

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТЕ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

© 2021 г. О.В. Слатинская*, О.Г. Лунева*, Л.И. Деев*, П.И. Зарипов*, Г.В. Максимов*, **

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

**Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049, Москва, Ленинский просп., 4

E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2021 г.

После доработки 11.03.2021 г.

Принята к публикации 15.03.2021 г.

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния исследовали изменения конформации гема и глобина гемоглобина при варьировании pO_2 в среде инкубации эритроцитов и гемоглобина. При изменении pO_2 , в спектрах комбинационного рассеяния гемоглобина в эритроците и в растворе наблюдаются изменения ряда характерных полос как в области $1000–1700\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания гема), так и в высокочастотной области спектра ($2800–3000\text{ см}^{-1}$, валентные колебания аминокислот глобина). Установлено, что зависимость степени оксигенации гемоглобина (sO_2), рассчитанной из параметров спектра комбинационного рассеяния, характеризуется S-образной кривой только для гемоглобина в эритроците. Установлено, что различия в конформации гема при изменении pO_2 меняют его способность образовывать и комплексы с NO. При увеличении pO_2 изменения конформации гема гемоглобина в клетке сопровождаются увеличением вклада боковых $-CH_3$ -групп колебаний полуколец пиррола и групповых колебаний связей полуколец пиррола, а конформации глобина гемоглобина обусловлено увеличением вклада колебаний N-метиновых групп и симметричных концевых метиленовых групп аминокислот.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, гемоглобин, эритроцит, pO_2 .

DOI: 10.31857/S0006302921050112

Известно, что связь между pH, CO_2 и сродством гемоглобина (Гб) к O_2 в эритроците описывается эффектом Бора: снижение pH в суспензии эритроцитов приводит к уменьшению сродства Гб к кислороду и увеличению P_{50} [1, 2]. Этот эффект характеризует усиление диссоциации Гб и O_2 в эритроците при увеличении pCO_2 до 40 мм рт. ст. (смесь растворенного газа (5%), бикарбоната (H^+ и HCO_3^- , 80–90%) и карбоната гемоглобина (5–13%). Как и O_2 , CO_2 легко диффундирует через мембрану эритроцита и переводится карбоангидразой в HCO_3^- и H^+ . Образующиеся ионы H^+ могут связываться с остатками гистидина в глобине, снижая его сродство к O_2 (Т-форма). Кроме того, снижение внутриклеточного pH стимулирует синтез 2,3-дифосфоглицерата, что дополнительно уменьшает сродство Гб к O_2 . HCO_3^- , об-

разующийся при активации карбоангидразы, переносится из эритроцитов в обмен на Cl^- белком полосы 3 (БП3). Координация между активностью карбоангидразы и БП3 осуществляется в мембране эритроцита: карбоангидраза связана с С-концевым доменом БП3, который обеспечивает транспорт HCO_3^-/Cl^- . Поскольку в каждом эритроците содержится около миллиона БП3, обмен происходит быстро и завершается на 90% в течение 0.4–0.5 с [3, 4].

В капиллярах легких Т-форма Гб (без связанного O_2) характеризуется высоким сродством к O_2 и связывание O_2 с Гб (R-форма) осуществляется благодаря конформационным изменениям Гб. Об этом свидетельствует и тот факт, что глобин, у которого аланин в «гемовом кармане» заменен на аспарат, обладает более низким сродством к O_2 , так как отрицательный заряд карбоксильной группы препятствует формированию комплекса «атом железа — супероксид-анион». Анализ структуры Гб свидетельствует о том, что в процес-

Сокращения: Гб — гемоглобин, БП3 — белок полосы 3, дГб — дезоксигемоглобин, КР — комбинационное рассеяние, оГб — оксигемоглобин.

се связывания O_2 существенную роль играют факторы, обусловленные как изменением длины связей Fe–N гема, так и ограничениями локализации O_2 в участке связывания [5].

Отметим, что у позвоночных способность Гб переносить O_2 регулируется дополнительно клеточными процессами: как за счет активности переносчиков ионов (например, Na^+/H^+ -обменник), контролирующим внутриклеточный pH и объем клеток [6–9], так и за счет обратимого связывания дезоксигемоглобина (дГб) эритроцита с компонентами цитоскелета (БПЗ) [10–12]. Ранее с помощью метода комбинационного рассеяния (КР) было установлено, что изменения конформации гема и глобина как в цельной крови и выделенных эритроцитах, так и, собственно, молекул гемоглобина могут быть различными в норме и при патологии [13]. Очевидно, что изменения конформации Гб в клетке обусловлены различным pO_2 (гипоксия). Однако исследований, свидетельствующих об изменениях конформации гема и глобина непосредственно в нативном эритроците при разном парциальном давлении кислорода в среде инкубации (pO_2), явно недостаточно [4, 6, 14–17].

