

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова  
Физический факультет  
Кафедра молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества

Работа студентки 204М группы  
Рубцовой Ольги Владимировны

**Исследование структуры гемоглобина при изменении ионной силы  
раствора методом комбинационного рассеяния света**

Научный руководитель

к. ф. – м. н., м.н. с.

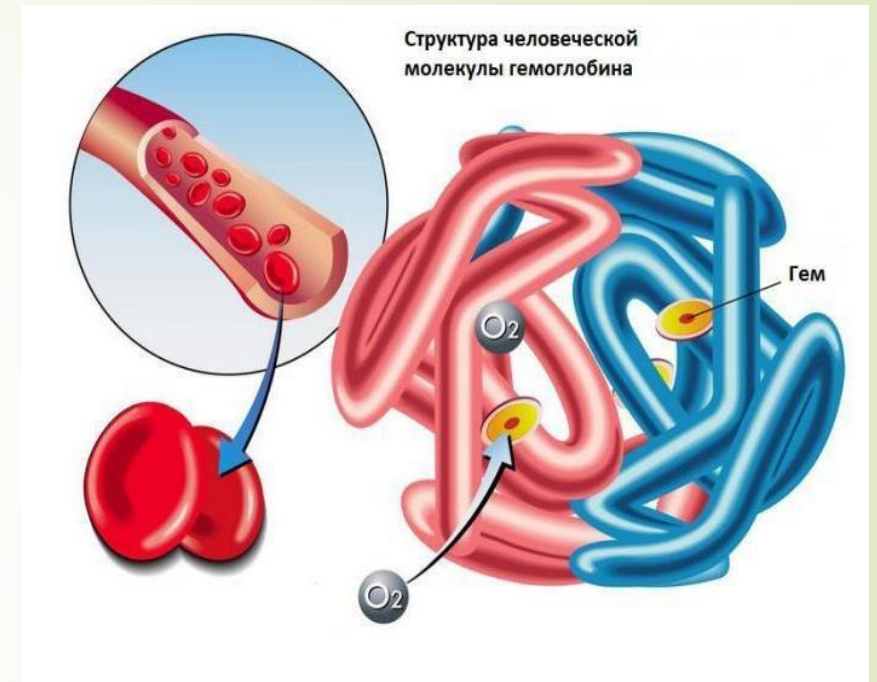
В. В. Гибизова

Москва  
2020

➤ **Актуальность:** исследование структуры белка – одна из важнейших задач при изучении биологических молекул, поскольку функциональная активность белков связана с их структурой. С помощью данных о структуре белка можно создавать лекарственные препараты направленного действия.

➤ Практически любой паталогический процесс в живых организмах связан с нарушением кислородной обеспеченности. Белком, отвечающим за перенос кислорода к тканям, является гемоглобин.

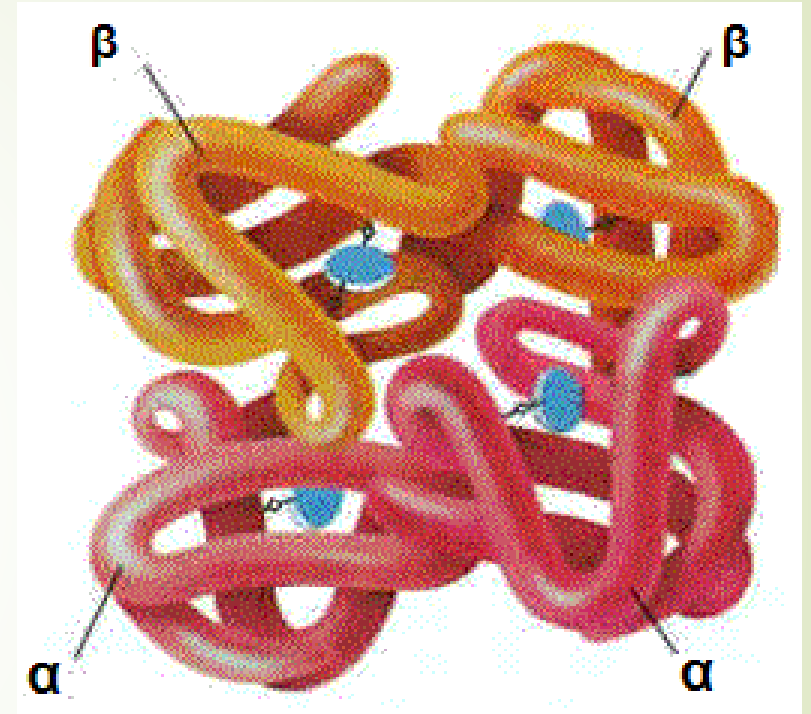
➤ **Цель** : изучение особенностей комбинационного рассеяния света (КР) в чистых растворах гемоглобина и в растворах гемоглобина, содержащих соль хлорида железа (III).



Структура человеческой молекулы гемоглобина [1]

# Гемоглобин

- ▶ Гемоглобин (Hb) – глобулярный белок. Относится к сложным белкам хромопротеидам. Hb составляет 35% от общей массы эритроцита.
- ▶ В состав ядра гема входит ион  $Fe^{2+}$ . Молекулярная масса: 64,5 – 68 кДа.
- ▶ Диаметр: 6,4 нм.
- ▶ Количество Hb в крови у мужчин составляет 13–170 г/л (8,56–10,7 ммоль/л), у женщин несколько меньше (на 10%), чем у мужчин – 120–150 г/л (7,5–9,36 ммоль/л).
- ▶ В ходе работы использовался гемоглобин человека H7379-1G фирмы Sigma.



Четвертичная структура гемоглобина [2]

# Хлорид железа (III)

- Хлорное железо  $\text{FeCl}_3$  - средняя соль трехвалентного железа и соляной кислоты.
- Железо в виде солей является основным источником поступления железа в организм, особенно при его пониженном содержании – анемии.
- Но и избыточное железо откладывается в тканях, образуется соединение трехвалентного железа с белками, но уже в виде нерастворимого в воде комплекса – гемосидерина.
- Его накопление расстраивает функции тканей и органов и приводит к развитию заболевания – гемосидероза.





