

## Исследование рассеяния света молекулами гемоглобина при воздействии хлорида железа (III) и различном pH

В.В. Гибизова,<sup>1,\*</sup> Г.П. Петрова,<sup>1</sup> И.А. Сергеева,<sup>1</sup> К.В. Федорова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

(Поступила в редакцию 08.12.2023; после доработки 29.02.2024; подписана в печать 27.03.2024)

Во многих литературных источниках рассматриваются заболевания, связанные с белком гемоглобином [1, 2]. В современном мире страдают от анемии более 800 млн человек [3]. Оценка уровня гемоглобина в системе кровообращения является одним из способов диагностики анемии. Белок гемоглобин также является перспективным источником биоактивных пептидов [4]. Целью работы было выявить причины, приводящие к изменению конформации данного белка. До сих пор остается неясным, что именно вызывает нарушения его функциональности. В работе изучался человеческий гемоглобин фирмы Sigma H7379, все эксперименты проводились на спектрометре динамического рассеяния света Photocor Complex. Экспериментальные данные были получены с помощью оптических методов статического и динамического рассеяния света. В работе был проведен анализ поведения белковых молекул гемоглобина в водных и в водно-солевых растворах при изменении параметров раствора (pH, добавление хлорида железа III). При значениях  $\text{pH} < (3.56 \pm 0.15)$  и  $\text{pH} > (10.4 \pm 0.2)$  молекула гемоглобина претерпевала конформационные изменения, в результате которых происходил распад четвертичной структуры на  $\alpha\beta$ -димеры и отдельные  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулы. В результате работы получено, что добавление  $\text{FeCl}_3$  в водные растворы гемоглобина увеличивает размеры и массу рассеивающих частиц, что можно объяснить адсорбцией ионов  $\text{Fe}^{3+}$  на поверхности белка. Но при достижении определенной концентрации  $\text{FeCl}_3$  pH раствора понижался настолько, что происходили конформационные изменения гемоглобина, которые приводили к распаду его четвертичной структуры. Данные результаты могут быть учтены при создании лекарственных препаратов для лечения анемии и других заболеваний, связанных с белком гемоглобином.

PACS: 33.20, 95.75.Fg. УДК: 535.36, 577.322

Ключевые слова: глобулярный белок, гемоглобин, конформация, динамическое рассеяние света, статическое рассеяние света, молекулярная масса, коэффициент межмолекулярного взаимодействия.

DOI: 10.55959/MSU0579-9392.79.2430402

### ВВЕДЕНИЕ

В современном мире заболевания, затрагивающие дыхательную систему человека, прогрессируют, в частности, недавно волну паники вызвал вирус COVID-19. В ходе лечения пациентов, заболевших данным вирусом, одним из параметров, который контролировался у них, являлся уровень гемоглобина в крови человека [5]. В данной работе изучалось изменение водородного показателя раствора, так как он может меняться при нарушениях дыхательной функции, связанной со снижением легочной вентиляции, в результате этого в крови накапливается избыточное количество углекислого газа, что приводит к образованию углекислоты и, как следствие, вызывает повышение кислотности крови. При гипервентиляции могут происходить и обратные процессы [6]. Помимо контроля уровня гемоглобина [7] для поддержания нормальной жизнедеятельности организма, у него есть и не широко известные функции, такие, как способность

индуцировать и контролировать развитие воспалительных, защитных и патологических реакций [8]. Свойства гемоглобина [9] активно изучаются как с позиции отдельной частицы, так и в составе системы, чаще всего в научных статьях исследуется гемоглобин, содержащийся в эритроцитах. В статье [10] с помощью метода рамановской спектроскопии изучалось изменение конформаций гема гемоглобина и глобина при изменении парциального давления кислорода внутри эритроцитов и в растворенном гемоглобине в инкубационной среде. В результате было обнаружено, что различия в конформации гема при разных уровнях парциального давления влияют на способность гемоглобина образовывать комплексы с оксидом азота.

В данной работе изучалось трехвалентное железо, которое содержится в пище, в связи с чем именно эта форма железа используется в лекарственных препаратах. Оно легче переносится организмом человека, поэтому в качестве ионов железа был выбран хлорид железа III [11]. При нормальном функционировании гемоглобина железо в нём находится в двухвалентной форме, но при возникновении патологий в организме может произойти сбой, напри-

\* E-mail: gibizova@physics.msu.ru

мер образуется метгемоглобин, внутри которого железо также находится в трёхвалентной форме.

В статье [12] особое внимание уделяется размерам исследуемых белков, в частности гемопротейнов. Белки, имеющие большие размеры, взаимодействуют с наночастицами с большим сродством, чем те, у которых размер меньше. Данное исследование может иметь большое значение при рассмотрении образования белковой короны в сложных биологических средах, где присутствуют крупные белковые комплексы. До недавнего времени размер белков не принимался во внимание как определяющий фактор для адсорбции белка. Отчасти это связано с тем, что белки обычно рассматриваются с точки зрения аминокислотных последовательностей и что фактический размер белка — особенно размер больших белковых комплексов — не может быть определен с помощью классического протеомного анализа. В этой статье показано, что большие белки имеют тенденцию образовывать неполные короны. Это можно легко объяснить тем фактом, что большие белки с большей вероятностью связываются с несколькими наночастицами, вызывая самосборку агрегированных структур, которые препятствуют взаимодействию большего количества белков с пустой поверхностью из-за стерических эффектов.

