

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ СВОБОДНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Слатинская О.В., Максимов Г.В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
ул. Ленинские горы 1 стр. 24, г. Москва, 119892, РФ; e-mail: slatolya@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. В работе рассматривается изменение конформации гемоглобина в эритроцитах и выделенного гемоглобина в условиях нормоксии и гипоксии. Диффузия молекул кислорода и оксида азота через плазматическую мембрану эритроцита зависит от упорядоченности жирнокислотных хвостов фосфолипидов плазматической мембраны и состояния цитоскелета эритроцита, а способность гемоглобина связывать и сбрасывать эти молекулы зависит от его локализации в примембранной области и цитоплазме клетки. Исследование молекулярно-клеточных свойств эритроцитов, важных для осуществления их кислород-транспортной функции возможно с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман-спектроскопия), при помощи которого возможно проводить регистрацию конформационных изменений гемоглобина эритроцитов *in vitro* и *in vivo*. В работе рассмотрены структурные изменения гема гемоглобина при взаимодействии с лигандами (O_2 или CO_2) при температурном воздействии. Использование лазера с длиной возбуждающего света 532 нм позволило изучить изменения в высокочастотной области спектра ($2800-3100\text{ см}^{-1}$), характерной для изменения симметричных колебаний молекулярных связей -С-Н- метиленовых групп аминокислот глобина, что позволит установить взаимодействия между гемовой и глобиновой частью белка внутриклеточного и свободного гемоглобина. Соотношения полос спектра комбинационного рассеяния позволяют характеризовать динамику изменений конформации гема оксигемоглобина и дезоксигемоглобина при температурном воздействии в диапазоне от 25 до 36 °С. Показано, что изменения конформации различны для молекул гемоглобина в эритроцитах и свободного гемоглобина при температурном и гипоксическом воздействии, но не коррелируют с удельной растворимостью кислорода в растворе.

Ключевые слова: гемоглобин, эритроцит, комбинационное рассеяние.

Эритроцит – высокоспециализированная клетка крови, основная функция которой – транспорт газов из легких к тканям и наоборот. Мембрана эритроцита обладает высоким запасом эластичности, содержит ряд мембраносвязанных ферментов гликолиза, ионотранспортных систем и занимает менее 1% суммарного веса клетки. Основным содержимым эритроцита является примембранный и цитоплазматический гемоглобин, которые участвуют в процессах стабилизации структуры эритроцита и обуславливают внутреннюю текучесть клетки [1, 2]. Гемоглобин (Гб) – хорошо изученный аллостерический белок класса хромопротеинов. Молекула Гб состоит из двух α (141 аминокислотный остаток) и двух β (146 аминокислотных остатков) субъединиц. Субъединицы Гб образуют $\alpha_1\beta_2$ - и $\alpha_2\beta_1$ -димеры за счет гидрофобных взаимодействий [3]. Активный центр, участвующий в связывании лигандов (O_2 , CO_2 и газы метаболического происхождения – NO, CO, H_2S), представлен гемом (протопорфирин IX Fe-комплекс), локализованным в гидрофобной области полипептидных цепей. Атом Fe^{2+} гема координационно связан с 4 атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца глобина.

В настоящее время одной из проблем биофизики клетки является детекция структурных изменений мембраны и цитоплазмы при изменении окружающих физико-химических условий среды, которые могут принимать участие в регуляции объема эритроцитов и гемодинамике в сосудах. Так, в условиях кислородного голодания (гипоксия), возникновение которого широко распространено при различных патологических состояниях, связанных с нарушением работы дыхательных и сердечно-сосудистых систем [4], снижается количество дискоцитов, меняется объем клеток, увеличивается деформируемость мембраны эритроцитов [5], а также, происходит изменение конформации молекул Гб, приводящие к снижению сродства к O_2 и отдаче O_2 тканям [6]. В настоящее время, считается, что основной причиной нарушения кислород-транспортной функции эритроцита является изменение конформации гемопорфирина гемоглобина. Известно, что у окси- и дезокси форм Гб различно распределение электронов по внешним оболочкам атома Fe^{2+} . Так, у оксиГб преобладают орбитали со спаренными электронами ($3d^6$), что энергетически выгодно при изменении длины электронных связей с последующими перестройками конформации гема и глобина [2].