# Метод комбинационного рассеяния

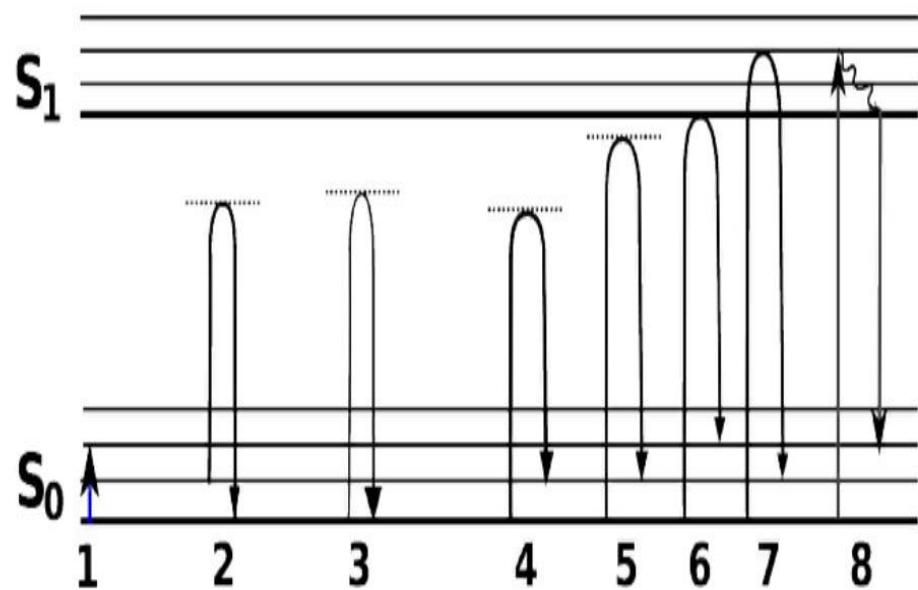


Рисунок 1. Схема переходов между колебательными подуровнями и электронными уровнями молекулы

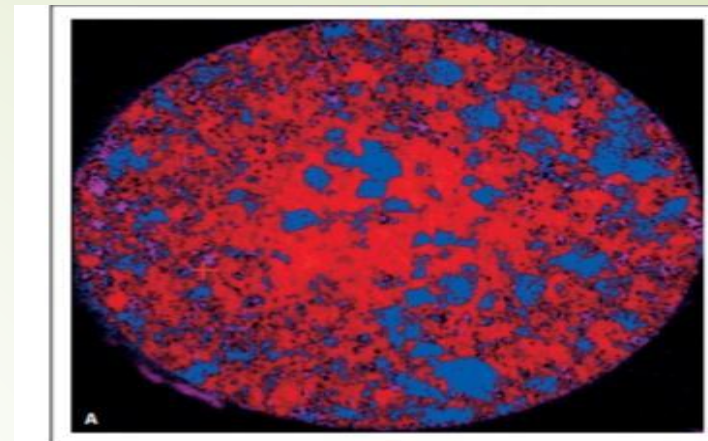
- ▶ Комбинационное рассеяние света (КР) – это рассеяние света веществом, сопровождающееся изменением частоты рассеиваемого света. В основе метода лежит взаимодействие монохроматического излучения с веществом.
- ▶ В результате наблюдается переход молекулы с одного уровня на другой (рис.1). При обычном, релеевском, рассеянии молекула возвращается на исходный энергетический уровень (переход 3). При комбинационном рассеянии молекула переходит в другое колебательное состояние, обладающее иной энергией (переход 2, 4-7).

- КР спектроскопия используется для анализа пептидной структуры.
- Рамановская спектроскопическая характеристика может быть применена к белкам в различных состояниях: водный (разбавленный) раствор (имеет низкую интенсивность в спектрах Рамана), аморфные агрегаты, твердые частицы и кристаллы.



Методом КР были исследованы колебательные и вращательные состояния молекул белка Hb.

Спектр Hb представляет собой совокупность полос, вызванных нормальными колебаниями связей в гемопорфирине



Комбинационное изображение таблетки тиболона (красная область - крахмал, синяя – лактоза [3])

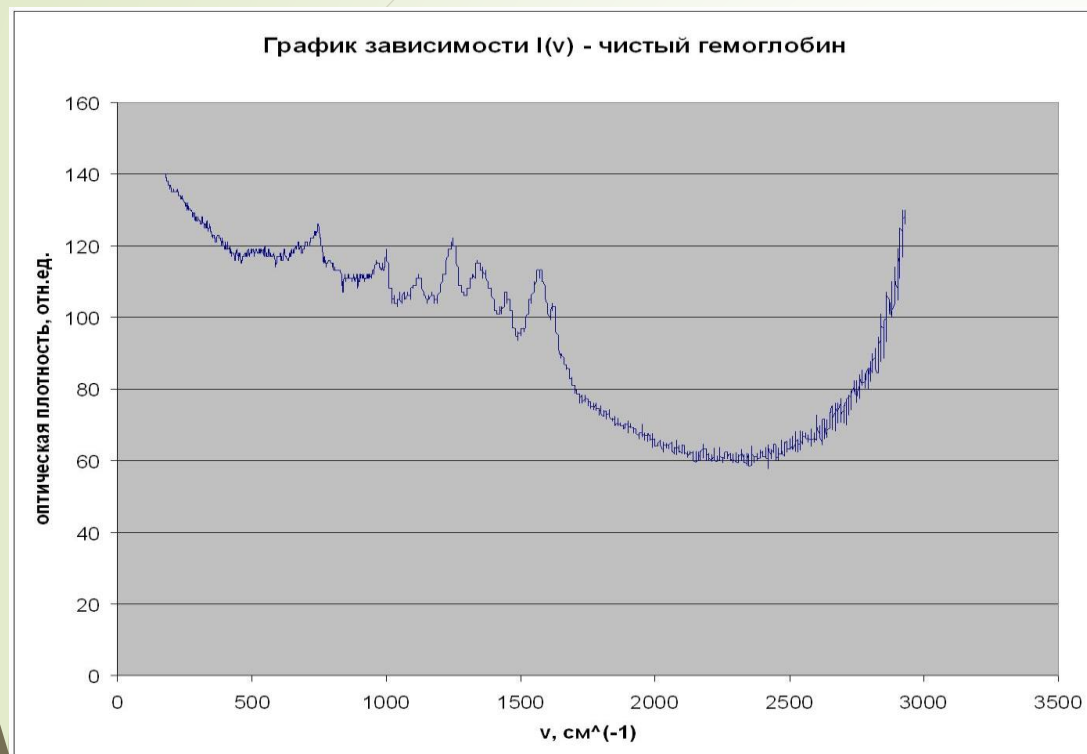


Экспериментальная установка: КР-микроскоп DXR Raman Microscope

[3] The Analysis of Low Dose Tablets and Polymorphs using Raman Imaging//Dr.

