Troitsky G.V., Demchenko O.P., Generalov I.V. Temperature and pH dependent changes of immunoglobulin G structure. *Biochim et biophys. Acta*, 1975, vol. 386, p. 155.
9. Stadler A.M., Digel I., Artmann G.M., Embs J.P., Zaccai G., Buldt G. Hemoglobin dynamics in red blood cells. Correlation to body temperature. *Biophys. J.*, 2008, vol. 95, no. 11, pp. 5449-5461.
10. 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.
11. Абатуров Л.В., Молчанова Т.П., Носова Н.Г., Шляпников С.В., Файзуллин Д.А. Конформационная динамика тетрамерной молекулы гемоглобина по данным водородного обмена. I. Влияние pH, температуры и связывания лигандов. *Молекулярная биология*, 2006, т. 40, № 2, с. 326-340. [Abaturov L.V., Molchanova T.P., Nosova N.G., Schlyapnikov S.V., Faizullin D.A. Conformational dynamics of tetramer hemoglobin molecule by hydrogen exchange data. I. Influence of pH, temperature and binding of ligands. *Molekularnaya biologiya*, 2006, vol. 40, no. 2, pp. 326-340. (In Russ.)]
12. Weickert M.J., Apostol I. High-fidelity translation of recombinant human hemoglobin in Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 1998, vol. 64, no. 5, pp. 1589-1593.
13. Santiago P.S., Moura F., Moreira L.M., Dominques M.M., Santos N.C., Tabak M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. *Biophysical journal*, 2008, vol. 94, no. 6, pp. 2228-2240.
14. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Савостин В.С. Физико-химические свойства и термостабильность молекул гемоглобина человека, модифицированного реополиглюкином и диальдегиддекстраном. *Биофизика*, 2006, т. 51, № 3, с. 430-439. [Artyuhov V.G., Putintseva O.V., Savostin V.S. Physic-chemical properties and thermostability of human hemoglobin molecule modified by reopolyglukin and dialdegiddextrane. *Biofizika*, 2006, vol. 51, no. 3, pp. 430-439. (In Russ.)]
15. Webb K.L., Dominelli P.B. Influence of high hemoglobin-oxygen affinity on human during hypoxia. *Front. Physiol*, 2022, doi: 10.3389/fphys.2021.763933.

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 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0532

Abstract. The wide application of biological objects low-temperature storage methods requires studying the temperature influence mechanisms at the molecular level. The effect of +10÷+38°C temperature range on hemoglobin A was studied using the methods of temperature-perturbation spectrophotometry and absorption spectra first derivatives analysis. The $\Delta E/E$ dependence on temperature for hemoglobin A solution is of an S-shaped form. On the $\Delta E/E$ dependence on temperature for hemoglobin A, breaks are observed: the first in +25÷+27°C temperature range and the second break in +33÷+35°C temperature range. In the experiment performed on myeloma immunoglobulin G, the S-shaped dependence of the temperature-differential spectra intensity on temperature was obtained, which has breaks at +25 and +35°C. The authors attribute this S-shaped dependence to the conformational transition presence in +25÷+35°C temperature range. Apparently, it can be assumed that in the hemoglobin A molecule, conformational changes occur in +25÷+35°C temperature range of +25÷+35°. According to spectrophotometry data, the globin conformational state changes at temperatures around +26÷+30°C. Our studies data indicate the conformational rearrangements presence in the hemoglobin molecule at 25 and 35°C. Our data, presumably indicating a change in the structure of human hemoglobin A at a temperature of about 25°C, are probably confirmed by other studies using dynamic light scattering, incoherent light scattering, IR spectroscopy, studies for intraerythrocyte hemoglobin A of donor blood 5 days of storage on oxyhemoglobin A content, according to which, since a decrease in oxyhemoglobin A content and hemoglobin molecule oxygenation is associated with its conformational state, it is possible that at 25°C a change in the hemoglobin A molecule conformational state begins to appear, which can contribute to a more pronounced decrease in oxyhemoglobin A content. The peculiar properties of HbA, which determine the presence of a special temperature of about 25°C on the various hemoglobin parameters temperature dependences, require further study in comparison in different temperature ranges.

Key words: *hemoglobin, conformational changes, temperature.*