

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИИ ИЗМЕНЕНИЙ КОНФОРМАЦИИ ГЕМА И ГЛОБИНА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

© 2020 г. О.В. Слатинская, О.Г. Лунева, Л.И. Деев, С.Н. Орлов, Г.В. Максимов

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119892, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: gmaksimov@mail.ru, slatolya@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 31.01.2020 г.

С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния в диапазоне 1000–3000 см⁻¹ исследованы изменения конформации гема и глобина гемоглобина эритроцитов человека при различных температурах и содержании кислорода. Показано, что при гипоксии меняется конформация гемоглобина за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов, а также выявлены изменения вклада валентных симметричных и ассиметричных колебаний СН₂- и СН₃-радикалов аминокислот гистидина (2850, 2860, 2900 см⁻¹) и лизина (2880, 2860 см⁻¹). Обсуждаются механизмы связывания кислорода гемоглобином, локализованным в при- мембранной области и цитоплазме клетки.

Ключевые слова: гемоглобин, эритроцит, комбинационное рассеяние, рамановская спектроскопия, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302920020052

Известно, что одной из причин развития патологии в тканях является гипоксия, которая зависит от ряда факторов – скорости кровотока, диаметра сосудов, взаимодействия эритроцитов с клетками эндотелия, а также свойствами гемоглобина (Гб) [1]. В частности, скорость кровотока зависит от деформируемости эритроцитов и выхода аденозинтрифосфата, стимулирующего пуринергические рецепторы и каскад реакций в эндотелиальных клетках сосудов, сопровождающийся выходом вазорелаксантов [2]. Ключевым звеном регуляции внутриклеточных процессов в самом эритроците является Гб, который в комплексе с цитоплазматическим доменом белка полисы 3 фиксирует О₂ в мембране [3, 4]. Так как гемоглобин является единственным О₂-связывающим белком в эритроцитах, то обратимая ассоциация дезоксигенированного Гб с последующими звеньями внутриклеточной сигнализации может рассматриваться как механизм запуска О₂-зависимых процессов в эритроците [5]. Важно, что при гипоксии было обнаружено изменение содержания других ассоциированных с мембраной цитоплазматических белков. Возмож-

но, эти изменения лежат в основе механизма не только изменения структурной целостности мембраны, выброса аденозинтрифосфата, но и изменения упорядоченности молекул Гб в цитоплазме клетки [6, 7].

Очевидно, что для понимания развития гипоксии на клеточном уровне необходимо исследовать изменения конформации гема и глобина гемоглобина при переносе О₂ в эритроцит. Одним из методов, позволяющих оценить одновременное изменение конформации гема и структуры глобина Гб, является метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), используемый как для исследования деформации метиновых групп порфиринового макроцикла гема, так и для оценки вклада валентных колебаний СН-групп аминокислот гемоглобина и белков плазматической мембраны эритроцита (табл. 1) [8–11].

В работе исследовали изменения конформации гема и его ближайшего белкового окружения в глобине при нормобарической гипоксии и воздействии температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили раствор гемоглобина, суспензия эритроцитов и тени эритро-

Сокращения: Гб — гемоглобин, КР — комбинационное рассеяние.

Таблица 1. Полосы спектра КР гемопорфирина гемоглобина при возбуждении лазером 532 нм и соответствие полос с колебаниями связей порфирина

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Тип симметрии колебаний	Причина изменения
1172	ν_{30} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда
1375	ν_4 , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда
1548–1552	A _{2g}	Спиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина
1580–1588	ν_{19} , A _{2g} асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Низкоспиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина
2850	A _{1g}	Симметричное растяжение СН
2880	A _{1g}	Асимметричное растяжение СН
2930 (оксигемоглобин)		Симметричное СН ₃ — растяжение, также С–Н-колебания от СН-боковой цепи свободной аминокислотной группы.
2940 (дезоксигемоглобин)	A _{1g}	Зависят от изменения внешнего воздействия или температуры

Примечание. Таблица составлена на основании данных работ [11, 12–16].

цитов, выделенные из крови здоровых доноров ($n = 10$, возраст 20–40 лет). Кровь забирали натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия). В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20–50 Ед/мл крови). После забора кровь хранили при температуре 4°C. Осаждение форменных элементов крови проводили центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин при температуре 4°C на лабораторной центрифуге Laborfuge 400R (Thermo Scientific, США). Плазму и лейкоциты удаляли, осадок трехкратно отмывали буфером А следующего состава (145мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМ раствора CaCl₂, 4мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, pH 7.0). Выделенную суспензию эритроцитов ($Ht = 40\%$) хранили при температуре 4°C и использовали в течение трех часов. Для выделения гемоглобина к суспензии эритроцитов добавляли фосфатный буфер (4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, pH 7.4) в десятикратном объеме, после чего суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатант отделяли и хранили при 4°C. Концентрацию гемоглобина в растворе определяли по оптической плотности, измеренной на спектрофотометре Hitachi 557 (Hitachi, Япония) при длине волны 415 нм.

