

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Слатинская Ольга Вадимовна

**Исследование конформации и распределения гемоглобина при
функционировании эритроцита**

Специальность 1.5.2. — Биофизика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор,
Максимов Георгий Владимирович

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1. Строение и функции эритроцита	16
1.1.1. Строение плазматической мембраны и цитоскелета эритроцита..	17
1.1.2. Молекулярный краудинг.....	20
1.1.3. Белок полосы 3	22
1.2. Гемоглобин	24
1.2.1. Общая характеристика семейства глобинов	24
1.2.2. Строение и функции гемоглобина эритроцита.....	25
1.2.3. Распределение гемоглобина в эритроците	28
1.3. Функционирование эритроцита	32
1.3.2. Гемодинамика	32
1.3.1. Влияние $[Ca^{2+}]_{out}$ на функционирование эритроцита	34
1.3.2. Роль воды в функционировании эритроцита	36
1.3.2.1. Na^+/K^+ -АТФаза: роль в поддержании объема эритроцита	39
1.4. Исследование изменений конформации и распределения Гб в эритроцитах при патологии.....	41
1.4. Влияние фотосенсебилизаторов на мембрану эритроцитов	43
ГЛАВА 2. Материалы и методы	44
2.1. Объект и материалы исследования	44
2.1.1. Материалы	44
2.1.2. Оборудование.....	44
2.1.3. Используемые растворы.....	45
2.2. Объект исследования.....	46
2.3. Выделение эритроцитарной массы из цельной крови	49
2.4. Выделение гемоглобина из крови	49
2.5. Выделение мембран эритроцитов (тени эритроцитов).....	49

2.6.	Приготовление фиксированного препарата эритроцитарной массы глутаровым альдегидом.....	51
2.7.	Определение $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в эритроците.....	52
2.8.	Изменение доли парциального давления кислорода в суспензии эритроцитов	53
2.9.	Динамическое рассеяние света.....	54
2.10.	Определение поверхностного (ζ) потенциала эритроцитов.....	56
2.11.	Спектроскопия комбинационного рассеяния	58
2.11.1.	Спектроскопия комбинационного рассеяния гемоглобина.....	61
2.11.2.	КР–изображение.....	67
2.11.3.	Режим термостатирования	68
2.11.4.	Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР).....	68
2.11.4.1.	Наноструктурированные подложки.....	70
2.11.4.2.	Синтез наноструктур типа серебряных колец	70
2.12.	Гемолиз	72
2.13.	Действие активных форм кислорода на мембрану эритроцита и раствор Гб	73
2.14.	Поляризационная спектроскопия комбинационного рассеяния....	74
2.15.	Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ).....	74
2.15.1.	Подготовка образца	76
2.15.2.	Гемолиз	77
2.15.3.	Действие активных форм кислорода на мембрану эритроцита.....	77
2.16.	Микротомография на базе лазерноинтерференционной микроскопии	78
2.16.1.	Подготовка образца	79
2.16.2.	Гемолиз	80
2.17.	Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)	81
2.18.	Счет одиночных фотонов с корреляцией по времени (Time Correlated Single Photon Counting — TCSPC) триптофана.....	83
2.19.	Инфракрасная спектроскопия (ИК)	87

2.20.	Статистический анализ.....	91
ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение		92
3.1.	Влияние парциального давления кислорода на конформацию гемоглобина	92
3.1.1.	Особенности анализа КР–спектров молекул Гб	92
3.1.2.	Изменение конформации гема в области парциального давления кислорода (от 2 до 118 мм рт.ст.)	93
3.1.3.	Конформационные изменения валентных колебаний аминокислот Гб в высокочастотной области КР–спектра 2800–3000 см ⁻¹	98
3.1.4.	Парциальное давление кислорода как фактор регуляции конформации гемоглобина.....	103
3.2.	Влияние температуры на конформацию гема и глобина.....	110
3.2.1.	Конформационные изменения гема и глобина в физиологическом диапазоне температур (20–42 °С)	111
3.2.2.	Исследование влияния циклических изменений температуры на конформацию Гб в эритроците	122
3.3.	Поверхностный заряд плазматической мембраны как фактор регуляции конформации Гб	124
3.3.1.	Исследование влияния [Ca ²⁺] _{out} на морфологию эритроцита.....	125
3.3.2.	Исследование влияния [Ca ²⁺] _{out} на конформацию гема и глобина Гб	128
3.3.3.	Исследование влияния фотоповреждения мембраны на конформацию гема и глобина Гб _{цп}	138
3.3.4.	Изменение конформации гема в зависимости от распределения эритроцитов в SiO ₂ капилляре	142
3.4.	Исследование роли изменения объема и поверхностного потенциала эритроцита в регуляции конформации гема и глобина.....	145
3.4.1.	Изменение конформации Гб при блокировании активности Na ⁺ /K ⁺ –АТФазы эритроцита	146

3.4.2.	Исследование конформации Гб при переходе из гетерогенного к гомогенному распределению	155
3.5.	Исследование распределения молекул Гб в эритроците	162
3.5.1.	Изменение распределения молекул Гб _{цп} в эритроците при изменении $[Ca^{2+}]_{out}$	162
3.5.2.	Исследование изменения ориентации Гб _{цп} при изменении поверхностного потенциала клетки	167
3.5.3.	Исследование распределения цитоплазматического Гб с помощью использования фазово–контрастной микроскопии (3D–микротомография клетки).	170
3.5.1.	Исследование конформации гемоглобина при его олигомеризации	179
3.6.	Изменение конформации гемоглобина в эритроцитах при ИЛГ .	183
3.6.1.	Исследование влияния ИЛГ на конформацию гема и глобина эритроцита	183
3.6.2.	Исследование изменения гем–глобиновых взаимодействий в Гб при ИЛГ	188
3.6.3.	Оценка конформационных изменений гема в зависимости от функционального класса заболевания	191
3.6.4.	Исследование влияния вазорелаксантов при лечении патологий гипоксической природы на конформацию гема и глобина Гб	196
3.6.5.	Исследование роли вязкости мембраны на плотность упаковки молекул гемоглобина в эритроците при патологии.....	197
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	202
	ВЫВОДЫ	206
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	207
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	208

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности.

Эритроциты — клетки крови, основная функция которых заключается в транспорте лигандов (в том числе, O_2 , NO_x , продукты метаболизма) в органах и тканях [1]. Важная роль крови в осуществлении кислород–транспортной функции связана как с ее реологическими свойствами (скорость, вязкость кровотока и др.) [2, 3], так и с эритроцитами и их взаимодействием с другими клетками и компонентами плазмы крови и клетками сосудов [4, 5]. В ходе гемодинамики в эритроциты человека подвержены следующим воздействиям (рисунок 1) [6]:

1. Изменение парциального давления кислорода (pO_2), влияющего на сродство гемоглобина (Гб) к O_2 : эритроцит переносит O_2 при движении по артериолам, капиллярам и венам (степень оксигенации крови при прохождении эритроцитов по кровеносным сосудам меняется от 20 мм рт.ст в венозной крови до 75 мм рт.ст. в артериальной крови; в скелетных мышцах и тканях, в которых потребление O_2 происходит интенсивней, pO_2 составляет 5 мм рт.ст.) [7].

2. При проникновении в тонкие капилляры, эритроцит меняет свою форму и объем (диаметр многих капилляров составляет 3 мкм, а диаметр эритроцитов 7–8 мкм), за счет выхода воды через мембрану эритроцитов (движение эритроцитов из артерий в капилляры сопровождается потерей 45% воды клетки, и наоборот, движение из капилляров венозного русла в вены и крупные вены сопровождается входом воды [8]. В связи с этим, объем эритроцита в венах больше, чем в артериях [9–11].

3. В капиллярах происходит изменение ζ -потенциала эритроцитов за счет взаимодействия заряженных групп фосфолипидов и белков поверхности плазматической мембраны эритроцита с заряженными группами эндотелия кровеносных сосудов. Ca^{2+} является одним из важных регуляторов ζ -потенциала эритроцита (который зависит от заряда фосфолипидных «головок» и сиаловых кислот плазматической мембраны эритроцита) [12–14]. Известно, что в результате

увеличения концентрации Ca^{2+} в плазме крови ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$) происходит экранирование отрицательных зарядов сиаловых кислот на поверхности плазматической мембраны эритроцита, что приводит к увеличению ζ -потенциала эритроцита [15, 16]. Этот процесс оказывает существенное влияние на активность ион-транспортных систем плазматической мембраны эритроцитов, например, Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы, участвующих в регуляции Na^+/K^+ и Ca^{2+} гомеостаза во внутриклеточной среде клетки [17–19].

4. При движении по кровеносным сосудам (кончики пальцев, капилляры легких, мышцы и внутренние органы) в зависимости от состояния организма, эритроцит испытывает изменение температуры от 20 до 42 °С (рисунок 1) [6].

В настоящее время активно исследуются такие физико-химические параметры эритроцита, как мембранный потенциал, вязкость мембраны и состояние цитоплазмы, а также распределение и конформация Гб при изменении $p\text{O}_2$, температуры, ζ -потенциала и мембранного потенциала, а также объема клетки. При этом, мало исследованы процессы изменения конформации и распределения Гб в нативном эритроците в данных условиях. Большинство физико-химических параметров Гб (конформация гема и глобина, сродство Гб к O_2) получены в исследованиях на выделенном из клетки Гб, что, очевидно, отличается от Гб, локализованного в цитоплазме эритроцита. Важно доказать, как изменение конформации глобина и распределение Гб в клетке влияют на конформацию гема и его O_2 -связывающие свойства [20, 21].

Известно, что Гб содержит Fe^{2+} -протопорфирин IX (гем) [22], который может находиться в двух конформациях [22–24]:

1. В конформации, при которой все атомы молекулы порфиринового «цикла» локализованы в одной плоскости. Данная форма гема получила в литературе название «плоская» конформация гема [22, 23]. «Плоская» конформация характерна для гема оксигенированного гемоглобина (оксигемоглобина, оГб), в котором атом Fe^{2+} связан с двумя аксиальными лигандами: молекулой O_2 и имидазольной группой гистидина His64 глобина. В оГб расстояние между атомом Fe^{2+} и плоскостью порфиринового «цикла» составляет 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. В конформации, при которой атом железа «выходит» из плоскости порфиринового «цикла» и расстояние между атомом Fe^{2+} и плоскостью порфирина составляет около 0,9 Å. Данная конформация получила название «куполообразной» и является характерной для дезоксигенированного гемоглобина (дезоксигемоглобина, дГб), в котором атом железа находится в пятикоординированном состоянии [22, 23].

