

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Слатинская Ольга Вадимовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ФУНКЦИОНИРОВАНИИ
ЭРИТРОЦИТА**

Специальность 1.5.2. — Биофизика (биол. науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре биофизика биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** — *Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор*
- Официальные оппоненты** — *Лопина Ольга Дмитриевна, доктор биологических наук, кафедра биохимии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, профессор*
- Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, заслуженный деятель науки Российской Федерации, профессор*
- Яминский Игорь Владимирович, доктор физико-математических наук, кафедра физики полимеров и кристаллов, профессор*

Защита диссертации состоится «14» сентября 2023 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation//015.5/2564>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-
математических наук

Фурсова П.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности.

Важная роль крови в осуществлении кислород–транспортной функции связана с ее реологическими свойствами, взаимодействием эритроцитов с другими клетками, компонентами плазмы и клетками сосудов (Муравьев и др. 2012). При гемодинамике, эритроциты человека подвержены воздействиям (рисунок 1):

1. Изменение парциального давления кислорода (pO_2), влияющего на сродство гемоглобина (Гб) к O_2 (степень оксигенации крови 75 – 5 мм рт.ст.) (Богаченко и Устинов, 2007).

2. При проникновении в тонкие капилляры (диаметр многих капилляров — 3 мкм; эритроцитов 7–8 мкм), эритроцит меняет свою форму и объем, за счет выхода до 45% воды через мембрану и изменения цитоскелета (Lang et al. 2003).

3. В капиллярах происходит изменение ζ -потенциала эритроцитов при взаимодействии заряженных групп фосфолипидов и белков поверхности плазматической мембраны эритроцита с заряженными группами на поверхности эндотелия кровеносных сосудов. Концентрация экстраклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{out}$) — один из важных регуляторов ζ -потенциала эритроцита (Tokumasu et al. 2012), изменение которого оказывает существенное влияние на активность ион-транспортных систем плазматической мембраны эритроцитов, например, Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы (Jorgensen, Håkansson, and Karlsh, 2003).

4. В зависимости от состояния организма, изменение температуры составляет 20–42 °С (температура в кончиках пальцев 20°С) (Бурякина и Кармазановский, 2011).

В настоящее время активно исследуются физико-химические параметры эритроцита: мембранный потенциал, вязкость мембраны, состояние цитоплазмы, распределение и конформация Гб при изменении pO_2 , температуры, ζ -потенциала и мембранного потенциала, а также объема клетки. Большинство физико-химических параметров Гб в данных условиях (конформация гема и глобина, сродство Гб к O_2) получены в исследованиях на выделенном из клетки Гб, что, очевидно, отличается от O_2 -связывающих свойств Гб цитоплазмы эритроцита (Kozicki et al. 2015).

Известно, что Гб содержит Fe^{2+} -протопорфирин IX (гем), который может находиться в двух конформациях (Hoard, 1971; Perutz, 1978):

1. Все атомы молекулы порфиринового «цикла» локализованы в одной плоскости («плоская» конформация гема), которая характерна для оксигенированного гемоглобина (оГб), в котором атом Fe^{2+} связан с двумя аксиальными лигандами: молекулой O_2 и имидазольной группой 64 гистидина глобина. В оГб расстояние между атомом Fe^{2+} и

плоскостью порфиринового «кольца» около 0,8 Å, а расстояние в β-цепях снижается на 2 Å и на 1,3 Å в α-цепях по сравнению с дезоксигенированной формой гемоглобина.

2. Атом Fe^{2+} в пятикоординированном состоянии «выходит» из плоскости порфиринового «кольца» («куполообразная» конформация), которая характерна для дезоксигенированного гемоглобина (дГб).

В зависимости от количества молекул O_2 , связанных субъединицами Гб, локальной концентрации ионов H^+ , CO_2 и др., возможны реализации «плоской» конформации гема, не связанного с O_2 , и «куполообразной» конформации гема, связанного с O_2 . Переход между «плоской» и «куполообразной» конформацией гема является триггером, запускающим ряд структурных перестроек глобина в ходе диссоциации (или при связывании) O_2 (Monod, 1965). При этом, для оГб характерна более «плотная» структура глобулы, чем для дГб, что возможно оценить по изменению интенсивности вклада колебаний $-CH_2$ и $-CH_3$ аминокислотных остатков КР-спектра (так, параметр I_{2880}/I_{2930} этого спектра характеризует изменение упорядоченного пространственного расположения отдельных участков полипептидной цепи без учета типа и конформации боковых радикалов аминокислот («плотность упаковки глобина»)) (Goheen et al. 1993).

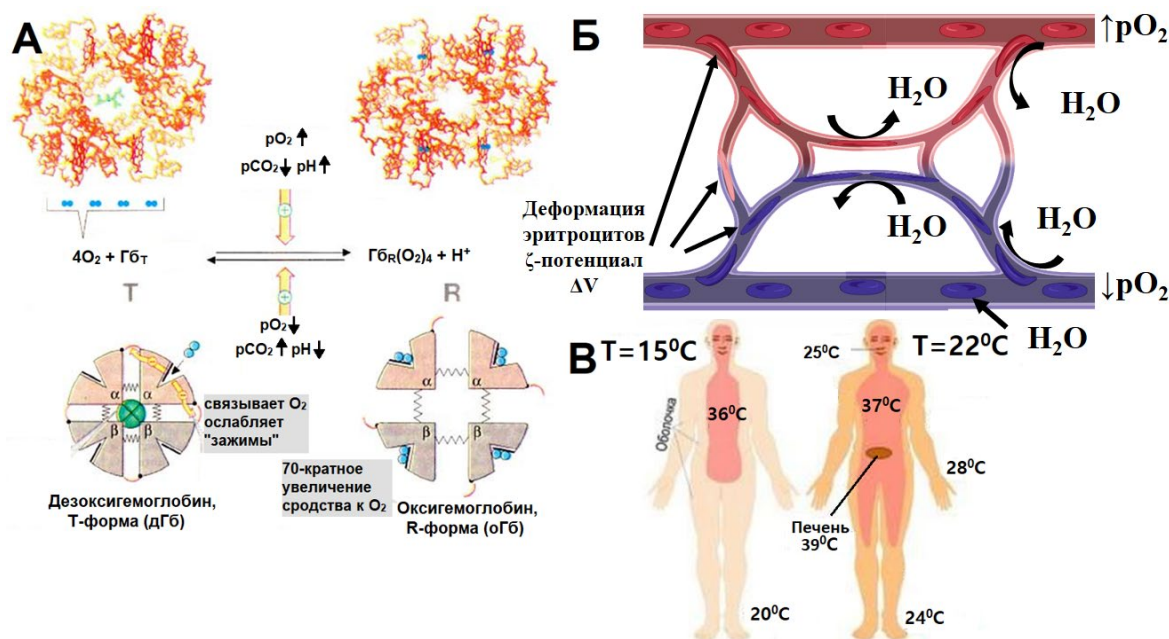


Рисунок 1 — А — аллостерическая регуляция конформации Гб (Нельсон, 2011), Б — Изменения физиологических условий и конформации Гб при гемодинамике эритроцитов, В — распределение температуры в теле человека (biorender.com)

В настоящее время существенный интерес представляют исследования конформации при различной локализации Гб в эритроците (Kang et al. 2008). Существование гетерогенного распределения Гб в клетке доказано наличием нескольких «фракций» Гб в клетке (Brazhe et al. 2009a): мембраносвязанный Гб ($Гб_{mc}$), формирующий комплекс с белком полосы 3 (БП3)

(Brazhe et al. 2009b); цитоплазматический Гб (Гб_{цп}), локализованный в цитоплазме эритроцита (0,5 и 98% от общего объема Гб в клетке соответственно). Вероятно, перераспределение плотности (или содержания) Гб_{цп} в эритроците (расстояние между молекулами — 10 Å (Meuwly and Karplus, 2022)), обусловлено формированием специфических взаимодействий между молекулами Гб в условиях «молекулярного краудинга» (система «толпящихся» молекул), реализуемых в изменении плотности упаковки глобина и конформации гема каждой молекулы Гб (Norris and Malys, 2011). Отметим, что факторы молекулярного краудинга, обуславливающие конформацию и распределение Гб_{цп} в клетке практически не исследованы.

Предметом исследования настоящей работы являются изменения конформации и распределения Гб в эритроците в зависимости от функционального состояния нативной клетки методами молекулярной спектроскопии и оптической микроскопии.

Целью данной работы было исследовать конформацию и распределение гемоглобина (конформация гема и глобина Гб_{цп} и Гб_{мс}, распределение Гб_{цп} в цитоплазме) при изменении pO₂, температуры, ζ-потенциала плазматической мембраны клетки, объема и гомеостаза ионов Na и K в клетке.

Для достижения цели были поставлены следующие экспериментальные **задачи**:

1. Исследование конформации гема и глобина Гб в эритроците при изменении pO₂, (в интервале pO₂ 118–2 мм рт.ст.)
2. Исследование конформации гема и глобина Гб в эритроците при изменении температуры (в интервале температур 20–42 °С);
3. Исследование конформации гема и глобина Гб в эритроците при изменении поверхностного заряда плазматической мембраны клетки (изменение экстраклеточной концентрации Ca²⁺ в интервале 1 мМ — 1 мкМ);
4. Исследование конформации гема и глобина Гб в эритроците при изменении внутриклеточной концентрации Na⁺ в интервале 80–106 мМ (при блокировании Na⁺/K⁺-АТФазы);
5. Исследование конформации гема и глобина Гб в эритроците при патологии (идиопатической легочной гипертензии (ИЛГ)).

