

## ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ ГЕМА И ГЛОБИНА ФРАКЦИОНИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

© 2023 г. Б.Г. Юшков\*, \*\*, М.Г. Зуев\*\*\*, С.А. Бриллиант\*, \*\*, А.А. Васин\*\*\*

\*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, ул. Первомайская, 106, Екатеринбург, 620049, Россия

\*\*ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ул. Карла Маркса, 22а, Екатеринбург, 620026, Россия

\*\*\*Институт химии твердого тела УрО РАН, ул. Первомайская, 91, Екатеринбург, 620108, Россия

E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Выявлены конформационные изменения гема и глобина фракционированных эритроцитов крыс с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света. Полученные данные показывают, что в крови крыс преобладают (более 80%) нормальные (основные) изоформы гемоглобина, которые выполняют ключевые кислородтранспортную и защитную функции. Однако наличие тяжелых (3%) и легких изоформ (11%), образующихся в результате полимеризации или деградации белка, играет важную роль в организме, поскольку они выполняют дополнительные функции, такие как участие в передаче сигналов и связывание экзогенных лигандов.

*Ключевые слова:* гемоглобины, метод спектроскопии комбинационного рассеяния света, фракционное центрифугирование.

DOI: 10.31857/S0006302923010040, EDN: NZMURQ

Гемоглобины состоят из смеси близких по структуре молекул, которые методом электрофореза на различных носителях (бумага, агар, крахмал, полиакриламид) удается разделить на фракции. Электрофоретические различия между отдельными белковыми фракциями гемоглобина определяются в первую очередь отличиями первичной структуры белковой молекулы, следовательно, фракционный состав гемоглобина находится под строгим генетическим контролем.

На данный момент описаны первичные структуры более 600 вариантов гемоглобинов различных организмов [1, 2]. Термин «вариант», а не «аномальный», является предпочтительным, поскольку большинство гемоглобинов не связано с заболеванием. В крови одного организма определяются различные типы гемоглобинов, называемых изоформами. Установлено, что у человека выделяются как минимум пять изоформ (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, HF, HP), у собаки, лошади, кошки — две, у крысы — шесть, а по некоторым данным девять, которые отличаются по своей молекулярной структуре [3, 4]. Молекулярная масса большин-

ства изоформ этого пигмента колеблется в пределах 64.5–68 кДа.

Если различия между вариантами гемоглобинов по молекулярной массе и электрофоретической активности описаны давно и хорошо известны, то насколько они отличаются по своим структурным характеристикам представляется мало изученной проблемой, что обусловлено недостатками обычно применяемых для исследования методик. Одним из современных методов характеристики структурного состояния гемоглобина может служить метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии). В основе этой методики лежит принцип идентификации колебательного состояния фотонов, что позволяет изучить характеристики молекул и структурные изменения молекулярных связей. Целью исследования являлась оценка различий структурных характеристик изоформ гемоглобина с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили крысы-самцы ( $n = 16$ , в возрасте 3–3.5 месяца) массой 250 г.

Забор крови осуществляли из хвостовой вены животных в объеме 5 мл, используя золетил-ксилазиновый наркоз. Периферическую кровь использовали для разделения эритроцитов на фракции. Для этого 5 мл цельной крови развели физиологическим раствором (ООО «Гротекс», Россия) в соотношении 1 : 1 и центрифугировали с помощью центрифуги Sigma 3R30 (Россия) в течение 5 мин (1-я проба) при 500 об/мин ( $RCF = 19.56 g$ ). Процедуру повторяли 6 раз, увеличивая время центрифугирования для каждой последующей пробы: 2-я проба – 10 мин, 3-я проба – 15 мин, 4-я – 20 мин, 5-я проба – 25 мин и 6-я проба – 30 мин. После шестого центрифугирования эритроциты в надосадочной жидкости не выявлялись [5, 6].