В зависимости от степени насыщенности гемоглобина кислородом (количества молекул O_2 , связанных субъединицами гемоглобина), 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 .

Вероятно, что переход между «плоской» и «куполообразной» конформацией гема является триггером, запускающим ряд структурных перестроек глобина в ходе диссоциации (или при связывании) молекулы кислорода [25]. При этом, для оГб характерна более «плотная» структура глобулы (из-за изменения конформации гемопорфиринового макроцикла), чем для молекулы дГб. Молекулярная динамика Гб выявлена с помощью КР-спектроскопии (в области 2800–3000 cm^{-1}) и обусловлена изменениями отношения вклада симметричных колебаний концевых метильных радикалов ($-\text{CH}_3$) аминокислот по отношению к симметричным колебаниям метиленовых групп ($-\text{CH}_2$) аминокислот (I_{2930}/I_{2850}), а также изменением отношения вклада несимметричных колебаний концевых метильных радикалов ($-\text{CH}_3$) аминокислот по отношению к симметричным колебаниям метиленовых групп ($-\text{CH}_2$) аминокислот (I_{2880}/I_{2930}) (параметр характеризует изменение упорядоченного пространственного расположения отдельных участков полипептидной цепи без учета типа и конформации боковых радикалов аминокислот далее, «плотность упаковки глобина») [26–29].

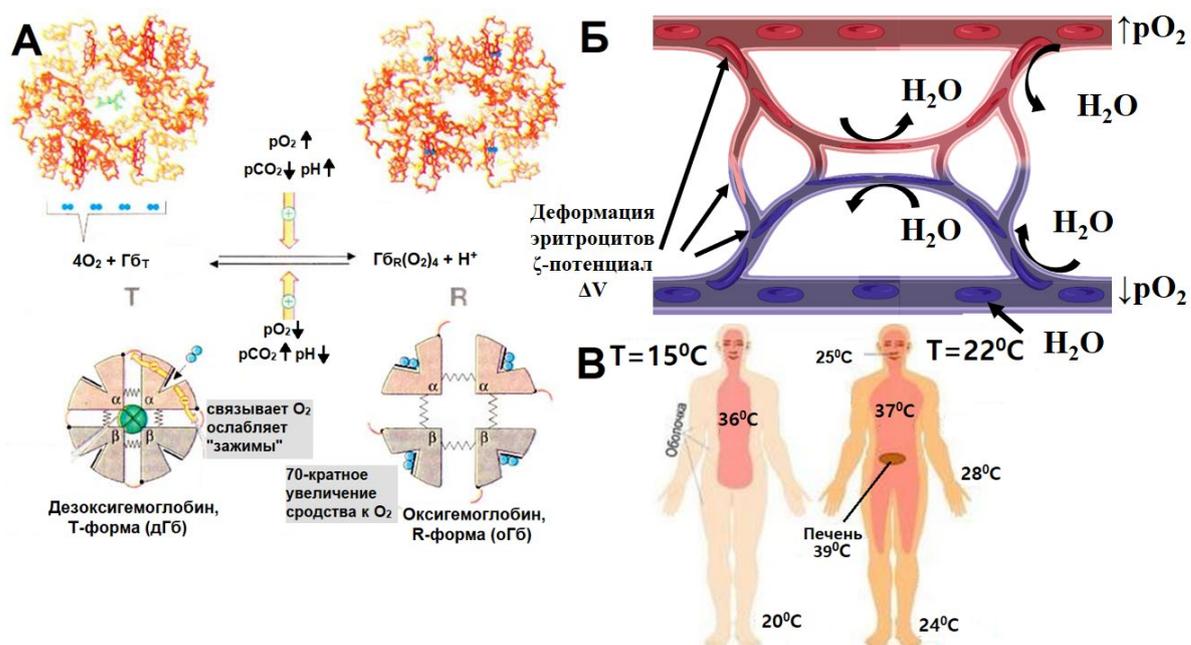


Рисунок 1 — Изменения физиологических условий (размер сосудов, насыщенность крови O_2 , деформация эритроцитов и изменение ζ -потенциала эритроцитов при взаимодействии с положительно заряженными стенками сосудов) и конформацией Гб (Нельсон, Кокс, и Ленинджер 2011): А — аллостерическая регуляция конформации Гб, Б — изменение морфологии эритроцита при движении по кровеносному руслу, В — распределение температуры в теле человека. Пояснения в тексте (для создания рисунка использован ресурс biorender.com)

В настоящее время существенный интерес представляют исследования конформации молекулы Гб при различной локализации Гб в эритроците. Известно, что при старении эритроцитов, Гб в клетке перераспределяется, и максимальное содержание $\text{Гб}_{\text{цп}}$ обнаружена в примембранной области клетки, что, по мнению авторов, является сигналом для начала процесса эриптоза [15, 31]. Существование гетерогенного распределения Гб в клетке доказано выявлением нескольких «фракций» Гб в клетке [32–34]: мембраносвязанный Гб ($\text{Гб}_{\text{мс}}$), формирующий комплекс с белком полосы 3 (БПЗ), составляет 0,5% от общего объема Гб в клетке [35]; цитоплазматический Гб ($\text{Гб}_{\text{цп}}$), локализованный в цитоплазме эритроцита (нет прямого контакта с плазматической мембраной), составляет 98% от общего объема Гб в клетке. Вероятно, перераспределение плотности (или содержания) $\text{Гб}_{\text{цп}}$ в эритроците (расстояние между молекулами составляет 10 \AA [36], обусловлено

формированием специфических взаимодействий между молекулами Гб (так называемая система «толпящихся» молекул — «молекулярный краудинг»), реализуемых в изменении плотности упаковки белковой глобулы (глобина) и конформации гема каждой молекулы Гб (например, из-за электростатического взаимодействия между молекулами Гб_{цп} [37–39]. 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 pO_2 , 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 pO_2 , (в интервале pO_2 118–2 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 Ca^{2+} 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 pO_2 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».

Личный вклад автора:

Автору принадлежат выбор методов и решения поставленных целей и задач исследования, формулировка защищаемых положений. Из результатов совместных публикаций, в работу вынесены те, в которых личный вклад автора был определяющим. Выделение суспензии эритроцитов (СЭ) и раствора Гб автор проводил лично. Результаты, полученные методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), инфракрасной спектроскопии (ИК), пикосекундной флуоресценции триптофана, лазерно-интерференционной микроскопии, динамического светорассеяния, регистрации ζ -потенциала получены и проанализированы автором лично. Автор провел статистическую обработку данных и выполнил комплексный анализ результатов, представленных в работе ниже.

Работы по вытеснению кислорода из проб с СЭ и раствором Гб проводили совместно с к.б.н., доцентом кафедры биофизика биологического факультета МГУ

имени М.В. Ломоносова Лунева Оksаной Георгиевной и к.б.н., с.н.с. Деевым Леонидом Ивановичем.

Приготовление наноструктурированных серебряных подложек для регистрации ГКР–сигнала проводили совместно с аспирантом кафедры биофизика биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Бочковой Жанной Владиславовной. Выделение мембран (теней) эритроцитов проводили совместно с с.н.с. кафедры биофизика биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Байжумановым Адилем Ануаровичем и аспирантом Бочковой Жанной Владиславовной. Эксперименты по определению содержания ионов Na^+ и K^+ в эритроците были получены с.н.с. ИМБ РАН Петрушанко Ириной Юрьевной и аспирантом Зариповым Павлом Ильдаровичем. Эксперименты по электрофорезу автор проводил в лаборатории инженерии белка ИБХ им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством с.н.с. Чертковой Риты Валерьевны.

В обсуждении полученных экспериментальных данных с автором принимали участие сотрудники лаборатории биофизики клетки кафедры биофизика биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в.н.с. Браже Надежда Александровна, доцент Лунева Оксана Георгиевна, проф. Максимов Георгий Владимирович, с.н.с. Юсипович Александр Иванович, ординатор ФГБУ НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России Аллахвердиев Эльвин Сулейман оглы.

Связь с плановыми работами и возможность внедрения результатов работы:

Исследование поддержано грантом РФФИ Аспиранты-2020 «Исследование конформации и перераспределения гемоглобина в эритроцитах при старении эритроцита на основе метода Раман-спектроскопии» (№20-34-90073, 2020-2022 гг.)

Полученные результаты могут быть использованы в научных организациях и медицинских учреждениях, занимающиеся исследованиями и разработками в области молекулярной спектроскопии, биофизики, реологии крови и отделениях кардиологии. Результаты патента освещены в патенте «Способ прогнозирования

тяжести идиопатической легочной гипертензии» (№ 2770820, дата публикации патента: 22 апреля 2022).

Апробация работы:

Основные результаты работы докладывались на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, Российских и международных конференциях (23-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пушино, 2019), VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019), Актуальные вопросы биологической физики и химии (Москва, 2019), 26-я международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019), 27-я международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2020» (Москва, 2020), XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Санкт-Петербург, 2020), XXXII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020), 28-я международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (Москва, 2021), международная конференция 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (Краков, 2021), 7-й Урало-Сибирский семинар «Спектроскопия комбинационного рассеяния света (Екатеринбург, 2021), Форум молодых кардиологов «Спорные вопросы и инновации в современной кардиологии» Российского кардиологического общества (Москва 2021), XXXIII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2022), 29-я международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2022» (Москва, 2022), XXVIII Каргинские чтения (Тверь, 2022), «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2022» (Севастополь, 2022), Всероссийская научная конференция с международным участием «Енисейская фотоника-2022» (Красноярск, 2022)).

Публикации:

Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 21 работе, из них 7 статей в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК [40–46], индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI (РИНЦ), 1 патент, а также 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.

Благодарности:

Автор выражает благодарность своему научному руководителю Максиму Георгию Владимировичу. Автор благодарит членов лаборатории биофизики клетки кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и лично к.б.н. с.н.с. Паршину Евгению Юрьевну и к.б.н. с.н.с. Юсиповича Александра Ивановича.

Автор выражает благодарность кафедре биофизики и ее заведующему профессору академику Рубину Андрею Борисовичу. Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории физико–химии биологических мембран биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и её заведующему д.б.н. в.н.с. Максиму Евгению Георгиевичу.