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман спектроскопия, КР) хорошо зарекомендовал себя, как метод, при помощи которого возможно проводить регистрацию конформационных изменений гемоглобина эритроцитов *in vitro* и *in vivo*. При смещении области регистрации с «области отпечатков пальцев» ($1000-1700\text{ см}^{-1}$) в высокочастотную область ($2800-3100\text{ см}^{-1}$), становится возможным регистрация сигналов валентных колебаний СН-групп аминокислот гемоглобина и эритроцитарной мембраны [1]. Так, в ряде работ предлагают использовать положение пиков в области $1200-1250$ и $1500-1650\text{ см}^{-1}$ как маркеры для деформации метиновых групп и изменения размера атома Fe^{2+} , соответственно [7-9] Так же, в работах [7, 10] предлагают

Таблица 1. Полосы спектра КР гемопорфирина гемоглобина при возбуждении лазером 532 нм и соответствие полос с колебаниями связей порфирина (оГб – оксигемоглобин, дГб – дезоксигемоглобин) [7, 11-15]

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Связь	Тип симметрии колебаний	Чувствительность колебания	Форма гемоглобина
1172	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	ν_{30} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1355	C ₂ _{vinyl} H	ν_4 , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	дГб
1375	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	ν_4 , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1548-1552	C _a C _m , C _a C _m H	A _{2g}	Спиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина	дГб
1580-1588	C _a C _m , C _a C _m H	ν_{19} , A _{2g} асимметричные колебания мегтиновых мостиков между пирролами	Низкоспиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина	оГб
2850	2 ν_{28} или $\nu_3 + \nu_4$ (1357 + 1473)	A _{1g}	Симметричное растяжение СН	оГб, дГб
2930	2 ν_3	A _{1g}	Симметричное СН ₃ — растяжение. Так же, С-Н-колебания от СН боковой цепи свободной аминокислотной группы. Зависит от изменения внешнего воздействия или температуры	оГб
2940			дГб	

использовать полосы 1355 и 1375 см⁻¹ для определения окси- и дезокси-состояния гемоглобина. Так, полоса 1355 см⁻¹ характерна для оГб, а 1375 см⁻¹ для дГб. Согласно таблице 1 интенсивность указанных полос зависит от степени окисления атома Fe и наличия шестого лиганда в симметричных колебаниях пиррольных полуколец C_aC_b, C_aN, C_aNC_a в молекулах оГб и дГб соответственно.

В работе проведено исследование роли конформации глобина в формировании упорядоченности распределения гемоглобина в цитоплазме эритроцита, а также, взаимосвязь изменения конформации белковой и гемовой части гемоглобина при температурном и гипоксическом воздействии.

Исследования проводили на крови добровольцев натошак (n=10, возраст 25-45 лет), которую отирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20-50 Ед/мл крови). После забора, кровь хранили при t = + 4°C.

Форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1500 g в течении 10 минут. Плазму и лейкоцитарный слой отбрасывали, к осадку добавляли среду промывания и инкубации эритроцитов (145 mM NaCl, 5mM KCl, 1mM раствора CaCl₂, 4mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 5 mM глюкозы, pH 7, далее – буфер Аллена) в трехкратном объеме, тщательно перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R) при 1500 g в течении 5 минут при температуре +4°C. Полученный супернатант отделяли от осадка. Процедуру осаждения эритроцитов повторяли дважды при тех же условиях центрифугирования. К полученной суспензии выделенных эритроцитов добавляли буфер Аллена в трехкратном объеме и хранили при температуре +4 °C не более 3 часов.

Для выделения гемоглобина, к суспензии выделенных эритроцитов в десятикратном объеме добавляли фосфатный буфер (4mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, pH 7,4), после чего раствор тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 g в течении 10 минут при температуре +4 °C. После, супернатант отделяли от осадка и хранили при +4°C. Концентрацию выделенного гемоглобина определяли на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония).

Вытеснение кислорода из пробы с выделенными эритроцитами и пробы с выделенным гемоглобином проводили при помощи газовой смеси азота и 0.04% CO₂ (ПГС-сервис, Россия) при объеме 2 мл (Ht = 40%). Вытеснение кислорода проводилось при комнатной температуре в течении 20 минут при постоянном перемешивании пробы и скорости потока газовой смеси 0.1 л/мин (состояние гипоксии, далее – дГб). Насыщение проб кислородом (состояние нормоксии, далее – оГб) осуществляли параллельно при скорости потока воздуха

0,1 л/мин. Помещение образцов в гематокритные капилляры с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия) проводили в герметичной камере. Контроль парциального давления газовой смеси азота и кислорода осуществляли при помощи платинового электрода. После забора образца, капилляры герметично запаивались и хранились при температуре +4 °С не более 3 часов.