Изоформы гемоглобина исследовали как в эритроцитах цельной крови, так и в отдельных фракциях клеток. Для этого приготавливали гемолизат клеток, а затем проводили разгонку методом электрофореза в полиакриламидном геле (по Г. Мауреру). Для рамановской спектроскопии гемолизат после каждого центрифугирования высушивали в термостате при  $53.8^{\circ}C$  в течение суток. Оценку конформации гема и его белкового окружения в глубине осуществляли с помощью метода комбинационного рассеяния света [7–11].

Для записи спектров комбинационного рассеяния использовали конфокальный рамановский микроскоп inVia Qontor (Renishaw plc, Великобритания), оборудованный двумя полупроводниковыми твердотельными лазерами – на  $532$  нм (измеряемый диапазон частот от  $50$  до  $4000\text{ см}^{-1}$ ,  $200$  мВт) и  $785$  нм (диапазон от  $50$  до  $3500\text{ см}^{-1}$ ,  $300$  мВт) – и ICDD-детектором (оптическая чувствительность до  $1.08$  мкм), а также системой стабилизации положения лазеров и измерительной сотовой плиты.

Перед началом работы прибор был откалиброван с использованием кремниевой пластины в режиме Static при помощи лазера на  $532$  нм по положению линии Si ( $520\text{ см}^{-1}$ ). Порошкообразные образцы были горизонтально размещены на препаративном стекле, которое при закрытой шторке лазера было установлено в пазах сотовой плиты и закреплено пружинным фиксатором. Для съемки был выбран лазер на  $785$  нм. Съемку проводили в режиме Extended в диапазоне от  $100$  до  $3200\text{ см}^{-1}$  с автоматической калибровкой по центральной частоте  $750\text{ см}^{-1}$ . Для лазера  $785$  нм (режим точечной съемки – Edge) была выбрана дифракционная решетка  $1200$  штрихов/мм. При съемке было задано минимально возможное время экспозиции  $10$  с и мощность лазера  $10\%$  от максимальной. Съемку проводили в режиме на-

копления сигнала с числом шагов, равным трем за одно измерение. Для каждой точки в автоматическом режиме проводили по три измерения с временным интервалом между измерениями  $2$  с. Для каждого образца было проведено четыре независимых измерения в разных точках. Фокусировку лазерного луча на зернах и поверхностях образцов осуществляли при помощи стереоскопической системы (бинокулярные линзы) и системы регулировки положения сотовой плиты, состоящей из двух рукояток – грубой и более тонкой настройки, расположенных под сотовой плитой. Посредством инструментов, включенных в пакет программного обеспечения, обеспечивающего связь между персональным компьютером и прибором, была проведена цифровая очистка полученных спектров от фонового сигнала и шумоподавление при помощи фильтра Савицкого–Голея (фильтр 7-го порядка, длина кадров –  $24$ ).

Анализируя частоты колебаний и отношения интенсивностей линий в спектрах комбинационного рассеяния, в геме оценивали различия состояния пиррольных полуколец ( $1170\text{ см}^{-1}$ ,  $1355\text{ см}^{-1}$ ,  $1375\text{ см}^{-1}$ , отношения интенсивностей линий  $I_{1375}/I_{1172}$  и  $I_{1375}/I_{1127}$ ), метиновых мостиков между пирролами ( $1550\text{ см}^{-1}$ ,  $1580\text{ см}^{-1}$ ), винилов ( $1620\text{ см}^{-1}$ ), атомов железа ( $1567\text{ см}^{-1}$ ,  $1550\text{ см}^{-1}$ ,  $1580\text{ см}^{-1}$ ,  $1640\text{ см}^{-1}$ ,  $1355\text{ см}^{-1}$ ), ( $-C=C-$ )- и ( $-C=N-$ )-групп ( $1620\text{ см}^{-1}$ ,  $1640\text{ см}^{-1}$ ), а в глубине в валентных колебаниях аминокислот, симметричном/ассимметричном растяжении  $CH_3$ -групп, колебаниях  $CH$ -концевых метиленовых групп аминокислот ( $2850\text{ см}^{-1}$ ,  $2880\text{ см}^{-1}$ ,  $I_{2930}/I_{2850}$ ), полярном окружении аминокислот ( $2930\text{ см}^{-1}$ ,  $2940\text{ см}^{-1}$ ) и плотности упаковки белка ( $I_{2850}/I_{2880}$ ), отдельно оценивали лигандсвязывающую способность гемоглобина ( $1355\text{ см}^{-1}$ ,  $1375\text{ см}^{-1}$ ,  $1618\text{ см}^{-1}$ ,  $I_{1375}/I_{1355}$ ,  $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ ,  $I_{1618}/(I_{1355}+I_{1375})$ ,  $I_{1618}/I_{1580}$ ,  $I_{1688}/I_{1580}$ ,  $I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$ ,  $I_{1355}/I_{1550}$ ,  $I_{1375}/I_{1580}$ ,  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ ) [8, 9, 12–14].