Задачей данной работы было исследование изменений конформации Гб (гем и глобин) в эритроците и Гб в растворе при различном pO_2 .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила кровь здоровых доноров ($n = 10$, возраст 20–40 лет), которую отбирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) и хранили при $4^\circ C$. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20–50 Ед/мл крови). Фракцию эритроцитов получали с помощью центрифугирования при $1500 g$ в течение 10 мин при $4^\circ C$ (Laborfuge 400R, Heraeus, Германия). Осадок трижды отмывали в буфере (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 4 мМ Na_2HPO_4 , 1 мМ NaN_2PO_4 , 1 мМ $MgSO_4$, 5 мМ глюкозы (Sigma, США), pH 7.4). Суспензию эритроцитов ($Ht = 40\%$) хранили при $4^\circ C$ и использовали в эксперименте в течение трех часов после выделения. Гемоглобин выделяли из эритроцитов при инкубации клеток в буфере (4 мМ Na_2HPO_4 , 1 мМ NaN_2PO_4 , pH 7.4) в соотношении 1:10 (гемолиз) с последующим удалением клеточных мембран центрифугированием в течение 10 мин при $6000 g$ и $4^\circ C$. Концентрацию гемоглобина (далее – раствор Гб) определяли спектрофотометрическим методом (длина волны 415 нм) с помощью спектрофотометра Hitachi 557 (Япония).

Изменение содержания кислорода в пробе проводили с помощью продувки газовой смесью

(смесь А: азот и 0.04% CO_2 (ООО «ПГС-сервис», Россия)) над средой инкубации с объектом исследования (объем пробы 2 мл ($Ht = 40\%$) в течение 20 мин) при постоянном перемешивании (при $18–21^\circ C$, скорость потока газовой смеси 0.1 л/мин) [17, 18]. При формировании смеси с требуемым парциальным давлением кислорода (смесь Б) внутри герметичного бокса проводили смешивание определенных долей смеси А и кислорода (pO_2 контролировали при помощи электрода KE-25 (Figaro Engineering Inc., Япония)). Все манипуляции при заполнении капилляров осуществляли в герметичном боксе при постоянной подаче газовой смеси Б с требуемым уровнем pO_2 . Для этого внутри герметичного бокса образец помещали в предварительно продутые в течение 2 мин смесью Б стеклянные капилляры (диаметр поперечного сечения 1 мм, ООО «Агат-Мед», Россия). Для нормализации избыточного давления смеси Б в боксе применяли воздушный клапан с порогом срабатывания около 1 атм. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов и Гб, приготовленные в тех же условиях, но вместо бескислородной газовой смеси А использовали воздух. После заполнения капилляры герметично запаивали и хранили при температуре $4^\circ C$ не более 3 ч.

Используемые в работе параметры вытеснения кислорода позволяют получить пробы суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина в состоянии нормобарической гипоксии, поскольку после вытеснения O_2 в пробах увеличивалась доля дГб (определяли путем регистрации и анализа спектров КР, методику см. ниже).

Исследование конформации гема и глобина гемоглобина проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Спектры КР регистрировали с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне $1000–3000\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 0.8 см^{-1} , регистратор – CCD-детектор с Пельтье-охлаждением до температуры $-50^\circ C$ (объектив $5\times$ с апертурой 0.15, решетка 600 штр/мм), мощность лазера на образце составляла не более 3 мВт, длина волны возбуждения – 532 нм, время регистрации одного спектра – 10 с, количество накоплений сигнала – 3. Количество повторов для каждого эксперимента (образец при заданном парциальном давлении кислорода) – 12. Обработка спектров включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров в программе Origin2017 (OriginLab Corp., США).

Для оценки изменений конформации гема и глобина молекулы Гб использовали величины соотношений интенсивностей характерных полос спектра КР [18–23]:

1. I_{1375}/I_{1127} — вклад колебаний боковых $-\text{CH}_3$ - групп полуколец пиррола в гемопорфирине, выраженных при изменении конформации глобина в непосредственной близости от гема; соотношение характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец (изменение величины характеризует переход конформации Гб из Т-формы (дГб) в R-форму (оксигемоглобин, оГб). Как правило, чем выше данное отношение, тем выше вероятность нахождения гема в R-форме;

2. I_{1375}/I_{1172} — вклад ассиметричных и симметричных колебаний пиррольных колец в гемопорфирине; величина отношения зависит от воздействия на гем белкового окружения глобина, а также от изменений пирролов в геме;

3. $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ — вклад связей симметричных колебаний пиррольных колец (связи CaCb, CaN и CaNca) в молекулах дГб (1355 и 1580 cm^{-1}) и Гб, связанного с лигандами (1375 cm^{-1} и 1550 cm^{-1}). Данное соотношение характеризует способность Гб выделять лиганды;

4. I_{1640}/I_{1375} — характеризует выраженность колебаний метиновых мостиков по отношению к симметричным колебаниям пиррольных колец гема;

5. I_{1580}/I_{1550} — вклад колебаний метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине, выраженных при деформации макроцикла (характеризует сродство Гб к лигандам, в частности к O_2);

6. I_{1618}/I_{1580} — вклад валентных колебаний (C_1C_2) винильных групп к CaCmH, колебаниям метиновых мостиков, характеризующие относительное число комплексов гемоглобина с NO (комплекс Гб-NO(I));