Тени эритроцитов получали трехкратной отмывкой осадка после гемолиза эритроцитов при

12000 g в течение 30 мин при температуре 4°C. Содержание теней оценивали по концентрации мембранных белков методом Лоури [17], оно составило 4.9 ± 0.4 мг/мл.

Вытеснение кислорода из суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина проводили газовой смесью, содержащей азот и 0.04% CO₂ (ООО «ПГС-сервис», Россия). Вытеснение проводили путем продувки газовой смесью через газовую фазу над пробой в течение 20 мин (скорость потока газовой смеси 0.1 л/мин [18] при постоянном перемешивании и комнатной температуре. Используемые в работе параметры вытеснения кислорода позволяют получить пробы суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина в состоянии нормобарической гипоксии, поскольку после вытеснения в пробах присутствовал главным образом дезоксигемоглобин (определяли путем регистрации и анализа спектров КР, методику см. ниже). Контрольные пробы суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина (нормоксия) были приготовлены в таких же условиях, но вместо газовой смеси без кислорода использовали воздух. Образцы помещали в стеклянные гематокритные капилляры с диаметром поперечного сечения 1 мм (ООО «Агат-Мед», Россия). Все манипуляции при заполнении капилляров осуществляли в герметичном боксе при постоянной подаче газовой смеси (азот с 0.04% CO₂). Для нормализации избыточного давления гипоксической смеси в

боксе применяли воздушный клапан с порогом срабатывания около 1 атм. Продувку предварительно помещенных в бокс гематокритных капилляров проводили в течение 2 мин. Контроль парциального давления кислорода в газовой смеси внутри бокса осуществляли при помощи электрода KE-25 (Figaro Engineering Inc., Япония). После заполнения капилляры герметично запаивались и хранились при температуре 4°C не более 3 ч.

Исследование конформации гема и глобина гемоглобина проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Спектры КР регистрировали с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в диапазоне 1000–3000 см⁻¹, с шагом измерения 0.8 см⁻¹, регистратор – CCD-детектор с пельтье-охлаждением –50°C (объектив 5× с апертурой 0.15, решетка 600 штр./мм), мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15 с, количество накопленных сигналов – 3. Изменение температуры проводили в диапазоне 22–36°C в ячейке прибора, время адаптации образца к температуре – 5 мин. Спектры КР обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corp., США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров. Лазер с длиной волны возбуждающего света 532 нм был выбран для минимизации вклада в спектр КР сигналов от липидов и белков мембраны эритроцитов [11, 16, 17].

Для оценки вклада различных групп молекулы гемоглобина использовали величины соотношений интенсивностей полос спектра КР (табл. 1) [8, 11, 18, 19]:

- I_{1375}/I_{1127} – вклад боковых –CH₃-групп колебаний полуколец пиррола в гемопорфирине, выраженных при изменении конформации глобина в непосредственной близости от гема, характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец (изменение величины соотношения характеризует изменение конформации гемоглобина из Т (дезоксигемоглобин) в R (оксигемоглобин));

- I_{1580}/I_{1550} – вклад колебаний метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине, выраженных при деформации макроцикла (характеризует сродство Гб к лигандам, в частности к кислороду);

- I_{2850}/I_{2880} – вклад симметричных колебаний к несимметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот;

- I_{2930}/I_{2850} – вклад колебаний симметричных концевых метиленовых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот

(характеризует изменение полярности окружения аминокислот).

Для регистрации ζ -потенциала суспензии эритроцитов, который характеризует изменение поверхностного заряда клетки [20], использовали Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Для этого 1 мл суспензии эритроцитов ($Ht = 40\%$) помещали в пластиковую кювету с золотыми электродами для регистрации ζ -потенциала и тщательно перемешивали во избежание образования пузырей воздуха или скопления эритроцитов в одной из частей кюветы. Измерения проводили в термостатируемой ячейке при температуре 25 и 36°C, время адаптации образца к температуре – 60 с, количество снятых измерений – 100. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в комплекте с прибором, и программу MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что спектры КР гемоглобина в растворе и в суспензии эритроцитов имеют характерные полосы в области 1000–3000 см⁻¹ (рис. 1). В отсутствие гемоглобина в спектре КР теней эритроцитов были выявлены только полосы в области 2800–3100 см⁻¹, обусловленные валентными колебаниями связей СН-групп аминокислот (рис. 1 и 2а, табл. 1) [16, 21]. Вероятно, полосы КР-спектра в области 2800–3100 см⁻¹ обусловлены валентными симметричными и ассиметричными колебаниями СН₂- и СН₃-радикалов аминокислот гистидина (2850, 2860, 2900 см⁻¹) и лизина (2880, 2860 см⁻¹) [16, 22–25].

На наш взгляд, перенос молекулы кислорода из внешней среды в эритроцит осуществляется в несколько этапов: сначала кислород проникает в липидный бислой плазматической мембраны, затем координируется в гемопорфириновом цикле дезоксигемоглобина, фиксированным в белке полосы 3, и, наконец, оксигемоглобин десорбируется с молекулой кислорода в клетку, где осуществляются белок-белковые взаимодействия, меняющие способность гема фиксировать молекулу кислорода. Таким образом, в ходе этого процесса должна сначала меняться конформация гема, а затем конформация глобина.