Достоверность отличий в сравниваемых выборках оценивали с применением непараметрического (рангового)  $U$ -теста Манна–Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные данные свидетельствуют, что если в цельной крови крыс методом электрофореза в полиакриламидном геле можно выделить шесть отличающихся по электрофоретической подвижности изоформ гемоглобина, то в каждой отдельной фракции клеток всегда содержатся только две изоформы – одна более легкая, другая – тяжелая

Таблица 1. Общие характеристики гема и глобина крыс фракционированных эритроцитов

Фракции эритроцитов						
Показатели	ФЭ-1	ФЭ-2	ФЭ-3	ФЭ-4	ФЭ-5	ФЭ-6
Варианты гемоглобинов	T + T	T + Hт	Hт + Hл	Hт + Hл	Hл + Л	Л + Л
Молекулярная масса, кДа	84.84 ± 1.50 74.51 ± 0.84	83.32 ± 1.0 66.68 ± 0.83	71.89 ± 0.57 64.04 ± 1.08	73.46 ± 1.04 64.55 ± 0.46	61.70 ± 0.52 55.3 ± 0.80	59.09 ± 0.75 50.76 ± 0.82
Соотношение вариантов гемоглобинов, %	46.0% 54.0%	40.0% 60.0%	66.7% 33.3%	56.5% 43.1%	62.9% 37.1%	67.1% 32.5%
Отношения интенсивностей спектральных линий гема в интервале частот 1000–1700 см <sup>-1</sup>						
«Плоская» конформация гема, I <sub>1640</sub> /I <sub>1375</sub>	0.7719 ± 0.1582	0.5551 ± 0.1004	0.4767 ± 0.1209	0.4676 ± 0.0431	0.5634 ± 0.0433	0.8403 ± 0.1246
Нахождение гема в плоской конформации, I <sub>1640</sub> /I <sub>1127</sub>	1.1417 ± 0.2106	0.40701 ± 0.028	1.416 ± 0.1268	1.8565 ± 0.2819	1.2891 ± 0.09805	1.1622 ± 0.0474
«Скрученная» конформация гема, I <sub>1172</sub> /I <sub>1375</sub>	0.2481 ± 0.0234 b	0.40701 ± 0.028	0.2532 ± 0.0680 b	0.1748 ± 0.0420 b	0.3752 ± 0.110648	0.2529 ± 0.0542 b
Жесткость белкового окружения гема, I <sub>1170</sub> /I <sub>1127</sub>	0.2756 ± 0.0431	0.7725 ± 0.049 a	0.8029 ± 0.0672 a	0.6097 ± 0.0669 a	0.7673 ± 0.2400 c d	0.316 ± 0.1138
Интенсивность спектральных линий пиррольных колец в интервале частот 1300–1370 см <sup>-1</sup>						
Ассиметричные колебания пиррольных полуколец оксигемоглобина, 1170 см <sup>-1</sup>	1523.5 ± 169.26 b	625.25 ± 128.268 a d	864.25 ± 146.6756	656.5 ± 174.2194	2237.75 ± 699.808 b	1257.25 ± 186.764
Симметричные колебания пиррольных полуколец в молекулах дезоксигемоглобина, 1355 см <sup>-1</sup>	8360.667 ± 1073.034 b	1435.68 ± 382.79	4359 ± 2221.8	5594.6 ± 1514.803 b	5820.33 ± 873.01 b	7205.19 ± 497.9538 b
Симметричные колебания пиррольных полуколец в молекулах гемоглобина, связанного с лигандами, 1375 см <sup>-1</sup>	6420.25 ± 689.579 b	1396.333 ± 374.2523 a d f	3999.667 ± 2047.55	5025.5 ± 1827.603	4129.0 ± 1186.021 b	6604.308 ± 821.6703 b
Выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных колец, I <sub>1375</sub> /I <sub>1172</sub> – конформационные изменения пирролов	4.137624 ± 0.382869	3.979275 ± 1.503758	4.546194 ± 1.149223	7.716417 ± 2.89026	2.532694 ± 0.7819806	4.574989 ± 0.96907
Вклад боковых СН <sub>3</sub> -групп колебаний полуколец пиррола гема, I <sub>1375</sub> /I <sub>1127</sub>	1.33021 ± 0.104345 e	3.07814 ± 1.168709	1.33021 ± 0.104345 e	4.2724 ± 1.135425 a f	2.35965 ± 0.350801	1.189855 ± 0.060178 e
Колебание метиновых радикалов, I <sub>1127</sub>	4534.5 ± 928.39 b c d	808 ± 160.98 a f	1039.667 ± 227.97 a f	1107.75 ± 288.358 a f	2549.667 ± 390.4367 b c d	4927.75 ± 1040.268 b c d