Наконец, каждый гемопротейн сохраняет свою общую (четвертичную) структуру при адсорбции. Тем не менее небольшие изменения в третичной структуре (т. е. организации спиралей) происходят для небольших белков, но не для больших. Эти изменения могут объяснить модификации свойств оксигенации, обнаруженные для гемоглобина, адсорбированного на наночастицах кремнезема.

Отсутствие каких-либо структурных модификаций больших белков также может представлять большой интерес для создания переносчиков кислорода на основе гемоглобина. Инкапсуляция гемоглобина внутри полисахаридных гидрогелей дает возможность для замены эритроцитов в процессе переливания крови, что представляет особую значимость для спасения жизни при травматическом кровоизлиянии или хирургических операциях [13]. Тем самым становится актуальным контроль размера белковых молекул, особенно гемоглобина, как для наномедицины, так и для нанотоксикологии.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гемоглобин выполняет в организме важнейшие функции [14] и является индикатором многих заболеваний, поэтому в современном научном мире этот белок является объектом пристальных исследований. За последние годы появилось множество статей, в которых описываются взаимодействия гемоглобина с различными внешними факторами. Существует ряд статей, в которых обсуждаются различные патологии, связанные с уровнем белка [15, 16]. В данной работе для исследований был выбран человеческий гемоглобин фирмы

Sigma H7379 ( $pI \sim 6.8$ , молекулярный вес составляет 64 500 Да), а в качестве растворителя — вода для инъекций (АО «Новосибхимфарм»,  $pH \sim 7.0$ ). Главная особенность белка гемоглобина заключается в его способности обратимо присоединять кислород и углекислый газ [17]. Значения  $pH$  измерялись каждый раз при разведении новой серии растворов с помощью  $pH$ -метра фирмы Mettler Toledo. Измерения проводились при температуре  $20^\circ\text{C}$ . Для исследования растворов гемоглобина при различных  $pH$  использовались кислота  $\text{HCl}$  и основание  $\text{KOH}$ . Они добавлялись поочередно в воду для инъекций для получения нужного значения  $pH$ , а затем в раствор с заданным значением  $pH$  добавлялся раствор гемоглобина концентрацией 20 мг/мл и шагом 12.5 мкл. Полученные значения для концентрации гемоглобина составляли от 0.05 мг/мл до 0.25 мг/мл с шагом 0.05 мг/мл. В качестве ионов железа использовался водный 30%-й раствор хлорида железа III, препарат фирмы Рапгеас. В исследуемом разбавленном растворе концентрация составляет 26 мг/мл. Для эксперимента по исследованию взаимодействия гемоглобина и  $\text{FeCl}_3$  использовалось 12.5 мкл из раствора гемоглобина с концентрацией 20 мг/мл и добавлялось в 5 мл воды. В этом случае измерения проводились для концентрации  $\text{FeCl}_3$  от 0 мг/мл до 0.125 мг/мл с шагом 0.025 мг/мл. Все вышеперечисленные растворы готовились таким образом, чтобы получились растворы, содержащие пониженную, нормальную и избыточную концентрации ионов железа по сравнению с концентраций молекул гемоглобина.

Все эксперименты были проведены с помощью многоугольного анализатора размеров частиц Photocor Complex [18], длина волны составляла 647 нм, мощность 25 мВт. Результаты, полученные в ходе работы, были обработаны методами статического и динамического рассеяния света [19]. Данные, полученные методом статического рассеяния света, позволили определить массу рассеивающих частиц и второй вириальный коэффициент, который отвечает за межмолекулярное взаимодействие частиц в растворе, а с помощью данных, полученных методом динамического рассеяния света, был определен коэффициент трансляционной диффузии рассеивающих частиц. Все экспериментальные результаты, полученные методом динамического рассеяния света, были обработаны с помощью программы DYNALS фирмы Alango Ltd. [20].

