

ИНДИКАТРИСА РАССЕЯНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЕМОГЛОБИНА

А. И. Исаева¹, Э. Майков², В. В. Гибизова^{2*}, Г. П. Петрова²

УДК 535.36:547.963.4

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

e-mail: gibizova@physics.msu.ru

(Поступила 14 мая 2021)

Методом многоугольного статического рассеяния света исследован водный раствор гемоглобина человека. Серповидная форма эритроцитов объясняется, в частности, способностью молекул гемоглобина к агрегации. Экспериментальные данные обработаны методами Дебая, асимметрии и Зимма. Получены массы рассеивающих частиц и проведена оценка размеров молекулы. Предположено, что структура молекулы гемоглобина изменяется и молекула приобретает вытянутую форму. Данные, полученные методом Зимма, лучше всего согласуются с полученными ранее. Большие размеры рассеивающих частиц, полученные методами асимметрии и Дебая, связывают с тем, что диссоциация гемоглобина представляет собой обратимый динамический процесс, равновесие которого зависит от концентрации белка.

Ключевые слова: индикатриса рассеяния, гемоглобин, статическое рассеяние света, молекулярная масса.

Human hemoglobin water solution was studied by a multi-angle static light scattering method. The sickle shape of erythrocytes was explained, in particular, by the ability of hemoglobin molecules to aggregation. The experimental data were processed by the methods of Debye, asymmetry, and Zimm. As a result of the work, the values of scattering particles weight were obtained and molecule size was estimated. It was assumed that the structure of the hemoglobin molecule had changed, and the molecule had acquired an elongated shape. The data obtained by the Zimm method are in the best agreement with the data obtained before. The large sizes of scattering particles obtained by the methods of asymmetry and Debye are possibly related to the fact that the dissociation of hemoglobin is a reversible dynamic process, the equilibrium of which depends on the protein concentration.

Keywords: scattering indicatrix, hemoglobin, static light scattering, molecular weight.

Введение. Гемоглобин [1, 2] — важный элемент крови, основной компонент эритроцитов, обладающий способностью захватывать кислород и транспортировать его в различные участки организма. При этом как дефицит, так и избыток этого белка очень опасны. Гемоглобин представляет собой тетрамер, состоящий из двух пар полипептидных цепей, называемых глобинами, и четырех групп гема. По данным [3], размер молекулы гемоглобина 6.5 нм. Актуальной проблемой является также изучение формы молекулы гемоглобина (см., например, [4—7]). Исследование модификации и трансформации молекулы гемоглобина может быть использовано для разработки стратегии реанимации и лечения угрожающих жизни типов анемии, связанных с изменением формы молекулы гемоглобина, которая влияет на нормальное функционирование клеток эритроцитов. Известно также, что развитие ряда заболеваний сопровождается морфофункциональными изменениями форменных элементов крови, в частности эритроцитов. При некоторых заболеваниях и травмах, сопровождающихся сильным повреждением тканей, нарушаются водно-электролитный состав крови и, как следствие,

HEMOGLOBIN WATER SOLUTIONS SCATTERING INDICATRIX

A. I. Isaeva¹, E. Maikov², V. V. Gibizova^{2*}, G. P. Petrova² (¹ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia; ² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: gibizova@physics.msu.ru)

функционирование форменных элементов крови. Гемореологические нарушения способствуют развитию гипоксии, от выраженности и длительности которой зависит вероятность осложнений и летальности [8]. В [9] описана взаимосвязь между повышенным и пониженным содержанием гемоглобина в крови человека и риском развития деменции и болезни Альцгеймера.

В данной работе исследованы изменения формы и размеров молекулы гемоглобина, происходящие в водных растворах при разных концентрациях белка, с помощью многоугольного метода статического рассеяния света.