Исследование конформации и свойств гемоглобина проводили при помощи метода спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман-спектроскопия, далее – КР) на конфокальном микроскоп-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига 900-3200 см⁻¹ с шагом измерения 0,8 см⁻¹, регистратор – CCD детектор с пельтье охлаждением -50 °С (объектив 5х с апертурой 0,15, решетка 600 штр/мм), мощность лазера на образце 3мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15 секунд, количество накопленных сигналов – 3. Спектры КР обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров. При анализе спектра КР оценивается наличие и положение полос, связанных с образованием комплексов Гб с лигандами и окислением Fe²⁺ до Fe³⁺. Далее, анализируется соотношение интенсивностей полос спектра согласно таблицы 2.

Результаты и их обсуждение.

При вытеснении кислорода из эритроцитов и выделенного Гб, основные изменения происходят в области отпечатков пальцев, что характеризует переход Гб из расслабленной в напряженную конформацию, при которой связывание кислорода гемоглобином существенно снижается и характерно для гипоксического состояния. Однако, на разностных спектрах оГб и дГб эритроцитов и выделенного Гб (рис. 1, синяя кривая), изменении различно. Так, в области 1500-1650 см⁻¹ для выделенного Гб изменения между оГб и дГб более интенсивна, чем у Гб в эритроцитах на 14,20 ± 0,52%. В то время, как разница в области 1300–1400 см⁻¹ у выделенного Гб на 16,03 ± 0,45% выше, чем у Гб в эритроцитах, что характеризует более интенсивное насыщение выделенного Гб O₂, чем Гб в эритроцитах. Отметим, что при вытеснении кислорода, происходят изменения в высокочастотной области спектра. Вклад в высокочастотной области спектра для оГб в выделенном и эритроцитарном Гб одинаков и составляет 30% от общей интенсивности спектра. В то время, как для дГб происходит изменение вклада от общей интенсивности спектра с 60% для Гб эритроцитов до 70% для выделенного Гб. Данные различия могут указывать как на более жесткое связывание выделенного Гб с CO₂, так и существенного вклада защитных механизмов у эритроцитов в условиях гипоксии (например, фосфорилирование тирозиновых остатков белков эритроцитов [5]). Таким образом, вклад от аминокислотной части Гб возрастает в условиях гипоксии.

Состояние гипоксии характеризуется изменением способностью Гб связываться с лигандами (в данном случае, с O₂). На рисунке 2 показано, что в условиях гипоксии, конформация молекулы Гб (снижение величины соотношения I₁₃₇₅/I₁₁₇₂) меняется на 51,07 ± 0,18%. Так же, количество оГб снизилось на 50,26 ± 0,17% в эритроцитах и на 64,83 ± 0,68% для выделенного Гб. Сродство к O₂ у Гб эритроцитов снизилось на 73 ± 0,68%, у выделенного Гб на 86 ± 1,23%.

При температурном воздействии на образец, происходит изменение конформации Гб в эритроцитах в гипоксическом состоянии на 11,08 ± 0,54 %. Так же, незначительные изменения конформации гема Гб происходят у выделенного Гб в гипоксических условиях. Однако, для обоих образцов характерно увеличение количества оГб в гипоксическом состоянии на 26,73 ± 1,47 %, так же, меняется сродство к лигандам, что указывает на изменение кислород-связывающей функции. Отметим, изменения более интенсивны для молекул Гб в эритроцитах, чем для молекул выделенного Гб. Увеличение сродства к лигандам характеризует увеличение взаимодействия между молекулами Гб и O₂, снижая эффективность его отдачи, что характерно для газотранспортной функции эритроцитов. В выбранном диапазоне температур отсутствуют изменения в мембране эритроцита [18]. Таким образом, изменения, наблюдаемые при увеличении температуры обусловлены внутренними системам регуляции эритроцита.