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВОДОРОДНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ

В ходе экспериментов с водными растворами гемоглобина были получены следующие результаты:

1. На графике (рис. 1) представлены результаты для водного раствора гемоглобина в изoeлектрической точке ( $pI \sim 6.8$ ). По полученным данным видно, что со временем и при

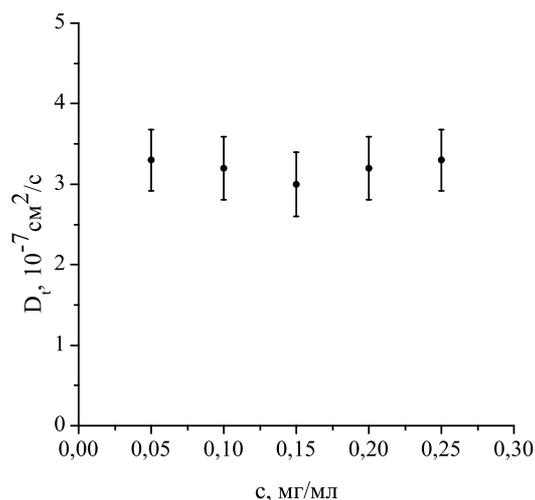


Рис. 1. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии от концентрации гемоглобина

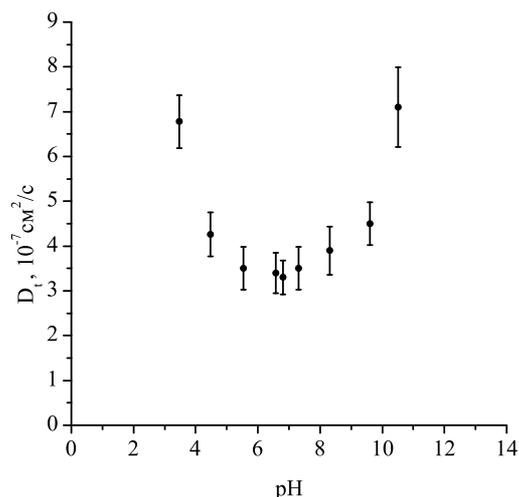


Рис. 2. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии гемоглобина от водородного показателя раствора

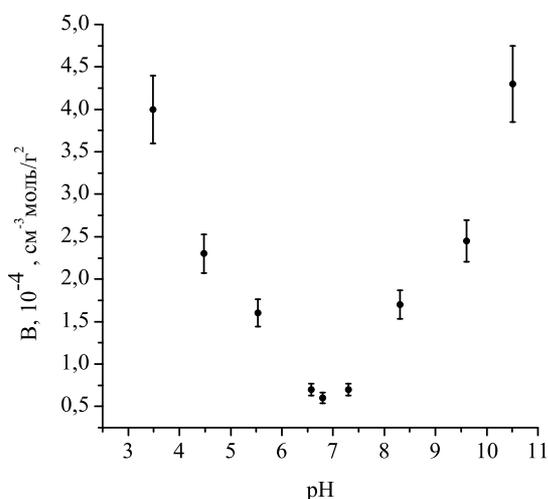


Рис. 3. График зависимости второго вириального коэффициента гемоглобина от водородного показателя раствора

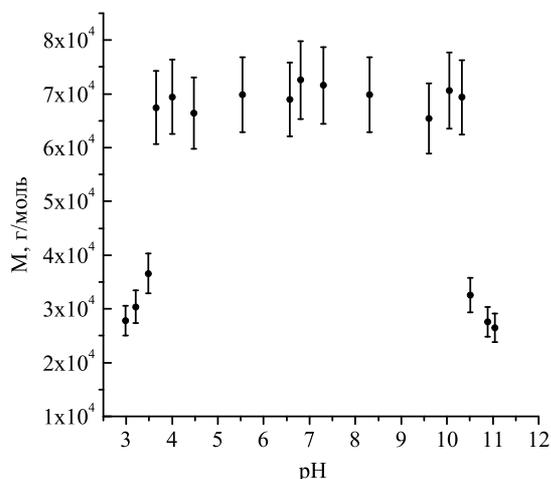


Рис. 4. График зависимости массы гемоглобина от водородного показателя раствора

изменении концентрации гемоглобина в растворе коэффициент трансляционной диффузии практически не изменяется и составляет  $D_t \approx (3.2 \pm 0.4) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ . Рассчитанный по формуле Стокса–Эйнштейна гидродинамический радиус составляет в этой серии экспериментов  $R_h \approx (6.8 \pm 0.8) \text{ нм}$ .

2. На графике (рис. 2) представлены данные для коэффициента трансляционной диффузии водного раствора гемоглобина при изменении pH среды. Из графика следует, что коэффициент диффузии меняется при изменении pH. Зависимость  $D_t$  от pH близка к пара-

болической. Такое поведение коэффициента трансляционной диффузии можно объяснить с помощью теории, предложенной Джеймсом и Эвансом. Данная зависимость  $D_t$  от поверхностного заряда на белке имеет минимальное значение в изоэлектрической точке.

3. С помощью программы Photosor были определены масса и второй вириальный коэффициент для водного раствора гемоглобина. Полученные значения составили  $M = (74 \pm 7) \text{ кДа}$  и  $B = (0.6 \pm 0.06) \text{ см}^{-3} \cdot \text{моль}/\text{г}^2$ .

4. На графике (рис. 3) представлена зависи-

мость второго вириального коэффициента  $B$  от рН раствора. Из полученных данных видно, что второй вириальный коэффициент меняется при изменении рН. Зависимость  $B$  от рН близка к параболической с минимумом (эффект Доннана) соответствующим изоэлектрической точке исследуемого белка [21].