7. I_{2850}/I_{2880} — вклад симметричных колебаний метиленовых групп $-\text{CH}$ аминокислот глобина;

8. I_{2930}/I_{2850} — вклад колебаний симметричных концевых метиленовых групп аминокислот глобина;

9. I_{2880}/I_{2930} — вклад колебаний N-метиновых групп аминокислот глобина.

В качестве маркера, свидетельствующего о полном вытеснении кислорода из пробы (увеличение доли дГб), использовали эффект отсутствия в КР-спектре полосы 1375 cm^{-1} и появление полосы 1355 cm^{-1} . Степень оксигенации эритроцитов ($s\text{O}_2$) рассчитывали из спектров КР по формуле: $s\text{O}_2 = 203x - 38$, где x — величина отношения $I_{1585}/(I_{1585} + I_{1552})$ [23, 24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что при изменении $p\text{O}_2$ в спектрах КР Гб в эритроците и в растворе наблюдаются изменения ряда характерных полос как в области 1000 – 1700 cm^{-1} (валентные колебания гема), так и в высокочастотной области спектра 2800 – 3000 cm^{-1} (валентные колебания аминокислот глобина (рис. 1). При увеличении $p\text{O}_2$ (в диапазоне от 5.0 до 159.6 мм рт. ст.) в гемопорфирине Гб (как в клетке, так и в растворе) меняется амплитуда полос 1355 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} и 1640 cm^{-1} КР спектра, а также выявлено смещение полосы 1620 cm^{-1} КР-спектра к 1585 cm^{-1} . Этот результат свидетельствует об изменениях конформации гема Гб при связывании O_2 (рис. 1а) [21, 22, 25]. В аналогичных условиях эксперимента выявлены изменения интенсивности полос в высокочастотной области КР-спектра 2800 – 3000 cm^{-1} (2850 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} и 2930 cm^{-1}), свидетельствующие об изменениях конформации глобина Гб и сопровождающие связывание O_2 (рис. 1б). Установлено, что зависимость степени оксигенации Гб ($s\text{O}_2$), рассчитанной из параметров спектра КР (см. раздел «Материалы и методы»), характеризуется S-образной кривой только для гемоглобина в эритроците (рис. 1в).

Как отмечалось выше, соотношения интенсивности полос КР-спектра характеризуют вклад различных связей молекулы в изменение конформации Гб [13, 17, 19]. Из сравнения зависимости сатурации Гб O_2 от $p\text{O}_2$ в крови (рис. 2, точечная кривая [14]), с изменениями соотношения интенсивностей полос КР-спектра, характеризующими конформацию гема ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$), вклад боковых CH_3 - групп колебаний полуколец пиррола гема (I_{1375}/I_{1127}) и связей полуколец пиррола в геме (I_{1375}/I_{1172}), а также вклад валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1550}/I_{1580}) следует, что конформация гема различна в области 0 – 15 мм рт. ст. («лаг-период»), в области 15 – 60 мм рт. ст. («линейная зависимость») и в области 70 – 120 мм рт. ст. («насыщение») (рис. 2а–г).

В области «линейной зависимости» конформация гема ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$) в эритроцитах и растворе Гб различны (рис. 2а): связывание O_2 гемом Гб в растворе происходит медленнее, чем связывание O_2 Гб в эритроците. Установлено, что в аналогичных условиях (в области 25 – 120 мм рт.ст.) вклад в изменение конформации гема Гб боковых $-\text{CH}_3$ -групп колебаний полуколец пиррола гема (рис. 2б) и групповых колебаний связей