Колебания метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, $I_{1550}$	10596.25 ± 2854.195 c d	1385.67 ± 320.33 a c d e f	2623 ± 767 a b e f	4185.6 ± 1024.628 a f	6181 ± 841.26 f	12603.9 ± 1316.547 b c d e
Колебания метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, $I_{1580}$	13847.75 ± 2511.795 b c d e	2343.625 ± 382.093 a f	3283.333 ± 585.0453 a f	4897.222 ± 861.4128 a f	6238.625 ± 1270.55 a f	14245.71 ± 1648.57 b c d e
Виниловая полоса – C=C–, $I_{1620}$	11015.25 ± 2201.64	1916.0 ± 493.9167 a f	2457.75 ± 645.1602 a f	3917.25 ± 1240.147 a f	6038.0 ± 650.681 a b	10669.5 ± 2095.529 b d

## Интенсивность спектральных линий железа

Маркер спинового состояния, $I_{1567}$	13379.02 ± 488.812	2324.0 ± 586.0283 a f	3334.0 ± 661.1953 a f	4718.0 ± 1449.671 a f	8005.667 ± 920.884 a c	13329.0 ± 2473.411
Спиновое состояние железа в дезокси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, $I_{1550}$	10596.25 ± 2854.195	1385.67 ± 320.33 a f	2623.0 ± 767 a f	4185.6 ± 1024.628	6181 ± 841.26 c	12603.9 ± 1316.547 b c d
Спиновое состояние железа в окси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, $I_{1580}$	13847.75 ± 2511.795	2343.625 ± 382.093 a f	3283.33 ± 585.0453 a f	4897.22 ± 861.4128	6238.625 ± 1270.55 f	14245.71 ± 1648.57 b d e
Зависимость от спинового состояния железа эквивалентное состоянию оксигенации анализируемой клетки, $I_{1640}$	5239.5 ± 1500	1111.5 ± 293.057	1486.0 ± 402.9173	2184.5 ± 714.768	2398.5 ± 678.268	5584.75 ± 1036.506
Редокс-состояние железа (Fe <sup>2+</sup> ) присутствие лиганда, $I_{1355}$ (дезоксигемоглобин)	8360.667 ± 1073.034 b	2739.25 ± 692 a f	4359 ± 2221.8	5594.6 ± 1514.803	5820.33 ± 873.01	7205.19 ± 497.9538 b
Редокс-состояние железа (Fe <sup>2+</sup> ) присутствие лиганда, $I_{1375}$ (оксигемоглобин)	6420.25 ± 689.579 b	2717.25 ± 1347.167 a	3999.667 ± 2047.555	5025.5 ± 1827.603	4129.0 ± 1186.021	6604.308 ± 821.6703 b
Колебание (–C=C–)-связей, $I_{1580}$	13847.75 ± 2511.795 b c d e	2343.625 ± 382.093 a f	3283.33 ± 585.0453 a f	4897.22 ± 861.4128 a f	6238.625 ± 1270.55 a f	14245.71 ± 1648.57 b c d e