Таблица 2. Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [7, 16-18]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1375}/I_{1172}	Групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине, зависит от белкового окружения глобина возле гемопорфирина (характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец). Изменение соотношения, может быть связано с конформационными изменениями пирролов
I_{1580}/I_{1550}	Характеризует сродство гемоглобина к O ₂ в пробе, где содержание оГб не меняется. Связано с колебанием метиновых мостиков между пирролами в молекулах Гб, где гемопорфирин растянут и деформирован, либо имеет компактную недеформированную конформацию
$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	Относительное количество комплексов оГб
I_{2930}/I_{2850}	Отношение колебаний симметричных колебаний –СН концевых метиленовых групп к несимметричным. Характеризует изменение полярности окружения

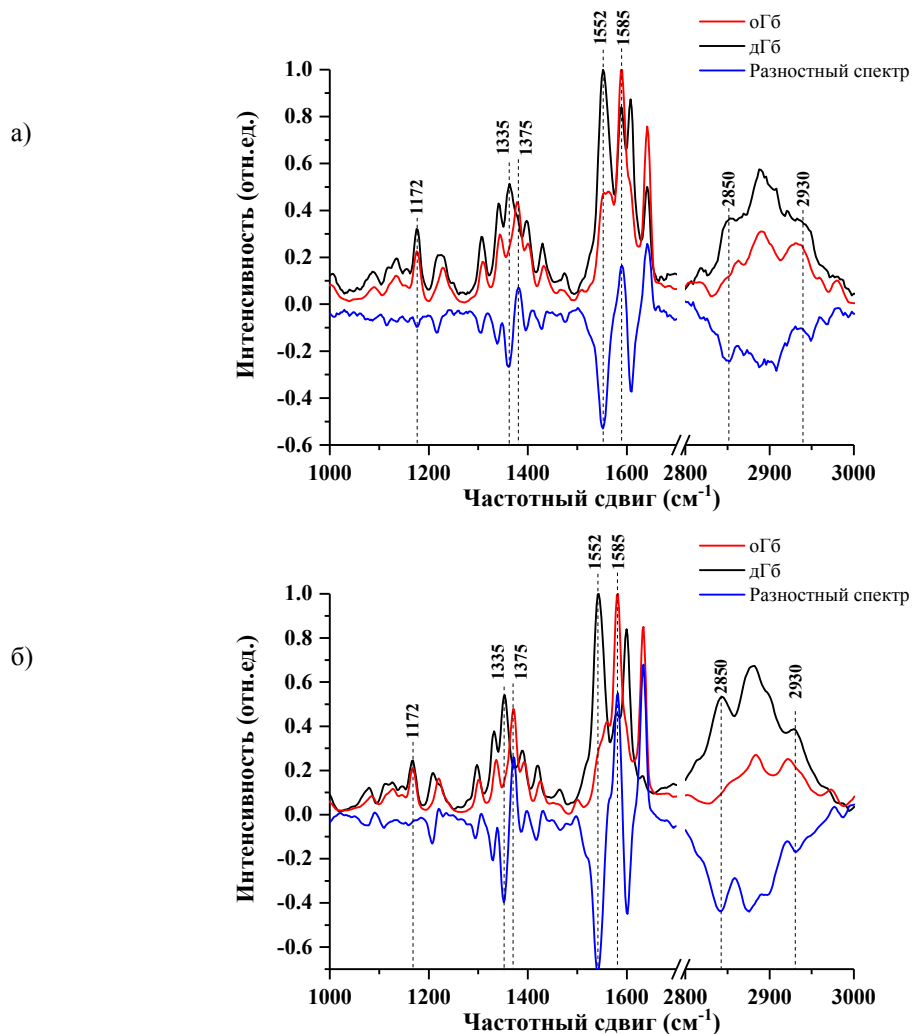


Рисунок 1. Спектры КР для оксигемоглобина (оГб) и дезоксигемоглобина (дГб) для гемоглобина в эритроцитах (а) и выделенного гемоглобина (б) в области отпечатков пальцев ($1000-1700\text{см}^{-1}$) и высокочастотной области ($2800-3000\text{ см}^{-1}$) спектра. Представленные спектры нормированы на максимум. Синим обозначен разностный спектр между оГб и дГб