Объектами исследования являются цельная кровь человека, суспензия эритроцитов (СЭ) в физиологическом буфере, выделенный Гб и тени эритроцитов (ТЭ) в фосфатном буфере; кровь пациентов с подтвержденной ИЛГ.

Положения, выносимые на защиту:

В условиях гипоксии (снижение pO₂ в суспензии эритроцитов до 2 мм рт.ст.), в эритроците увеличивается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и глобина в конформации с более высокой плотностью упаковки белка. При физиологических

условиях (при повышении температуры от 20 до 42 °С), выявлено увеличение ζ -потенциала и снижение плотности упаковки глобина Гб, а также увеличение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации и обнаружено перераспределение молекул Гб из центральной области дискоцита к внутренней поверхности плазматической мембраны.

Распределение Гб_{цп} в цитоплазме гетерогенно и меняется при различных функциональных состояниях эритроцита: увеличение ζ -потенциала клетки приводит к перераспределению молекул Гб_{цп} в цитоплазме (к увеличению содержания молекул Гб с увеличением плотности упаковки глобина в центральной части эритроцита). Доказано, что увеличение ζ -потенциала эритроцита (при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$) сопровождается как перераспределением молекул Гб_{цп} из центральной области к краю клетки, так и увеличением вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации и снижением плотности упаковки молекулы глобина.

Разработан подход на основе КР-спектроскопии, позволяющий определить состояние гема Гб_{цп}, характерного для пациентов с редкими формами гипоксии.

Научная новизна работы:

С помощью ИК- и КР-спектроскопии установлено, что при физиологических условиях (изменение pO_2 , температуры (20–42 °С), увеличение ζ -потенциала), возрастает вероятность нахождения гема Гб в «куполообразной» конформации и снижается плотность упаковки глобина Гб, а также происходит перераспределение молекул Гб из центральной области дискоцита клетки ближе к внутренней поверхности плазматической мембраны.

Доказано, что на способность Гб связывать и переносить кислород в цитоплазме эритроцита оказывают существенное влияние изменения конформации гема и плотность упаковки молекулы глобина, а также, гетерогенность распределения Гб в цитоплазме клетки.

Научная и практическая значимость:

Данные, полученные методами молекулярной спектроскопии, расширяют имеющиеся представления молекулярной и клеточной биофизики о конформации и перераспределении (локализации) Гб в эритроците при различных физиологических условиях (изменение pO_2 , температуры (20–42 °С), ζ -потенциала мембраны), изменяющихся при гемодинамике эритроцитов. Полученные результаты важны для понимания взаимодействий глобиновой части молекулы Гб с гемом, влияющих на сродство Гб к O_2 .

Выявленные механизмы изменения конформации глобиновой и гемовой частей молекулы Гб могут быть использованы для формирования новых методов диагностики при патологии (ИЛГ), подтверждено патентом № 2770820 «Способ прогнозирования тяжести идиопатической легочной гипертензии».

Апробация результатов исследования:

Основные результаты работы докладывались на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ, 15 Российских и международных конференциях¹, а также, опубликованы 7 статей в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI (РИНЦ), 1 патент, 13 тезисов в сборниках докладов международных и российских научных конференций.

Объем и структура диссертации:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 253 страницы и содержит 87 рисунков, 13 таблиц и 400 источников литературы.

Основное содержание работы

Введение

Обоснована актуальность темы диссертации, формулируется цель и задачи исследования, приводятся положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

Анализируются современные представления о строении и функциях эритроцита, конформации Гб_{цп} и Гб_{мс} при изменении рО₂, температуры и ζ-потенциала мембраны. Систематизированы современные данные о функционировании эритроцитов, конформации Гб_{цп} и Гб_{мс} и их распределении и упорядоченности в цитоплазме эритроцита. Рассмотрены современные представления об изменении конформации гема и глобина при осуществлении кислород-транспортной функции эритроцита. Особое внимание уделено анализу данных и гипотез о перераспределении Гб_{цп} внутри эритроцита (влияние рО₂ и температуры на конформацию гема и глобина, исследование роли изменения объема, [Na⁺]_{in} и ζ-потенциала эритроцита в регуляции конформации гема и глобина и распределения молекул Гб в эритроците). В последней главе рассмотрены молекулярные процессы в эритроцитах при различных заболеваниях человека.

¹ VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019), Актуальные вопросы биологической физики и химии (Москва, 2019), «Ломоносов-2019» (Москва, 2019), XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Санкт-Петербург, 2020), 11th ICAVS (Краков, 2021), 7-й Урало-Сибирский семинар «Спектроскопия комбинационного рассеяния света» (Екатеринбург, 2021), Форум молодых кардиологов «Спорные вопросы и инновации в современной кардиологии» (Москва 2021) и др.

Материалы и методы

Пробоподготовка объектов исследования: Изменение ζ -потенциала проводили снижением $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ, поликатионным боронированным амидом хлорина еб, изменением pO_2 (внутри герметичного бокса проводили смешивание доли смеси азота и 0,04% CO_2 и атмосферного кислорода при комнатной температуре, в течение 20 минут при постоянном перемешивании при скорости потока 0,1 л/мин) и температуры (20–42 °С). Изменение объема клетки осуществляли осмотическим гемолизом и инкубацией СЭ с 3 мМ уабаином.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) для исследования конформации гема и плотности упаковки глобина Гб. Для оценки конформационных изменений гема и плотности упаковки глобина $G_{цп}$ и $G_{мс}$ методом КР (Wood, Hammer, and McNaughton, 2005a) и ГКР (гигантское комбинационное рассеяние) (Brazhe et al. 2009a) использовали КР-спектрометр NTEGRA-SPECTRA (NT-MTD, Россия) в диапазоне 1000–3200 cm^{-1} , разрешение 1 cm^{-1} , объектив 5x (NA= 0,15), мощность лазера на образце менее 3 мВт.

Для выявления упорядоченности молекул $G_{цп}$ использовали КР-спектрометр WITec alpha 300 с поляризатором (ThorLabs) в диапазоне 200–3100 cm^{-1} , разрешение — 0,3 cm^{-1} , объектив — 20x, мощность лазера на образце менее 5 мВт (Wood, Hammer, and McNaughton, 2005b).

Для регистрации КР-изображения эритроцита, разбавленную буфером Аллена в 1000 раз СЭ наносили на предметное стекло. Регистрацию осуществляли в диапазоне 920–3200 cm^{-1} , разрешение 1 cm^{-1} , увеличение 40x, мощность лазера — 5 мВт, шаг измерения 1,33 мкм, количество точек измерений — 16x16. Обработку КР-спектров проводили в программе OriginPro2020. Измерения КР проводили при длине волны возбуждения 532 нм

Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ) для определения морфологии клетки. Для оценки изменения геометрических оптических свойств объектов (морфологии клетки, концентрации внутриклеточного вещества и т.д.) (Vishnyakov et al. 2004; Yusipovich et al. 2008) исследование проводили на лазерном интерференционном микроскопе на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия), объектив 30x (NA=0,65), мощность полупроводникового лазера (650 нм) на объекте — 2 мВт. Размер регистрируемого кадра — 195x145 мкм, разрешение 782x582 точек. Время регистрации изображения 10 сек (Yusipovich et al. 2011). Восстановление фазового изображения по интерферограммам методом фазовых шагов проводили в программе WinPhast.

Фазово-контрастная микроскопия (ФКМ) для определения распределения $G_{цп}$ п. Для анализа динамики изменения цитоплазмы клетки применяли экспериментальную установку, разработанную во ВНИИОФИ — дифференциальный микротомограф с точечным

светодиодом (650 нм), широко апертурным объективом 100х, разрешением регистрируемого кадра 80х80 мкм (Vishnyakov et al. 2018).

Измерение ζ -потенциала эритроцитов и гидродинамического радиуса молекул, выделенного Гб (динамическое рассеяние света) проводили на приборе Zetasizer NanoZS (Malvern, Великобритания);

Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэмбли применяли для оценки влияния $[Ca^{2+}]_{out}$ на олигомеризацию молекул Гб и степени его связывания с мембраной при изменении ζ -потенциала мембраны (Laemmli, 1970);

Для диагностики конформационного состояния глобина использовали счет одиночных фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) флуоресценции триптофана (Trp) (τ_{fl} Trp) в области 340 нм (возбуждение флуоресценции при 261 нм импульсным УФ-светодиодом (EPLLED 265 нм) регистрировали 16-канальным коррелированным по времени спектрографом с однофотонным счетом (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия) (Maksimov et al. 2017).

Конформацию глобина исследовали с помощью ИК-спектрометра с приставкой НПВО (неполное внутреннее отражение) Spectrum Two (Perkin Elmer, США) в диапазоне 500–4500 cm^{-1} (Creteur, Neves, and Vincent, 2009);

Определение содержания $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в эритроците проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрометра Квант-2М (КОРТЭК, Россия) (Fedorov et al. 2021), содержание белка определяли методом Бредфорд (Zor and Selinger, 1996) на спектрофотометре V560 (JASCO, Япония).

Статистический анализ проводили с использованием теста Манна-Уитни или дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

1. Исследование конформации гемоглобина в эритроците при изменении парциального давления кислорода (от 118 до 2 мм рт.ст.)

При снижении парциального давления кислорода со 118 до 2 мм рт.ст. наблюдаются характерные для оГб и дГб изменения в спектрах КР (1000–1700 cm^{-1}). При фиксированном pO_2 обнаружены существенные различия в КР-спектрах (в диапазоне 1355–1580 и 2800–3000 cm^{-1}) для СЭ и выделенного Гб, что, вероятно, свидетельствует о различном связывании гемом O_2 (Marzec et al. 2014a) за счет как изменения конформации гема Гб (переход из «плоской» в «куполообразную» конформацию), так и конформации глобина (укладка белка, соответствующая форме оГб и дГб) (Goheen et al. 1993; Harvey, 2022).