Интенсивность спектральных линий глобина

Симметричное растяжение СН, окси- и дезоксигемоглобина, $I_{2850}$	136.25 ± 26.939	69.57 ± 17.966	113.666 ± 13.990	312.77 ± 86.580	316.125 ± 120.62	117.762 ± 33.126
Ассимметричное растяжение СН-, $I_{2880}$	218.95 ± 41.136	171.25 ± 48.370	256.16 ± 52.54	411.11 ± 82.9307	896.875 ± 340.819 f	166.53 ± 20.701 d
Симметричное СН <sub>3</sub> -растяжение (оксигемоглобин), $I_{2930}$	315.644 ± 45.848 d	324.6 ± 59.825	357.5 ± 64.03	747.22 ± 146.03	766.25 ± 57.379 f	306.862 ± 35.612 d
Симметричное СН <sub>3</sub> -растяжение (дезоксигемоглобин), $I_{2940}$	202.266 ± 42.776	251.2 ± 53.397	290.166 ± 57.351	396.22 ± 106.25	476.875 ± 79.069	205.0 ± 41.996
Колебания Н-метиновых групп аминокислот, $I_{2930}/I_{2850}$	2.693 ± 0.611	5.160 ± 0.551	4.325 ± 0.883	3.374 ± 0.76	3.976 ± 0.858	3.485 ± 0.935
Плотность упаковки, $I_{2850}/I_{2880}$	0.54 ± 0.062 b	0.295 ± 0.072	0.412 ± 0.050 b	0.750 ± 0.119 b	0.355 ± 0.043 b	0.701 ± 0.160 b
Редокс и спиновое состояние железа, наличие лиганда, NO-Гб, $I_{1618}$	12990.0 ± 1642.103	1917 ± 488.4 a f	2646.33 ± 754.33 a f	4473.4 ± 1093.019 a f	6038 ± 650.628 a b f	11610 ± 1256.17 d

Примечание. ФЭ1–ФЭ6 – фракции эритроцитов с первой по шестую; Т+Т – тяжелые варианты гемоглобина, Т+Нт – нормальные варианты + тяжелая форма, Нт+Нл – нормальные (основные) варианты гемоглобина; Нл+Л – нормальные варианты + легкая форма, Л+Л – легкие варианты гемоглобина; а – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ1 ( $p < 0.05$ ), b – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ2 ( $p < 0.05$ ), c – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ3 ( $p < 0.05$ ), d – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ4 ( $p < 0.05$ ), e – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ5 ( $p < 0.05$ ), f – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ6 ( $p < 0.05$ ).

(табл. 1). В цельной крови наибольшая доля (65%) приходится на нормальные изоформы гемоглобина с молекулярной массой 60–70 кДа (в литературе чаще указывают диапазон 64–68 кДа), 11% составляют тяжелые (более 70 кДа) и 24% – более легкие (менее 60 кДа) изоформы. Возникновение тяжелых изоформ можно связать с полимеризацией, а легких – с деградацией белка.