5. На графике (рис. 4) представлены результаты для массы гемоглобина при изменении рН раствора. Масса гемоглобина остается постоянной при небольших отклонениях от изоэлектрической точки. При критических значениях рН, которые находятся в сильно кислой или щелочной областях, регистрируемая масса гемоглобина заметно уменьшается, что свидетельствует о конформационных изменениях в растворе, которые происходят при  $\text{pH} \approx (3.56 \pm 0.15)$  и  $\text{pH} \approx (10.4 \pm 0.2)$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛЯ РАСТВОРОВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ХЛОРИДА ЖЕЛЕЗА III

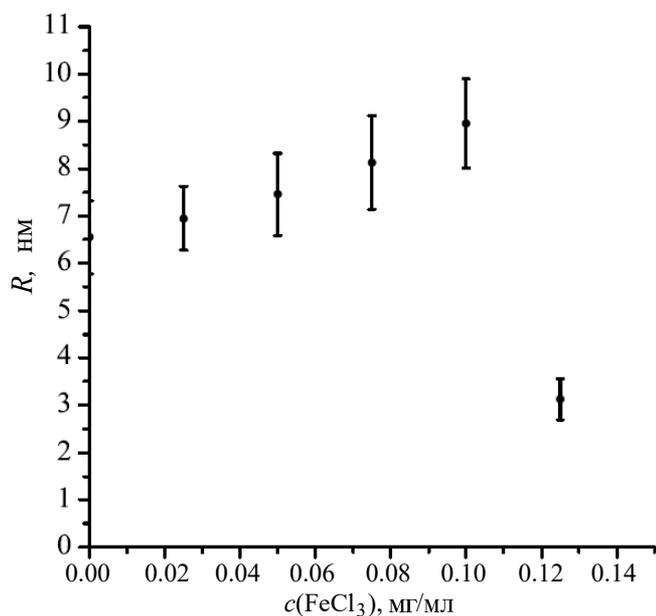


Рис. 5. График зависимости гидродинамического радиуса от концентрации хлорида железа III. Концентрация гемоглобина 0.05 мг/мл

В результате экспериментов с растворами гемоглобина, содержащими  $\text{FeCl}_3$  были получены следующие результаты:

1. На графике (рис. 5) представлены данные для гидродинамического радиуса рассеивающих частиц при добавлении в раствор гемоглобина хлорида железа. По полученным данным видно, что гидродинамический радиус  $R_h$  имеет тенденцию к увеличению при добавлении  $\text{FeCl}_3$ , а в последней точке значение для

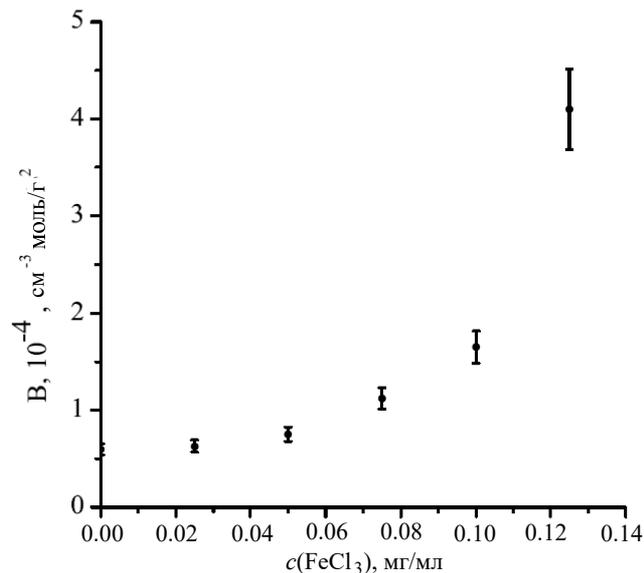


Рис. 6. График зависимости второго вириального коэффициента от концентрации хлорида железа III. Концентрация гемоглобина 0.05 мг/мл

гидродинамического радиуса испытывает скачок и уменьшается более чем в 3 раза.

2. На графике (рис. 6) представлены полученные данные для второго вириального коэффициента  $B$  при добавлении  $\text{FeCl}_3$ . По полученным данным видно, что второй вириальный коэффициент растёт при увеличении концентрации  $\text{FeCl}_3$ , а в последней точке значение для коэффициента  $B$  испытывает сильный скачок.
3. На графике (рис. 7) представлены полученные результаты для массы гемоглобина при добавлении  $\text{FeCl}_3$ . По результатам видно, что при добавлении  $\text{FeCl}_3$  в раствор гемоглобина значение массы рассеивающих частиц проявляет тенденцию к увеличению. Но при достижении определенной концентрации  $\text{FeCl}_3$  значение массы сильно уменьшается (примерно в 4 раза).