Вероятно, различия между конформацией гема и глобина в СЭ и выделенном Гб (максимально выраженные при 118 мм рт.ст.), обусловлены увеличением упорядоченности локализации (гетерогенное распределение) молекул Гб в цитоплазме клетки по сравнению с гомогенным распределением выделенного Гб в среде инкубации. Изменение величин соотношений интенсивностей пиков КР-спектра глобина (I_{2930}/I_{2850} и I_{2880}/I_{2850}) свидетельствует о том, что для СЭ (по сравнению с выделенным Гб, $pO_2 = 2$ мм рт.ст.) характерно увеличение вклада симметричных колебаний концевых $-CH_3$ -радикалов аминокислот глобина по сравнению с симметричными колебаниями $-CH_2$ -групп аминокислот (рисунок 2) (Goheen et al. 1993). Вероятно, в цитоплазме эритроцита молекулы Гб формируют ассоциаты (олигомерные комплексы), функционирование которых регулируется процессами молекулярного краудинга.

При снижении pO_2 нами выявлены изменения ζ -потенциала СЭ от $-20,8 \pm 0,5$ мВ ($pO_2 = 118$ мм рт.ст.) до $-15,7 \pm 1,3$ мВ ($pO_2 = 2$ мм рт.ст.), которые, вероятно, инициируют процесс сорбции-десорбции дГб в эритроците (Атауллаханов и др. 2018). Например, за счет электростатического взаимодействия анионного участка БПЗ, дГб формирует комплекс с БПЗ, который при связывании O_2 распадается, и оГб транспортируется в цитоплазму клетки (Huang et al. 2001; Olver, 2022). Вероятно, для глобина Гб_{цп} характерны изменения конформации как за счет перераспределения молекул в клетке, которое зависит от величины ζ -потенциала, долей бикарбонат ионов внутри клетки (HCO_3^-), АТФ, 2,3-бисфосфоглицерата (Ciaccio, Coletta, and Coletta 2021; Harvey, 2022).

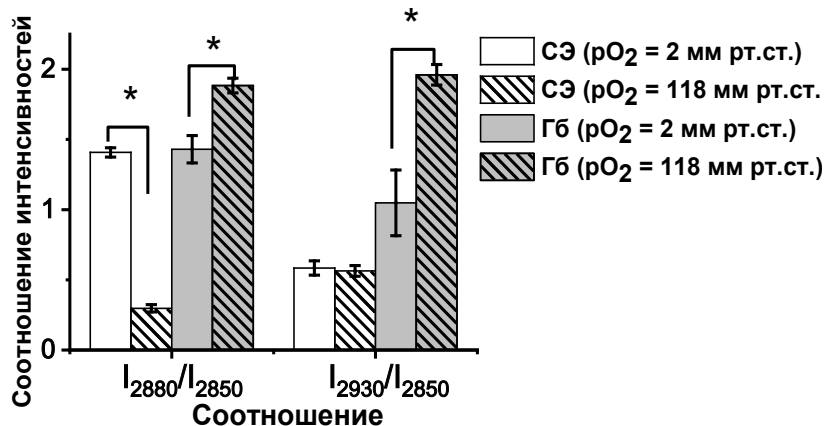


Рисунок 2 — Зависимость соотношений величин соотношений интенсивностей пиков КР-спектра глобина Гб в клетке (СЭ) и выделенном Гб от pO_2 . Данные представлены как среднее \pm SE, * $p < 0,05$ ($n = 10$)

Очевидно, что ассоциаты (олигомерные комплексы) Гб в клетке находятся в более упорядоченном состоянии, чем в растворе (за счет макромолекулярного краудинга), что сопровождается высокой вероятностью нахождения гема Гб_{цп} в «куполообразной» конформации и снижением плотности упаковки глобина (Meuwly and Karplus, 2021).

При изменении pO_2 , конформация гема Гб описывается S-образной кривой, форма которой различна для Гб СЭ и выделенного Гб (рисунок 3А). Характер изменений вклада валентных симметричных колебаний полуколец пиррола к ассиметричным колебаниям связей

пиррольных полуколец гема (I_{1375}/I_{1172}) и валентных колебаний винильных групп гема (I_{1550}/I_{1580}) в СЭ при различном pO_2 , свидетельствует о немонотонном увеличении вероятности нахождения гема Гб в «куполообразной» конформации (снижение I_{1375}/I_{1172} и I_{1550}/I_{1580}) и изменении конформации глобина (снижение I_{2880}/I_{2930} , изменение вклада колебаний –СН групп аминокислот) (рисунок 3Б) (Goheen et al. 1993; Marzec et al. 2014a). Вероятно, выявленные различия в плотности упаковки глобина свидетельствуют о том, что глобин в клетке и растворе имеет различную конформацию и, соответственно, гем обладает различной чувствительностью к O_2 : у гема в Гб СЭ выше сродство к O_2 , чем у выделенного Гб.

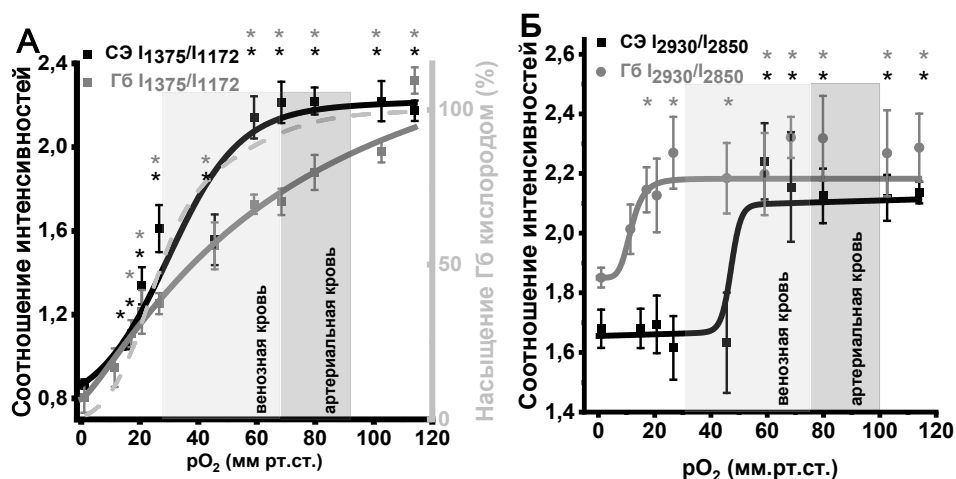


Рисунок 3 — Зависимость величины соотношений интенсивностей пиков КР–спектра гема и глобина Гб в клетке и выделенного Гб от pO_2 (118–2 мм рт.ст.). Серым прямоугольником выделена область, с pO_2 венозной и артериальной крови (Muravyov et al. 2013): А —изменение вклада валентных колебаний связей пиррольных полуколец гема Гб. Пунктирной линией указана величина кривой Бора для СЭ (Schmidt-Nielsen 1984), Б —вклад изменений симметричных колебаний концевых CH_3 -радикалов аминокислот по отношению к симметричным колебаниям CH_2 -групп аминокислот. Данные представлены как среднее \pm SE, * — различия относительно $pO_2 = 2$ мм рт.ст., $p < 0,05$ ($n = 6$)

2. Исследование конформации гемоглобина в эритроците при изменениях температуры (20–42 °С)

Для исследования механизма взаимодействия глобиновой части Гб и гема в цитоплазме клетки (в условиях молекулярного краудинга, по сравнению с выделенным Гб), изменяли температуру среды инкубации эритроцитов (в диапазоне 20–42 °С, при фиксированном значении pO_2). С ростом температуры в геме Гб эритроцита было выявлено снижение вклада валентных колебаний пиррольных колец (снижение I_{1375}/I_{1127}) и винильных групп (снижение I_{1580}/I_{1550}) и соотношений характеризующих плотность упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930} и I_{2930}/I_{2850} возрастают при увеличении плотности упаковки глобина), что, возможно, обусловлено сближением молекул (формирование олигомерных комплексов) Гб за счет макромолекулярного краудинга (рисунок 4А) (Minton, 2001).

С помощью регистрации флуоресценции Тгр в СЭ, исследовали изменения конформации глобина при увеличении температуры среды инкубации: выявлено уменьшение полуширины пика флуоресценции на полувысоте на $5 \pm 0,7$ нм и увеличение симметричности спектра флуоресценции Тгр СЭ, смещение максимума спектра флуоресценции Тгр СЭ (обусловлены главным образом Гб_{цп}) в коротковолновую область (на 3 нм, рисунок 4Б). Смещение максимума флуоресценции может быть связано с тем, что при распаде «ассоциатов» Гб (олигомерных комплексов или просто комплексов) в цитоплазме СЭ снижается энергия, которую Тгр Гб тратит на тепловую релаксацию перед актом испускания кванта флуоресценции. В этих условиях увеличивается симметричность спектра флуоресценции Тгр в СЭ и величина среднего τ_{fl} (с $135,8 \pm 5,9$ при 20 °С до $257,7 \pm 7,4$ при 42 °С) приближается к значениям, близких к среднему τ_{fl} выделенного Гб ($290,9 \pm 2,2$ при 20 °С и $291,5 \pm 4,3$ при 42 °С), что свидетельствует о «тушении» флуоресценции Тгр вследствие более «тесных» взаимодействий Тгр с микроокружением в молекулах Гб эритроцитов по сравнению с выделенным Гб. Важно отметить, что с увеличением температуры, соотношение I_{2880}/I_{2930} и среднее τ_{fl} в СЭ становится близким к значению величины соотношения для выделенного Гб. В то время, как для медленной компоненты (Тгр в положении $\alpha 214$, $\beta 215$, $\beta 217$ — удалены от гема в глобине) и быстрой компоненты τ_{fl} (Тгр в положении $\alpha 14$, $\beta 15$, $\beta 37$ — расположены рядом с локализацией гема в глобине), изменения с увеличением температуры аналогичны, что, вероятно, свидетельствует о снижении плотности белковой глобулы как в области локализации гема, так и на внешней стороне белковой глобулы глобина (рисунок 4В) (Li, Nagai, and Nagai 2000; Mahato et al. 2010).