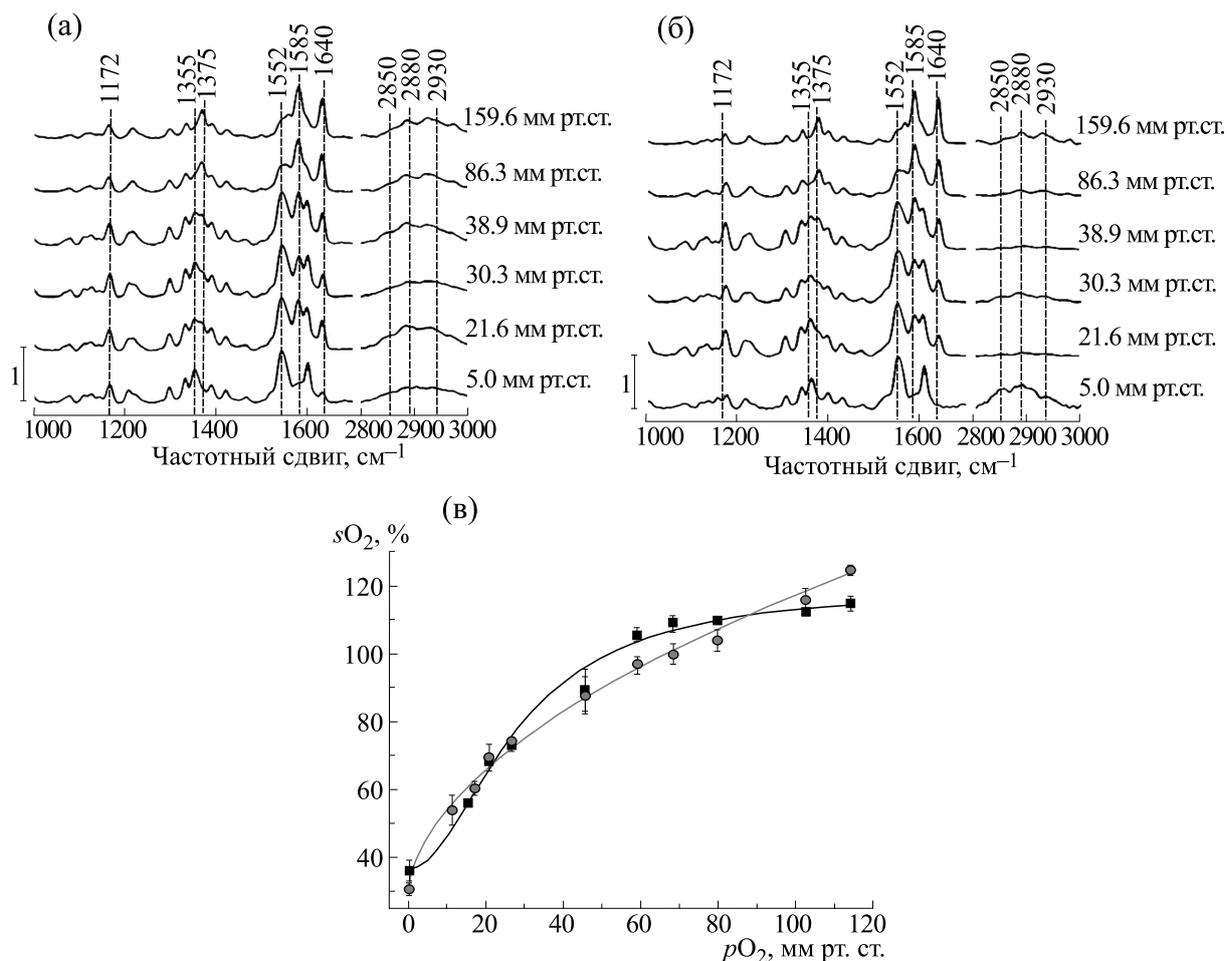


Рис. 1. Зависимости величины интенсивности КР эритроцитов (а) и раствора гемоглобина (б) от величины парциального давления кислорода (величина давления указана на рисунке в подписях к спектрам). Пики 1585 и 1640 cm^{-1} характеризуют колебания метиновых мостиков, пики 1355 и 1375 cm^{-1} – симметричные колебания пиррольных колец; пик 1172 cm^{-1} характеризует колебание метильных радикалов, пик 1172 cm^{-1} характеризует асимметричные колебания пиррольных колец. Спектры нормированы на величину максимума полос 1500–1600 cm^{-1} . (в) – Зависимость sO_2 от величины парциального давления кислорода: квадраты – суспензия эритроцитов, кружки – гемоглобин.

полуколец пиррола в геме более выражен для Гб в эритроците, чем для Гб в растворе (рис. 2в). При увеличении pO_2 до 60 мм рт. ст. вклад валентных колебаний винильных групп (I_{1550}/I_{1580}) в изменение конформации гема более выражен для Гб в клетке (рис. 2г).

В спектре КР гема выявлены полосы, изменение соотношения которых свидетельствует о различном сродстве к лигандам (в данном случае к O_2 (I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})) и сродству к NO (I_{1618}/I_{1580}). Установлено, что при увеличении pO_2 сродство Гб к лигандам и к NO меняется различно (рис. 3а,б). Так, конформация гема, характеризующая сродство к лигандам, снижается и меняется аналогично как для гема Гб в эритроците, так и для Гб в растворе (рис. 3а). Отметим, что

при увеличении pO_2 конформация гема, характеризующая сродство Гб к NO, меняется различно: уменьшается вклад колебаний (C_1C_2) винильных групп по сравнению с $CaSmH$ колебаниями метиновых мостиков (I_{1618}/I_{1580}) у Гб в клетке, и этот параметр увеличивается у Гб в растворе (рис. 3б). Этот результат свидетельствует о том, что различия в конформации гема при изменении pO_2 меняют его способность образовывать и комплексы с NO [26, 27].