Из полученных экспериментальных данных видно, что в водных растворах гемоглобин ведет себя стабильно, его гидродинамический радиус  $R_h$  и коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  остаются постоянными и не зависят от концентрации гемоглобина в растворе в исследуемом диапазоне концентраций. Полученные значения для гидродинамического радиуса гемоглобина  $R_h$  и коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  в изоэлектрической точке составили соответственно  $R_h \approx (6.8 \pm 0.8)$  нм и  $D_t \approx (3.2 \pm 0.4) \times 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{с}$ , что согласуется с литературными данными [22–24].

При изменении рН раствора коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  изменяется и зависимость  $D_t$  от рН близка с параболической. Это связано

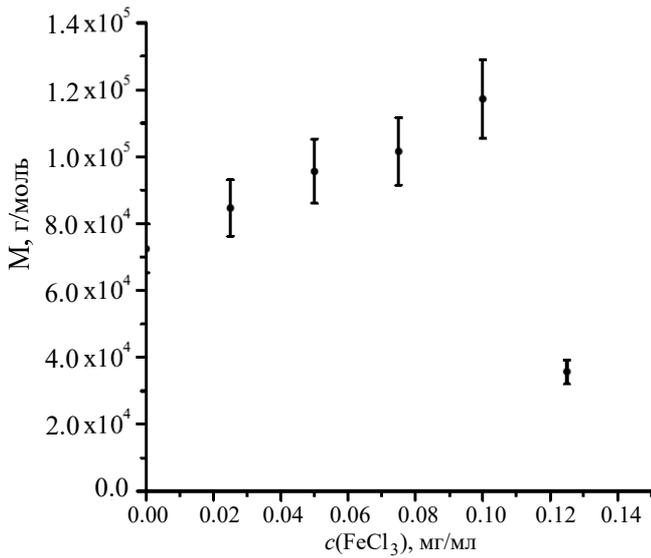


Рис. 7. График зависимости массы от концентрации хлорида железа III. Концентрация гемоглобина 0.05 мг/мл

с тем, что при отклонении pH от изоэлектрической точки заряд на белке возрастает (как в положительную, так и в отрицательную стороны), молекула белка перестает быть электронейтральной и создает вокруг себя электрическое поле, за счет чего отталкивание частиц друг от друга происходит с большей силой и подвижность частиц увеличивается. Зависимость второго вириального коэффициента  $B$  от pH раствора имеет также параболический вид, что согласуется с теорией Скэтчарда [25].

Зависимость массы гемоглобина  $M$  от pH раствора имеет существенно нелинейный характер. При небольших отклонениях pH от изоэлектрической точки гемоглобина масса белка практически не изменяется в пределах погрешности и составляет  $M = (69 \pm 7)$  кДа. Но при сильно кислотных значениях водородного показателя ( $\text{pH} \approx (3.56 \pm 0.15)$ ) и сильно щелочных значениях водородного показателя ( $\text{pH} \approx (10.4 \pm 0.2)$ ) значение массы заметно уменьшается и составляет  $M = (34 \pm 3)$  кДа. Похожие результаты для значений молекулярной массы субъединиц гемоглобина были получены в работе по исследованию белка гемоглобина *Daphnia Magma* [26]. Это может быть связано с тем, что при некоторой критической величине pH на белке возникает большой поверхностный заряд, который приводит к тому, что молекула распадается как на димеры ( $\alpha\beta$ ), так и на отдельные глобулы ( $\alpha$  и  $\beta$ ). Таким образом, в растворе присутствуют частицы с различными молекулярными массами. Следовательно, при pH, сильно далеких от изоэлектрической точки, определяемая нами масса  $M$  является средним значением от масс всех частиц молекулы гемоглобина, присутствующих в растворе. При дальнейшем уменьшении или увеличении pH в кислотную или щелочную области масса рассеивающих частиц продолжает слегка уменьшаться,

что свидетельствует о том, что распад четвертичной структуры продолжается и в растворе возникает больше мономеров, т.е. отдельных  $\alpha$ - и  $\beta$ -спиралей, вследствие чего полученное значение для средней массы рассеивающих частиц в растворе уменьшается.

#### 4. СМЕСИ

При добавлении в раствор гемоглобина  $\text{FeCl}_3$  гидродинамический радиус частиц  $R_h$  увеличивается, коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  уменьшается, при этом второй вириальный коэффициент  $B$  и масса  $M$  увеличиваются. Это объясняется тем, что при добавлении  $\text{FeCl}_3$  размер частиц немного увеличивается, что может быть связано с адсорбцией частиц  $\text{FeCl}_3$  на поверхности гемоглобина.

Рассмотрим результаты, полученные для массы частиц при добавлении  $\text{FeCl}_3$  (рис. 7).

В первой точке концентрация хлорида железа составляет  $c_{\text{FeCl}_3} = 0$  мг/мл, концентрация гемоглобина —  $c_{\text{Hb}} = 0.05$  мг/мл, а полученное значение для массы рассеивающих частиц  $M = (72 \pm 7)$  кДа.