Вероятно, с увеличением температуры в цитоплазме эритроцита происходит снижение взаимодействия Гб с соседними молекулами Гб (распад олигомерных комплексов Гб_{цп}) и формирование более гомогенного распределения Гб_{цп} в цитоплазме. Отметим, что после 38 °С наблюдается снижение интенсивности взаимодействия между молекулами Гб в клетке, что, вероятно, уменьшает вероятность образования олигомерных комплексов Гб_{цп} и, соответственно, гетерогенного распределения Гб в цитоплазме. В данных условиях выявлено снижение плотности упаковки глобина и увеличение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации (при этом с увеличением температуры в диапазоне 38–42 °С, наблюдается более эффективное снижение вероятности образования олигомерных структур, снижение плотности упаковки глобина и вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации), что подтверждает теоретические предположения, высказанные в работе (Meuwly and Karplus, 2021).

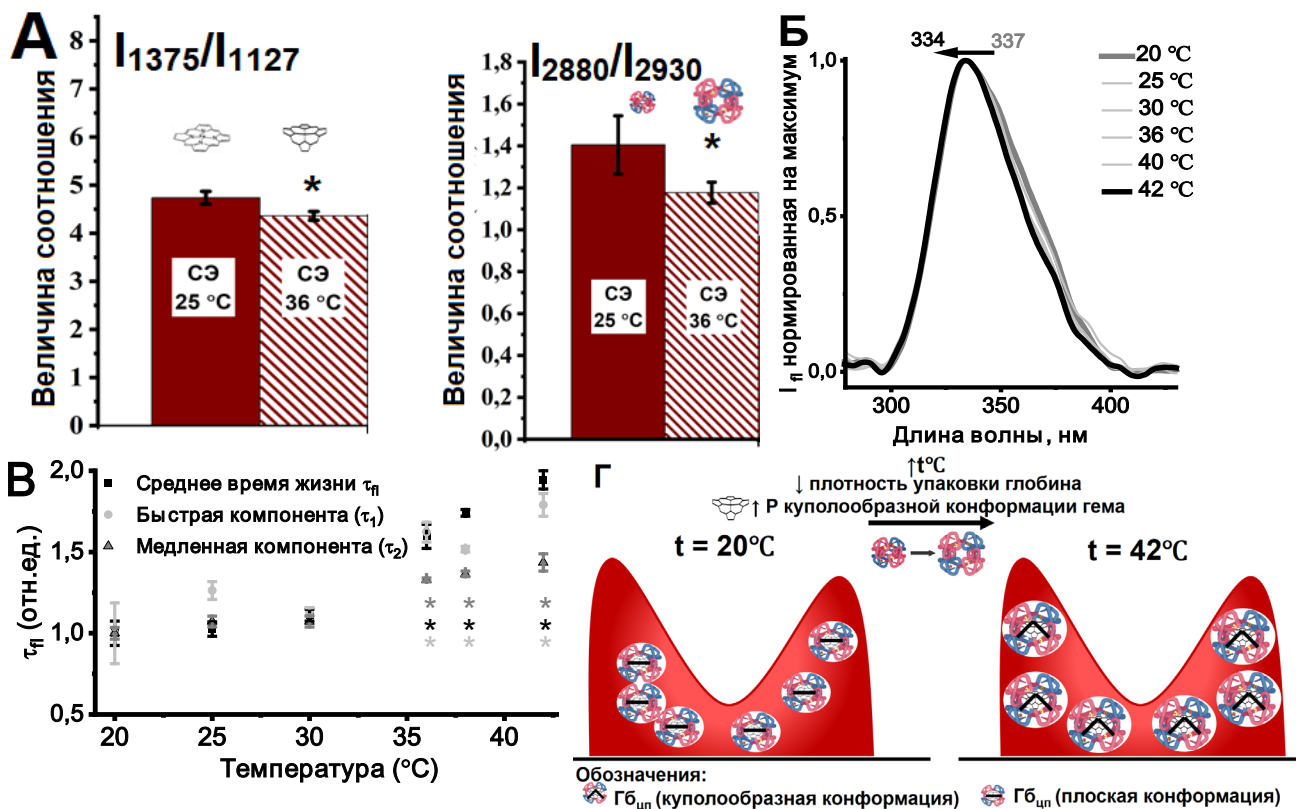


Рисунок 4 — А — Изменение величины соотношения интенсивностей пиков КР-спектра гема и глобина при 25 и 36 °С, Б — Спектр флуоресценции триптофановых остатков в СЭ при $\lambda_{\text{возб}} = 261$ нм и $\lambda_{\text{пл}} = 340$ нм, В — зависимость изменения быстрой и медленной компонент триптофановой флуоресценции СЭ, нормированное на значение при 20 °С. Данные представлены как среднее \pm SE (* различия относительно 25 °С, $p < 0,05$ ($n = 8$)), Г — Схема изменения распределения Гб_{цп} при изменении температуры с 20 до 42 °С: увеличивается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, снижается плотность упаковки глобина и вероятность образования олигомерных структур — увеличение гомогенности распределения Гб_{цп} в клетке

3. Исследование конформации гемоглобина в эритроците при изменении поверхностного заряда плазматической мембраны

Известно, что Гб_{мс} главным образом связан с БПЗ, который имеет NH₂-терминальный участок с «анионным» сегментом и может входить в «катионную», центральную полость дГб (Reithmeier et al. 2016). Предполагается, что при связывании молекулы кислорода, изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб увеличивается плотность отрицательного заряда в центральной полости дГб, способствуя смещению анионного сегмента в БПЗ. Модификация отрицательного заряда БПЗ приведет к модификации связанного с ним дГб (Sidorenko et al. 2018).

Нами установлено, что при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 1 мМ до 1 мкМ изменяется величина соотношения ОРХ_{центр}/ОРХ_{край} (ОРХ — оптическая разность хода) (распределение Гб), что, вероятно, свидетельствует об изменении $n_{\text{цит}}$ за счет перераспределении молекул Гб в центральной и периферической части клетки на $7 \pm 0,57$ отн.ед. (рисунок 5А). Параллельно, ζ -

потенциал плазматической мембраны эритроцита возрастает с $-15,4 \pm 0,2$ до $-14,5 \pm 0,3$ мВ, а мембранный потенциал снижается (согласно расчётам потенциала Нернста) на $90 \pm 1,5$ мВ.

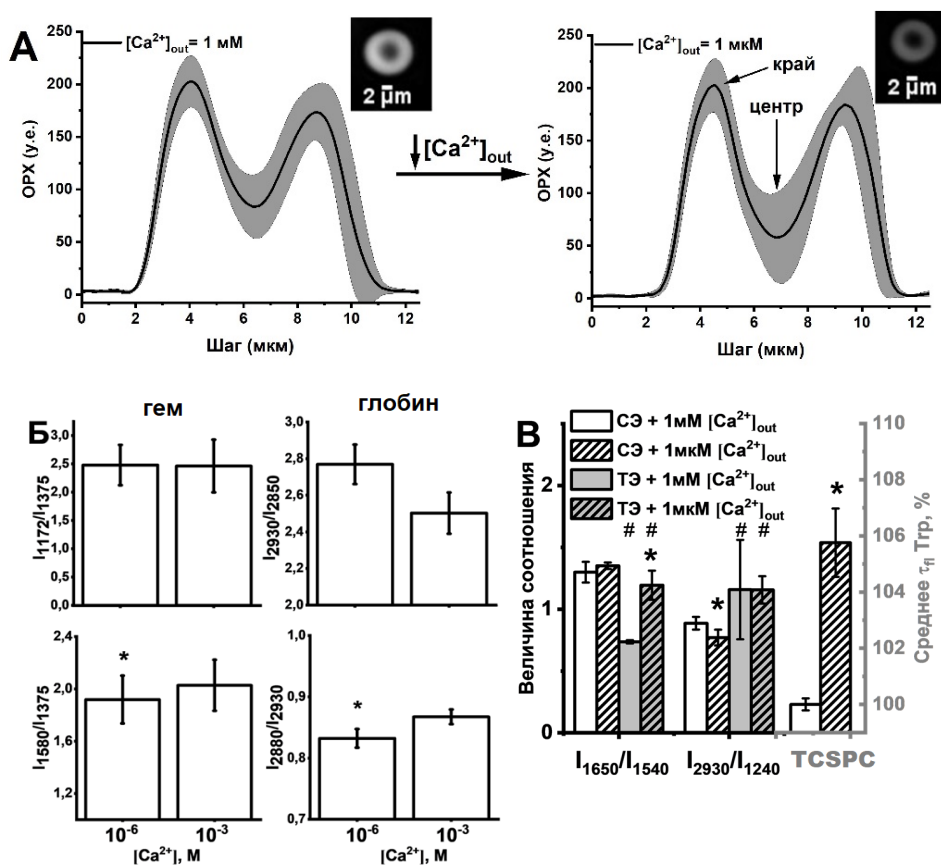


Рисунок 5 — Изменения при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ с 1 мМ до 1 мкМ: А — Зависимость величины ОРХ от локализации Гб в клетке ($n = 40$), Б — Изменение величины соотношений интенсивностей пиков КР-спектра для гема и глобина, В — Изменения величины соотношений интенсивностей пиков ИК-спектра и среднего τ_{fl} Тгр, характеризуют изменения конформации Гб_{мс}). Данные представлены как среднее \pm SE, * $p < 0,05$ ($n = 8$)