Robert Heintz, Thermo fisher Scientific, Madison, W, USA

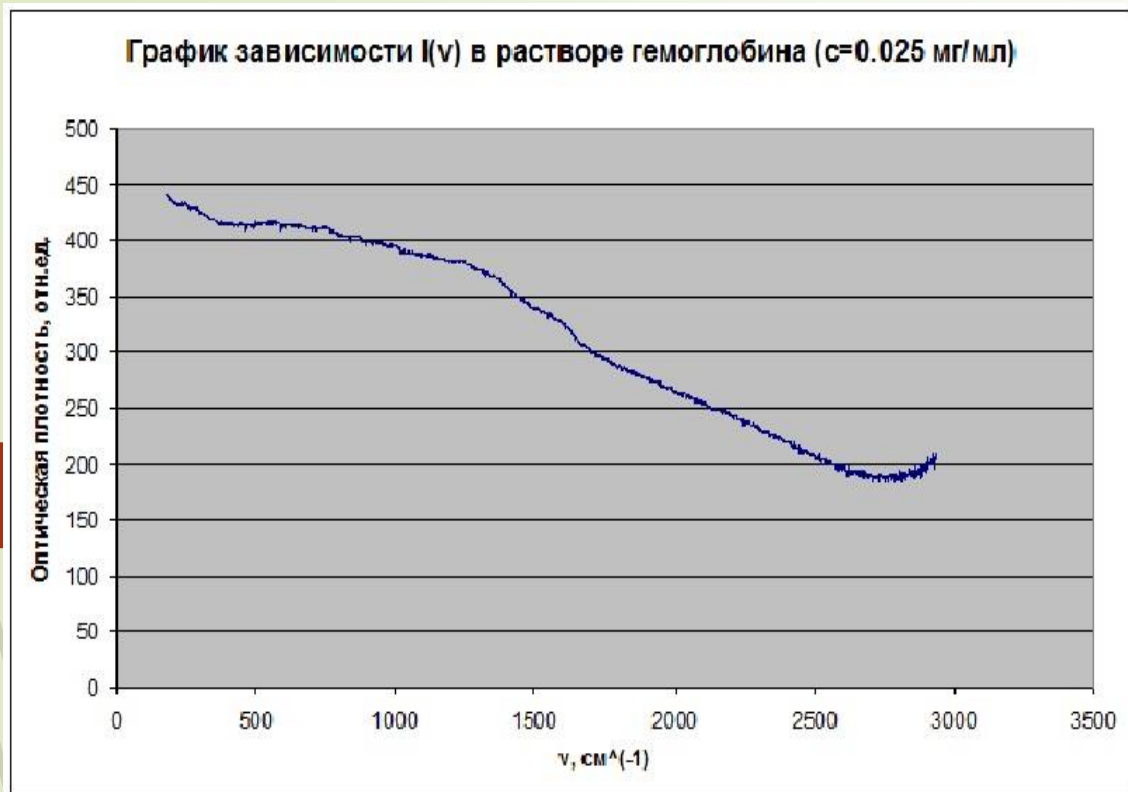
# Экспериментальные результаты



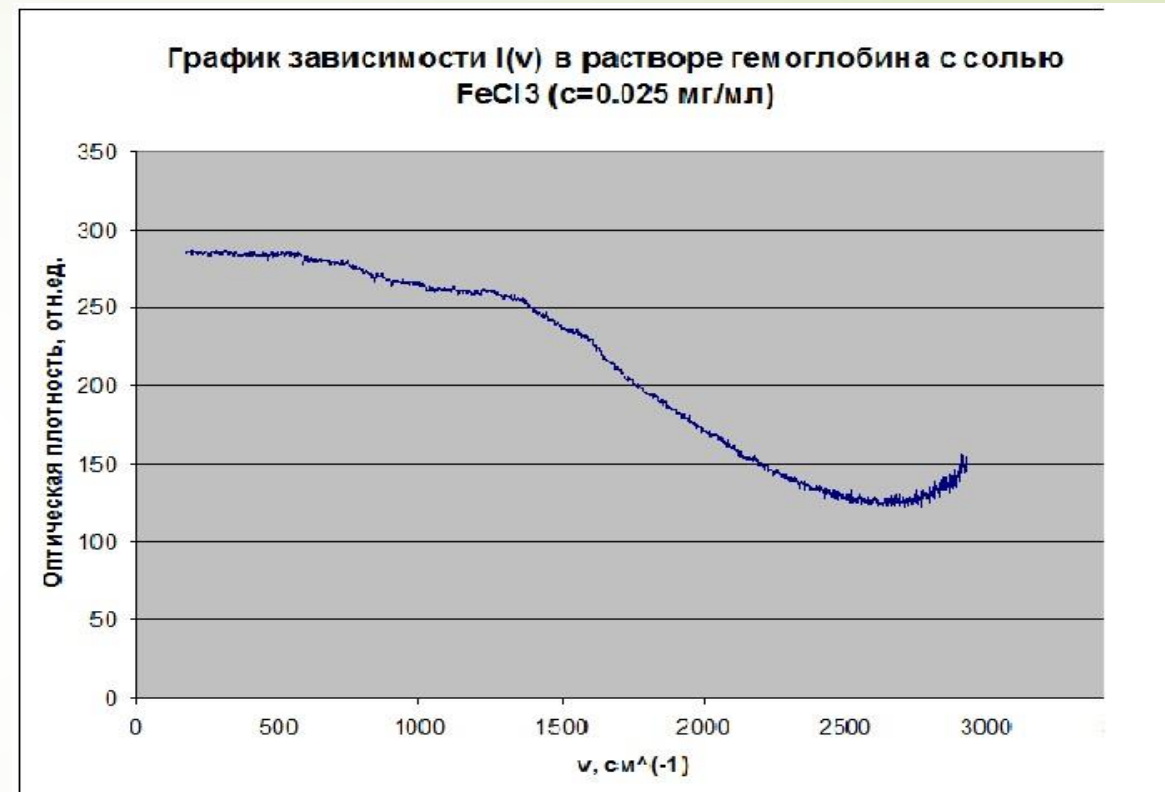