Эксперимент. Использован спектрометр Photocor Complex (PC) [10], предназначенный для многоугольных измерений статического рассеяния света, с диодным лазером ($\lambda = 647$ нм, мощность 25 мВт). Прибор позволяет регулировать температуру исследуемых растворов. Измерения проведены с помощью программы Photocor-FC. Программное обеспечение позволяет наблюдать изменение сигнала на мониторе в режиме реального времени, оценивать результаты для интенсивности и параметров раствора. Для приготовления растворов в качестве растворителя использована вода для инъекций “Новосибхимфарм”, pH ~ 7.0 . Для исследования использован человеческий гемоглобин фирмы Sigma H7379 в виде порошка.

На рис. 1 представлены зависимости интенсивности рассеянного света от угла рассеяния для четырех концентраций гемоглобина. Аналогичная зависимость получена в работе [11] для света, рассеянного на поверхности метилового спирта. На рис. 2 экспериментальные данные представлены в виде индикатрисы рассеяния в полярных координатах. Влияние внутренней интерференции учитывалось путем введения параметра $P(\theta)$ — фактора внутренней интерференции. В зависимости от размеров рассеивающих частиц, показателей преломления и направления наблюдения интерференция волн может усиливать или ослаблять интенсивность рассеянного света [12]. Вид индикатрисы рассеяния меняется, так как теряется симметрия интенсивности рассеянного света, посылаемого вперед и назад. По мере укрупнения частицы основное количество рассеянного света направляется узким “языком” вперед в направлении падения света, т. е. сконцентрировано в области малых углов рассеяния, близких к 0° .

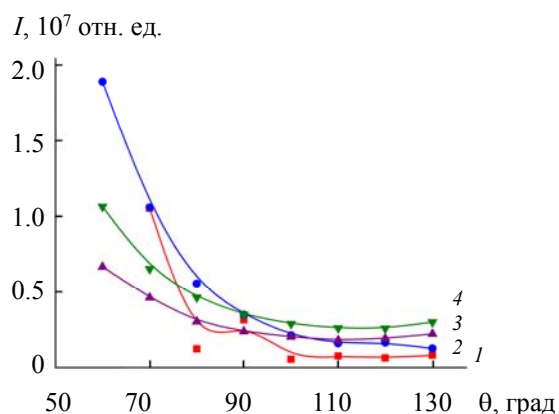


Рис. 1. Зависимости интенсивности рассеянного света от угла рассеяния для концентраций гемоглобина 0.05 (1), 0.15 (2), 0.25 (3) и 0.35 мг/мл (4)

Для получения полезной информации о гемоглобине, а именно его размерах и форме, необходимо определить интенсивности рассеянного света при различных углах в водных растворах гемоглобина. Такие значения получены для углов $60\text{—}130^\circ$. Обработка данных проведена с помощью методов асимметрии, Дебая и Зимма.