Автор выражает благодарность к.ф.-м.н. ИМБ РАН Петрушанко Ирине Юрьевне. Автор выражает благодарность к.б.н. с.н.с. Чертковой Рите Валерьевне за обучение методам работы с электрофорезом в акриламидном геле. Автор благодарит д.т.н., профессора Левина Геннадия Генриховича за возможность работы на лазерном интерференционном микроскопе. Кроме того, автор благодарит к.б.н. в.н.с. Браже Надежду Александровну и к.б.н., доцента Луневу Оксану Георгиевну за плодотворные научные дискуссии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Строение и функции эритроцита

Движение форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов) осуществляется по замкнутой системе сосудов [47]. Эритроциты — специализированные клетки крови, основной функцией которых является транспорт лигандов (в том числе, O_2 , CO_2 , NO_x) по кровотоку от альвеол легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким. Эритроцит переносит O_2 , не потребляя его и не расходуя энергию благодаря своему основному белку — гемоглобину (Гб) [48, 49]. Транспорт O_2 и NO_x по организму возможен благодаря их диффузии через мембрану эритроцита и тканевого капилляра [50]. Катаболизм глюкозы является основным источником энергии в эритроцитах. Поступая в эритроцит путем облегченной диффузии, глюкоза расходуется в цикле анаэробного гликолиза (90%) и пентозофосфатном пути (10%). Кроме того, для эритроцитов характерно наличие бисфосфоглицератмутазы, участвующей в образовании 2,3-бисфосфоглицерата (2,3-БФГ) из 1,3-бисфосфоглицерата, которые так же оказывают влияние на способность гемоглобина (Гб, главный белок эритроцита, подробнее, см. главу 1.2.2 «Строение и функции гемоглобина эритроцита», стр. 25) связываться с кислородом и осуществлять газотранспортную функцию эритроцита [51, 52].

Ионный гомеостаз эритроцита обеспечивают многочисленные рецепторы, ионные насосы и АТФ-азы, тирозинкиназные рецепторы, локализованные на билипидной мембране клетки [53–56]. Цитоскелет, расположенный под мембраной, представляет собой двумерную сеть филаментов на внутренней поверхности плазмолеммы эритроцита, главной функцией которой является поддержание формы клеток, подвижности и перераспределения интегральных мембранных белков [57–59]. Помимо газообмена, эритроцит осуществляет перенос

и других биологически активных веществ, благодаря наличию на мембране рецепторов инсулина, соматотропного гормона, ацетилхолина, иммуноглобулинов и др., а дефосфорилирование клеточных белков в эритроците приводит к деформации эритроцита [59].

1.1.1. Строение плазматической мембраны и цитоскелета эритроцита

Мембрана эритроцита составляет около 1% суммарного веса клетки. Структура рельефа плазматической мембраны одинакова по всей поверхности, имеет высокую пластичность, содержит ряд мембраносвязанных ферментов гликолиза, пентозофосфатного цикла, системы глутатиона, адениловой и антиоксидантной системы, мембранорецепторный комплекс и ионтранспортные системы [60–62]. Такие свойства мембраны, как вязкость, текучесть и эластичность снижаются при увеличении жесткости цитоскелета, образовании комплексов Гб с глюкозой, снижении насыщенных фосфолипидов, увеличении внутриклеточного холестерина и АТФ, при снижении свободного экстраклеточного Ca^{2+} , а увеличение Mg^{2+} улучшает подвижность эритроцитов, контролируя внутриклеточный транспорт кальция и калия [53, 58, 63]. Липидный бислой эритроцитарной мембраны состоит из внешнего и внутреннего монослоя, с различным составом:

- В состав внешнего монослоя входит сфингомиелин (26%), фосфатидилхолин (28%), а также ферменты эктонуклеотидазы, и отрицательно заряженные сиаловые кислоты (главным образом, ответственны за формирование заряда на поверхности мембраны), антигенные олигосахариды и адсорбированные белки;

- В состав внутреннего монослоя мембраны входит фосфатидилсерин (13%), фосфатидилэтаноламин (27%), аминокислоты, ферментные комплексы, гликопротеины, а также Гб_{мс} и фиксированные анионы [58, 64].

В цитоплазме, под липидным бислоем расположен цитоскелет, который представляет собой ионный гель (набухший ионный эластомер), состоящий из спектрино-актиновой сети [65]. Сам спектрин состоит из расположенных антипараллельно и нековалентно связанных (посредством водородных, ионных (электростатических) и гидрофобных связей) полипептидных α - и β -цепей диаметром около 2 нм и длиной 100 нм [66]. Анкирин — белок, связывающий интегральные мембранные белки с цитоскелетом эритроцита благодаря сайтам связывания с β -субъединицами спектрина (полосы 2.1, 2.2 и 2.3) и принимает участие в связывании цитоплазматического домена белка полосы 3 (БПЗ) [61]. Стоит отметить, что на поверхности цитоскелета эритроцита расположено большое количество интегральных и поверхностных белков, что вместе с отрицательно-заряженными сиаловыми кислотами формирует подвижную, отрицательно-заряженную трёхмерную структуру [67]. Спектрин, расположенный на внутренней поверхности мембраны, имеет несколько участков связывания с Ca^{2+} и регулирует изменение формы (конфигурации и площади) клетки, которая может быть обусловлена изменением агрегации спектрина, рН среды и электростатического заряда мембраны [67].

Регуляция гомеостаза ионов в эритроците осуществляется интегральными белками (БПЗ, гликофорин, белки полосы 4.1, 4.2, 4.9, Ca^{2+} -зависимая полоса 8 и другие) [68], рецептор-управляемыми каналами (P_2X_7) [69], ион-транспортными системами (Ca^{2+} -АТФаза, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменник, Na^+/K^+ -АТФаза, Na^+/H^+ -обменник, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортер, K^+/Cl^- -котранспортер) [11, 70], аквапорином 1 (рисунок 2) [71]. Отметим, что изменения в латеральной диффузии белков эритроцитарной мембраны наблюдаются при 25–30 °С. Наибольший температурный эффект принадлежит спектрину — при 40 °С начинается процесс его анфолдинга и уже при 48 °С происходит разворачивание молекул спектрина (то есть, денатурация), что влияет на подвижность белков, контактирующих с молекулами липидного бислоя мембраны эритроцита [72]. Так же, белки цитоскелета могут регулировать конформацию БПЗ и гликофорина [73].

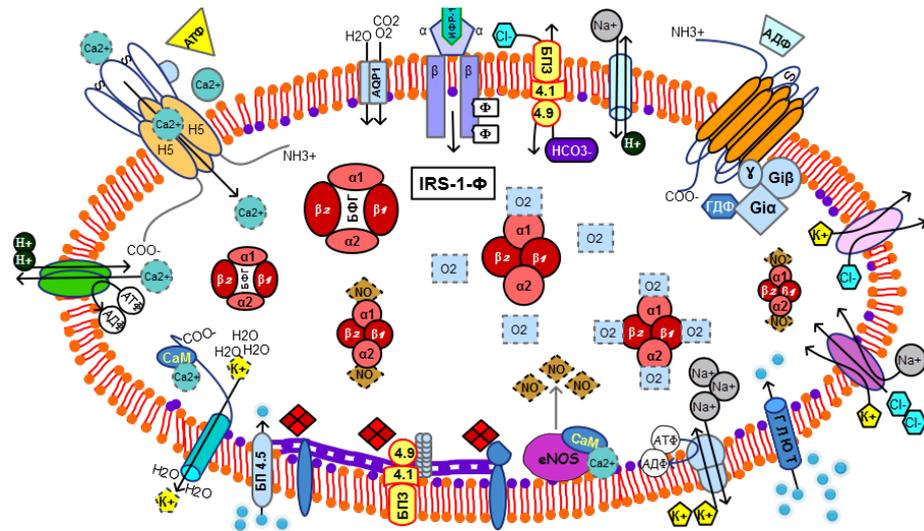


Рисунок 2 — Схема строения цитоплазматической мембраны эритроцита [74]

С другой стороны, при изменении трансмембранного (химический потенциал, который определяется градиентом концентрации ионов в клетке и экстраклеточной среде) и поверхностного (или ζ -потенциала) потенциала происходят изменения упаковки липидов, вызванные абсорбцией катионов (например, Ca^{2+} и Mg^{2+}) на поверхности плазматической мембраны [75, 76], а снижение числа водородных связей фосфолипидов мембраны эритроцитов приводит к снижению суммарного заряда фосфолипидных головок и сиаловых кислот, расположенных на поверхности мембраны [77], что снижает транспорт ионов (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) в клетку за счет изменения конформации трансмембранных белков [78, 79]. Кроме этого, ζ -потенциал зависит от вязкости липидного бислоя мембран (что, вероятно связано с перераспределением белков и липидов мембраны), механической устойчивости эритроцитов и конформации гликокаликса [80] (например, величина ζ -потенциала возрастает при старении эритроцита [15], при патологиях, связанных с увеличением концентрации экстраклеточного Ca^{2+} [13] (подробнее, см. главу 1.3.1 «Влияние $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ на функционирование эритроцита», стр.34) и при движении эритроцитов по кровеносному руслу [15]).

1.1.2. Молекулярный краудинг

Цитоплазма клетки представляет собой среду, в которой макромолекулы могут тесно взаимодействуют друг с другом ввиду того, что они занимают значительную часть цитоплазмы клетки (до 40%), снижая объем воды в цитоплазме и достигают концентраций 50–400 мг/мл [37]. В этих условиях, наблюдается эффект снижения «исключенного объема» внутриклеточной среды (эффект характеризует взаимодействия, связанные со столкновением молекул или олигомерных структур, когда объем одного из них снижается, другими словами — взаимная непроницаемость всех молекул растворенных веществ за счет неспецифического стерического отталкивания молекул [38]), который получил название «молекулярный краудинг» (от англ. crowding — столпотворение). Для биофизиков представляет интерес вопрос о роли структурных изменений цитоплазмы в регуляции объема и гемодинамики эритроцитов в сосудах [81]. С современной точки зрения, биохимические процессы в цитоплазме клетки протекают в среде, состоящей из ансамбля макромолекул, образующих функциональные комплексы из олигомеризованных молекул [82]. В теории молекулярного краудинга принято считать, что химическая активность молекул увеличивается не за счет случайных броуновских взаимодействий, а главным образом, за счет неспецифического стерического, электростатического и гидрофобного отталкивания молекул, что изменяет скорости, константы равновесий и диссоциации реакций (например, способствует образованию ассоциатов белковых комплексов) и форму макромолекул [38]. Известно, что молекулы Гб способны олигомеризоваться одинаково как в клетках, так и в растворе, благодаря чему данный процесс используется при производстве кровезаменителей (в качестве агентов связывания, обычно используют глутаровый альдегид, полиэтилен-гликоль, декстран) [83]. При этом, процесс олигомеризации (образование ассоциатов) при котором происходит образование волокна

характерен только для дГб, а формирование олигомерных волокон из молекул Гб происходит в 2 этапа:

1. Семь молекул дГб собираются вместе, формируя ядро, которое станет началом будущего олигомерного волокна. Молекулы Гб слипаются между собой, образуя S–S связи между цепями β_1 одной молекулы и β_1 другой молекулы Гб;
2. Ядра олигомерного волокна из молекул Гб слипаются между собой, образуя длинные волокна и/или стержни (рисунок 3) [83, 84].