Спектр КР сухого гемоглобина



Спектр КР сухого Нб в диапазоне частот 700 – 1700  $\text{cm}^{-1}$

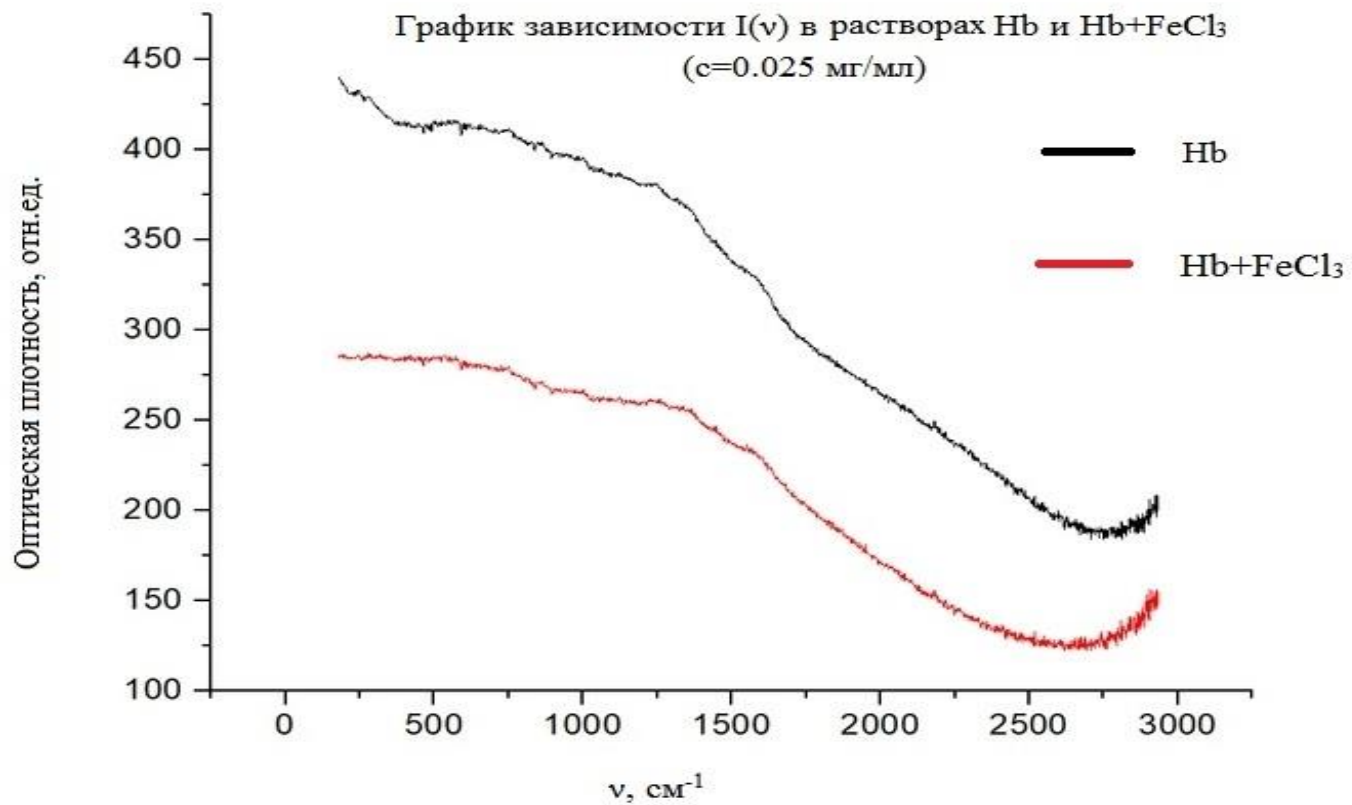


Спектр КР раствора Нв ( $c=0.025$  мг/мл)