Для проверки данного предположения контролировали изменения конформации гема при вытеснении кислорода из среды инкубации с выделенным гемоглобином и суспензией эритроцитов, регистрируя КР-спектр в области 1000–1800 см⁻¹. Были выявлены характерные различия в изменениях амплитуды полос 1355 и 1375 см⁻¹ в

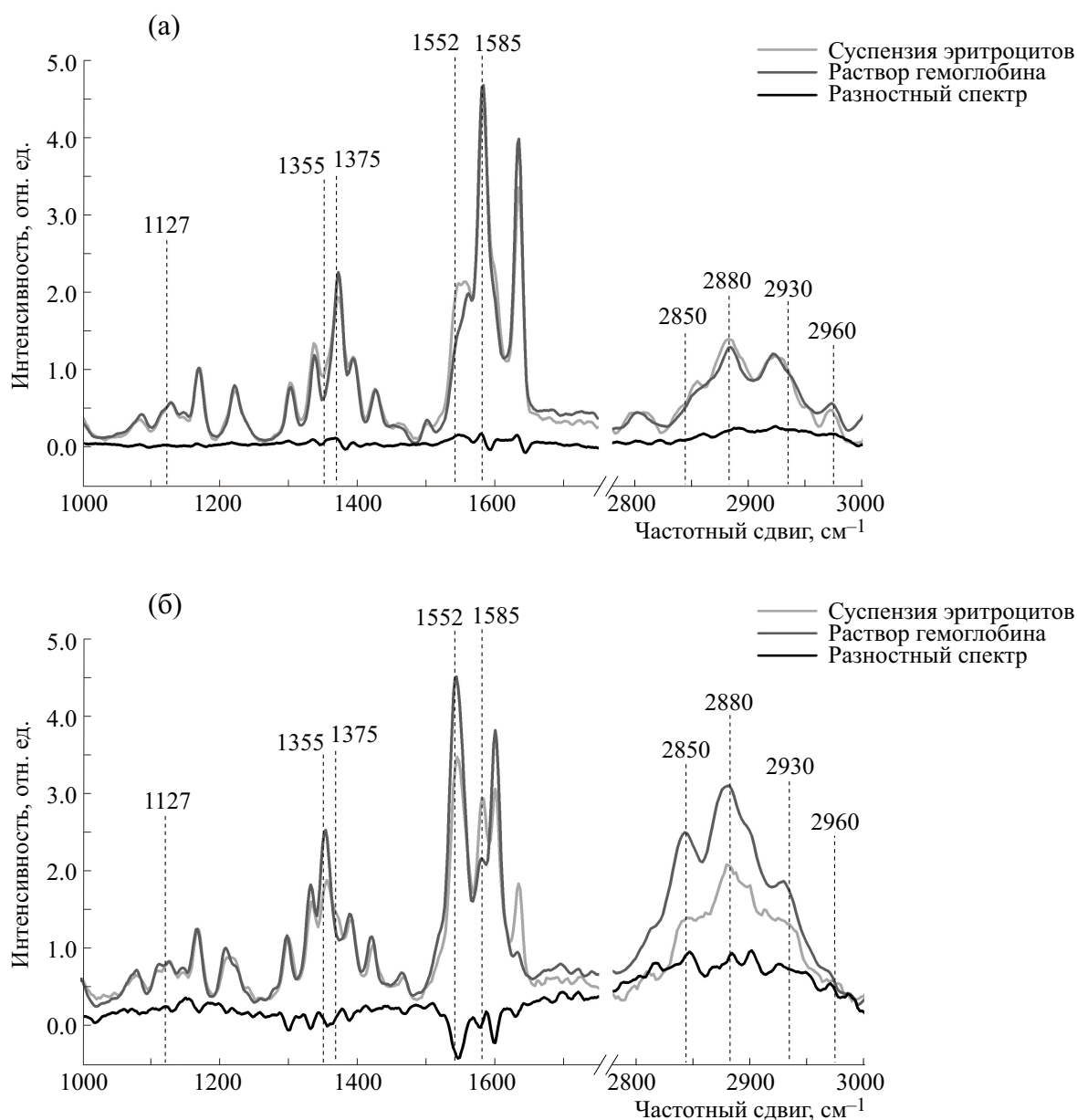


Рис. 1. Спектры КР гема и глобина в состоянии нормоксии (а) и гипоксии (б) суспензии эритроцитов и раствора Гб, область $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$. Спектры нормированы на полосу 1220 см^{-1} (в соответствии с работой [9]).

области $1300\text{--}1400\text{ см}^{-1}$, 1552 и 1580 см^{-1} – в области $1500\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ (рис. 3) [13, 22]. Так, при гипоксии изменения в области $1500\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ для выделенного Гб были более выражены, чем у Гб в эритроцитах (на $14.20 \pm 0.52\%$). В то же время в области $1300\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ у выделенного Гб интенсивность спектра КР на $16.03 \pm 0.45\%$ выше, чем у Гб в эритроцитах. Важно, что в области $1300\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ при гипоксии у Гб в клетке наблюдается сдвиг ряда полос КР-спектра, что характерно для изменения длины сопряжения двойных связей пиррольных колец гемопорфирина гема.