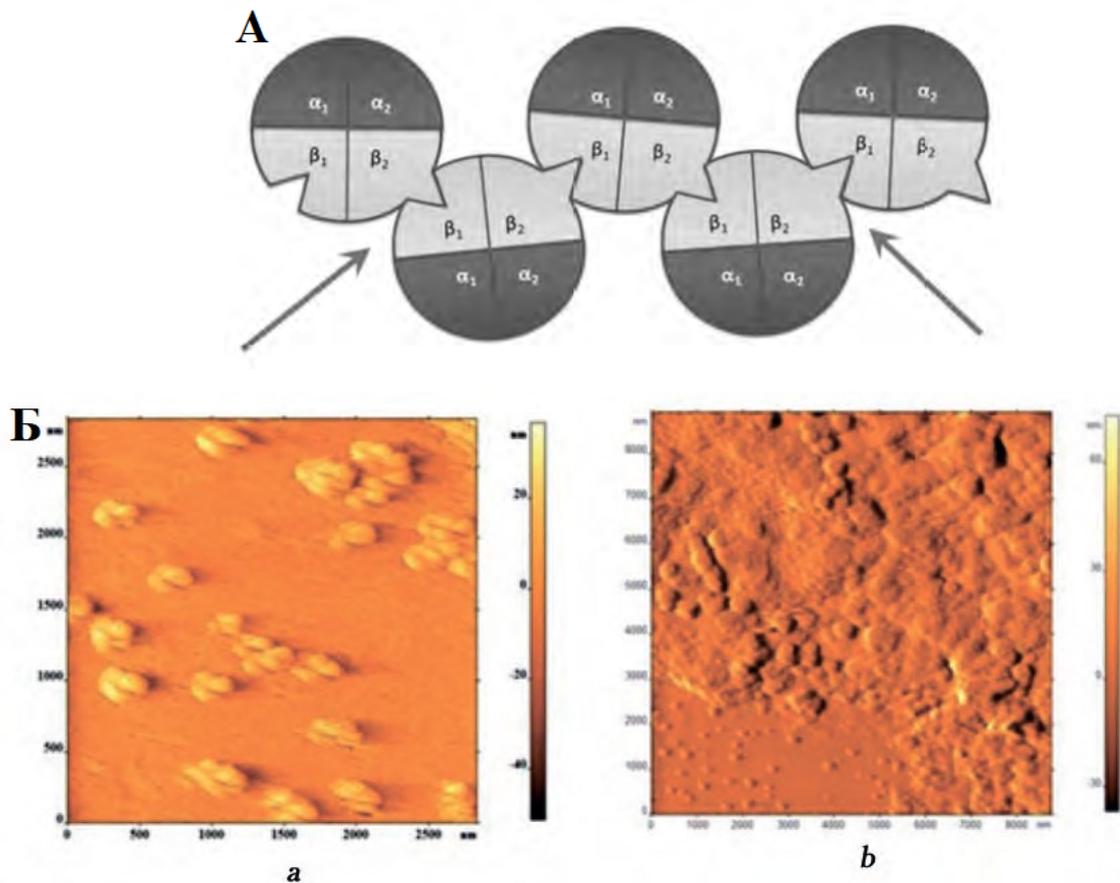


Рисунок 3 — А — полимеризация молекул Гб, стрелки показывают соединение β_2 и β_1 цепей молекул Гб, Б — коагуляция Гб после добавления 6 мМ Zn в раствор Гб: а — инкубация 30 мин, выявлено образование коагулянтов из молекул Гб в виде зерен, размером 20–70 нм, б — через 60 минут инкубации с 6 мМ Zn, зерна коагулянтов Гб объединились и увеличились в размере [83]

Для биофизики представляет большой интерес изучение явлений, связанных с конформационным состоянием белка — определенным, но не застывшим ввиду подвижности взаимно расположенных частей белковой молекулы, так как компактно свернутый белок будет занимать меньший объем, чем развернутая

белковая цепь. При этом, будет отмечаться снижение количества молекул воды, в гидратной оболочке биомолекулы и все молекулы воды в растворе станут связанными (то есть, в таких условиях снижается количество свободной (несвязанной) воды между биомолекулами (подробнее о роли воды в цитоплазме эритроцита в главе 1.3.2 «Роль воды в функционировании эритроцита», стр. 36). Одним из способов изучения конформационной подвижности белков в условиях снижения «исключенного объема» (то есть, перераспределение свободной и связанной воды в цитоплазме), является моделирование поведения макромолекул в виде сферических жестких частиц, которое показало, что эффект молекулярного краудинга оказывает влияние на коэффициент диффузии больших молекул больше, чем на малых (то есть, эффект на биологическую активность белков (их способность связываться с лигандами) и ферментов выше, чем на аминокислоты). Данный эффект связан с тем, что при снижении «исключенного объема» увеличивается степень димеризации биомолекул (и, как следствие, их олигомеризация), что в свою очередь ускоряет процесс химических реакций [85].

Таким образом, для понимания процессов, происходящих в цитоплазме живой клетки, недостаточно имитировать условия *in vitro*. Эффект молекулярного краудинга показывает, что измерения, выполняемые в разбавленном растворе, могут не отражать реальный характер происходящих внутри клетки изменений [37–39].

1.1.3. Белок полосы 3

Анионный обменник 1 (АЕ1) или белок полосы 3 (БПЗ) представляет собой белок мембранного цитоскелета эритроцитов. Известно, что БПЗ играет важную роль в анионном транспорте, а также, осуществляет взаимодействие с гемоглобином С (примембранный (или мембраносвязанный, в зависимости от взаимодействия с мембраной) Гб, на долю которого приходится около 0,5% Гб от

общего количества Гб клетки) [78]. Известно, что цитоплазматический домен БПЗ связывает спекترین через белок 2.1 (анкирин) [72], а так же, его анион чувствительный N-конец (CDB3) содержит центры связывания глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназы, участвующей в гликолизе и окислении Гб [86, 87].

NH₂-терминальный участок БПЗ с гибким анион-чувствительным сегментом может входить в катионную центральную полость примембранного дГб. Предполагается, что при связывании молекулы кислорода, изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб увеличивают плотность отрицательного заряда в центральной полости дГб, способствуя смещению анионного сегмента в БПЗ [86]. За счет изменения поверхностного потенциала (и ζ-потенциала) на цитоплазматической стороне мембраны происходит изменение упорядоченности жирнокислотных хвостов фосфолипидов и изменение OH-групп тирозина белков мембраны (в том числе, БПЗ), в результате, происходит снижение доли связанного с БПЗ Гб_{мс} [88].

В условиях гипоксии, в цитоплазме эритроцита увеличивается продукция 2,3-БФГ и сфингозин-1-фосфата — липида, обладающего сигнальной функцией. Сфингозин-1-фосфат способствует усилению гликолиза в эритроцитах и обеспечивает высвобождение O₂ из клетки [89]. Так же, сфингозин-1-фосфат напрямую связывается с дГб способствуя его связывания с БПЗ в мембране, что приводит к увеличению гликолиза и продукции 2,3-БФГ, который в свою очередь конкурирует с БПЗ за один и тот же сайт связывания и снижает количество Гб_{мс} (рисунок 4) [61, 90].

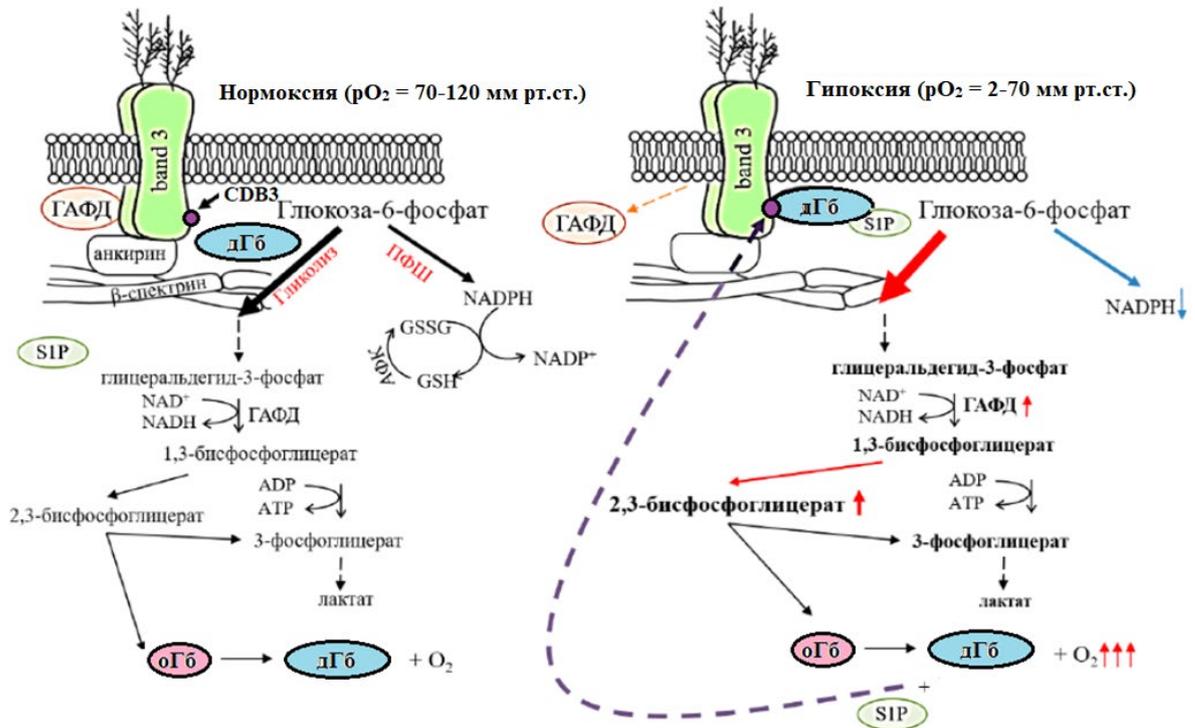


Рисунок 4 — Схема изменения метаболизма эритроцитов в условиях гипоксии благодаря взаимодействию сфингозин-1-фосфата (S1P) с дГб и взаимодействию аниончувствительного участка БПЗ (СДВЗ) с центральной катионной полостью дГб. В результате, происходит усиление высвобождения глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) в цитоплазму, (band 3 — БПЗ) [91]

1.2. Гемоглобин

1.2.1. Общая характеристика семейства глобинов

Представители семейства глобинов встречаются почти во всех живых организмах. Причина высокого интереса к изучению глобинов лежит в их функциях — глобины выполняют газотранспортную функцию, участвуют в метаболизме NO_x , обезвреживании активных форм кислорода, внутриклеточной передаче сигналов, защите от апоптоза и выработке энергии в процессе окислительных реакций [92]. Большинство глобинов относят к металлопротеинам,

содержащих простетическую группу — гем и белковую часть — глобин. Наиболее распространенным гемом является железосодержащий комплекс гемопорфирин — Fe^{2+} -протопорфирин IX, обратимо связывающий кислород и другие лиганды [22]. Наиболее известными представителями семейства глобинов являются гемоглобин и миоглобин благодаря своей большой роли в процессах переноса кислорода [92].