В следующей серии экспериментов исследовали изменения конформации глобина (валентные колебания аминокислот глобина) при увеличении pO_2 . Регистрация КР в высокочастотной области спектра (2800–3000 cm^{-1}) свидетельствует о том, что вклад симметричных колебаний СН-ме-

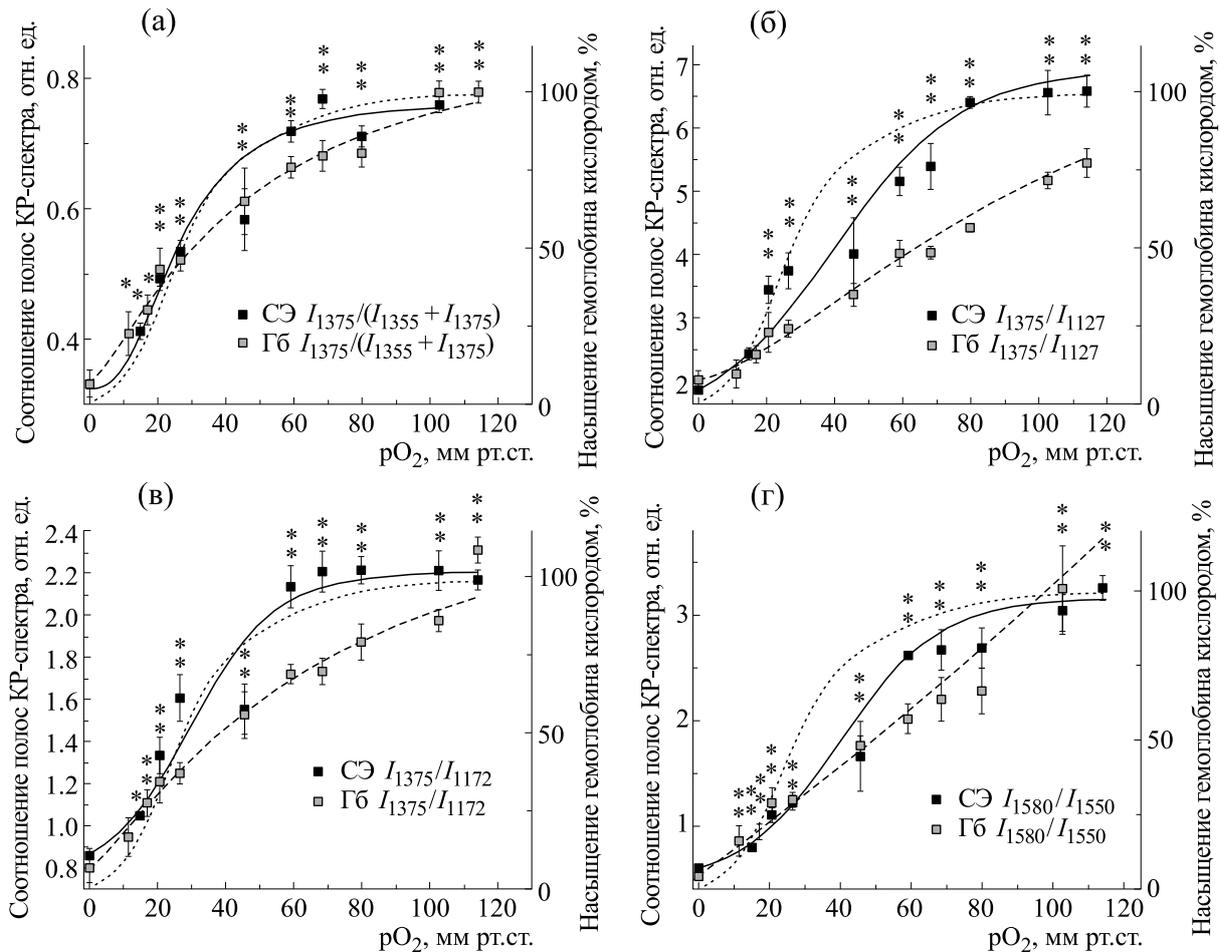


Рис. 2. Изменения величин соотношений интенсивностей полос КР-спектра в зависимости от pO_2 для суспензии эритроцитов (черные квадраты) и раствора Гб (Гб, серые квадраты): (а) — относительное число комплексов оГб, (б) — вклад боковых $-CH_3$ -групп колебаний полукольца пиррола гема, (в) — групповые колебания связей полукольца пиррола в геме, (г) — вклад валентных колебаний винильных групп гема. Точечные кривые — зависимости сатурации O_2 от pO_2 в крови [14]; * — статистически значимое различие от полностью дезоксигенированной формы Гб. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего.

тиленовых групп аминокислот (I_{2850}/I_{2880}) у Гб в эритроците не меняется и обратимо снижается у Гб в растворе, свидетельствуя, вероятно, об обратимых изменениях плотности упаковки аминокислот (рис. 3в). В аналогичных условиях вклад колебаний Н-метиновых групп аминокислот (I_{2880}/I_{2930}) Гб в растворе снижается, а в Гб эритроцитов выявлен максимум при 40–50 мм рт. ст. (рис. 3г). При увеличении pO_2 вклад симметричных концевых метиленовых групп аминокислот (I_{2930}/I_{2850}) глобина Гб в растворе не меняется, но возрастает у Гб в эритроците (рис. 3д). Возможно, в этих условиях (область «линейной зависимости») у глобина эритроцита происходит конформационный переход как за счет изменения упорядоченности, так и полярного окружения аминокислот белка (рис. 3г,д).