В полученных в процессе разделения путем центрифугирования шести фракциях клеток первая содержит исключительно тяжелые варианты гемоглобина ( $84.84 \pm 1.50$  кДа –  $74.51 \pm 0.84$  кДа), вторая – тяжелую и нормальную изоформы ( $83.32 \pm 1.0$  кДа –  $66.68 \pm 0.83$  кДа), третья и четвертая – нормальные в различных сочетаниях ( $71.89 \pm 0.57$  кДа –  $64.04 \pm 1.08$  кДа и  $73.46 \pm 1.04$  кДа –  $64.55 \pm 0.46$  кДа), пятая – нормальную и легкую ( $61.70 \pm 0.52$  кДа –  $55.3 \pm 0.80$  кДа), шестая – исключительно легкие изоформы ( $59.09 \pm 0.75$  кДа –  $50.76 \pm 0.82$  кДа).

Данные спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии)

свидетельствуют, что варианты гемоглобинов, содержащиеся в различных фракциях эритроцитов отличаются не только по молекулярной массе и электрофоретической подвижности, но и имеют ряд структурных особенностей.

Тяжелые и легкие варианты в одинаковой степени отличаются от нормальных по жесткости белкового окружения гема –  $I_{1170}/I_{1127}$  [15], колебаниям метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, –  $I_{1550}$  [16], колебаниям метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, –  $I_{1580}$  [12, 16], маркеру спинового состояния –  $I_{1567}$  [12, 16], спиновому состоянию железа в дезокси-форме, степени погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца –  $I_{1550}$  [12, 16], спиновому состоянию железа в окси-форме, степени погруженности атома железа в плоскость порфиринового

кольца —  $I_{1580}$  [12, 16], колебаниям —C=C—связей  $I_{1580}$  [14, 17], редокс- и спиновому состоянию железа, наличию лиганда NO-Гб —  $I_{1618}$  [18]. Таким образом, как увеличение, так и уменьшение молекулярной массы гемоглобина одинаково сказываются на состоянии гема (табл. 1).

Добавление к нормальному варианту гемоглобина тяжелой формы приводит к увеличению «скрученной» конформации гема  $I_{1172}/I_{1375}$  [13], к снижению (замедлению) симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах дезокси-гемоглобина —  $1355 \text{ см}^{-1}$  [8, 9] и симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах гемоглобина, связанного с лигандами, —  $1375 \text{ см}^{-1}$  [13], уменьшению колебаний метиновых радикалов —  $I_{1127}$  [19], уменьшению колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, —  $I_{1550}$  [14, 17].

Добавление к нормальному варианту гемоглобина легкой формы приводит к увеличению колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформации, —  $I_{1580}$  [12, 16]. Спиновое состояние железа в дезокси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца повышается в два раза по сравнению с нормальными (основными) изоформами.

Анализ смесей «нормальные + легкая форма» (Нл+Л) и «нормальные + тяжелая форма» (Нт+Т) (табл. 1) показывает, что наибольшие различия между ними касаются симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах оксигемоглобина —  $1170 \text{ см}^{-1}$ , симметричных колебаний пиррольных полуколец дезоксигемоглобина —  $1355 \text{ см}^{-1}$ , колебаний метиновых радикалов, колебаний метиновых мостиков, спинового состояния железа в дезокси-форме, степени погруженности атома железа в плоскости порфиринового кольца —  $I_{1580}$ , колебаний —C=C— связей, плотности упаковки, редокс и спинового состоянии железа, наличия лиганда NO-Гб —  $I_{1618}$ .

Тяжелые варианты гемоглобина (Т+Т) в сравнении с смесью «нормальные + тяжелая форма» (Нт+Т) отличаются «скрученной» конформации гема, также отмечаются различия между смесью «нормальные + тяжелая форма» (Нт+Т) и основными изоформами (Нт+Нл). Жесткость белкового окружения гема ( $I_{1170}/I_{1127}$ ) увеличивается в фракциях IF2 (Нт+Т), IF3 и IF4 (Нт+Нл) по сравнению с фракцией IF1 (Т+Т), что, вероятно, обусловлено уменьшением расстояния между ковалентно связанными атомами (табл. 1). В литера-

туре описано, что атомы, располагающиеся наиболее близко друг к другу и имеющие тесные межатомные контакты, будут являться наиболее жесткими (твердыми), что обусловлено заданными ковалентными связями и углами [15].