Установлено, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ конформация гема (I_{1172}/I_{1375} , I_{1580}/I_{1375}) меняется более выражено по сравнению с конформацией глобина (I_{2930}/I_{2850} , I_{2880}/I_{2930}) (рисунок 5Б). При этом, нами не обнаружены изменения вклада колебаний С=О связи в $-COO^-$ группе по сравнению с деформационным колебанием С-N-H групп в белках мембран и глобина (соотношение AmideI/AmideII, I_{1650}/I_{1540}) (Polakovs et al. 2012). Отметим, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ выявлены изменения в упорядоченности липидов и плотности упаковки жирнокислотных остатков (I_{2930}/I_{1240}), что может свидетельствовать о зависимости состояния заряженных «головок» фосфолипидов мембраны эритроцита от ζ -потенциала (рисунок 5В). Отметим, что конформация глобина Гб_{мс} более чувствительна к изменениям ζ -потенциала, чем Гб_{цп} (увеличение соотношения I_{1650}/I_{1540} на 30%), что, вероятно, связано с изменениями во вторичной структуре белка (рисунок 5 В).

Мы предполагаем, что снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ и увеличение ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита сопровождается изменением конформации Гб (Perutz, 1979; Uzan et al. 2004). Изменения локализации анионного сегмента БПЗ за счет увеличения величины ζ -потенциала и/или потенциала мембраны (см. далее) стимулируют десорбцию оГб_{мс} и олигомеризацию оГб_{цп} (De Rosa et al. 2007), что увеличивает вероятность нахождения гема в

«куполообразной» конформации (на 15%, по изменению величины соотношения I_{1580}/I_{1375} , рисунок 5Б).

Таким образом, нами впервые доказано, что конформация Гб чувствительна к изменению ζ -потенциала мембраны эритроцита и изменения электрических свойств мембраны участвуют в регуляции переноса кислорода Гб эритроцита.

4. Исследование конформации гемоглобина в эритроците при изменении соотношения Na^+ и K^+ в клетке

Известно, что изменения внутриклеточной концентрации ионов натрия (соотношение $[\text{Na}^+]_{\text{in}}/[\text{K}^+]_{\text{in}}$) в эритроците зависят от активности Na -насоса. Данный процесс может сопровождаться перераспределением воды и изменениями объема клетки (Olver, 2022; Harvey, 2022). Нами установлено, что в течение 60 минут инкубации СЭ с 3 мМ убаином (блокатор активности Na -насоса) наблюдаются изменения в цитоплазме (ОРХ) клетки (рисунок 6 А, Б). Вероятно, эффект обусловлен перераспределением молекул Гб в цитоплазме при увеличении соотношения $[\text{Na}^+]_{\text{in}}/[\text{K}^+]_{\text{in}}$ (рисунок 6 А) и сопровождается изменением ζ -потенциала мембраны (с $-15,2 \pm 0,2$ до $-13,2 \pm 0,2$ мВ) и трансмембранного потенциала (расчет по уравнению Нернста — с -130 ± 2 мВ до -172 ± 3 мВ) (рисунок 6 Б). Отметим, что в этих условиях выявлены изменения конформации гема Гб (увеличение I_{1375}/I_{1172} и I_{1580}/I_{1375} , что соответствует увеличению сродства Гб к O_2), но отсутствуют изменения плотности упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}) (рисунок 6 В). С помощью ГКР доказано, что конформация Гб_{мс} (или примембранный Гб) более чувствительна (по сравнению с Гб_{цп}) к изменениям заряда на внутренней поверхности мембраны. Вероятно, это связано с перераспределением молекул Гб в клетке (большей вероятностью локализации Гб в примембранном слое и увеличением межмолекулярного расстояния между молекулами Гб), а также увеличением плотности упаковки отдельных молекул глобина. В этих условиях конформация Гб меняется: снижается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации (снижение величин $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$, I_{1580}/I_{1550} , I_{1580}/I_{1375}) и плотность упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}) для Гб_{цп} и Гб_{мс} (рисунок 6 Д).

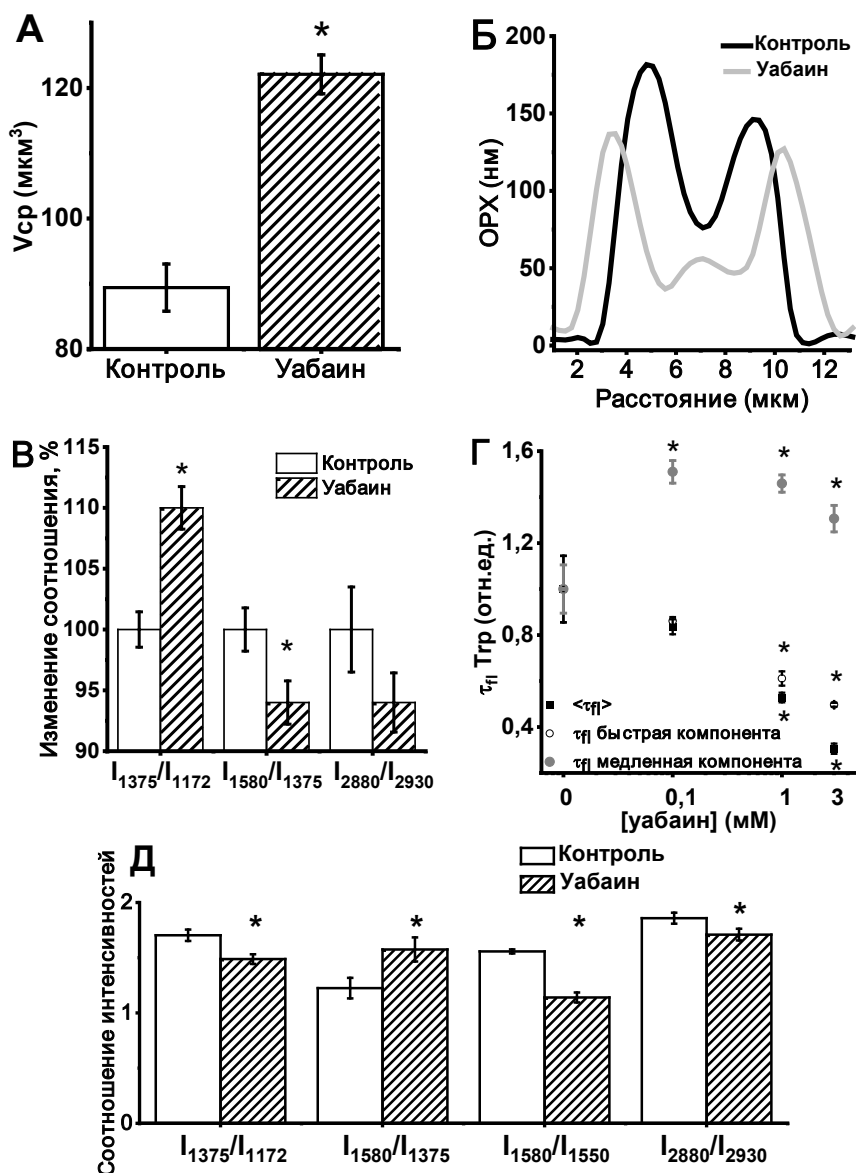


Рисунок 6 — Изменения параметров эритроцита при 60 минутной инкубации с 3 мМ уабаином: А — 3D распределение ОРХ в эритроците (n=58), Б — ОРХ эритроцита, В — соотношение величин интенсивностей пиков КР-спектра, Г — τ_{fl} Тр, нормировано на величину τ_{fl} Тр в контроле (без инкубации с уабаином), Д — соотношение величин интенсивностей пиков ГР-спектра. Данные представлены как среднее \pm SE, * p < 0,05, (n=8)

При увеличении соотношения $[\text{Na}^+]_{in}/[\text{K}^+]_{in}$, снижение величины среднего τ_{fl} Тр (в том числе и глубина Гб) эритроцита и величины соотношения I_{2880}/I_{2930} глубина свидетельствуют о снижении плотности упаковки глобина и/или изменении окружения молекул Гб либо за счет увеличения количества связанной воды, либо за счет и/или электростатического взаимодействия Na^+ с молекулой Гб. Снижение среднего τ_{fl} Тр обусловлено большим вкладом от быстрой компоненты τ_{fl} Тр, чем от медленной компоненты τ_{fl} Тр, величина которой возрастает с увеличением доли $[\text{Na}^+]_{in}$ (рисунок 6Г). Вероятно, данные изменения связаны с изменением взаимодействий Тр с микроокружением в молекулах Гб эритроцитов (по сравнению с выделенным Гб), а также, снижением вклада водородных связей между молекулами Гб при снижении плотности упаковки на поверхности глобина (увеличение медленной компоненты τ_{fl} Тр) (Li, Nagai, and Nagai 2000; Mahato et al. 2010). Итак, при изменении мембранного потенциала эритроцита выявлено как перераспределение Гб, так и

увеличение вероятности нахождения гема Гб в «куполообразной» конформации, что увеличивает способность Гб связывать O_2 (рисунок 6 Г).