Итак, при изменении pO_2 конформация гема и глобина меняется различно при локализации Гб в растворе и в клетке. Известно, что у дГб двухвалентный атом железа находится в высокоспиновом, пятикоординированном состоянии и смещен от плоскости порфиринового макроцикла («куполообразная» форма). При связывании O_2 атом железа остается двухвалентным, но переходит в низкоспиновое, шестикоординированное состояние, при этом длина связи Fe–N уменьшается от 2.06 до 1.98 Å, а порфириновый макроцикл характеризуется «плоской» формой [28]. У оГб проксимальные гистидины смещены на 0.5–0.6 Å ближе к плоскостям макроцикла, чем в дГб. При потере связанного с атомом железа H_2O и восстановлении атома железа Гб до трехвалентного железа в R-форме Гб атом железа смещается от плоскости порфиринового макроцикла на

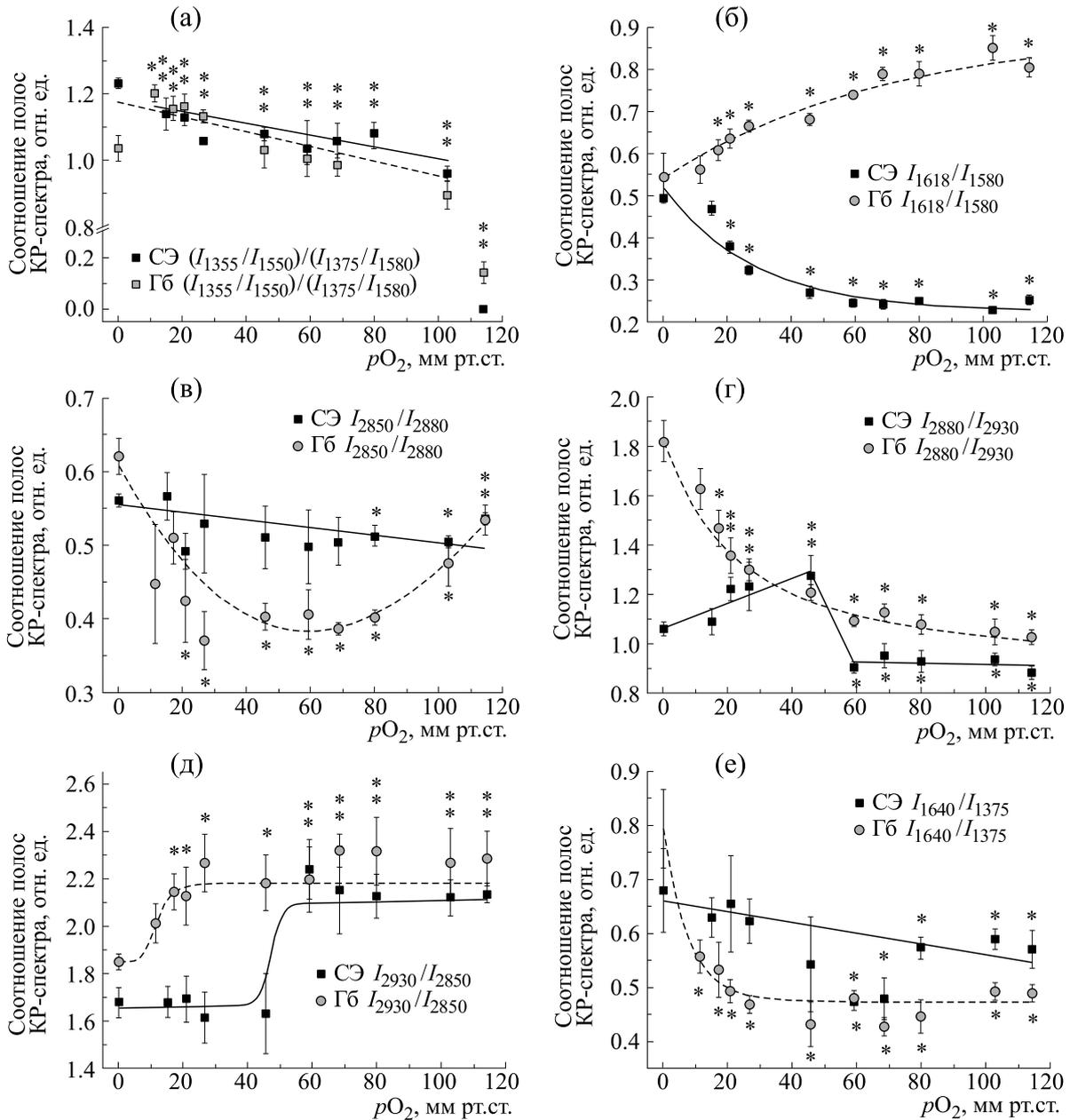


Рис. 3. (а) – Средство Гб к лигандам (в первую очередь, к O_2); (б) – относительное число комплексов гемоглобина с $NO(I)$; (в) – отношение симметричных колебаний $-CH$ метиленовых групп аминокислот к несимметричным колебаниям; (г) – вклад колебаний H метиновых групп аминокислот, определяется конформационной подвижностью; (д) – отношение вклада колебаний симметричных концевых метиленовых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот; (е) – колебания метиновых мостиков гема, соотношение интенсивности полос спектра КР I_{1640}/I_{1375} обратно пропорционально степени скручивания гема. * – Статистически значимое различие от полностью дезоксигенированной формы Гб. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего.