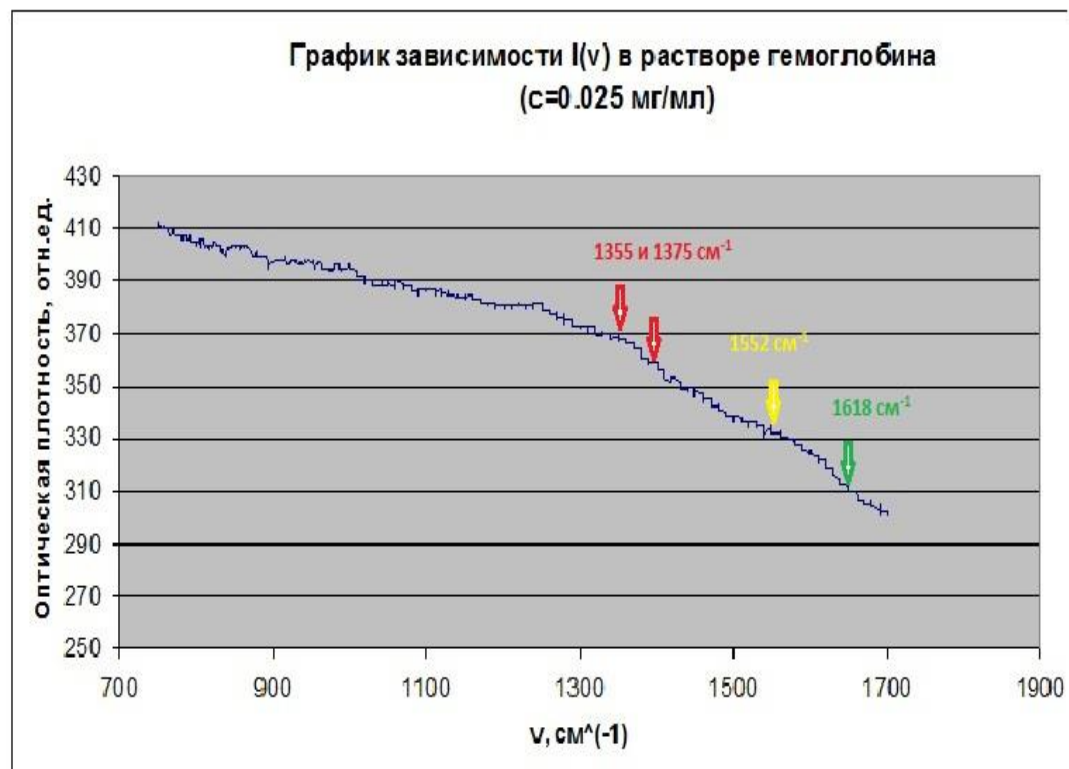


Спектр КР раствора Нв с солью  $\text{FeCl}_3$  ( $c=0.025$  мг/мл)

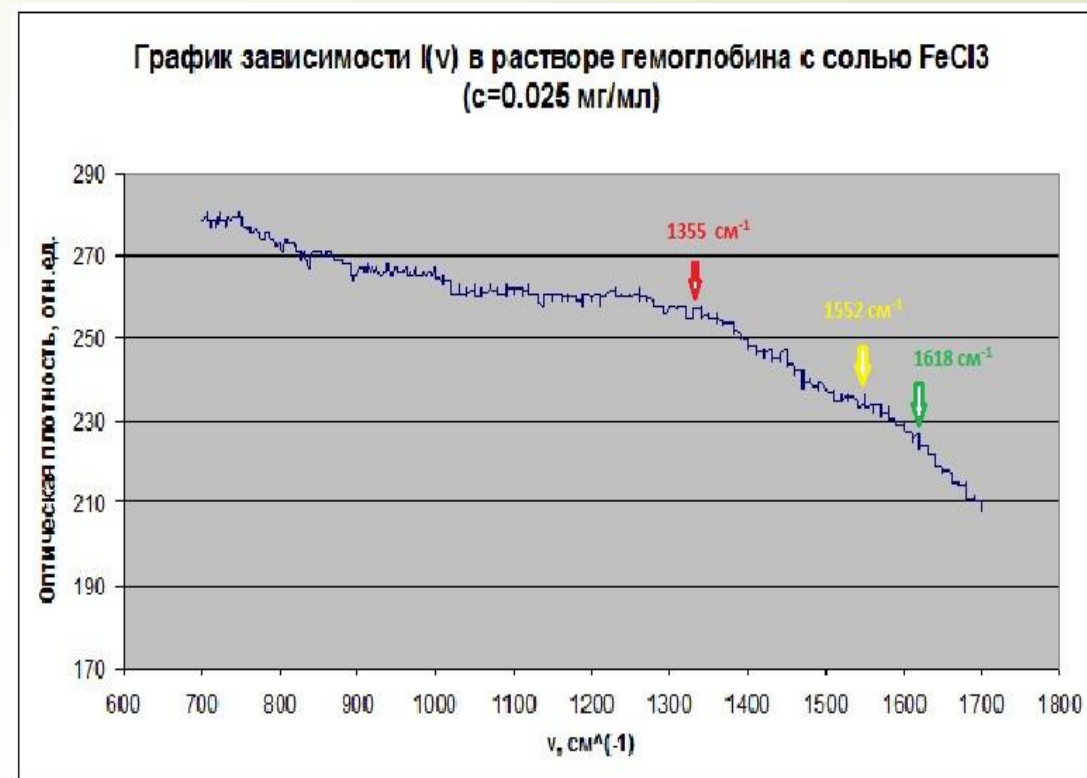




Сравнительный КР спектр растворов Hb и Hb с солью FeCl<sub>3</sub> ( $c=0.025$  мг/мл)