Таким образом, блокирование Na^+/K^+ -АТФазы, приводит к увеличению содержания $[Na^+]_{in}$, изменению ζ -потенциала на цитоплазматической поверхности мембраны, что сопровождается изменениями упорядоченности распределения и конформации молекул Гб (увеличение вероятности «куполообразной» конформации (снижение величины соотношения I_{1580}/I_{1375} , рисунок 6 В).

5. Исследование конформации гемоглобина в эритроците при изменении упорядоченности молекул Гб в эритроците

Выше мы отмечали, что в эритроците формируются комплексы (ассоциаты, олигомеры и т.д.) Гб_{цп} и распределение молекул Гб в эритроците становится гетерогенным (негомогенно) (Klug, Kreuzer, and Roughton, 1956; Zander and Schmid-Schönbein, 1973; Vandegriff and Olson, 1984; Bouwer, Hoofd, and Kreuzer, 1997). Установлено, что снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ приводит к более гомогенному распределению Гб, увеличению вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации, которое связано с увеличением ζ -потенциала плазматической мембраны (до $-14,5 \pm 0,3$ мВ) (рисунок 7А). При этом, в центральной и примембранной областях клетки выявлены изменения ОРХ олигомерных комплексов Гб (рисунок 5А, 7А). С помощью поляризационной КР-спектроскопии нами впервые было установлено, что в зависимости от $[Ca^{2+}]_{out}$ в эритроците меняется упорядоченность распределения и конформация для Гб_{цп} (валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец гема, I_{1580}/I_{1375}) и глобина (I_{2880}/I_{2930}), что, вероятно, свидетельствует о формировании олигомерных структур Гб_{цп} в цитоплазме клетки (рисунок 7Б,В) (Wood et al. 2005). Дополнительно, с помощью метода ФКМ установлено, что распределение Гб в клетке зависит от величины ζ -потенциала плазматической мембраны (рисунок 7Г).

Итак, снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ сопровождается увеличением ζ -потенциала эритроцита (с $-15,4 \pm 0,2$ до $-14,5 \pm 0,3$ мВ, раздел 3, стр.13), вследствие чего, молекулы Гб_{цп} в клетке формируют комплекс с БПЗ, взаимодействуют с цитоплазматической поверхностью плазматической мембраны, что приводит к формированию упорядоченности Гб в данном кластере клетки (рисунок 7В). Таким образом, изменения ζ -потенциала эритроцита плазматической мембраны клетки могут быть одним из факторов регуляция конформации и перераспределения Гб_{цп} в цитоплазме.

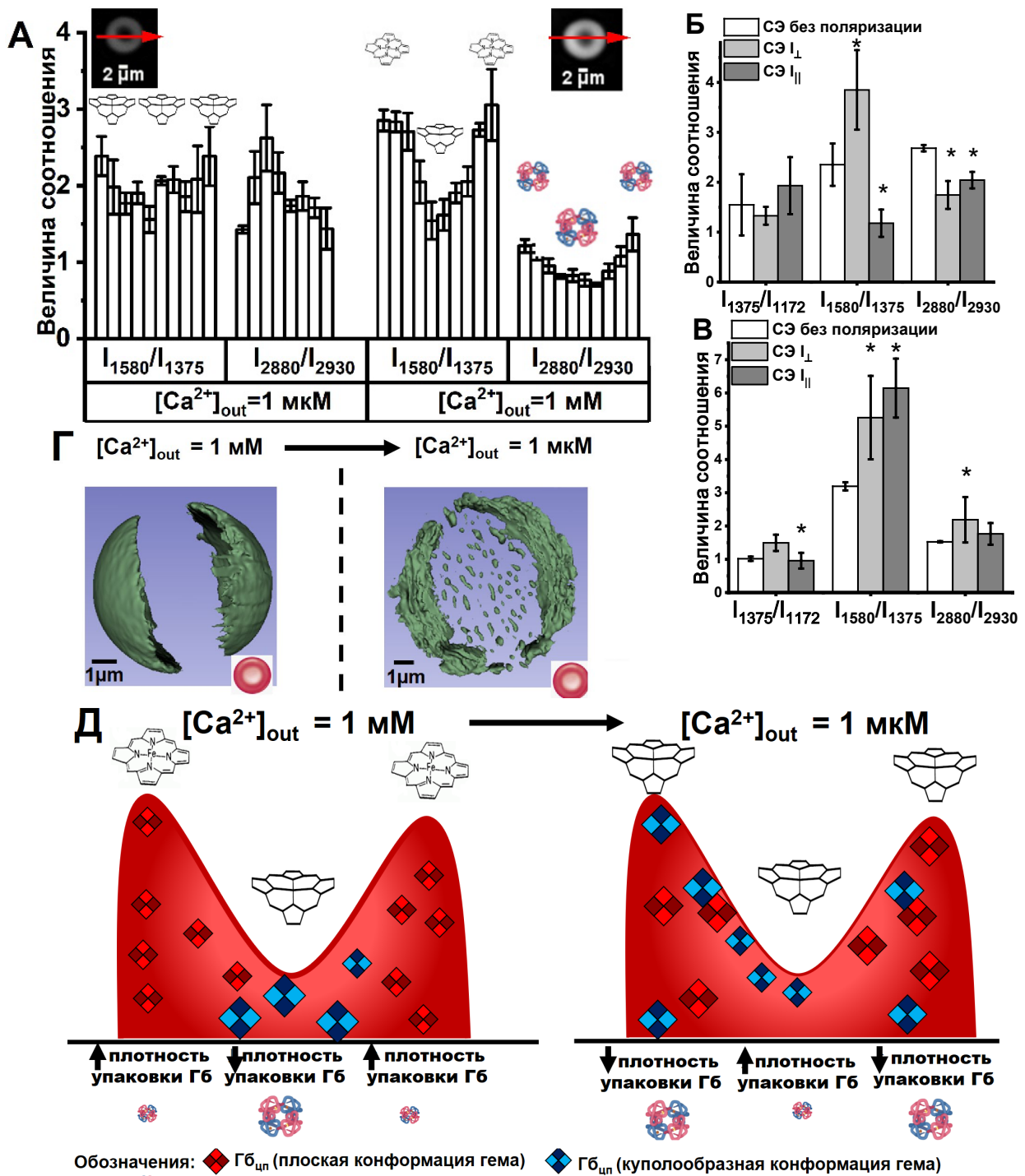


Рисунок 7— А — Изменения величины соотношений интенсивностей пиков КР-спектра при 1 мМ и 1 мкМ $[Ca^{2+}]_{out}$ вдоль скан-линии (стрелка указывает направление движения измерения).
 Сверху представлен фазовый профиль эритроцита (ЛИМ), Б, В — Изменения соотношений максимумов КР-спектра в поляризованном свете для 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$ (Б) и 1 мкМ $[Ca^{2+}]_{out}$ (В). Данные представлены как среднее \pm SE, * $p < 0,05$ ($n = 10$), Г — изменение распределения второй производной величины ОРХ в эритроците при 1 мМ и 1 мкМ $[Ca^{2+}]_{out}$ (характеризует наличие оптических неоднородностей, вызванных наличием комплексов Гб_{пл} ($n = 10$)), Д — Схема изменения распределения молекул Гб в эритроците, плотности упаковки глобина и конформации гема при изменении ζ -потенциала

6. Исследование конформации гемоглобина в эритроците при патологии (идиопатическая легочная гипертензия)

Известно, что в патогенезе ИЛГ важную роль играет гипоксия, возникающая за счет снижения сердечного выброса и нарушения переноса O_2 в ткани (Galie et al. 2016). Проведенное нами исследование конформации Гб эритроцитов крови и СЭ пациентов с ИЛГ свидетельствует о том, что колебания пирролов гема Гб при патологии более выражены по отношению к колебаниям винильных групп (I_{1580}/I_{1375}), а вклад валентных колебаний метиновых мостиков (I_{1580}/I_{1550}) снижается при сравнении с группой здоровых доноров (контроль) (рисунок 8А). Выявленные изменения соотношения валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец (I_{1580}/I_{1375}) в зависимости от изменения плотности упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}) свидетельствует о том, что для здоровых доноров и пациентов с ИЛГ изменения упаковки глобина и конформации гема Гб различны: в контрольной группе увеличение плотности упаковки глобина коррелирует со снижением вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации, а для ИЛГ — наоборот (рисунок 8 Б,В).