0.2 Å, и порфирины приобретают «куполообразную» форму. Нами установлено, что при связывании O_2 (область «линейной зависимости») конформация гема ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$) в эритроцитах и растворе Гб различны: связывание O_2 гемом Гб в растворе происходит менее выражено, чем связывание O_2 Гб в эритроците (рис. 2а). Установлено, что

вклад боковых $-CH_3$ -групп колебаний полуколец пиррола гема (рис. 2б) и групповые колебания связей полуколец пиррола в геме (рис. 2в) в изменении конформации гема Гб более выражены для Гб в эритроците, чем Гб в растворе.

Известно, что в цитохроме *c* гемы могут находиться в разных конформациях: «плоской, скру-

ченной, куполообразной, седловидной» и т.д. В цитохроме *c* «скрученная» конформация гема снижает эффективность переноса электронов [29]. Вероятно, гем находится в «скрученной» конформации, когда пиррольные кольца повернуты в разные стороны относительно оси Fe–N. Известно, что полоса 1640 см^{-1} спектра КР гема характеризует колебания метиновых мостиков гема: в «плоской» конформации вероятность колебаний метиновых мостиков велика, тогда как в «скрученной» конформации эти колебания затруднены; чем более выражен пик 1640 см^{-1} , тем в более «плоской» конформации находится гем [30]. В связи с этим соотношения интенсивности полос спектра КР I_{1640}/I_{1375} и I_{1172}/I_{1375} гема цитохрома *c* должны быть обратно пропорциональны степени «скручивания» гема и чем больше величина этих соотношений, тем в более «плоской» конформации находится гем. В наших экспериментах установлено, что при увеличении pO_2 переход от «плоской» конформации гема к «скрученной» конформации более выражен для Гб в растворе, чем для Гб в клетке (рис. 3е).

Отметим, что обнаруженные изменения конформации гема сопровождаются различиями в конформации глобина Гб как в клетке, так и в растворе. Известно, что при переходе из дГб в оГб конформационные изменения передаются глобину как за счет проксимальных гистидинов белка, так и прилегающих к ним аминокислотных остатках молекулы белка (G1-4, H18-21 и HС1-3) [31]. При связывании O_2 с атомом железа порфириновый макроцикл гема принимает плоскую форму и поворачивается по часовой стрелке на 10° , что меняет конформацию глобина за счет расположения ряда аминокислот (например, Leu FG3 и Val FG5). В Т-форме аминокислоты (например, Val) блокируют сайт связывания O_2 с атомом железа, а в R-форме это препятствие устраняется за счет сдвига спиралей D и E и сегмента CD. В Т-форме N- и C-концы глобина образуют водородные связи, а в R-форме эти водородные связи разорваны, концевые остатки более подвижны и их pK_{as} падает при увеличении pO_2 [28]. Нами установлено, что в клетке при увеличении pO_2 изменения конформации глобина Гб обусловлены увеличением вклада колебаний H-метиновых групп аминокислот (рис. 3г) и симметричных концевых метиленовых групп (рис. 3д). В растворе при увеличении pO_2 изменения конформации глобина Гб обусловлены обратимым снижением вклада симметричных колебаний СН-метиленовых групп аминокислот (рис. 3в) и колебаниями H-метиновых групп аминокислот Гб (рис. 3г).

По-видимому, конформация гема Гб, локализованного в цитоплазме (в отличие от Гб в раство-

ре), другая, что и способствует более эффективному перераспределению O_2 в «высококонтрированном гемоглобиновом окружении» в цитоплазме [33–35]. Вероятно, изменение конформации гема является важным фактором эффективного переноса O_2 как между молекулами оГб и дГб при связывании Гб с БПЗ в плазматической мембране, так и при формировании олигомерных структур («кластеров») Гб в цитоплазме клетки, способствующих изменению конформации гема дГб и «эстафетной» передаче O_2 от оГб.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90073, для С.О.В.) и Российского научного фонда (грант № 19-79-30062, для М.Г.В.), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с этическим кодексом Всемирной медицинской ассоциации для экспериментов с участием человека и одобрено этическим комитетом биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Hilpert, R. G. Fleischmann, D. Kempe, et al., *Am. J. Physiol.* **205** (2), 337 (1963).
2. M. Berenbrink, *Respiratory Physiol. Neurobiol.* **154** (1–2), 165 (2006).
3. B. F. Verigo, *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere* **51**, 321 (1892).
4. Ch. Bohr, K. Hasselbalch, and A. Krog, *Skand. Arch. Physiol.* **16**, 401 (1904).
5. M. F. Perutz, *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 327 (1979).
6. F. B. Jensen, *Acta Physiol. Scand.* **182** (3), 215 (2004).
7. M. I. Nikinmaa, *Physiol. Rev.* **72** (2), 301 (1992).
8. B. Berenbrink, M. Berenbrink, and Ch. Bridges, *J. Exp. Biol.* **192** (1), 253 (1994).
9. M. Berenbrink, P. Koldkjær, O. Kepp, et al., *Science* **307** (5716), 1752 (2005).
10. R. Motais, F. Garcia-Romeu, and F. Borgese, *J. Gen. Physiol.* **90** (2), 197 (1987).