В области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ КР-спектра (область валентных колебаний СН-связей аминокислот глобина) были выявлены изменения вклада полос 2850 и 2880 см^{-1} , более выраженные для выделенного гемоглобина (на $13.20 \pm 0.23\%$), чем для гемоглобина в клетке [12, 21] (рис. 2 и 3; табл. 1). Известно, что при гипоксии изменения в области КР-спектра от 200 до 500 см^{-1} обусловлены связью Fe–His, что также подтверждается нашими данными по изменениям вклада гистидина в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ [25, 27]. Отметим, что при нормоксии и гипоксии полосы 2850 см^{-1} и

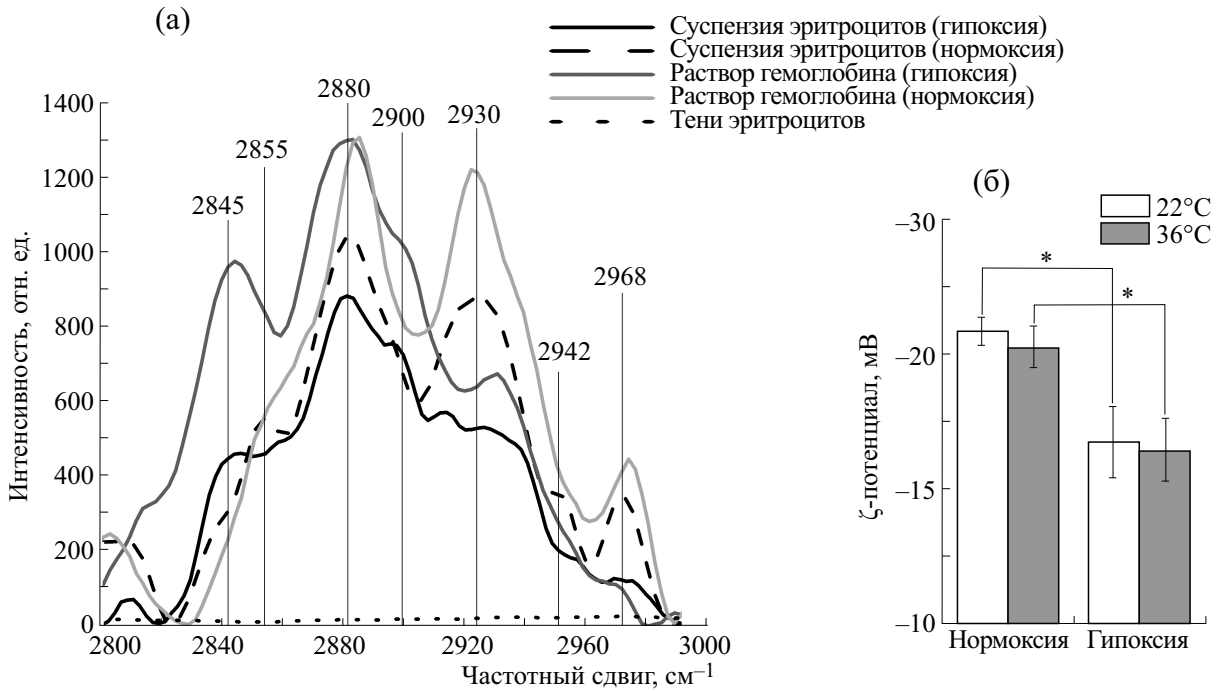


Рис. 2. (а) — Область спектра КР валентных колебаний в суспензии эритроцитов, растворе Гб и тенях эритроцитов в состоянии нормоксии и гипоксии в области $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, спектры не нормированы; (б) — ζ -потенциал мембраны эритроцита в условиях нормоксии и гипоксии (* — $p \leq 0.05$).

2930 см^{-1} выделенного Гб смещены в более высокочастотную область по сравнению с Гб в клетках, что может быть обусловлено изменением конформации глобина за счет увеличения упорядоченности расположения молекул в клетке по сравнению с раствором [21].

В данной работе изменения конформации глобина инициировали за счет увеличения температуры раствора с гемоглобином или суспензией эритроцитов. Известно, что в температурном диапазоне $22\text{--}36^\circ\text{C}$ отсутствуют фазовые переходы липидов в плазматической мембране эритроцита [15, 19]. В связи с этим возможно, что изменения спектра КР суспензии эритроцитов в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ будут связаны исключительно с изменением белков, в первую очередь гемоглобина [18, 27] (табл. 2, рис. 4). При увеличении температуры на фоне нормоксии (рис. 5) выявлены существенные различия в изменении конформации гема и глобина в зависимости от упаковки молекул Гб (суспензия эритроцитов или раствор гемоглобина): вклад пиррольных колец и винильных групп снижается в эритроците, а в глобине существенно увеличивается плотность упаковки белка и снижается полярность окружения. Так, нами показано, что увеличение температуры существенно меняет величину соотношения I_{1375}/I_{1172} КР-спектра Гб в растворе, что соответствует изменению конформации пиррольных

колец гема (снижение на $32.86 \pm 0.45\%$), которые не обнаружены в суспензии эритроцитов.