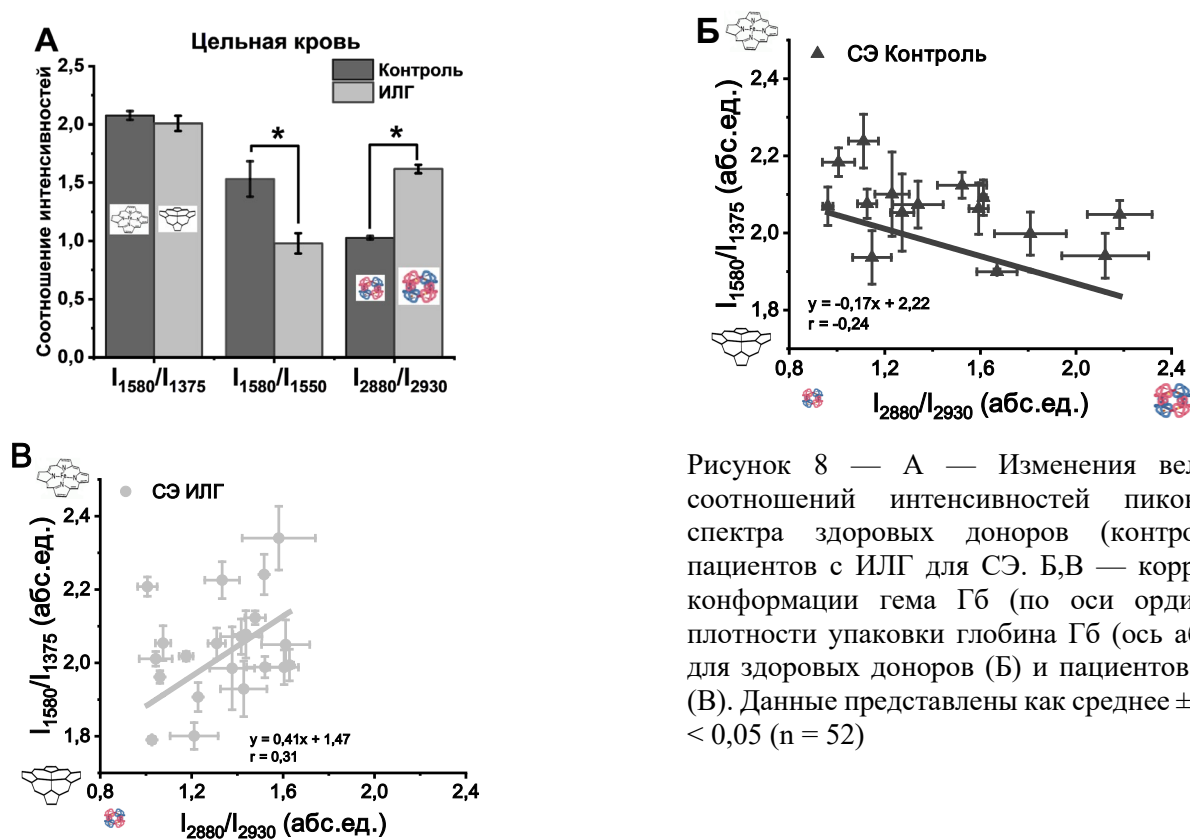


Рисунок 8 — А — Изменения величины соотношений интенсивностей пиков КР-спектра здоровых доноров (контроль) и пациентов с ИЛГ для СЭ. Б,В — корреляция конформации гема Гб (по оси ординат) и плотности упаковки глобина Гб (ось абсцисс) для здоровых доноров (Б) и пациентов с ИЛГ (В). Данные представлены как среднее \pm SE, * $p < 0,05$ ($n = 52$)

Отметим, что в цельной крови глобин Гб_{цп} пациентов с ИЛГ характеризуется более плотной упаковкой молекулы (I_{2880}/I_{2930}) по сравнению с контролем, что, вероятно, свидетельствует о влиянии ряда компонентов плазмы (например, D-димера, содержание которого в плазме ИЛГ повышено (Чазова и др. 2007)) (рисунок 8А). Важно, что впервые для

Гб в эритроцитах были обнаружены различия между ИЛГ и контролем: глобин Гб_{цп} и Гб_{мс} эритроцитов человека при ИЛГ имеет менее плотную упаковку (I₂₈₈₀/I₂₉₃₀). При ИЛГ, выявлено увеличение вероятности нахождения гема Гб_{цп} и Гб_{мс} в «куполообразной» конформации (I₁₅₈₀/I₁₅₅₀).

Итак, при ИЛГ конформация гема Гб_{цп} и Гб_{мс} эритроцитов в цельной крови меняется: в норме при снижении sO₂ для гема Гб_{цп} характерно изменение колебаний связей пиррольных колец и винильных групп, а для ИЛГ обнаружены изменения только в валентных колебаниях винильных групп (I₁₅₈₀/I₁₅₅₅) гема и колебаниях, связанных с изменением плотности упаковки глобина. Возможно, выявленные различия обусловлены перераспределением молекул Гб в эритроците при патологии (Huang et al. 2001) и могут служить одной из причин снижения эффективности связывания молекулы O₂ с гемом.

Заключение

В работе представлены результаты исследования, свидетельствующие о том, что изменение морфологии, объема (и/или увеличение [Na⁺]_{in}), температуры и ζ-потенциала оказывают влияние как на конформацию гема и глобина Гб, так и на распределение Гб_{цп} в цитоплазме клетки (таблица 1, рисунок 9) (El Hage et al. 2018).

Таблица 1. Изменение конформации гема и плотности упаковки глобина при изменении pO₂, температуры, ζ-потенциала и объема

Воздействие	Изменения внутриклеточного Гб _{цп} (СЭ)	
	Гем — вероятность «куполообразной» конформации	Глобин — плотность упаковки
pO ₂ (↓ pO ₂ 118 → 2 мм рт.ст.)	Возрастает	Возрастает
Температура (20 → 42 °С)		Снижается
ζ-потенциал клетки (↓ [Ca ²⁺] _{out})		
↑ [H ₂ O] в клетке, ↑ [Na ⁺] _{in} (Hamlyn, Hamilton, and Manunta 1996)		

Внешнее воздействие, модифицирует электростатические взаимодействия комплекса дГб с БПЗ (аллостерическая регуляция с анионным участком БПЗ катионной центральной полости дГб), а также образование комплексов Гб с мембранными компонентами (ковалентные сшивки дисульфидными связями, гидрофобные взаимодействия с мембранными липидами), приводит к формированию внутриклеточного примембранного слоя из молекул Гб, которые компенсируют изменение ζ-потенциала мембраны эритроцита (Huang et al. 2001; Brazhe et al. 2009a; Космачевская и др. 2019).

О важной роли олигомеризации и перераспределения Гб (молекулярный краудинг) можно судить из результатов, полученных на целой клетке и выделенном Гб:

При изменении pO_2 , конформация гема и глобина в СЭ и выделенном Гб различна, при этом, для выделенного Гб характерны менее выраженные изменения конформации, чем в СЭ (Рисунок 10) (De Rosa, 2007).

При изменении температуры, меняется вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, плотность упаковки глобина и гомогенность распределения Гб в цитоплазме.

При изменении ζ -потенциала, меняется конформация комплекса «Гб–БПЗ» и его способность связывать дГб, что приводит к десорбции Гб_{мс}, изменению распределения молекул Гб за счет олигомеризации молекул Гб в цитоплазме, что сопровождается изменением вероятности нахождения гема в «плоской» или «куполообразной» конформации.

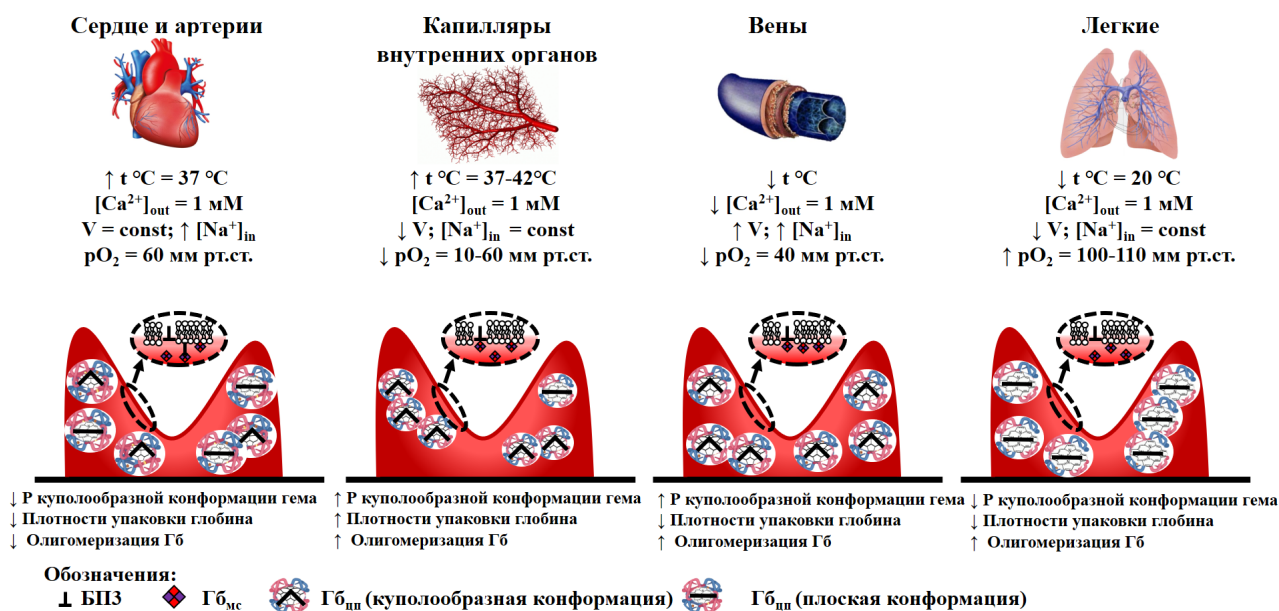


Рисунок 9 — Схематичное изображение изменения конформации гема и плотности упаковки глобина в эритроците при гемодинамике

При изменении $[Na^+]_{in}/[K^+]_{in}$ в клетке (блокирование Na^+/K^+ -АТФазы), меняется $[Na^+]_{in}$ и ζ -потенциал плазматической мембраны клетки (Hamlyn, Hamilton, and Manunta, 1996), что сопровождается изменением вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации. Согласно динамике компонент τ_{fl} Тгр, изменение плотности упаковки глобина происходит не равномерно (по объему глобулы): в области локализации гема увеличивается плотность упаковки аминокислот глобина, а на поверхности глобина наоборот, наблюдается её снижение и расхождение отдельных молекул Гб.