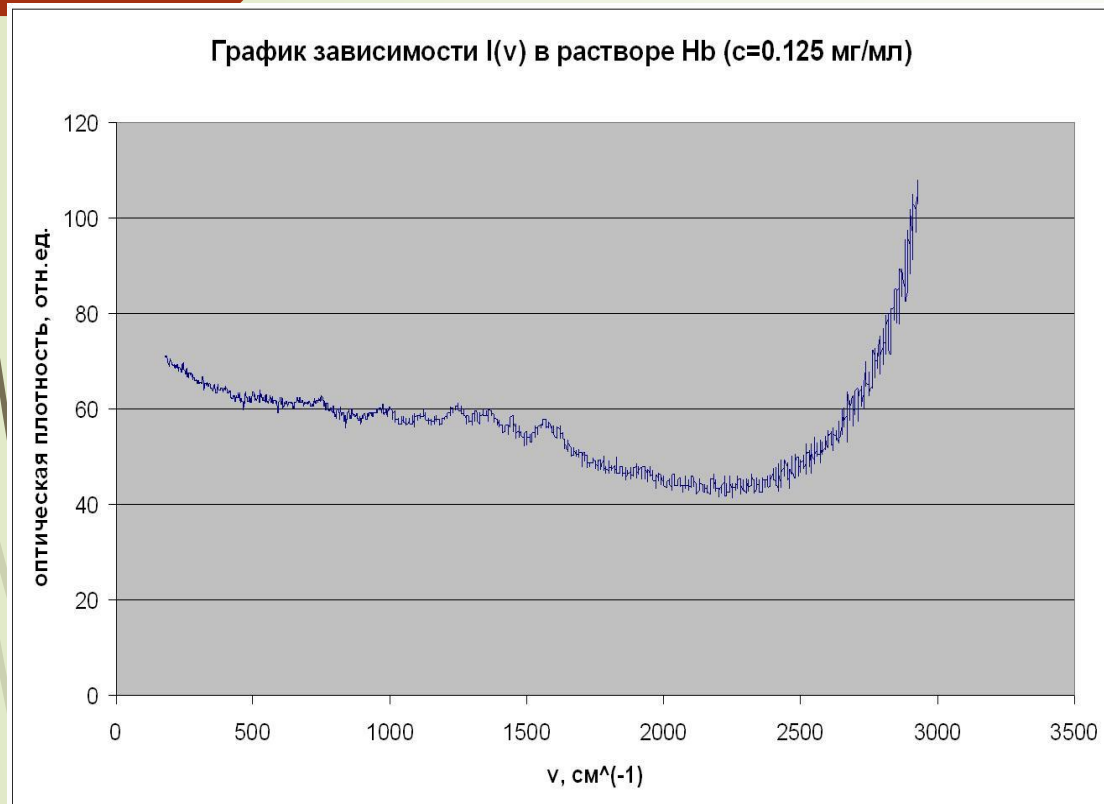


Спектр КР раствора Нв в диапазоне частот 700 – 1700  $\text{см}^{-1}$  ( $c=0.025$  мг/мл)

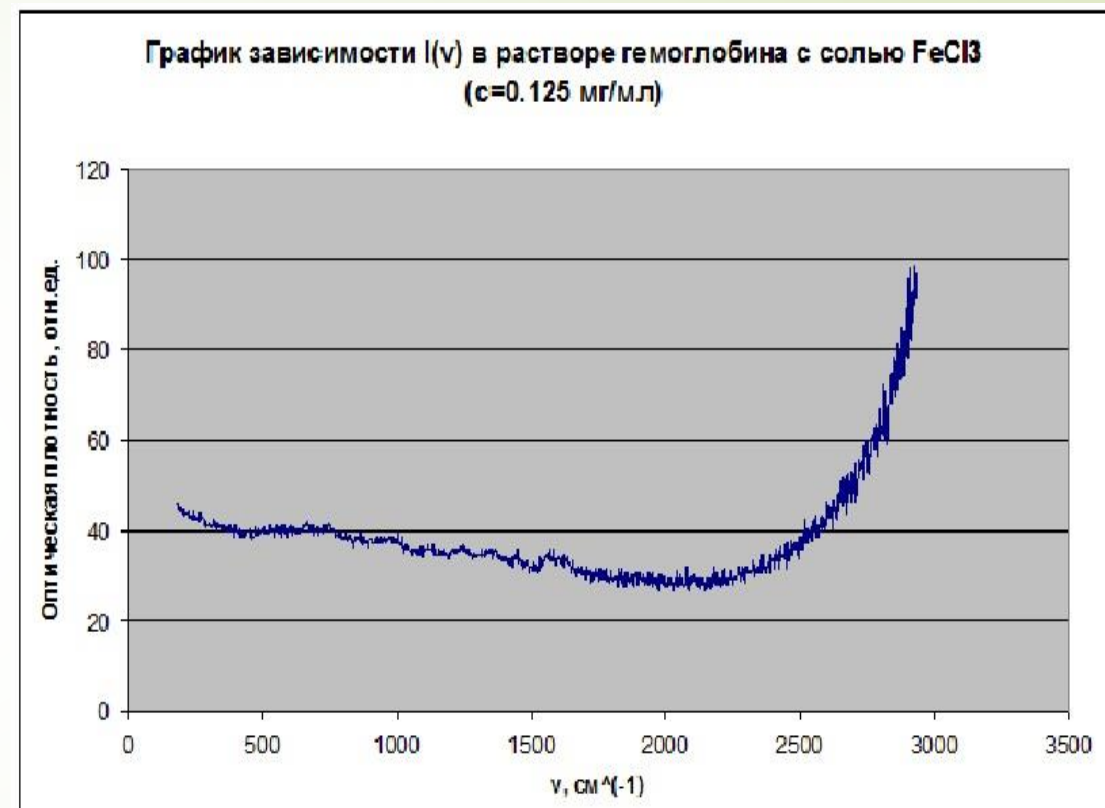


Спектр КР раствора Нв с солью  $\text{FeCl}_3$  в диапазоне частот 700 – 1700  $\text{см}^{-1}$  ( $c=0.025$  мг/мл)