Для семейства глобинов характерно наличие гистидина (His) в проксимальном положении F8, который образует координационную связь между глобиновой частью молекулы и Fe^{2+} . При дезоксигенации (процесс вытеснения кислорода), шестой сайт связывания Fe^{2+} остается незанятым, а связывающий лиганд (CO_2) вытесняет дистальный остаток His, вызывая конформационные изменения глобина [93].

1.2.2. Строение и функции гемоглобина эритроцита

Цитоплазматический Гб — основной внутриклеточный белок эритроцита, который обеспечивает перенос O_2 , CO_2 , NO_x в организме [79, 94]. Известно, что помимо своей основной функции, Гб выполняет буферную функцию, поддерживая внутри эритроцита $\text{pH}=7,2$: согласно эффекту Гиббса–Доннана, отрицательно заряженный Гб «выталкивает» отрицательно заряженные ионы из клетки путем облегченной диффузии ионов через мембрану [95–97]. Другими функциями Гб являются: окисление гема и старение эритроцитов, устойчивость к малярии [98].

Молекула Гб состоит из четырех субъединиц, включая две α -спирали (содержат по 141 аминокислотному остатку) и два β -листа (содержат по 146 аминокислотных остатков), которые образуют вместе восемь спиральных участков. Субъединицы Гб соединены друг с другом за счет гидрофобных взаимодействий, образуя $\alpha_1\beta_2$ - и $\alpha_2\beta_1$ -димеры, в результате чего образуют четвертичную структуру Гб [99]. В качестве гема, Гб содержит четыре железо-протопорфирина в гидрофобных областях, образованных складками полипептидных цепочек глобина

полипептидной цепи. Железо в ферро-состоянии (Fe^{2+}) координационно связано с четырьмя атомами азота пирролов плоского порфиринового «кольца», пятая координационная связь перпендикулярна плоскости «кольца» и соединяет атом Fe с N-концом гистидина имидазольного «кольца». В оГб, шестая валентная связь занята лигандом, а в дГб свободна [100]. Молекула оГб более компактно расположена по сравнению с молекулой дГб: атом Fe^{2+} погружен в плоскости порфиринового «кольца» на 0,8 Å, расстояние в β -цепях снижается на 2 Å и в α -цепях на 1,3 Å [101, 102].

Существует три модели взаимодействия кислорода с гемом, но в настоящее время, принято считать, что изменение функций Гб основано прежде всего на принципе связанного с лигандом конформационного изменения в многосубъединичной структуре — молекула Гб состоит из 4 протомеров (субъединиц) [103–105]. В рамках аллостерической модели с двумя состояниями, предложенной Monod et al. [25], строение электронных оболочек атома железа оГб характеризуется возможностью изменения конформаций валентных связей с преобладанием орбиталей со спаренными электронами $3d^6$, что более энергетически выгодно для образования низкоспиновых комплексов. В рамках модели Monod, существует зависящее от парциального давления кислорода ($p\text{O}_2$) равновесие между двумя различными четвертичными структурами из (низкоаффинное состояние или T-форма (дГб), характеризуется «куполообразной» конформацией гема и высокоаффинное состояние или R-форма (оГб), характеризуется «плоской» конформацией гема). Отметим, что наиболее стабильными состояниями Гб являются дезоксиформа Гб (форма T_0), которая стабильна, когда лиганд (нижний индекс «0») не связан с гемовым железом и оксиформа Гб (форма R_4), которая стабильна, когда каждый из четырех групп гема имеют лиганд (индекс «4»), связанный с гемовым Fe [106].

При низкой концентрации кислорода, когда Гб находится в дезоксигенированном состоянии, предпочтительна четвертичная структура с низким сродством к O_2 (или T-форма). Постепенное увеличение степени насыщения лиганда смещает равновесие в сторону высокоаффинного (или

R-форма) четвертичной структуры. Таким образом, T-форма имеет низкое сродство к O_2 и высокое сродство к H^+ , хлоридам, органическим PO_i и CO_2 . В R-состоянии эти относительные сродства меняются местами [98]. Другими словами, кооперативное связывание кислорода возникает из-за эффекта связывания лиганда на отдельной субъединице Гб (1) и взаимодействиями между субъединицами Гб в четвертичной структуре молекулы (2). Следовательно, сигмовидная форма зависимости связывания молекул Гб с O_2 (кривая насыщения Бора [107]) характеризует последовательное кооперативное связывание тетрамеров Гб лигандов и конформационные переходы молекулы Гб (промежуточные состояния между конформационными переходами $T_0 \rightarrow R_4$ при кооперативном связывании гемов Гб с лигандами) [98].

Так называемый, «кислородный гомеостаз» на молекулярном уровне может быть описан как динамическое равновесие между O_2 -связанным и безлигандным Гб на одном из четырех атомов железа гема и зависит от pO_2 [106]. При этом, эритроцит принимает участие в кислородном гомеостазе Гб (выделение 2,3-БФГ, АТФ при дезоксигенации или при низком pO_2), регулируя аллостерические свойства Гб связываться с лигандами (O_2 , CO_2 , NO_x) путем структурной адаптации (так, 2,3-БФГ встраивается в центральную полость тетрамера молекулы дГб, связывается с β -цепями (H-спирали), образуя поперечный солевой мостик (новые H-связи и ионные связи) между атомами кислорода и NH_2 -группами аминокислотных остатков лизина и гистидина) и стабилизации структуры дГб. В результате, Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} , что приводит к увеличению сродства к кислороду и уменьшению кооперативности, что может привести к полной потере способности обмена молекулами O_2 между молекулами Гб [98]. Дело в том, что для конформационной перестройки и связывания первой молекулы O_2 с гемом необходимо разорвать большое количество солевых мостиков (C-концы глобина дГб дважды соединены солевыми мостиками, аминокислотные остатки тирозина зафиксированы в полостях между α -спиралями H-связями), что энергетически не выгодно.

Известно, что кооперативный переход в молекуле Гб происходит следующим образом: при присоединении первой молекулы кислорода к железу (за счет 6-й координационной связи) атом железа втягивается в плоскость гема, а молекула O_2 остается вне плоскости, что вызывает смещение участка белковой цепи (глобина) и изменение конформации первого мономера Гб. Изменения первого мономера вызывает структурные изменения соседнего мономера (субъединицы), облегчая присоединение последующих молекул O_2 . Однако, в настоящее время, в литературе отсутствуют данные об изменении конформации гемовой и глобиновой части Гб при изменении парциального давления O_2 в крови, что могло бы характеризовать кооперативный переход между мономерами Гб в тетрамере [94, 108]. При этом, учитывая, что молекулы Гб способны олигомеризоваться, видится перспективным установить, как изменение pO_2 влияет на кооперативный переход (например, на настоящий момент не известно, что именно вызывает кооперативный переход — изменение конформации гема или плотности упаковки глобина), что могло бы помочь в понимании функционирования Гб и последовательности его конформационных перестроек.

1.2.3. Распределение гемоглобина в эритроците

Долгое время было принято считать, что эритроцит представляет собой «мешок с гемоглобином», что характеризует гомогенное распределение молекул Гб в цитоплазме эритроцита. Однако, за последние десятилетия были обнаружены несколько типов Гб в эритроцитах человека, отличающихся друг от друга последовательностью аминокислот: ГбА (Гб_{цп}) — нормальный Гб, составляет 95–98% от цитоплазматического Гб в клетке; ГбВ (Гб_{мс}) — нормальный Гб, расположенный около внутренней стенки цитоскелета эритроцита, составляет 0,5% от общего количества Гб в клетке и др. [109]. Отметим, что все молекулы Гб в эритроцитах можно разделить на две группы: свободный Гб цитоплазмы (Гб_{цп}) и

субмембранный Гб, взаимодействующий с плазматической мембраной (Гб_{мс}). Отдельно выделяют Гб_{цп}, расположенный в примембранном слое цитоплазмы, но не взаимодействующий с компонентами мембраны эритроцита (Гб_{пр}). Гб_{пр} расположен в эритроците тонким слоем около цитоплазматической мембраны, который увеличивает свою толщину при деполяризации мембраны, что необходимо для компенсации заряда на цитоплазматической поверхности мембраны. Так же, предполагается, что для молекул Гб_{пр} характерно более плотное расположение молекул относительно друг друга, чем для Гб_{цп} [59, 109–111]. В последнее десятилетие стали появляться данные, о том, что Гб расположен в эритроците не хаотично, а имеет некую упорядоченность (то есть, возможно гетерогенное распределение молекул Гб в цитоплазме эритроцита). Прежде всего, к упорядоченному распределению Гб, относят Гб_{мс}, который способен взаимодействовать двумя способами с поверхностью плазматической мембраны: взаимодействие с липидами мембраны и с цитозольной частью анионнообменника БПЗ. Взаимодействие Гб_{мс} с БПЗ достаточно хорошо изучено в системе *in vitro* очищенного Гб и мембраны эритроцитов или очищенного Гб_{мс} и цитозольной части БПЗ [112]. Методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) (подробнее, см. главу 2.11.1 «Спектроскопия комбинационного рассеяния гемоглобина», стр. 61) было доказано, что Гб_{цп} и Гб_{мс} имеют различную конформацию гема при одинаковых условиях в одной и той же клетке [35]. Таким образом, было выдвинуто предположение, что Гб_{мс} участвует в эстафетной передаче молекулы O₂ и CO₂ Гб_{цп}. Так же, для Гб_{мс} характерна большая вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, чем для Гб_{цп} в одной клетке [110, 113, 114].