Легкие варианты гемоглобина (Л+Л) отличаются от смеси «нормальные + легкая форма» (Нл+Л) большим увеличением колебаний метиновых радикалов, возрастанием колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, —  $I_{1550}$ , ростом колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, —  $I_{1580}$ , изменениями виниловой полосы —  $I_{1620}$ , спинового состояния железа в дезокси-форме, ассиметричным растяжением СН- групп —  $I_{2880}$ , симметричным растяжением СН<sub>3</sub>-групп —  $I_{2930}$ , редокс- и спиновым состоянием железа, наличием лиганда NO-Гб —  $I_{1618}$  (табл. 1).

**Лиганд-связывающая способность.** Тяжелые и легкие формы обладают наиболее низкой, по сравнению с основными нормальными изоформами IF3-F4 (Нт+Нл), лиганд-связывающей способностью. В одинаковой степени снижены как относительная способность гемоглобина связывать лиганды ( $I_{1355}/I_{1550}$ ), так и его способность выделять их ( $I_{1375}/I_{1580}$ ). Наиболее зависимыми от изменений молекулярной массы гемоглобина являются такие показатели, как его сродство к лигандам и колебания метиновых мостиков в геме.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Считают, что разнообразие форм гемоглобина дает определенные преимущества организму в процессе его приспособления к условиям среды. Хорошо известно, что свободный от стромы гемоглобин очень токсичен из-за воздействия на функции почек, коагуляцию и тонус сосудов. Токсичность гемоглобина в основном обусловлена диаметрами и мономерами, вызывающими почечную недостаточность и экстравазацию гемоглобина, который связывается с NO, вызывая тяжелую гипертонию. Увеличение молекулярной массы путем полимеризации или конъюгации уменьшает экстравазацию. Также вязкость прямо пропорциональна молекулярной массе гемоглобина [20]. Оказывается, что полимеризованные гемоглобины улучшают показатели гемодинамики по сравнению с исходной молекулой 64 кДа. Внеклеточный полимерный дигемоглобин человека (130 кДа) менее токсичен для почек и обладает меньшей вазоактивностью по сравнению с гемоглобином 64 кДа [21].

На кинетику полимеризации гемоглобина серповидно-клеточной анемии влияют гемоглобин А2 и фетальный гемоглобин. Известно, что у людей сохранение экспрессии фетального гемоглобина плода во взрослом возрасте улучшает патологические эффекты серповидноклеточной анемии.

Поскольку фетальный гемоглобин при его содержании в цельной крови приблизительно 15–20% от всего белка ингибирует полимеризацию гемоглобина серповидно-клеточной анемии, а при 4–15% снижает развитие вазоокклюзионных кризов на 50%, то его повышение в крови с терапевтической целью создает условия для улучшения состояния пациентов с серповидноклеточной анемией.

Полученные данные показывают, что в крови крыс преобладают (более 80%) нормальные (основные) изоформы гемоглобина, которые выполняют ключевые кислородтранспортную и защитную функции. Однако наличие тяжелых (3%) и легких изоформ (11%), образующихся в результате полимеризации или деградации белка, играют тоже немаловажную роль в организме, поскольку выполняют дополнительные функции, такие как: участвуют в передаче сигналов, связывают экзогенные лиганды и т.д.

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света в ходе нашего исследования показано, что изоформы гемоглобина отличаются по характеристикам как гема, так и глобина, что отражается на их лиганд-связывающей способности.