Локализация Гб в примембранной области сопровождается модификацией конформации Гб, выражаемой в более плотной упаковке глобина с более выраженными симметричными колебаниями пирролов гема. Важно, что вероятность нахождения гема в

«плоской» конформации выше у Гб, локализованного в примембранной области, чем в центральной области клетки. Итак, в эритроците, молекулы Гб распределены не хаотично (или гомогенно), а существует несколько областей (кластеров) с гетерогенным распределением Гб:

- Примембранный кластер связанного с БПЗ комплекса «БПЗ–Гб_{MC}» в мембране клетки;
- Цитоплазматический кластер, олигомерная структура, ориентированных молекул Гб в цитоплазме клетки.

При патологии меняется конформация Гб у пациентов с ИЛГ, что снижает способность Гб связывать O₂ (I₁₅₈₀/I₁₃₇₅). Разработан методический подход диагностики ИЛГ с помощью КР. Введен спектральный маркер (I₁₅₈₀/I₁₅₅₀), который предложен в качестве показателя степени тяжести заболевания.

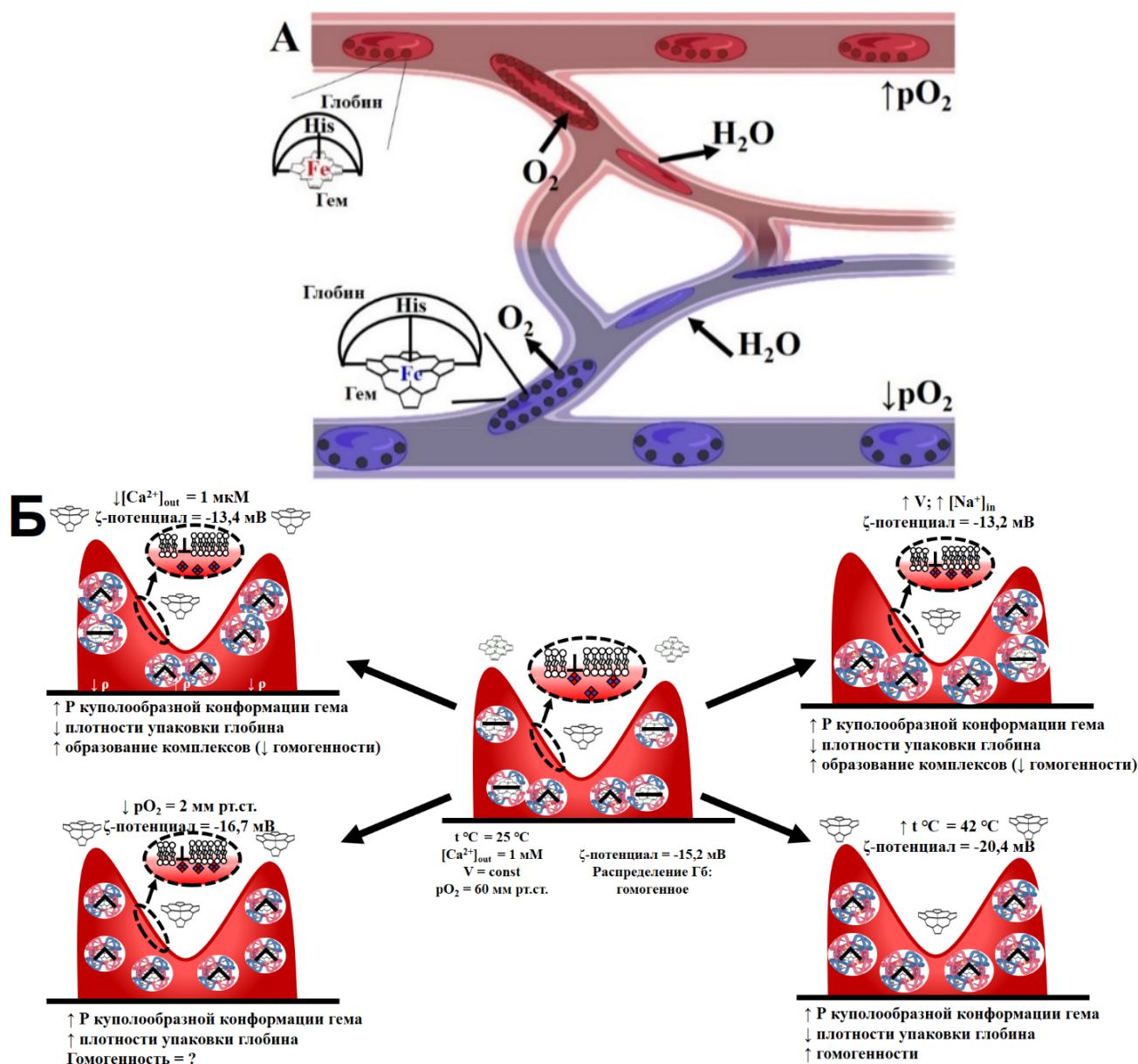


Рисунок 10 — А — Изменение конформации гема и расположения молекул Гб при гемодинамике, Б — Изменение конформации гема и плотности упаковки Гб при изменении внешних параметров (пояснения в тексте)

Выводы

1. Установлено, что снижение pO_2 (от 118 до 2 мм рт.ст.) увеличивает вероятность нахождения гема Гб в «куполообразной» конформации и плотность упаковки глобина (вклад SN_3 -радикалов аминокислот I_{2880}/I_{2930}). Доказано, что изменения конформации гема и глобина в цитоплазме клетки и выделенном Гб при прочих одинаковых условиях различны.

2. Установлено, что увеличение температуры (22–42 °С) приводит к изменению конформации гема (вклад колебаний пиррольных колец (I_{1375}/I_{1127}) и валентных колебаний винильных групп (I_{1580}/I_{1550})), снижению плотности упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}), а также к увеличению гомогенности распределения Гб в цитоплазме (оценено по величине среднего τ_{fl}).

3. При изменении ζ -потенциала (снижение $[Ca^{2+}]_{out}$, увеличение $[Na^+]_{in}$) в цитоплазме возрастает вероятность гомогенного распределения Гб, увеличивается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации (I_{1580}/I_{1375}) и снижается плотность упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}). При изменении ζ -потенциала максимальные изменения в глобиновой части Гб выявлены у Гб_{мс}

4. Установлено, что увеличение соотношения $[Na^+]_{in}/[K^+]_{in}$ сопровождается увеличением ζ -потенциала и увеличением вероятности «куполообразной» конформации гема Гб. При этом, существенные изменения плотности упаковки глобина выявлены на поверхности белковой глобулы.

5. Доказано, что Гб_{мс} имеет большую чувствительность к изменению ζ -потенциала мембраны эритроцитов, чем Гб_{цп}. При увеличении ζ -потенциала возрастает вероятность «куполообразной» конформации гема и снижается плотности упаковки глобина

6. Выявлена положительная корреляция между вероятностью реализации «куполообразной» конформации гема и плотностью упаковки глобина Гб_{цп} эритроцитов при патологии (ИЛГ), а для Гб эритроцитов здоровых — наоборот.

Основные публикации Слатинской Ольги Вадимовны по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2 — биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах).

1. Brezgin S., Kostyusheva A., Slatinskaya O. et al. Hydroxychloroquine enhances cytotoxic properties of extracellular vesicles and extracellular vesicle-mimetic nanovesicles loaded with chemotherapeutics // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15, № 2. — P. 534 (IF 6.525, 0.602 / 0.112 п.л.);

2. **Slatinskaya O.V.**, Zaripov P.I., Brazhe N.A. et al. Changes in the conformation and distribution of hemoglobin in the erythrocyte upon inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity // Biophysics. — 2022. — Vol. 67, № 5. — P. 726–733. (**SJR 0.205, 0.680 / 0.600 п.л.**);
3. **Slatinskaya O.V.**, Luneva O.G., Deev L.I. et al. The hemoglobin conformation in erythrocytes at different levels of oxygen partial pressure // Biophysics. — 2021. — Vol. 66, № 5. — P. 797–803. (**SJR 0.205, 0.677 / 0.620 п.л.**);
4. **Slatinskaya O.V.**, Brazhe N.A., Orlov S.N., Maksimov G.V. The role of extracellular Ca²⁺ in regulating the distribution and conformation of hemoglobin in erythrocytes // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. — 2021. — Vol. 15, № 3. — P. 230–238. (**SJR 0.206, 0.909 / 0.900 п.л.**);
5. **Slatinskaya O.V.**, Luneva O.G., Deev L.I. et al. Conformational changes that occur in heme and globin upon temperature variations and normobaric hypoxia // Biophysics. — 2020. — Vol. 65, № 2. — P. 213–221. (**SJR 0.205, 0.767 / 0.700 п.л.**);
6. Maksimov G.V., **Slatinskaya O.V.**, Tkhor E.S. et al. The role of erythrocyte receptors in regulation of the conformation and distribution of hemoglobin // Biophysics. — 2019. — Vol. 64, № 1. — P. 57–61 (**SJR 0.205, 0.576 / 0.144 п.л.**);
7. Maksimov E.G., Sluchanko N.N., **Slatinskaya O. V.** et al. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components // Scientific reports. — 2017. — № 7. — P. 15548. (**IF 4.379, 0.548 / 0.093 п.л.**);
8. Аллахвердиев Э.С., **Слатинская О.В.**, Родненков О.В. и др. Патент № 2770820 «Способ прогнозирования тяжести идиопатической легочной гипертензии». Дата публикации патента: 22 апреля 2022 г. (**0.685 / 0.438 п.л.**)

Работа была поддержана грантом РФФИ «Аспиранты–2020» № 20-34-90073 «Исследование конформации и перераспределения гемоглобина в эритроцитах при старении эритроцита на основе метода Раман-спектроскопии»