При гипоксии (снижении доли комплексов оксигемоглобина в пробе) гем меняет свою конформацию за счет вклада пиррольных колец (увеличение I_{1375}/I_{1172} , на $21.07 \pm 0.18\%$) и валентных колебаний групп винилов (увеличение I_{1580}/I_{1550} на $20.26 \pm 0.17\%$) в суспензии эритроцитов и выделенного Гб (на $17.60 \pm 0.68\%$ и $15.08 \pm 0.53\%$ соответственно). Отметим, что изменения в гемовой части Гб более выражены для суспензии эритроцитов, чем для выделенного гемоглобина, что, вероятно, свидетельствует об эффекте большей упорядоченности молекул гемоглобина в клетке, чем в растворе. Также в глобине гемоглобина клетки при гипоксии возрастает вклад полярного окружения аминокислот (увеличение соотношения I_{2930}/I_{2850}), но не меняется плотность упаковки белка (I_{2850}/I_{2880}) [11]. В аналогичных условиях у глобина выделенного Гб меняется как плотность упаковки, так и полярность окружения глобина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовали молекулярный механизм изменения конформации гема и глобина в эритроците, который чувствителен к изменениям парциального давления O_2 и определяет

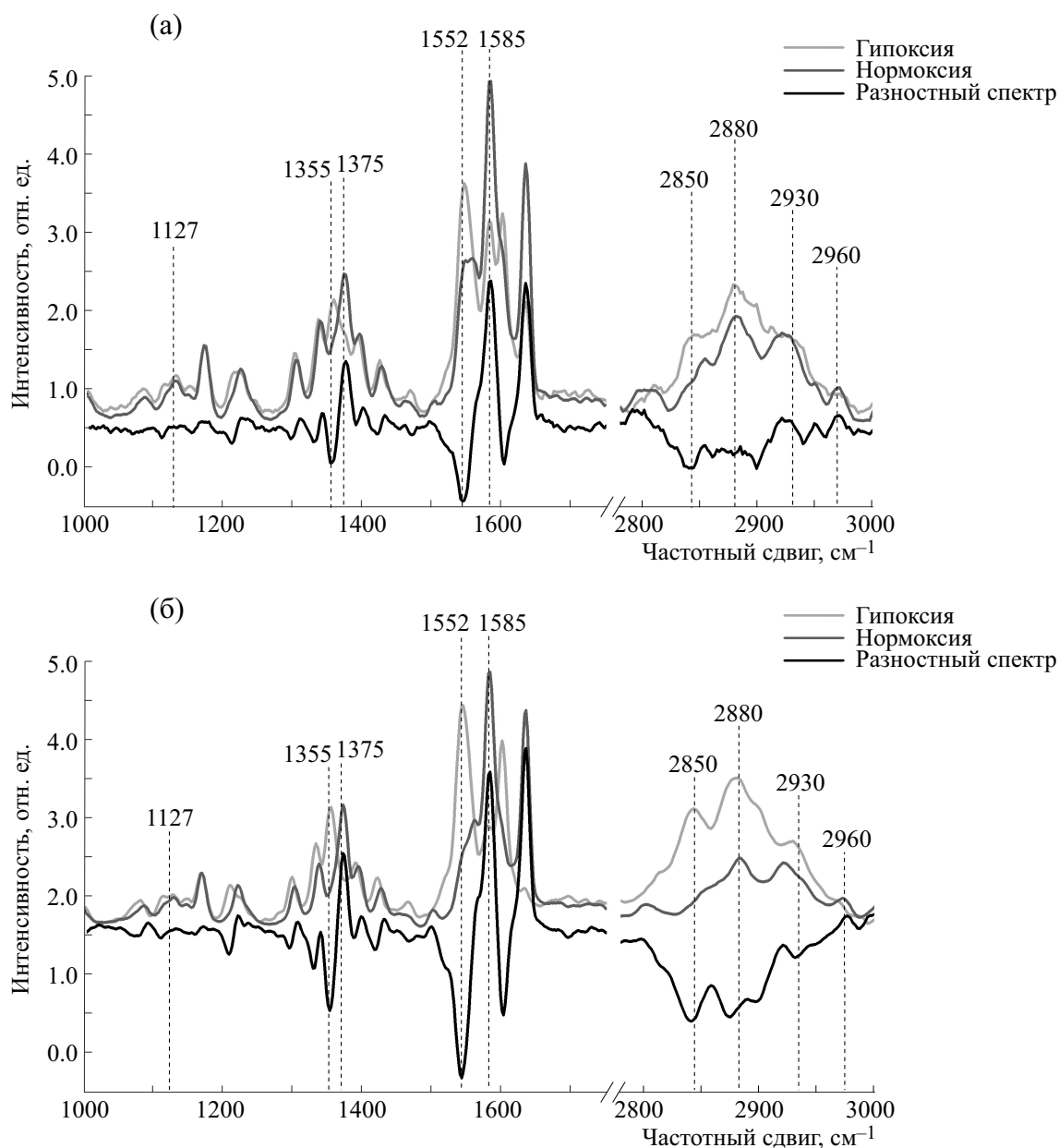


Рис. 3. Спектры КР суспензии эритроцитов (а) и раствора гемоглобина (б) в условиях нормоксии и гипоксии и их разностный спектр. Спектры нормированы на максимум полосы 1220 см^{-1} (в соответствии с работой [9]).