Можно оценить число молекул гемоглобина:  $c_{\text{Hb}} = 0.05$  мг/мл,

объем раствора  $V = 5$  мл  $\Rightarrow m_{\text{Hb}} = 0.25$  мг.

$M_{\text{Hb}} \approx 67000$  г/моль  $\Rightarrow \nu_{\text{Hb}} = (m_{\text{Hemo}})/(M_{\text{Hemo}}) = (0.25 \text{ мг})/(67000 \cdot 1000 /) \approx 3.73 \times 10^{-9}$  моль. Отсюда количество частиц гемоглобина в растворе при отсутствии  $\text{FeCl}_3$ :  $N_{\text{Hb}} \approx \nu_{\text{Hb}} \cdot N_A = 3.73 \times 10^{-9} \text{ моль} \cdot 6 \times 10^{23} \text{ моль}^{-1} \approx 2.2 \cdot 10^{15}$ .

Во второй точке концентрация  $\text{FeCl}_3$  составляет  $c_{\text{FeCl}_3} = 0.025$  мг/мл, концентрация гемоглобина —  $c_{\text{Hb}} = 0.05$  мг/мл, а полученное значение для массы рассеивающих частиц  $M = (85 \pm 8)$  кДа.

Можно оценить число молекул  $\text{FeCl}_3$  в растворе:  $c_{\text{FeCl}_3} = 0.025$  мг/мл,

объем раствора  $V = 5$  мл  $\Rightarrow m_{\text{FeCl}_3} = 0.125$  мг.

$M_{\text{FeCl}_3} \approx 162$  г/моль  $\Rightarrow \nu_{\text{FeCl}_3} = (m_{\text{FeCl}_3})/(M_{\text{FeCl}_3}) = (0.125 \text{ мг})/(162 \cdot 1000 \text{ мг/моль}) \approx 7.7 \times 10^{-7}$  моль. Отсюда количество частиц  $\text{FeCl}_3$  во втором растворе:  $N_{\text{FeCl}_3} \approx \nu_{\text{FeCl}_3} \cdot N_A = 7.7 \times 10^{-7} \text{ моль} \cdot 6 \times 10^{23} \text{ моль}^{-1} \approx 4.6 \times 10^{17}$ . Рассчитаем количество частиц  $\text{FeCl}_3$ , которое приходится на одну молекулу гемоглобина:  $N_{\text{FeCl}_3/\text{Hb}} = N_{\text{FeCl}_3}/N_{\text{Hb}} = (4.6 \times 10^{17})/(2.2 \times 10^{15}) \approx 200$  молекул  $\text{FeCl}_3$  приходится на 1 молекулу гемоглобина во втором случае.

И, наконец, в шестой точке концентрация  $\text{FeCl}_3$ :  $c_{\text{FeCl}_3} = 0.125$  мг/мл, концентрация гемоглобина  $c_{\text{Hb}} = 0.05$  мг/мл, а полученное значение для массы рассеивающих частиц  $M = (36 \pm 4)$  кДа.

Полученные значения для массы рассеивающих частиц резко уменьшаются по сравнению с предыдущими пятью точками, а pH среды, измеренный после проведения эксперимента с концентрацией  $\text{FeCl}_3$ , равной  $c_{\text{FeCl}_3} = 0.125$  мг/мл,  $\text{pH} \sim 3.42$ . Из чего можно сделать вывод, что в растворе происходят конформационные изменения, т.к.  $\text{FeCl}_3$  изменяет pH раствора до такого значения, при котором

происходит распад четвертичной структуры гемоглобина на димеры и мономеры.

Если сравнить полученные результаты для расчета количества частиц  $\text{FeCl}_3$  на молекулу гемоглобина и значения для массы рассеивающих частиц, то можно получить зависимость массы от количества частиц хлорида железа. Если предположить, что увеличение массы частиц связано с адсорбцией частиц  $\text{Fe}^{3+}$  на поверхности гемоглобина, то можно проследить закономерность в приросте массы (таблица).

Таблица. Сравнение полученной массы рассеивающих частиц и количества частиц  $\text{Fe}^{3+}$ , приходящихся на 1 молекулу гемоглобина

$c_{\text{FeCl}_3}$ , мг/мл	$M$ , кДа	$N(\text{Fe}^{3+})$ на 1 молекулу $Hb$
0	$72 \pm 7$	0
0.025	$84 \pm 8$	200
0.05	$95 \pm 9$	413
0.075	$101 \pm 10$	625
0.1	$117 \pm 12$	803
0.125	$36 \pm 4$	Распад

Например в точке, где первый раз в водный раствор гемоглобина был добавлен хлорид железа ( $c_{\text{FeCl}_3} = 0.025$  г/моль), прирост массы рассеивающих частиц составил  $\Delta M \approx (12 \pm 1)$  кДа, что сопоставимо с массой  $\text{Fe}^{3+}$  в данном растворе, приходящейся на 1 молекулу гемоглобина:  $M_{\text{Fe}^{3+}} = M_{\text{Fe}^{3+}} \cdot N_{\text{Fe}^{3+}} \approx 11200$  кДа. Во второй точке, где концентрация хлорида железа была  $c_{\text{FeCl}_3} = 0.05$  г/моль, прирост массы рассеивающих частиц, по сравнению с водным раствором гемоглобина, составил  $\Delta M \approx (23 \pm 2)$  кДа, что также сопоставимо с массой  $\text{Fe}^{3+}$  в данном растворе, приходящейся на 1 молекулу гемоглобина:  $M_{\text{Fe}^{3+}} = M_{\text{Fe}^{3+}} \cdot N_{\text{Fe}^{3+}} \approx 23128$  кДа.