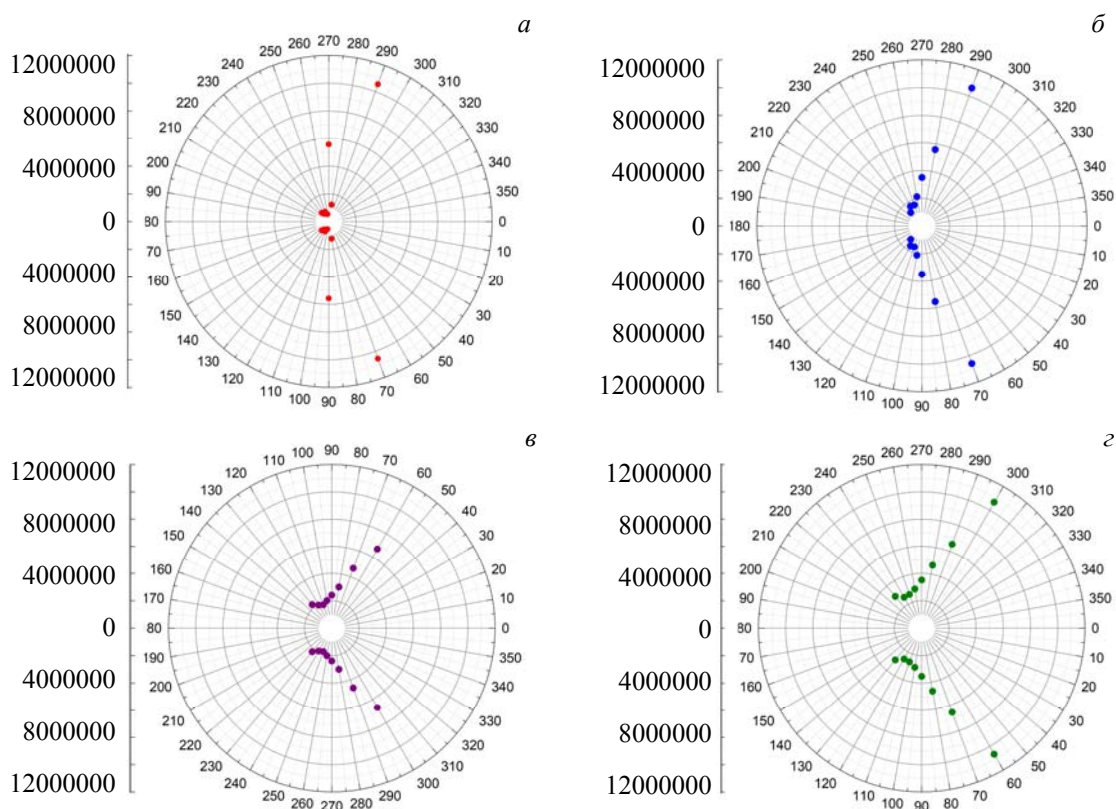


Рис. 2. Зависимости интенсивности рассеянного света от угла в полярных координатах при симметричном отображении угла для концентраций гемоглобина 0.05 (а), 0.15 (б), 0.25 (в) и 0.35 мг/мл (г)

Результаты и их обсуждение. Для расчета коэффициента асимметрии использованы интенсивности для углов, симметричных относительно 90° . Построены зависимости интенсивности рассеянного света I от угла θ для четырех концентраций (C_1 — C_4) в полярных координатах (рис. 3, табл. 1) и рассчитан коэффициент асимметрии Z , с помощью которого можно определить форму и относительные размеры рассеивающей частицы [13].

Т а б л и ц а 1. Данные, полученные с помощью метода асимметрии

Параметр	C_1	C_2	C_3	C_4
Z	2.27	2.61	1.49	1.61
P^{-1}	2.05	2.44	1.38	1.48
D/λ	0.45	0.50	0.40	0.45
Форма	клубки	клубки	палочки	палочки

Сравнительные данные для трех методов обработки экспериментальных значений представлены в табл. 2. Средняя молекулярная масса $M_{\text{ср}} = 67644 \pm 6564$ г/моль. Полученные размеры рассеивающих частиц больше и зависят от концентрации. Вероятно, структура молекулы гемоглобина переходит из четвертичной в третичную, вторичную или первичную, из-за чего длина молекулы увеличивается.

Методом Дебая обработаны данные для угла рассеяния 90° . С помощью экстраполяции к нулевой концентрации гемоглобина получена обратная масса $M_w^{-1} = 1.49 \cdot 10^{-5}$ моль/г, из которой рассчитаны эффективная масса рассеивающих частиц $M_w = 67114 \pm 8475$ г/моль [14] и второй вириальный коэффициент $B = (4.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ см³/г². С помощью обработки данных методом Зимма получены эффективная молекулярная масса $M_w = 65000 \pm 5850$ г/моль и радиус инерции частиц $R_g = 103 \pm 21$ нм.