формирование комплекса Гб с белком полосы 3, а также олигомеризацию гемоглобина в цитоплазме. Известно, что Гб связывается с мембранами эритроцитов с большим сродством, чем оксигемоглобин, при этом N-конец белка полосы 3 локализуется в центральной полости тетрамера Гб, которая недоступна при оксигенации Гб. Известно, что NH_2 -терминальный участок белка полосы 3 имеет анионный сегмент и может входить в катионную центральную полость дезокси-гемоглобина, которая значительно сужается при связывании O_2 (это снижает сродство O_2 к Гб)

[27]. Важно, что при гипоксии (снижение числа комплексов гема с O_2) меняется конформация гемопорфирина за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов [9, 28]. Нами выявлены изменения вклада расположенных близко к гему аминокислот гистидина и лизина в глобине: смещение полосы 2930 см^{-1} до 2940 см^{-1} , вероятно, за счет изменения конформации глобина и увеличения вклада лизина [21]. Таким образом, состояние гипоксии характеризуется изменением конформации и способности гемопорфирина Гб

Таблица 2. Изменение конформации гема и глобина при различном парциальном давлении O_2

Соотношение	Температура			
	22°C		22–36°C	
	Суспензия эритроцитов	Выделенный Гб	Суспензия эритроцитов	Выделенный Гб
I_{1375}/I_{1127}	Колебания пирролов в отсутствие O_2 менее выражена	Колебания пирролов в отсутствие O_2 менее выражена	При гипоксии вклад пирролов возрастает, при нормоксии не меняется	При гипоксии вклад пирролов снижается, при гипоксии неизменно
I_{1580}/I_{1550}	Колебания винильных групп в отсутствие O_2 менее выражена	Колебания винильных групп в отсутствие O_2 менее выражена	При гипоксии вклад валентных колебаний винильных групп возрастает, при нормоксии не меняется	При гипоксии вклад валентных колебаний винильных групп не меняется, при нормоксии увеличивается
I_{2850}/I_{2880}	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот более выражен, снижается плотность упаковки белка при отсутствии O_2	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот более выражен, снижается плотность упаковки белка при отсутствии O_2	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот при дезоксигемоглобине не меняется, при оксигемоглобине снижается плотность упаковки белка	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот не меняется
I_{2930}/I_{2850}	Снижается в состоянии гипоксии	Снижается в состоянии гипоксии	Полярность окружения при нормоксии снижается, при гипоксии увеличивается	Полярность окружения не меняется

связывать O_2 . При увеличении температуры должны наблюдаться изменения конформации белков клетки, в первую очередь глобина. В клетке (но не в выделенном Гб) при изменении температуры на фоне гипоксии увеличивается вклад колебания винильных групп и пиррольных колец гема. Отметим, что зависимые от температуры изменения конформации глобина при гипоксии, вероятно, возможны за счет полярного окружения аминокислот (I_{2930}/I_{2850}) [11]. Мы связываем это с изменениями структуры белков мембраны и цитоплазмы, так как при этих температурах фазовые переходы в липидах мембраны клетки не выявлены [17]. Вероятно, при связывании кислорода изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот Гб (например, гистидина и лизина) меняют локализацию анионного сегмента белка полосы 3 вследствие изменения расположения аминокислот или увеличения плотности отрицательного заряда в центральной полости Гб.

Все это происходит в плазматической мембране эритроцита, и изменение конформации гема и глобина при связывании кислорода может отражаться на величине поверхностного заряда мембраны [20]. Действительно, ζ -потенциал в условиях нормоксии составляет -20.8 ± 0.5 мВ и 16.7 ± 1.3 мВ в условиях гипоксии (рис. 26). Таким образом, в условиях гипоксии происходит увеличение поверхностного потенциала мембраны, что может быть обусловлено взаимодействием дезоксигемоглобина с мембраной через белок полосы 3 и возможными структурными изменениями мембраны.

Другим элементом внутриклеточной сигнальной системы эритроцитов является обусловленное гипоксией изменение сродства к мембране не только Гб, но и целого ряда цитоплазматических белков [7, 18]. В зависимости от упорядоченности молекул Гб в цитоплазме по сравнению с выделенным в раствор гемоглобином меняется как конформация гема (за счет валентных колебаний