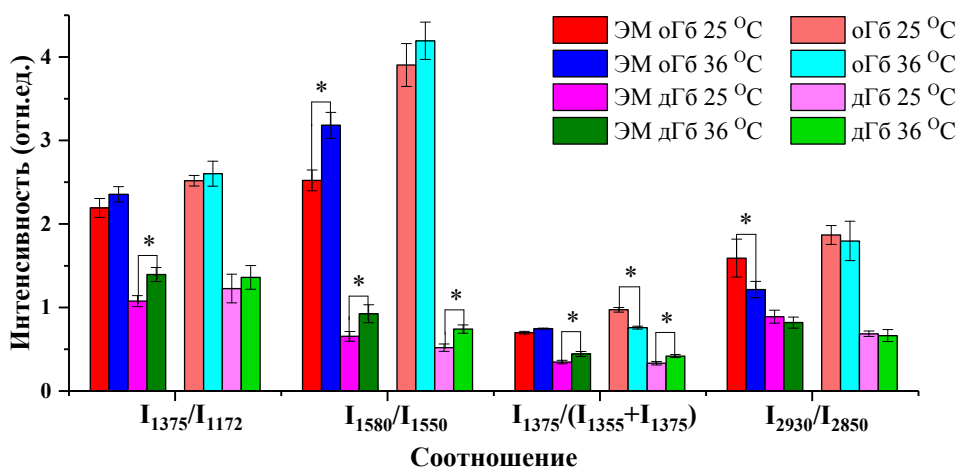


Рисунок 2. Соотношение интенсивностей полос спектра КР для оГб и дГб эритроцитов (ЭМ) и выделенного гемоглобина при комнатной (25°C) и физиологической (36°C) температуре (* – $p \leq 0.05$)

Изменения величины соотношения I_{2930}/I_{2850} свидетельствуют об изменении полярного окружения при условиях гипоксии, что может быть вызвано изменением конформации и изменением pH среды, характерной для оГб и дГб [6]. Отметим, что при увеличении температуры, величина соотношения снизилась на $23,83 \pm 0,75\%$ для молекул оГб в эритроците. Данный эффект отсутствует для других образцов при изменении образцов, что может быть связано с увеличением текучести Гб внутри эритроцитов.

Таким образом, методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что изменения симметричных колебаний молекулярных связей -СН- метиленовых групп аминокислот и пиррольных колец гема выделенного и внутриклеточного гемоглобина в диапазоне температур 20-36°C характеризуется различной динамикой при сравнении с конформационными изменениями гема, но не коррелируют с удельной растворимостью O_2 раствора при изменении температуры. Дальнейшее увеличение температуры может приводить к разрушению цитоскелета и изменению конформации Гб, связанной с олигомеризацией молекул Гб, которая также зависит от температуры инкубации эритроцитов.

По мнению авторов, изменения объема или активация рецепторов эритроцита стимулирует процессы изменения конформации в белковых молекулах как в мембране (при изменении вязкости), так и цитоплазматического гемоглобина связано с упорядоченностью гемоглобина в цитоплазме, что способствует эффективному перераспределению кислорода в эритроците.

Список литературы / References:

1. De Rosa M.C., Alinovi C.C., Galtieri A. Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: New insights in gas transport and metabolic modulation. *IUBMB Life*, 2008, vol. 60, no. 2. DOI: 10.1002/iub.15.
2. Jensen K. Roos B., Ryde U. O-binding to heme: electronic structure and spectrum of oxyheme, studied by multiconfigurational methods. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, vol. 99 no. 1. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2004.11.008
3. Hill R.J. The Structure of Human Hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1962, vol. 237, no. 5.
4. Holly D., Glenn B. Cerebral microvascular dilation during hypotension and decreased oxygen tension: a role for nNOS. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007, vol. 293, no. 4. DOI: 10.1152/ajpheart.00190.2007
5. Wei H.S., Kang H., Rasheed I.Y.D., Zhou S., Lou N., Gershteyn A., McConnel E.D., Wang Y., Richardson K.E., Palmer A.F., Xu C., Wan J., Nedergaard M. Erythrocytes are oxygen-sensing regulators of the cerebral microcirculation. *Neuron*, 2016, vol. 91. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.07.016.
6. Уразова О.И., Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В. *Патофизиология: учеб.: в 2 т. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012, 304 с. [Urazova O.I., Goldberg E.D., Novitsky V.V. Pathophysiology. M: GOATAR-Media, 2012, 304 p.]*
7. Goheen S.C., Lis L.J., Kucuk O., Westerman M.P., Kauffman J.W. Study of intact and modified erythrocyte membranes with laser Raman spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy*, 1993, vol. 24, no. 9. DOI: 10.1002/jrs.1250240908.
8. Wood B.R., McNaughton D. Micro-Raman characterization of high- and low-spin heme moieties within single living erythrocytes. *Biopolymers*, 2002, vol. 67, no. 4-5, DOI: 10.1002/bip.10120.
9. Wood B.R., Tait B., McNaughton D. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 2001, vol. 1539, no. 1-2, DOI: 10.1016/S0167-4889(01)00089-1.
10. Wood B.R., Hammer L., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte. *Vibrational Spectroscopy*, 2005 vol. 38, no. 1-2. DOI: 10.1016/j.vibspec.2005.02.016.
11. Parthasarathi N., Hansen C., Yamaguchi S., Spiro T.G. Metalloporphyrin core size resonance Raman marker bands revisited: implications for the interpretation of hemoglobin photoproduct Raman frequencies. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, vol. 109, no. 13. DOI: 10.1021/ja00247a009.
12. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancherri S., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007, vol. 387, no. 5. DOI: 10.1007/s00216-006-0881-8.
13. Nagatomo S., Nagai M., Mizutani Y., Yonetani T., Kitagawa T. Quaternary structures of intermediately ligated human hemoglobin A and influences from strong allosteric effectors: resonance Raman investigation. *Biophysical journal*, vol. 89, no. 2. DOI: 10.1529/biophysj.104.049775.
14. Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M., Budd D.L., La Mar G.N. Structural correlations and vinyl influences in resonance Raman spectra of protoheme complexes and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 1982, vol. 104, no. 16. DOI: 10.1021/ja00380a006.
15. Howell N.K., Arteaga G., Nakai S., Li-Chan E.C. Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1999, vol. 47, no. 3. DOI: 10.1021/jf981074l.
16. Camp Jr.C.H., Cicerone M.T. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. *Nature photonics*, 2015, vol. 9, no. 5. DOI: 10.1038/nphoton.2015.60.
17. Torres Filho I.P., Terner J., Pittman R.N., Proffitt E., Ward K.R. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation. *Journal of applied physiology*, 2008, vol. 104, no. 6. DOI: 10.1152/jappphysiol.00025.2008.

18. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biophysical journal*, 2009, vol. 97, no. 12. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.09.029.

19. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M., Petrucci T.C., Marchesi V.T. Spectrin involvement in a 40 C structural transition of the red blood cell membrane. *Journal of cellular biochemistry*, 1986, vol. 30, no. 4. DOI: 10.1002/jcb.240300409

EFFECTS OF TEMPERATURE ON CONFORMATIONAL DYNAMIC OF RED BLOOD CELLS AND INTACT HEMOGLOBIN

Slatinskaya O.V., Maksimov G.V.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory 1/24, Moscow, 119892, Russia; e-mail: slatolya@mail.ru

Abstract. The conformational and structure changes of heme side-chains of human hemoglobin in red blood cells and intact hemoglobin upon ligand (O_2 or CO_2) dissociation have been studied by resonance Raman spectroscopy. Resonance Raman spectra of oxygenated and deoxygenated functional red blood cells and isolate hemoglobin recorded using 532 nm laser excitation are presented. The high sensitivity of Raman spectroscopy allows to registration conformation changes of heme (protoporphyrin) and globin part of protein *in vivo* and *in vitro*. We studied the effects of temperature on conformational dynamic changes of intracellular and intact hemoglobin upon hypoxia and normoxia states. We showed modification in the hemoglobin vibration bands in the CH_2/CH_3 stretching bands in the 2800-3100 cm^{-1} region. Spectral profile in the higher spectral region have been assigned to the symmetric / asymmetric CH_2 stretch, and symmetric / asymmetric CH_3 stretch. This study provides new insights into the vibrational dynamics of heme and globin parts within functional red blood cells and solve to cooperative ligand binding mechanism of conformation changes of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin. Ratios from chosen Raman peaks were calculated and compared between the different subjects. We show that conformational and side-chains of hemoglobin in red blood cells and intact hemoglobin do not correlated with oxygen water solubility.

Key words: hemoglobin, red blood cells, Raman spectroscopy.