И далее, если рассматривать остальные точки, в которых в раствор добавлялся хлорид железа, такая зависимость также прослеживается.

Таким образом, можно сделать вывод, что увеличение массы рассеивающих частиц в водном растворе гемоглобина при добавлении в него  $\text{FeCl}_3$  может быть связано с адсорбцией ионов  $\text{Fe}^{3+}$  на поверхности белка. Однако при достижении определенной концентрации хлорида железа, pH раствора понижается настолько, что гемоглобин начинает претерпевать конформационные изменения, как было получено в эксперименте с растворами гемоглобина при различных pH. Эти изменения приводят к распаду четвертичной структуры, в связи с чем значения массы рассеивающих частиц резко уменьшается.

## 5. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В работе проведена серия экспериментов по исследованию процессов взаимодействия молекул гемоглобина в водных растворах, растворах с различными значениями pH, а также в растворах, содержащих различные концентрации хлорида железа. Исходя из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Гидродинамический радиус молекул гемоглобина не изменяется при изменении концентрации гемоглобина и составляет  $R_h \approx (6.8 \pm 0.8)$  нм, что согласуется с литературными данными [27].
2. Коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  гемоглобина не зависит от концентрации гемоглобина и составляет  $D_t \approx (3.2 \pm 0.4) \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с, что согласуется с литературными данными [28].
3. В изоэлектрической точке определены масса и второй вириальный коэффициент. Полученные значения составили  $M = (72 \pm 7)$  кДа и  $B = (0.6 \pm 0.06) \times 10^{-4}$  см<sup>-3</sup>моль/г<sup>2</sup>.
4. При изменении pH раствора гемоглобина коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  изменяется, причем зависимость  $D_t$  от pH имеет параболический вид. Это связано с тем, что при отклонении pH от изоэлектрической точки заряд на белке возрастает и молекула создает вокруг себя электрическое поле, за счет чего отталкивание частиц друг от друга происходит с большей силой и подвижность частиц увеличивается.
5. Зависимость второго вириального коэффициента  $B$  от pH имеет параболический вид, что согласуется с теорией Скэтчарда [29].
6. При значениях  $\text{pH} < (3.56 \pm 0.15)$  и  $\text{pH} > (10.4 \pm 0.2)$  молекула гемоглобина претерпевает конформационные изменения, в результате которых происходит распад четвертичной структуры на  $\alpha\beta$ -димеры и отдельные  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулы.
7. Добавление  $\text{FeCl}_3$  в водные растворы гемоглобина увеличивает размеры и массу частиц, что можно объяснить адсорбцией ионов  $\text{Fe}^{3+}$  на поверхности белка. Но при достижении определенной концентрации  $\text{FeCl}_3$  pH раствора понижается настолько, что происходят конформационные изменения гемоглобина, которые приводят к распаду его четвертичной структуры.