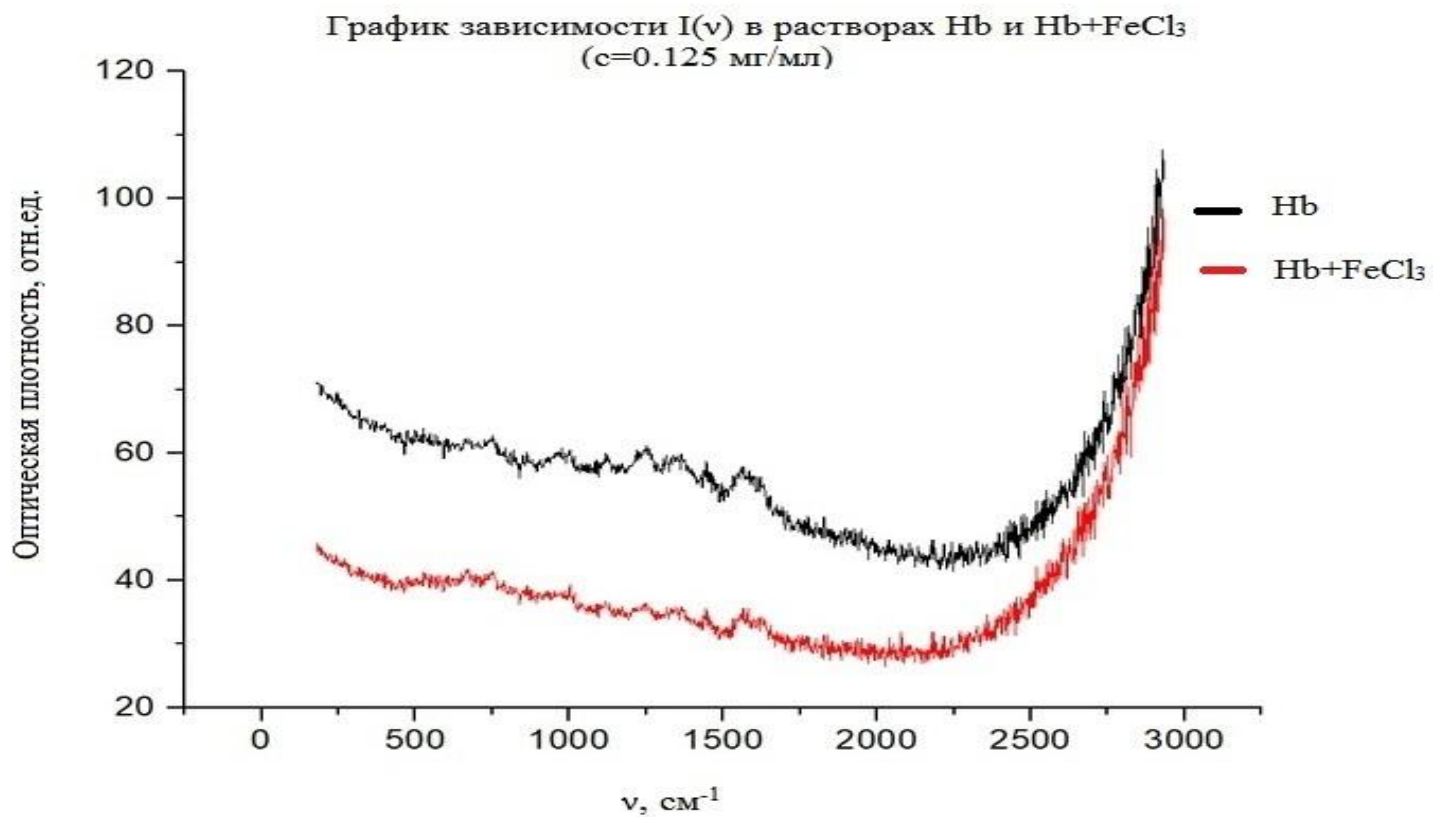
$\mu (\text{FeCl}_3) = 0,105$  моль/л



Спектр КР раствора Hb ( $c=0.125$  мг/мл)



Спектр КР раствора Hb с солью  $\text{FeCl}_3$  ( $c=0.125$  мг/мл)

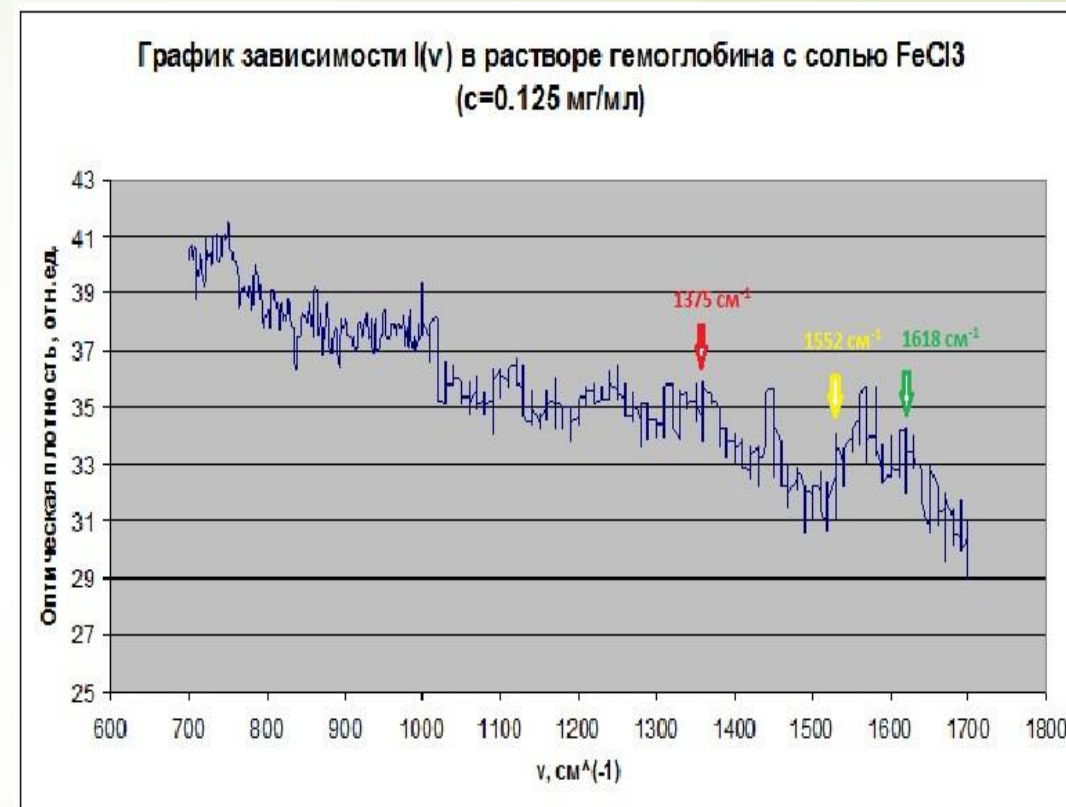


Сравнительный КР спектр растворов Hb и Hb с солью FeCl<sub>3</sub> ( $c=0.125$  мг/мл)





Спектр КР раствора Нв в диапазоне частот 700 – 1700  $\text{см}^{-1}$  ( $c=0.125$  мг/мл)



Спектр КР раствора Нв с солью  $\text{FeCl}_3$  в диапазоне частот 700 – 1700  $\text{см}^{-1}$  ( $c=0.125$  мг/мл)