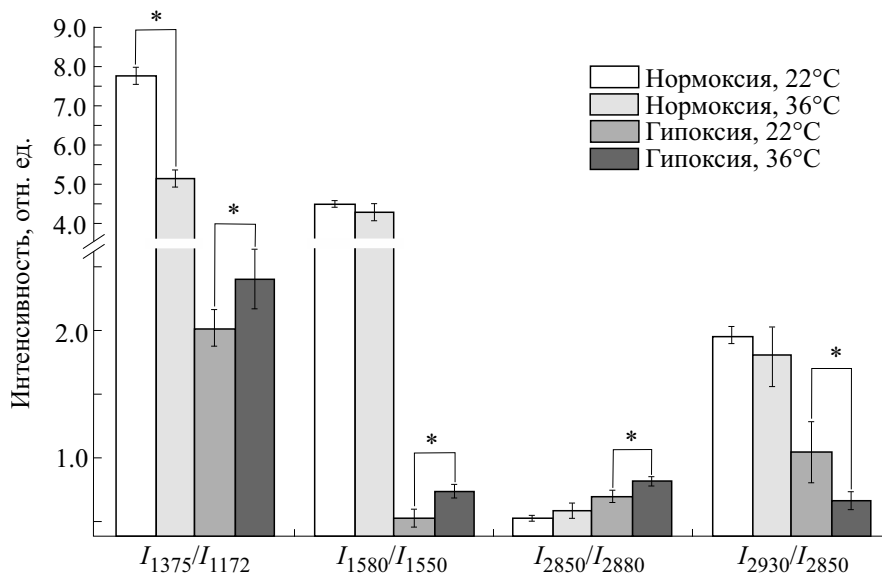


Рис. 4. Соотношения интенсивностей полос спектра КР раствора Гб при нормоксии (* – $p \leq 0.05$).

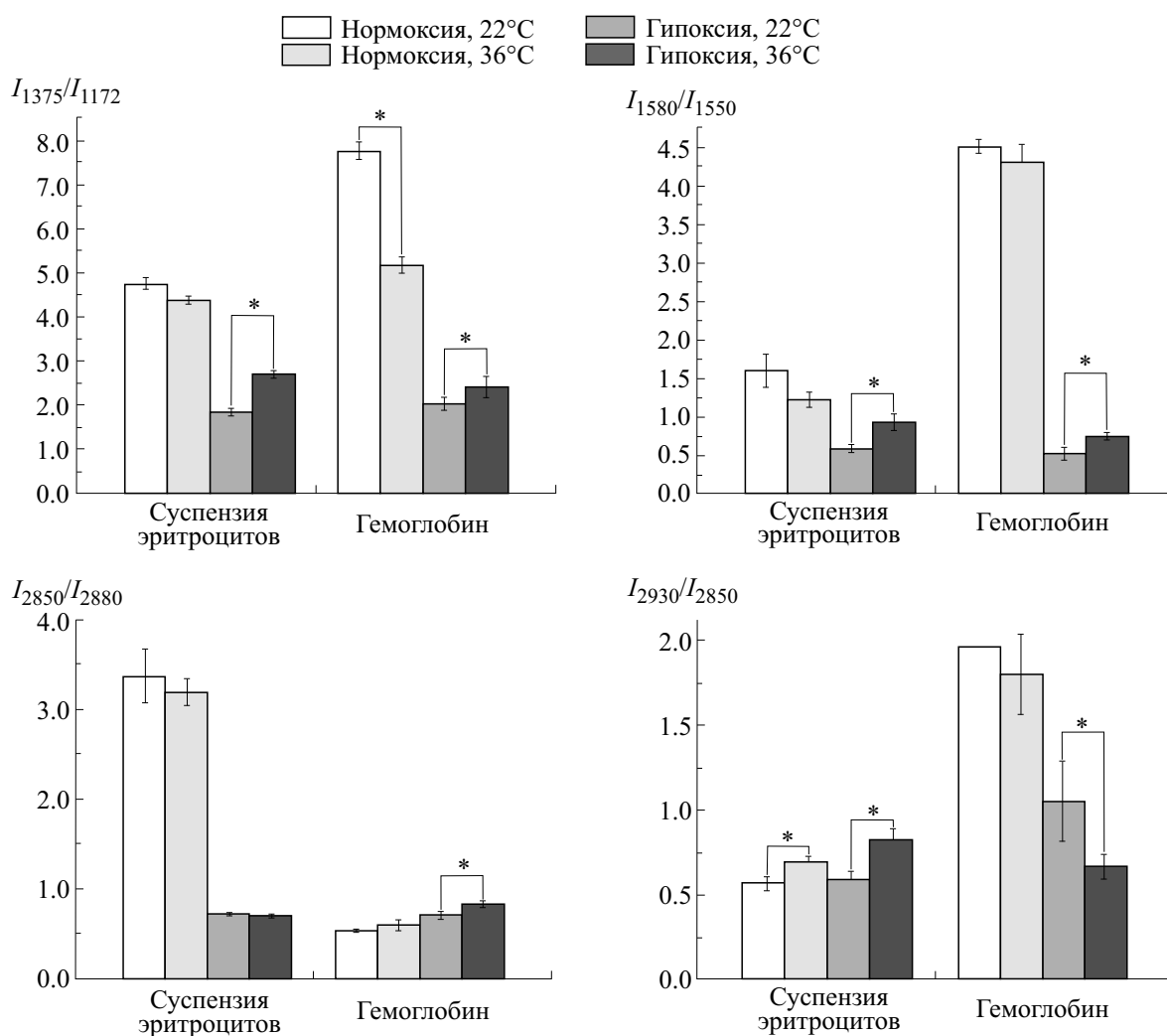


Рис. 5. Соотношения интенсивностей полос спектра КР в области гема (вверху) и глобина (снизу) для суспензии эритроцитов и раствора Гб в условиях нормоксии при температурах 22 и 36°C (* – $p \leq 0.05$). Пояснения в тексте.