Первые предположения о том, что Гб должен иметь упорядоченное (гетерогенное) распределение в эритроците, начинают появляться в литературе с середины XX века. Например, Klug [115] выдвинул гипотезу о диффузии и перемещении слоев из молекул Гб в цитоплазме клетки, согласно которой, градиент O₂ может создавать движущую силу, если присутствует переносчик, такой как Гб, который связывает O₂ в области с высокой концентрацией O₂ и высвобождает его

в области цитоплазмы эритроцита с низкой концентрацией O_2 . Zander и Schmid-Shobein [116] выдвинули гипотезу, что внутриклеточный транспорт O_2 в слоях цитоплазмы, вызванный деформацией эритроцита при их движении по кровеносному руслу, имеет большее значение, чем диффузия O_2 , и что присутствие молекул O_2 играет важную роль в процессах дезоксигенации. Vandegriff и Olson [117] сообщили о нескольких факторах, важных для диффузии O_2 при разработке моделей эритроцитов. К ним относятся размер и морфология клеток, внутриклеточная концентрация гемоглобина, изменения внутриклеточного рН, PO_i , и толщина «неподвижного слоя молекул Гб», прилегающего к клетке (вероятно, исследователи имели в виду слой Гб_{пр}, молекулы которого выстраиваются около цитоскелета и реагируют на изменение заряда внутренней поверхности мембраны и Гб_{мс}, который связан с мембраной [118], но Гб_{мс} еще не был открыт). Vouwer и др. [119] рассчитали коэффициенты диффузии O_2 для тонких слоев Гб, представляя цитоплазму, как турбулентную жидкость (имеется в виду, неомогенное распределение Гб и воды внутри эритроцита; при этом, исследователи предполагали, что около мембраны соотношение Гб : вода выше и его снижение происходит при движении к центру эритроцита). Так, было получено, что содержание Гб и O_2 в цитоплазме клетки составляет 46 и 100 г/л соответственно [119].

До сих пор большинство исследований процессов оксигенации Гб в эритроците основывалось на изучении изолированного Гб *in vitro*. В 2005 году, Wood при помощи КР-спектроскопии показал на фиксированных 0,01% раствором гидробромида поли-L-лизина (SIGMA) эритроцитах, что в этих клетках существует отчетливое упорядочение молекул Гб (по конформационным состояниям гема). Однако, все еще неясно, является ли это упорядочение компартиментализованным или представляет собой общую ориентацию Гб внутри клетки [120]. Важно отметить, что эксперименты обычно проводят на отдельных клетках и не учитывают их скопления (как в экспериментах с оксигенацией сосудов [121]), а так же, возможного распределения Гб по конформации и степени оксигенации внутри цитоплазмы. Таким образом, на данном этапе изучения

эритроцитов и Гб, можно только догадываться о возможности ориентации Гб в клетке, которая, скорее всего, необходима для увеличения эффективности внутриклеточного транспорта O_2 в условиях исключенного объема клетки. При этом, существуют предположения, указывающие на необходимость гетерогенного распределения Гб [115, 116, 120]:

- Существует упорядоченность молекул Гб (по конформации *гема*) в клетке;
- Упорядоченность/передача O_2 зависит концентрации Гб;
- Выдвинуто предположение, что ориентация *гема* в клетке — важный фактор диффузии O_2 в эритроците;
- Гб в растворе расположен монослоем ($\Gamma_{||}$).

Научная новизна нашей работы заключается в исследовании механизма изменения конформации и распределения молекул гема и глобина Гб, а также общей динамики физико–химических параметров эритроцита (морфология и объем клетки, поверхностный заряд, конформация и распределение Гб) на выделенных клетках *in vitro* в ответ на изменение внешних условий (изменение pO_2 , температуры, $[Ca^{2+}]_{out}$, $[Na^+]_{in}$). Используемые в работе методы молекулярной (оптической и колебательной) спектроскопии — метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), инфракрасной спектроскопии (ИК), пикосекундной триптофановой флуоресценции, лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) позволяют оценивать изменения исследуемых параметров как для выделенных эритроцитов, так и эритроцитов в плазме крови [122–124]. Мы предполагаем, что изменение ζ -потенциала клетки и объема могут регулировать изменения конформации гема и глобина Гб и сродство Гб к O_2 .

1.3. Функционирование эритроцита

1.3.2. Гемодинамика

Эритроциты — красные клетки крови, передвигающиеся по сети кровеносных сосудов в организме. Эритроциты принимают участие в следующих функциях организма: буферная функция, питательная (перенос на поверхности мембраны органических веществ), защитная, антиоксидантная, гемостаз, гуморальная регуляция, а также, принимают участие в регуляции сосудистого тонуса [53]. Сами клетки эритроцитов выполняют функцию сенсора кислорода, при локальной гипоксии тканей [125], стимулируя высвобождение АТФ. Высокая способность эритроцитов к деформации [126], высокая вязкость нормального Гб (ГбА, ГбВ) [58] и высокая проницаемость мембран для молекул воды (диффузия воды через мембрану, аквапориновые каналы, подробнее, в главе 1.3.2 «Роль воды в функционировании эритроцита», стр. 36), позволяет эритроцитам быстро изменять форму и размер клеток при движении по кровеносной системе в зависимости от диаметра сосудов [59, 127].

На другие не менее важные физиологические процессы: суспензионную устойчивость эритроцита (отсутствие агрегации) [128] и поддержание сосудистого тонуса, существенное влияние оказывает высокая способность к изменчивости поверхностного заряда эритроцитарной мембраны при поддержании нормального функционирования клетки [59, 129], которая зависит от следующих параметров окружающей среды:

1. Изменение pO_2 изменяет поверхностный заряд (и ζ -потенциал) при прохождении через лёгкие и ткани, а также, осуществление газообмена при движении по капиллярам и венам кровеносных сосудов (оксигенация крови при прохождении эритроцитами по кровеносному руслу меняется от 20–45 мм рт.ст. в

венозной крови до 75 мм рт.ст. в артериальной крови; в скелетных мышцах и тканях, где необходим интенсивный газообмен, pO_2 составляет 5–10 мм рт.ст.).

2. В капиллярах происходит изменение ζ -потенциала эритроцитов за счет взаимодействия эритроцита с эпителием кровеносных сосудов (моноунитарный тип гладкомышечных клеток, характеризуются низким потенциалом покоя и высокой проницаемостью для Na^+) и увеличения Ca^{2+} в сосудах и скелетных мышцах (экранирование сиаловых кислот на поверхности эритроцита приводит к снижению ζ -потенциала клетки) [13], а так же, изменения активности ионтранспортных систем (например, при нехватке Mg^{2+} в организме) [17, 18].

Помимо изменений, происходящих эритроцитом, большое внимание уделяется внутриклеточным процессам изменения конформации Гб [83, 98]. Известно, что Гб меняет конформацию гема и глобина в ответ на внешние воздействия (изменение pO_2 , pH, вязкость мембраны) [130] и старение эритроцита [15], для которого так же характерно снижение вязкости мембраны и увеличении ζ -потенциала клетки [131]. Изменение температуры в физиологическом диапазоне температур не оказывает существенного влияния (~3%) на текучесть мембраны (за счет увеличения содержания сфингомиелина ненасыщенных жирных кислот) [6]. Для млекопитающих характерен экзотермический тепловой эффект связывания кислорода (понижение температуры вызывает увеличение сродства к O_2 Гб_{цп} в клетке) ввиду увеличения вероятности связывания молекул O_2 с Гб и аллостерическим переходом $T_0 \rightarrow R_4$ конформации Гб [59, 132, 133]:

Известно, что при старении эритроцитов происходит снижение ζ -потенциала клетки и наблюдается перераспределение Гб в клетке по данным КР-профиля [131]. Таким образом, мы предполагаем, что при моделировании состояний, подобных тем, что испытывают эритроциты при движении по кровеносным сосудам, можно наблюдать процессы, связанные с перераспределением мембраносвязанного, примембранного и цитоплазматического Гб методом КР-спектроскопии без приложения механического воздействия, которые испытывают эритроциты при движении по кровеносному руслу (турбулентность, агрегация, изменение формы и объема и т.д.).

1.3.1. Влияние $[Ca^{2+}]_{out}$ на функционирование эритроцита

Важным регулятором работы сердечно сосудистой системы является содержание таких электролитов, как ионы кальция и магния. Дисбаланс Ca^{2+} в плазме крови может приводить к осложнениям разного рода: ожирение, инсулинорезистентность, ишемия сердца, иммунная гиперчувствительность, регуляция сосудистого тонуса, сократительная способность миокарда [134–136]. Так, при увеличении экстраклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{out}$) наблюдается кальцификация артерий (например, у больных остеопорозом [13]), а также, преждевременное старение эритроцитов и их гемолиз из-за гиперполяризации мембраны [16] и накоплению концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_{in}$), что приводит к эриптозу [136]. С другой стороны, снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ приводит к снижению усвоения витамина D, увеличению артериального давления [13], патологии костной ткани, дефициту эстрогенов [134, 135], а так же, истощение клеток эритроцитов по АТФ [137].

Для ионов кальция характерно большое различие по концентрации во внутриклеточной среде эритроцита и плазме крови. Так, в норме, содержание $[Ca^{2+}]_{in}$ поддерживается на уровне около 1 мкМ, а активное поступление из экстраклеточной среды ($[Ca^{2+}]_{out}$ составляет в норме в плазме крови 1–2,5 мМ [138]) контролируется активным транспортом через цитоплазматическую мембрану при участии Ca -зависимых K^+ каналов (отвечают за вход Ca^{2+} по градиенту концентрации) и Ca^{2+} -АТФазы (отвечает за выход Ca^{2+} за счет гидролиза АТФ), перенося 1 Ca^{2+} из клетки в обмен на 2 H^+ [138, 139]. Известно, что увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ до 50 мкМ в цитоплазме эритроцита приводит к снижению его эластичности (происходит высаливание молекул Гб и активация K^+ -(Ca^{2+})-каналов [140]), агрегации клеток и снижению поверхностного потенциала мембраны [16, 131, 141]. В то же время, $[Ca^{2+}]_{out}$ регулирует поверхностный заряд и мембранный потенциал клетки, упорядоченность фосфолипидов липидного бислоя мембраны, конформацию белков плазматической мембраны клетки [16].