Применение спектроскопии комбинационно-го рассеяния света для оценки структурно-функциональных различий изоформ гемоглобина у крыс показывает перспективность данного подхода в изучении заболеваний крови, связанных с гемоглобином, как в норме, так и при действии на организм экстремальных факторов (или при патологии).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А21-121012090091-6).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли согласно правилам, описанным Международным Советом медицинских научных обществ (СЮМС) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (Этический комитет ИИФ УрО РАН, протокол №01/20 от 8.04.2020 г.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Н. Федяшкина и Г. В. Максимов, Вестн. Мордов. универ., **3** (4), 141 (2013).
2. A. Bogdanova, L. Kaesthner, et al., Rev. Artic. Front. Physiol., **11**, 392 (2020).
3. И. К. Проскурина и А. В. Титовский, Ярослав. педагогич. вестн., **3** (21), 83 (1999).
4. M. Z. Lu, Y. J. Guo, et al., Spectroscopy and Spectral Analysis, **34** (2), 439 (2014).
5. Б. Г. Юшков и С. А. Бриллиант, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, **106** (10), 1312 (2020).
6. Б. Г. Юшков и С. А. Бриллиант, Бюл. эксперим. биологии и медицины, **173** (1), 16 (2022).
7. П. Кэри, *Применения спектроскопии КР и РКР в биохимии* («Мир», М., 1985).
8. О. В. Слатинская, О. Г. Лунева и др. Биофизика, **65** (2), 250 (2020).
9. О. В. Слатинская и Г. В. Максимов, Актуал. вопр. биологии, физики и химии, **4** (2), 283 (2019).
10. И. А. Хуторская, В. П. Балашов и др. Вестн. нов. мед. техн., **23** (3), 55 (2016).
11. K. Ramser, K. Logg, et al. J. Biomed. Opt., **9**, 593 (2004).
12. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., Biophys. J., **97** (12), 3206 (2009).
13. V. V. Revin, N. V. Gromova, et al., BioMed Res. Int., 973 (2015).
14. I. V. Syusin, V. V. Revin, et al., Biol. Med., **7**, 239 (2015).
15. H. Holtje, W. Sippl, et al., *Molecular Modeling*. Third edition (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008).
16. А. И. Юсипович, Н. А. Браже и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **155** (2), 201 (2013).
17. И. В. Сюсин, Дисс. ... канд. биол. наук (Мордов. гос. ун-т им. Н.П. Огарева, Воронеж, 2015).
18. С. С. Бочкарева, Дисс. ... канд. биол. наук (МГУ имени М.В. Ломоносова, М., 2016).
19. Э. И. Никельшпарг, Дисс. ...канд. биол. наук (МГУ имени М.В. Ломоносова, М., 2019).
20. C. R. Haney and P. W. Buehler, Adv. Drug. Deliv., **40** (3), 153 (2000).
21. V. Budhiraja and J. D. Hellums, Microvasc. Res., **64** (2), 220 (2002).

## **Study of Heme and Globin Conformation in Fractionated Rat Erythrocytes by Means of Raman Spectroscopy**

**B.G. Yushkov\*, \*\*, M.G. Zuev\*\*\*, S.A. Brilliant\*, \*\*, and A.A. Vasin\*\*\***

*\*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomayskaya ul. 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

*\*\*GAUZ SO "Institute for Medical Cell Technologies", ul. Karla Marksa 22a, Yekaterinburg, 620026 Russia*

*\*\*\*Institute of Solid State Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomayskaya ul. 91, Yekaterinburg, 620108 Russia*

Conformational changes of heme and globin in fractionated rat erythrocytes have been investigated using Raman spectroscopy. The results obtained show that normal isoforms (common variants) of hemoglobin, which plays a key role in oxygen transport and a protective role against oxidative stress, are dominant (more than 80%) in rat blood. However, heavy chain (3%) and light chain isoforms (11%) formed as a result of protein polymerization or degradation perform important roles in the body because they also function in signal transmission and binding to exogenous ligands.

*Keywords: hemoglobin, Raman spectroscopy, fractional centrifugation*