пиррольных колец, связей винильных групп), так и глобина (за счет плотности его упаковки).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Holly and B. Glenn, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, 2193 (2007)
2. M. R. Hardeman, P. T. Goedhart, and S. K. Shin, in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics* (IOS Press Ebooks, 2007), pp. 242–266.
3. J. A. Walder, R. Chatterjee, T. L. Steck, et al., *J. Biol. Chem.* **259** (16), 10238 (1984).
4. R. A. Reithmeier, J. R. Casey, A. C. Kalli, et al. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1858** (7), 1507 (2016)
5. R. R. Tuck, J. D. Schmelzer, and P. A. Low, *Brain* **107** (3), 935 (1984)
6. O.G. Luneva, S. V. Sidorenko, O. O. Ponomarchuk, et al., *Cell. Physiol. Biochem.* **39** (1), 81 (2016)
7. S. V. Sidorenko, O. G. Luneva, T. S. Novozhilova, et al., *Biochemistry, Suppl. Ser. A* **12** (2), 114 (2018)
8. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., *Biophys. J.* **97** (12), 3206 (2009)
9. B. R. Wood and D. McNaughton, *Biopolymers* **67** (4–5), 1691 (2002)
10. G. V. Maksimov, N. V. Maksimova, A. A. Churin, et al., *Biochemistry (Moscow)* **66** (3), 295 (2001)
11. S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, et al., *J. Raman Spectroscopy* **24** (9), 275 (1993)
12. N. Parthasarathi, C. Hansen, S. Yamaguchi, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **109** (13), 3865 (1987)
13. B. R. Wood, P. Caspers, G. J. Puppels, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (5), 1691 (2007)
14. S. Nagatomo, M. Nagai, Y. Mizutani, et al., *Biophys. J.* **89** (2), 1203 (2005)
15. S. Choi, T. G. Spiro, K. C. Langry, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **104** (16), 4345 (1982)
16. N. K. Howell, G. Arteaga, S. Nakai, et al., *J. Agricult. Food Chem.* **47** (3), 924 (1999)
17. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
18. S. V. Sidorenko, R. H. Ziganshin, O. G. Luneva, et al., *J. Proteomics* **184**, 25 (2018)
19. I. P. Torres Filho, J. Terner, R. N. Pittman, et al., *J. Appl. Physiol.* **104** (6), 1809 (2008)
20. I. A. Tikhomirova, A. V. Murav'ev, L. A. Mikhailichenko, et al., *Human Physiol.* **32**(6), 748 (2006)
21. K. M. Marzec, D. Perez-Guaita, M. De Veij, et al., *ChemPhysChem* **15** (18), 3963 (2014)
22. B. R. Wood, L. Hammer, and D. McNaughton, *Vibrational Spectroscopy* **38** (1-2), 78 (2005)
23. J. Surmacki, R. Musial, R. Kordek, et al., *Mol. Cancer* **12** (1), 48 (2013)
24. M. Nagai, N. Mizusawa, T. Kitagawa, et al., *Biophys. Rev.* **10** (2), 271 (2018)
25. J. M. Friedman, T. W. Scott, R. A. Stepanoski, et al., *J. Biol. Chem.* **258** (17), 10564 (1983)
26. S. Nagatomo, M. Nagai, and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (26), 10101 (2011)
27. С. Н. Орлов, *Бюл. сибирской медицины* **18** (2), 234 (2019)
28. A. A. Semenova, A. P. Semenov, E. A. Gudilina, et al., *Mendelev Communications* **26** (3), 177 (2016)

Study of Conformational Changes in Heme and Globin in Temperature Variation and Normobarical Hypoxia

O.V. Slatinskaya, O.G. Luneva, L.I. Deev, S.N. Orlov, and G.V. Maksimov

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119892 Russia

Combined dynamic light scattering and Raman spectroscopy approach in the 1000–3000 cm⁻¹ spectral range was applied in the study of conformational and structure changes in the heme group and globin of the hemoglobin protein in human red blood cells at various temperatures and oxygen content. It is shown that in hypoxia, the conformation of hemoglobin changes as the contribution of the pyrrole rings of hematoporphyrin and vibrational motions of the molecules in the vinyl groups increase. Also, we revealed modification in the contribution of symmetric and asymmetric vibrations of the CH₂/CH₃ radicals of histidine (2850, 2860, 2900 cm⁻¹) and lysine (2880, 2860 cm⁻¹) amino acids. Mechanisms of binding of oxygen by hemoglobin, localized in the submembrane region and cytoplasm of cells are discussed.

Keywords: hemoglobin, red blood cells, combined dynamic light scattering, Raman spectroscopy, hypoxia