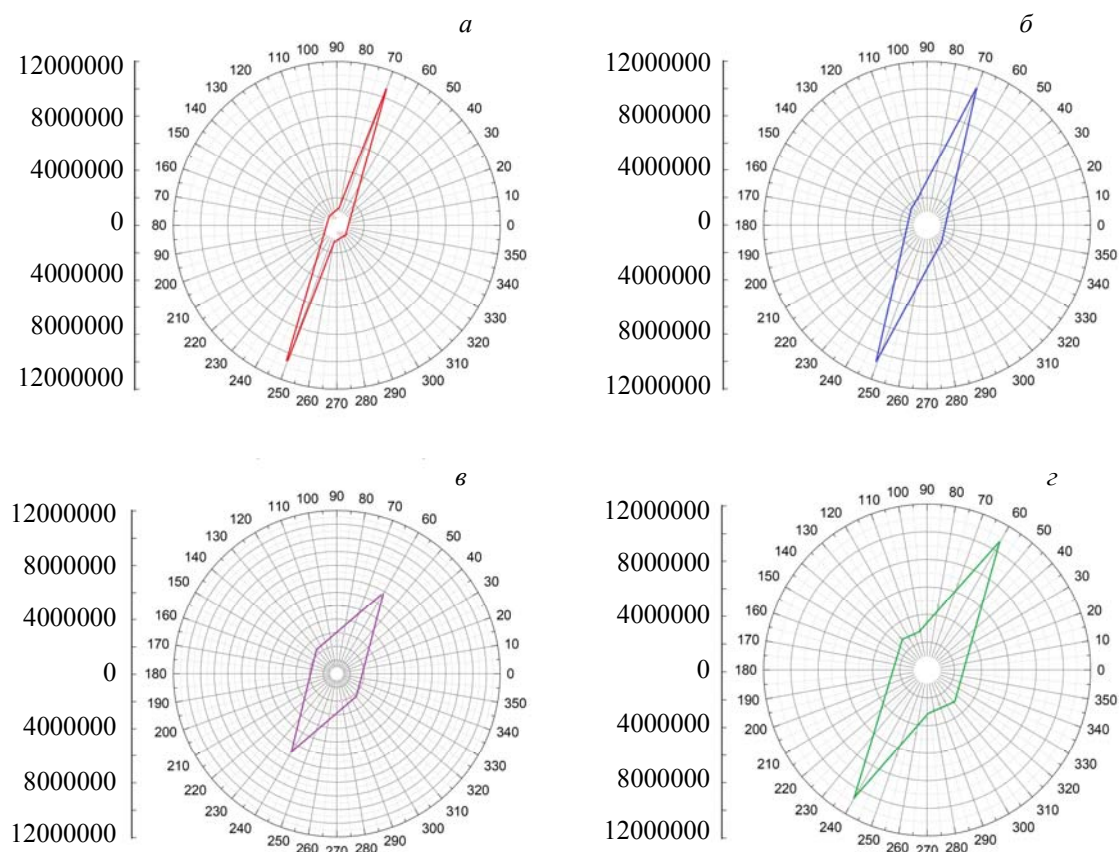


Рис. 3. Зависимости интенсивности рассеянного света от угла в полярных координатах при асимметричном отображении угла для концентраций гемоглобина 0.05 (а), 0.15 (б), 0.25 (в) и 0.35 мг/мл (г)

Т а б л и ц а 2. Сравнительные данные для трех методов обработки экспериментальных значений

Метод	Молекулярная масса, г/моль	Дополнительные данные
Асимметрии	67644 ± 6564	$R_g = 145.6$ нм
Дебая	67114 ± 8475	$B = (4.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ см ³ /г ²
Зимма	65000 ± 5850	$R_g = 103 \pm 21$ нм

Закключение. Исследован гемоглобин в водном растворе при разных углах и увеличении концентрации. Получены угловые зависимости интенсивности рассеянного света в чистом водном растворе гемоглобина при разных концентрациях. Построены индикатрисы рассеянного света, которые показывают распределение интенсивности света в чистых водных растворах гемоглобина. Результаты обработаны с помощью трех методов. Показано, что рассчитанные массы рассеивающих частиц — молекул гемоглобина — близки к известным данным $M = 64500$ г/моль, а радиусы инерции не соответствуют значению $R = 3.25$ нм [3]. Это может быть связано с тем, что молекула гемоглобина изменяет форму, образуя вытянутую структуру, по форме напоминающую палочку, что приводит к тромбообразованию в организме человека. Для молекулы белка гемоглобина наблюдается тенденция, описанная в [15]. В силу плохой растворимости в воде свободный гем не способен к транспорту кислорода, а значит, гемоглобин теряет свою основную функцию. Окисление железа гема происходит в случае, если две молекулы гема взаимодействуют с молекулой кислорода. Связывание гема с белком (глобином) в молекуле гемоглобина предотвращает такое взаимодействие и сохраняет железо в двухвалентной форме.