Ранее, на эритроцитах голубя было показано, что увеличение концентрации $[Ca^{2+}]_{out}$ до 3,5 мМ приводит к изменению фазового профиля клетки (данные получены методом ЛИМ) и нарушению её морфологии [142]. Авторы связывают наблюдаемые процессы с гиперполяризацией мембраны [143] в следствие которой выходят K^+ (скорость выхода K^+ при работе $K^+-(Ca^{2+})$ -каналов составляет $1,19 \pm 0,4$ мМоль/л/мин) и наблюдается снижение объема клетки — Гардош эффект. Авторы работы отмечают, что данные процессы незначительно увеличивают количество комплексов оГб и способность Гб выделять лиганды (данные получены методом КР, рисунок 5). При этом, авторы не уделяют особого внимания перераспределению Гб (на рисунке 5 видно смещение максимума интенсивности КР–сигнала в нижнюю часть клетки) внутри клетки и связывают данные изменения исключительно со снижением объема эритроцита и избавлению эритроцита от ядра [144].

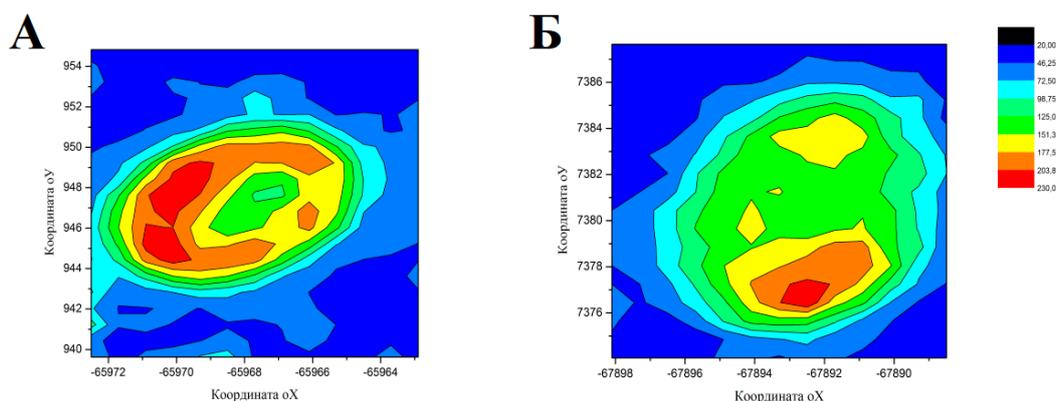


Рисунок 5 — КР–картирование эритроцитов голубя. А — контроль, Б — 30 минутная инкубация эритроцитов голубя с 3,5 мМ CaCl₂

Мы предполагаем, что снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ (характерно, например, для людей, не занимающихся спортом [145]), которое не вызывает деструкции мембран эритроцитов и не запускает процесс эритроптоза, будет способствовать изменению ζ -потенциала мембраны, что может оказать влияние на перераспределение Гб в цитоплазме. Данное предположение представляет интерес в связи с тем, что гиперполяризация мембраны оказывает влияние на белки, расположенные на поверхности мембраны [76]. Особый интерес представляет БПЗ [61], который имеет NH₂-терминальный участок с гибким анионным сегментом и может входить

в катионную центральную полость дГб. Предполагается, что при связывании молекулы кислорода, изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб увеличивают плотность отрицательного заряда в центральной полости дГб, способствуя смещению анионного сегмента в БПЗ [86]. Модификация отрицательного заряда БПЗ приведет к модификации связанного с ним дГб, запуская каскад внутриклеточных перестроек, в результате которых может наблюдаться перераспределение молекул Гб в эритроците.

1.3.2. Роль воды в функционировании эритроцита

Эритроцит представляет собой клетку с «исключенным объемом», в цитоплазме которой реакции протекают в высококонцентрированной среде. Так, известно, что примерно 97% белкового состава эритроцита занимает Гб, а 72% цитоплазмы принадлежит воде [146]. Однако, интересны процессы, связанные с сохранением доли воды в цитоплазме, которые чувствительны к температуре [147], структурным изменениям мембраны [148, 149]. Так же, интерес представляют взаимодействия между макромолекулами в условиях молекулярного краудинга, изменение суммарного заряда биомолекул при изменении доли растворителя (воды) в цитоплазме клетки [150]. С другой стороны, сохранение гидратации имеет жизненно важное значение не только для самих эритроцитов, но и для организма: благодаря работе ионных каналов и аквапоринов, эритроцит регулирует содержание ионов солей и воды в условиях внеклеточных и внутриклеточных осмотических возмущений для поддержания узкого диапазон концентрации Гб — критически важный процесс для нормального функционирования эритроцитов и их выживания [127, 151]. Нарушение объема клетки (увеличение объема клетки приводит к гемолизу, а сокращение объема клетки может вызывать «высаливание» молекул Гб) приводит к преждевременной гибели и повреждениям эритроцитов (например, серповидно-клеточная анемия, наследственный сфероцитоз) [151].

Однако, помимо увеличения объема, для эритроцитов возможен и обратный процесс — его уменьшение. Например, при обезвоживании, наблюдается процесс, известный как увеличение регуляторного объема (RVI), который опосредован в первую очередь Na^+/H^+ обменом и котранспортом ионов $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ [152]. Эритроциты человека относятся к очень небольшому числу типов клеток, для которых уменьшение объема, вызванное потерей растворенных веществ (например, при снижении концентрации внутриклеточных ионов или биомолекул), является необратимым процессом; по мере старения эритроциты теряют объем и становятся более плотными [153, 154]. В конце XX века, группа G.Artmann установила, что при помещении эритроцита в капилляр с диаметром канала $1,3 \pm 0,2$ мкм (диаметр эритроцитов 7–8 мкм), обеспечивающей перепад давления 2,3 кПа, объем эритроцитов при входе в капилляр снижался почти вдвое. При этом, происходила потеря 55% цитоплазматической воды, а концентрация внутриклеточного Гб возрастала в 1,7 раз (по мнению G.Artmann, при втягивании эритроцита в капилляр, концентрация Гб возрастает в до 500 мг/мл за счет выхода воды из клетки, рисунок 6). Предполагается, что данные процессы аналогичны тем, что протекают в организме при входе эритроцита из сосудов в капилляры [155].

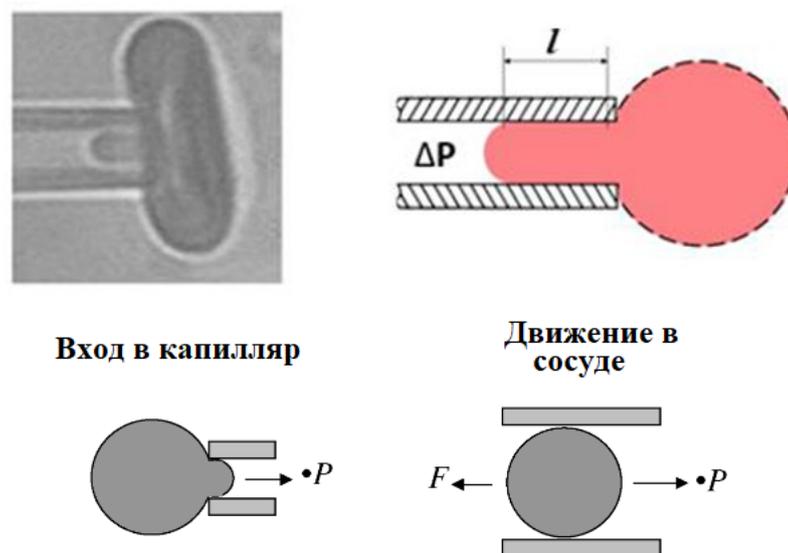


Рисунок 6 — Измерение деформационных свойств эритроцитов при аспирации клетки внутрь рабочего пространства пипетки (слева — фото изображение, справа — схематичное изображение деформации, снизу представлено схематичное изменение формы эритроцита при входе в капилляр и его движения в сосуде (широкий капилляр)) [156, 157]

Не менее интересным результатом оказалось то, что в эритроцитах человека наблюдался фазовый переход между гелеобразной и жидкой фазами при температуре 36,6–36,9 °С (310 К) [155]. Отметим, что температура фазового перехода в мембране коррелирует с температурой тела соответствующего вида, которая увеличивает модуль Юнга для белков цитоскелета эритроцита и вязкость мембраны [158]. При этом, с увеличением температуры снижается эффективность водообмена через аквапорины мембраны эритроцитов [147]. Безусловно при увеличении температуры, фазовый переход мембраны значительно снижает вероятность повреждения и разрыва мембраны при входе эритроцита в капилляр [155].

При формировании гидратных оболочек биомолекул большую роль играют Н–связи. Так, при входе в капилляр, молекулы Гб сближаются, гидратный слой около молекул Гб уменьшается, нарушается взаимодействие Н–связей, препятствующая олигомеризации молекул Гб и через аквапориновые каналы выходят молекулы воды [159, 160]. Другими словами, растворенное вещество и вода разделяются, что приводит к увеличению образования Н–связей между молекулами воды при минимизации площади контакта между растворенным веществом и водой [161]. Однако, молекулы воды влияют на внутреннее движение молекул и регулируют возможность взаимодействия молекул Гб друг с другом, образуя вокруг каждой из молекул Гб гидратную оболочку. Однако, в условиях цитоплазмы (концентрация белка в цитоплазме эритроцита с достигает 330–400 мг/мл), молекулы воды не могут создать гидратную оболочку достаточного размера, чтобы полностью экранировать заряд биомолекул [162, 163]. Для решения этого вопроса, использовали метод классической молекулярной динамики, который позволяет представить изменения, происходящие на границе раздела фаз Гб/вода уделяя большое внимание структуре, динамике белка и его окружения [94]. В результате моделирования, было обнаружено, что состояние R_0 более стабильно, чем T_0 [164], а скорость перехода $T_0 \rightarrow R_0$ зависит от размера окна моделирования (объем воды, в котором находится молекула Гб при построении математической модели). В условиях, когда количество молекул воды в 10 раз больше, наблюдается

стабилизация молекул T_0 за счет гидрофобного эффекта [165]. Быстрый переход $T_0 \rightarrow R_0$ обусловлен высоким значением коэффициента диффузии воды в смесях Гб/вода при ~ 330 мг белка/мл [166]. Так же, было обнаружено, что среднее расстояние между макромолекулами в условиях макромолекулярного краудинга цитоплазмы эритроцита составляет порядка 10 \AA , что соответствует всего ~ 3 слоям молекул воды, а процессы, переориентации воды на поверхности белка замедляется в 2–3 раза по сравнению с водой в растворе [36], что значительно отличается от большинства исследований, выполненных методами молекулярной динамики [94].