$\mu(\text{FeCl}_3) = 0,105$  моль/л

Таблица 1. Характеристика полос спектра КР гемопорфирина Hb

Частотный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Связь	Тип симметрии колебаний	Чувствительность колебания	Форма Hb	Интенсивность, отн.ед.				
					C <sub>Hb</sub> =0.025 мг/мл		C <sub>Hb</sub> =0.125 мг/мл		
					Сухой Hb	Hb	Hb+FeCl <sub>3</sub>	Hb	Hb+FeCl <sub>3</sub>
1355	C <sub>a</sub> C <sub>b</sub> , C <sub>a</sub> N, C <sub>a</sub> NC <sub>a</sub>	Симметричные колебания пиррольных полуколец	Ферро-состояние железа (Fe <sup>2+</sup> ), наличие лиганда	д-Гб	115	370	255	59	
1375			Ферри-состояние железа (Fe <sup>3+</sup> ), наличие лиганда	о-Гб	113	360		58	36
1552	C <sub>a</sub> C <sub>m</sub> , C <sub>a</sub> C <sub>m</sub> H	Асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Высокоспиновое состояние железа (Fe <sup>2+</sup> )	д-Гб	105	330	235	57	34
1580			Низкоспиновое состояние железа (Fe <sup>3+</sup> )	о-Гб	112				
1618	CaCb, CbCb	$\nu(C=C)$	Редокс и спиновое состояние железа, наличие лиганда	NO-Гб	103	312	225	53	33

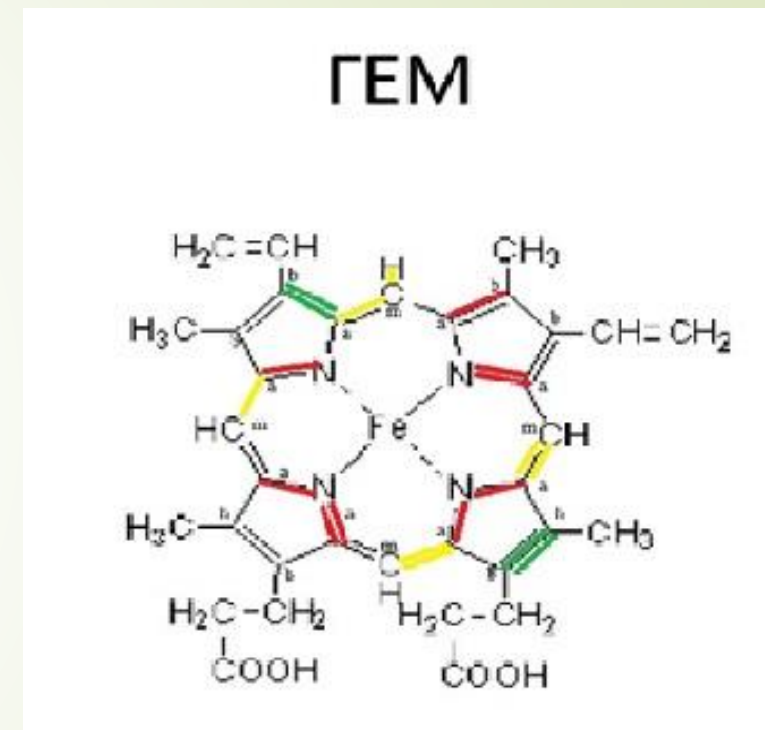


Рисунок 2. Структурная формула гемопорфирина Hb

# Обсуждение результатов

- В результате были получены соотношения интенсивностей КР-полос:
- А) Расчёты для полученных спектров представлены в таблице 2, отсюда видно, что относительное содержание комплексов ГбНО (I типа) относительно суммарного Hb клетки составляет примерно 0.5. Содержание комплексов ГбНО остается также в 2 раза ниже суммарного Hb клетки при повышении концентрации белка в растворе.
- Б) Относительная способность Hb эритроцитов связывать лиганды составляет примерно 1.1 (таблица 3), как в растворе с меньшей (0.025 мг/мл), так и большей (0.125 мг/мл), концентрацией белка.
- В)  $\frac{I_{1375}}{I_{1580}} = 1.01$
- Однако относительная способность Hb сбрасывать лиганды получена только для спектра сухого белка (поскольку пиков на частоте 1580 см<sup>-1</sup> обнаружено не было), и составляет примерно 1.

Таблица 2. Соотношение

интенсивностей  $\frac{I_{1618}}{I_{1355} + I_{1375}}$

Исследуемые образцы	$\frac{I_{1618}}{I_{1355} + I_{1375}}$
сухой Hb	0.45
Hb (c=0.025 мг/мл)	0.43
Hb (c=0.125 мг/мл)	0.45

Таблица 3. Соотношение

интенсивностей  $\frac{I_{1355}}{I_{1552}}$

Исследуемые образцы	$\frac{I_{1355}}{I_{1552}}$
сухой Hb	1.10
Hb (при c=0.025 мг/мл)	1.12
Hb (при c=0.125 мг/мл)	1.04

# ВЫВОДЫ

- ▶ 1) В растворах с наименьшей концентрацией белка ( $c=0.025$  мг/мл) были получены более высокие значения интенсивности (примерно в 3-4 раза), чем в спектре сухого Hb и растворов с большей концентрацией ( $c=0.125$  мг/мл), что хорошо согласуется с литературными данными. Это может быть связано с ослаблением аминокислотными остатками водородных связей.
- ▶ 3) В каждом спектре (и растворов белка, и белка с солью) наблюдаются характерные пики, соответствующие частотам колебаний в молекулах Hb и дезоксигемоглобина. Таким образом, сделан вывод о типе симметрии колебаний и форме Hb (табл. 1).
- ▶ Пики  $1355$  и  $1375$   $\text{см}^{-1}$  свидетельствуют о симметричных колебаниях пиррольных колец, а частота  $1618$   $\text{см}^{-1}$ , наблюдаемая как в спектре белка, так и белка с солью, указывает на образование гексакоординированных комплексов I типа ГБНО.
- ▶ 4) Обнаружено, что при добавлении в раствор белка соли, интенсивность уменьшается примерно в 1.5 раза. На сравнительном КР спектре также наглядно видно, что при добавлении в раствор соли, пики интенсивности несколько сглаживаются и смещаются по оси частот, что, вероятно, связано с изменением конформации белка.





Спасибо за внимание!