- [1] Орлов Ю.П., Говорова Н.В., Ночная Ю.А., Руднов В.А. // Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова **1**, № 2. 20 (2019).
- [2] Абрашева М.В., Андреева А.И., Виноградова О.Е., Викторович Н.Н. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. **7**, № 7. 7 (2021).
- [3] Karakochuk C.D., Hess S.Y., Moorthy D. et al. // Ann. N.Y. Acad. Sci. **1450**, N 1. 126 (2019).
- [4] Salikhova D.I., Golovicheva V.V., Fatkhudinov T.K. et al. // International Journal of Molecular Sciences **24**, N 15. 1 (2023).
- [5] Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Мин-во здравоохранения РФ, 2020.
- [6] Панина М.И. // Казанский медицинский журнал. **84**, № 4. 288 (2003).
- [7] Härmäläinen P., Saltevo J., Kautiainen H. et al. // Lipids in Health and Disease **17**. 1 (2018).
- [8] Серебряная Н.Б., Якуцени П.П. // Иммунология **41**, № 5. 458 (2020).
- [9] Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. М.: КДУ, 2012.
- [10] Slatinskaya O.V., Luneva O.G., Deev L.I. et al. // Biophysics. **66**, N 5. 797 (2021).
- [11] Лебедев В.В., Демитов В.Г., Дмитриев А.В. и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии **15**, № 4. 5 (2016).
- [12] Laurent Marichal, Jéril Degrouard, Anouchka Gatin et al. // Langmuir. **36**. 8218 (2020).
- [13] Husnain Ahmed, Essa Ahsan Khan, Bjørn Torger Stokke // Soft Matter. **19**, № 1. 69 (2023).
- [14] Ahmed M.H., Ghatge M.S., Safo M.K. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. T 94. Springer, 2020.
- [15] Forget B.G., Bunn H.F. // Cold Spring Harb Perspect Med. **1**, N 3. (2013).
- [16] Kohne E. // Dtsch Arztebl Int. **108**. 532 (2011).
- [17] David A. Gell // Blood Cells, Molecules, and Diseases. **70**, N 13. (2018).
- [18] [www.photocor.ru/products/photocor-complex](http://www.photocor.ru/products/photocor-complex)
- [19] Gast K. Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation. pp. 477–524. John Wiley & Sons, Inc., (2010).
- [20] [www.softscientific.com/science/WhitePapers/dynals1/dynals100.htm](http://www.softscientific.com/science/WhitePapers/dynals1/dynals100.htm)
- [21] Генфорд Ч. Физическая химия полимеров. М.: Химия, 1965.
- [22] Stéphane Longeville, Laura-Roxana Stingaciu // Sci. Rep. N 7. 1 (2017).
- [23] Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Носков А.И. // Вестник АГТУ. **6**. № 41. (2007).
- [24] Камминс Г., Пайк Э. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М.: Мир, 1978.
- [25] Эскин В.Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. Л.: Наука, 1986.
- [26] Lamketmeyer T., Zeis B., Decker H. // The FEBS Journal **273**, N 14. (2006).
- [27] Ленинджер А. Основы биохимии. 1–3. М.: Мир, 1985.
- [28] Петрова Г. П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Часть 1. Учебное пособие по спецкурсу кафедры молекулярной физики, 2008.
- [29] Scatchard G.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. **51**, N 4. 660 (1949).

## Studies of Light Scattering by Hemoglobin Molecules under the Effect of Iron (III) Chloride and Various pH Levels

V. V. Gibizova<sup>a</sup>, G. P. Petrova, I. A. Sergeeva, K. V. Fedorova

Department of Molecular Processes and Extreme Matter States, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University  
Moscow 119991, Russia

E-mail: <sup>a</sup>[gibizova@physics.msu.ru](mailto:gibizova@physics.msu.ru)

A lot of literature sources discuss diseases associated with the hemoglobin protein [1, 2]. In the modern world, more than 800 million people suffer from anemia [3]. Assessing the level of hemoglobin in the circulatory system is one of the ways to diagnose anemia. Hemoglobin protein is also a promising source of bioactive peptides [4]. The aim of the work was to identify the reasons leading to conformational changes of this protein. It still remains unclear what exactly causes disruption of its functionality. Human hemoglobin from Sigma H7379 was studied in the work; all experiments were conducted on a dynamic light scattering spectrometer — Photocor Complex. Experimental data were obtained using optical methods of static and dynamic light scattering. The work included an analysis of the behaviour of hemoglobin protein molecules in aqueous and aqueous-saline solutions with changes in solution parameters (pH, addition of iron chloride III). At values of  $\text{pH} < (3.56 \pm 0.15)$  and  $\text{pH} > (10.4 \pm 0.2)$ , the hemoglobin molecule underwent conformational changes, resulting in the disintegration of the quaternary structure into  $\alpha\beta$ -dimers and individual  $\alpha$ - and  $\beta$ -globules. As a result of the study, it was found that the addition of  $\text{FeCl}_3$  to aqueous solutions of hemoglobin increases the size and mass of scattering particles, which can be explained by the adsorption of  $\text{Fe}^{3+}$  ions on the protein surface. However, upon reaching a certain concentration of  $\text{FeCl}_3$ , the pH of the solution was lowered to such an extent that it caused conformational changes in hemoglobin, leading to the disintegration of its quaternary

structure. These results can be taken into account when creating medicinal drugs for the treatment of anemia and other diseases associated with the hemoglobin protein.

PACS: 33.20, 95.75.Fg.

*Keywords:* globular protein, hemoglobin, conformation, dynamic light scattering, static light scattering, molecular weight, intermolecular interaction coefficient.

*Received 08 December 2023.*

English version: *Moscow University Physics Bulletin*. 2024. **79**, No. 3. Pp. .

#### Сведения об авторах

1. Гибизова Виктория Валерьевна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: [gibizova@physics.msu.ru](mailto:gibizova@physics.msu.ru).
2. Петрова Галина Петровна — доктор физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: [petrova.phys@gmail.com](mailto:petrova.phys@gmail.com).
3. Сергеева Ирина Александровна — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: [sergeeva@physics.msu.ru](mailto:sergeeva@physics.msu.ru).
4. Федорова Ксения Вячеславовна — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: [fedorova@physics.msu.ru](mailto:fedorova@physics.msu.ru).