11. P. Giardina, V. Aurilia, R. Cannio, et al., *Eur. J. Biochem.* **235** (3), 508 (1996).
12. N. Barvitenko, N. Adragna, and R. Weber, *Cell. Physiol. Biochem.* **15** (1–4), 1 (2005).
13. O. V. Slatinskaya, O. G. Luneva, and L. I. Deev, *Biophysics* **65** (2), 213 (2020).
14. J. T. Edsall, *J. Hist. Biol.* **5** (2), 205 (1972).
15. B. Wranne, R. D. Woodson, and J. C. Detter, *J. Appl. Physiol.* **32** (6), 749 (1972).
16. J. B. West, *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* **316** (4), 585, (2019).
17. C. Bohr and K. Hasselbalch, *Skand. Arch. Physiol.* **16**, 402 (1904).
18. S. V. Sidorenko, R. H. Ziganshin, O. G. Luneva, et al., *J. Proteomics* **184**, 25 (2018).
19. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., *Biophys. J.* **97** (12), 3206 (2009).
20. S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, et al., *J. Raman Spectroscopy* **24** (9), 275 (1993).
21. I. P. Torres Filho, J. Terner, R. N. Pittman, et al., *J. Appl. Physiol.* **104** (6), 1809 (2008).
22. B. R. Wood, L. Hammer, and D. McNaughton, *Vibrational Spectroscopy* **38** (1–2), 78 (2005).
23. O. G. Luneva, S. V. Sidorenko, O. O. Ponomarchuk, et al., *Cell. Physiol. Biochem.* **39** (1), 81 (2016).
24. B. R. Wood, P. Caspers, G. J. Puppels, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (5), 1691 (2007).
25. I. P. Torres Filho, J. Terner, R. N. Pittman, et al., *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* **289**, 488 (2005).
26. G. Chottard and D. Mansuy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77** (4), 1333 (1977).
27. A. Szabo and L. D. Barron, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (3), 660 (1975).
28. G. Louie, T. Tran, J. I. Englander, and S. W. Englander, *Mol. Biol.* **201**, 755 (1988).
29. Y. Sun, A. Benabbas, W. Zeng, et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111** (18), 6570 (2014).
30. R. V. Chertkova, N. A. Brazhe, T. V. Bryantseva, et al., *PLoS One* **12** (5), e0178280 (2017).
31. R. Liddington, Z. Derewenda, G. Dodson, and D. Harris *Nature* **331**, 725 (1988).
32. A. Klug, F. Kreuzer, and F. J. W. Roughton, *Physiol. Acta* **14**, 121 (1956).
33. R. Zander and H. Schmid-Schoenbien, *Respir. Physiol.* **19**, 279 (1973).
34. K. D. Vandegriff and J. S. Olson, *J. Biol. Chem.* **259**, 12609 (1984).
35. S. T. Bouwer, L. Hoofd, and F. Kreuzer, *Biochim. Biophys. Acta* **1338**, 127 (1997).

Investigation of Hemoglobin Conformation within Erythrocytes under Different Levels of the Partial Pressure of Oxygen

O.V. Slatinskaya*, O.G. Luneva*, L.I. Deev*, P.I. Zaripov*, and G.V. Maksimov*, **

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

**National University of Science and Technology "MISiS", Leninskiy prosp. 4, Moscow, 119049 Russia

Through the use of Raman spectroscopy, changes in the conformation of heme and globin in hemoglobin in response to a change in the partial pressure of oxygen (pO_2) have been investigated in the incubation medium for erythrocytes and hemoglobin. Raman spectra of hemoglobin within erythrocytes in a solution showed that a number of characteristic bands in the range of 1000 to 1700 cm^{-1} (stretching vibrations from the heme group) and in the high frequency range of 2800 to 3000 cm^{-1} (stretching vibrations from globin amino acids) also change under different pO_2 levels. It was found that the hemoglobin-oxygen saturation (sO_2) curve obtained from Raman scattering data displays sigmoidal behavior only for hemoglobin within erythrocytes. It was shown that differences in the conformation of heme under different pO_2 levels affect the ability of hemoglobin to form complexes with NO. As pO_2 level increases, the conformational changes of hemoglobin heme in the cell are accompanied by increased contribution of lateral- CH_3 -group vibrations of semirings of pyrrole and group vibrations of bonds of semirings of pyrrole, while the conformation of hemoglobin globin is associated with increased contribution of vibrations from H-methine groups and symmetric terminal methylene groups of amino acids.

Keywords: Raman spectroscopy, hemoglobin, erythrocyte, partial pressure of oxygen