Большие размеры рассеивающих частиц, полученные методами асимметрии и Зимма, можно объяснить тем, что диссоциация гемоглобина — обратимый динамический процесс, равновесие которого зависит от концентрации белка. При высокой концентрации гемоглобина (физиологические условия, которые не описаны в работе) равновесие сильно сдвинуто в сторону образования тетрамера, так как субъединицы гемоглобина имеют высокое сродство друг к другу. Поэтому при нормальных условиях концентрация мономеров относительно мала или последние вообще отсутствуют. При малых концентрациях гемоглобина (ниже физиологических) равновесие смещается в сторону образования димеров и в меньшей степени — мономеров [16]. Поскольку наиболее прочные межмолекулярные взаимодействия наблюдаются между α_1 - β_1 - и α_2 - β_2 -глобулами [16], в молекуле гемоглобина выделяются димеры α_1 - β_1 и α_2 - β_2 .

Работа выполнена при поддержке междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина”.

- [1] **Н. И. Стуклов.** Рациональная фармакотерапия в кардиологии, **13**, № 5 (2017) 651—660
- [2] **R. V. Gardner.** Ochsner J., **18**, N 4 (2018) 377—389
- [3] **Jun Liu, Zhihong Li, Yanru Wei, Wenjia Wang, Bing Wang, Hongli Liang, Yuxi Gao.** Protein Science, **25**, N 8 (2016) 1385—1389
- [4] **S. H. De Bruin, H. S. Rollema, L. H. M. Janseen, G. A. J. Van Os.** Biochem. Biophys. Res. Commun., **58**, N 1 (1974)
- [5] **M. Diez-Silva, M. Dao, J. Han, Ch.-T. Lim, S. Suresh.** MRS Bull, **35**, N 5 (2010) 382—388
- [6] **K. G. Engstrom, E. Lofvenberg.** Blood, **91**, N 10 (1998) 3986—3991
- [7] **Xuejin Li, Bruce Caswell, George Em Karniadakis.** Biophys. J., **103** (2012) 1130—1140
- [8] **В. В. Мороз, А. М. Голубев, А. В. Афанасьев, А. Н. Кузовлев, В. А. Сергунова, О. Е. Гудкова, А. М. Черныш.** Сб. тр. НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва (2012) 52—60
- [9] **Frank J. Wolters, Hazel I. Zonneveld, Silvan Licher, Lotte G. M. Cremers, M. Kamran Ikram Peter J. Koudstaal, Meike W. Vernooij, M. Arfan Ikram.** Neurology, **93**, N 9 (2019)
- [10] <https://www.photocor.ru/theory/particle-size-analyzer>
- [11] **И. Л. Фабелинский.** Молекулярное рассеяние света, Москва, Наука (1965)
- [12] **С. А. Вшивков, А. П. Сафронов, Е. В. Русинова, Л. В. Адамова, А. Л. Надольский, И. С. Тюкова, Т. В. Терзиян, А. Г. Галяс.** Методы исследования полимерных систем: уч. пособие, Екатеринбург, изд-во Уральского университета (2016)
- [13] **В. Е. Эскин.** Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул, Ленинград, Наука (1986)
- [14] <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich>
- [15] **В. А. Сергунова, Е. А. Манченко, О. Е. Гудкова.** Общая реаниматология, **12**, № 6 (2016) 49—63
- [16] **Ю. А. Кривенцев, Д. М. Никулина.** Биохимия: строение и роль белков гемоглобинового профиля: уч. пособие для среднего профессионального образования, Москва, Юрайт (2020)