Очевидно, что изменения морфологии или объема эритроцита приводят к изменению способности Гб связывать и сбрасывать лиганды (в том числе O_2 и NO_x). Конечно, эти изменения могут как вызвать нарушения газообмена в организме, так и быть обусловлены рядом патологий [167–169].

1.3.2.1. Na^+/K^+ -АТФаза: роль в поддержании объема эритроцита

Выше были перечислены важные для функционирования эритроцита и поддержания кислород–транспортной функции Гб свойства воды внутри клетки. Ввиду этого, вызывают большой интерес изменения, связанные с механизмом регуляции конформации и распределения Гб при изменении объема клетки. К способам изменения объема клетки можно отнести изменение осмолярности среды, прохождение клеток через узкие капилляры, растяжение при помощи лазерных пинцетов, стимуляция преждевременного старения эритроцитов (например, увеличение $[Ca^{2+}]_{out}$), изменение ионного гомеостаза эритроцита [94, 170, 171]. Однако, изменение формы и объема эритроцита механическим путем (помещение в пипетку, лазерный пинцет) может не отражать происходящих в действительности процессов в связи с большим механическим воздействием, которое ощущает эритроцит при прохождении по кровеносному руслу [172], проблемам достижения равномерной по величине внешней механической силе,

вызывающей деформацию, а также, положительным зарядом стекла (на поверхности SiO_2 формируются положительные заряды) [173]; увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ характерно для патологических состояний эритроцита, значительно меняет ζ -потенциал эритроцита и может приводить к значительным изменениям формы эритроцита (переход из дискоцитарной формы в эхиноцит) и последующей гибели клетки [15, 142]. Одним из «мягких» способов изменения внутриклеточного объема видится регуляция активности ионного гомеостаза эритроцита путем блокирования работы Na^+/K^+ -АТФазы (Na^+/K^+ -аденозин трифосфатаза ЕС 3.6.3.9) — фермента, который играет существенную роль в поддержании объема и формы эритроцитов за счет АТФ-зависимого переноса 3 Na^+ (всего, в цитоплазме эритроцита содержится около 80,0 мМоль/л) из клетки и 2 K^+ (всего, в цитоплазме эритроцита содержится около 14,0 мМоль/л) в клетку против градиента концентрации [151, 174, 175]. Помимо этого, Na^+/K^+ -АТФаза играет ключевую роль в образовании мембранного потенциала эритроцита, поддерживая в эритроците низкий уровень $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и высокий уровень $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ [19].

В 1991 году Судзуки и Накаджима (Y.Suzuki и T.Nakajima) доказали, что молекулы АТФ и 2,3-БФГ регулируют поддержание дискоцитарной формы и нормального объема эритроцита в условиях гипоксии [62, 91, 92] за счет регуляции активности АТФ-зависимых транспортеров и пуринергической деградации молекул АТФ [176]. Активность Na^+/K^+ -АТФазы возможно блокировать сердечным гликозидом убаином, который оказывает ингибирующее воздействие на активность канала [177, 178]. Выбор убаина в качестве блокатора связан с молекулярным механизмом изменения объема и трансмембранного потенциала [179–181].

Мы считаем, что изменение ионного гомеостаза (т.е. соотношение концентраций Na^+ к K^+ в клетке) при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы модифицирует состояния БПЗ ввиду изменения трансмембранного потенциала, что в свою очередь может приводить к изменению распределения и конформации гемоглобина в клетке. Отметим, что в литературе мало исследован вопрос о том, каким образом изменения ионного гомеостаза или мембранного потенциала

оказывают влияние на кислород–транспортную функцию Гб и его перераспределение внутри клетки.

1.4. Исследование изменений конформации и распределения Гб в эритроцитах при патологии

За последние десятилетия гематологические заболевания стали чаще встречаться у молодых людей и имеют большое распространение [182, 183]. Помимо широкого распространения, гематологические заболевания каждого типа имеют схожую клиническую картину и, часто, биохимические показатели, на которые ориентируется врач при постановке диагноза, что значительно ухудшает качество оказываемого лечения [184]. Для исследования конформационных изменений гема и глобина Гб нами было выбрано заболевание с неустановленным патогенезом — идиопатическая легочная гипертензия (ИЛГ). Известно, что клинические симптомы ИЛГ обусловлены снижением сердечного выброса и нарушением транспорта O_2 и не оказывает влияния на морфологию эритроцита. Главным образом, ИЛГ связывают с аномальными сосудистыми изменениями, вазоконстрикцией (нарушение выработки NO_x , простаглицлина, тромбоксана A_2) и обструкцией легочных артерий, что способствует повышению сопротивления легочных сосудов, легочной гипертензии и правожелудочковой недостаточности [185]. В литературе отсутствуют данные об изменениях конформации гема и глобина Гб эритроцитов больных ИЛГ, а также, изменения морфологии эритроцитов при данном заболевании. Однако, присутствуют данные о снижении эластичности мембраны эритроцита (патогенез не установлен) [186].

Плазматическая мембрана разделяет внутриклеточное содержимое клетки и её окружение, а трансмембранные функции мембраны зависят от баланса между вязкостью, текучестью и фликкером мембраны, на который, в свою очередь, влияет сложный состав мембраны и ее взаимодействие с внеклеточным матриксом и

цитоскелетом [187]. Одним из способов изменений вязкости является изменение липидного состава мембраны. Поэтому, мы исследовали состояние и конформацию Гб в условиях изменения фосфолипидного состава плазматической мембраны эритроцита при синдроме Гоше — болезни лизосомального накопления. Причина заболевания — дефект фермента, ответственного за катаболизм липидов — глюкоцереброзидазы. Снижение его функционирования приводит к накоплению неутилизованных липидов в цитоплазме макрофагов, в результате чего возникает нарушение физиологических функций макрофагов, регуляции кроветворения и метаболизма костной ткани [188, 189]. Измененный липидный состав плазматической мембраны клеток [190] приводит к изменению динамических и сигнальных свойств клеточной мембраны [188]. Так же, необходимо помнить, что для эритроцитов пациентов с болезнью Гоше характерно накопление глюкоцереброзидов (сложные липиды, компоненты клеточных мембран) [191]. В работе [188] было доказано, что сфинголипиды, накапливающиеся в плазматической мембране стимулируют снижение рафтовых компонентов, что увеличивает латеральную подвижность и скорость эндоцитоза.

Таким образом, мы предполагаем, что на фоне накопления глюкоцереброзидов мембраны возможны изменение поверхностного заряда и ζ -потенциала мембраны и, как следствие, изменение конформации гемовой и глобиновой части молекул Гб [191]. В связи с этим исследовали изменения конформации гемовой и глобиновой части молекул Гб_{цп}, в условиях патологии гипоксической природы и изменения вязкости мембраны эритроцитов с помощью методов КР-спектроскопии и ЛИМ. Так же, мы предполагаем, что у больных с подтвержденным ИЛГ различного функционального класса будут по-разному выражены конформационные изменения гема и глобина Гб.

1.4. Влияние фотосенсибилизаторов на мембрану эритроцитов

Фотодинамическая терапия представляет собой нехирургический метод лечения рака, используя способность специальных веществ, содержащих хромофорную группу атомов генерировать синглетный кислород и другие активные формы кислорода убивающие клетки. Данные вещества получили название фотосенсибилизаторы (ФС). Успешное применение данных веществ в противоопухолевой терапии обусловлено их способностью поглощать свет в УФ–видимой области спектра, и, что имеет большое значение для терапии — в окне прозрачности тканей [192]. После поглощения кванта света, молекула переходит в возбужденное состояние и в следствие перераспределения электронного облака электрон переходит из возбужденного состояние в триплетное. Молекула находится в триплетном состоянии достаточно долго, чтобы передать избыток энергии другим молекулам, что приводит в данном случае к образованию свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) [193–195].

Один из наиболее важных вопросов о применении ФС связан с причинами их избирательного накопления в клетках опухолей и подходами к улучшению их накопления [196, 197]. Кроме важного для терапии фактора накопления ФС, стоит учитывать, что накопление ФС происходит так же и в здоровых тканях, а также, клетках крови [198, 199]. Современные гидрофобные ФС (например, хлорин е-6 и его производное BS–23 (или BACE)) располагаются ближе к месту расположения двойных связей в липидах мембран эритроцитов. Ввиду этого видится целесообразным использование таких ФС в работе, как веществ, оказывающих прямое воздействие на мембрану, но не меняющих её без фотодинамического воздействия. Так же, предполагается, что BACE будет менять заряд мембраны эритроцита, что не было ранее отражено в литературе в связи с отсутствием интереса исследователей в этой области [199].

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Объект и материалы исследования

2.1.1. Материалы

NaCl (ч.д.а., Helicon, Россия), KCl (ч.д.а., Helicon, Россия), MgSO₄ (ч.д.а., Helicon, Россия), глюкоза (ч.д.а., Диа-М, Россия), гепарин (с = 5000 Ме/мл), CaCl₂ (ч.д.а., Helicon, Россия), NaH₂PO₄ · 2 H₂O (ч.д.а., Helicon, Россия), Na₂HPO₄ · 12 H₂O (ч.д.а., Helicon, Россия), убаин (G-Strophanthin, х.ч. Sigma, США), ВАСЕ (водный раствор 1 мкл DMSO на 1000 мл раствора) (ФИАН, Россия), суспензия эритроцитов (СЭ), тени эритроцитов и гемоглобин крови человека.

2.1.2. Оборудование

Конфокальный микроскоп-спектрометр NTEGRA-SPECTRA (НТ-МДТ, Зеленоград, Россия) на базе микроскопа Olympus IX, объектив 5x (Olympus, Япония), 40x (Olympus, Япония), лазер 532 нм, КР-спектрометр WITec alpha 300, объектив 5x (Zeiss, Германия), лазер 532 нм (WITec, Германия), Zetasizer Nano ZS (Malvern, Россия), рН-метр рН410 (Аквилон, Россия), центрифуга Laborfuge 400R (Thermo Scientific, США), термостат «Гном» (ДНК-технологии, Россия), термостат твердотельный «Термит» (ДНК-технологии, Россия), источник питания «Эльф-8» (ДНК-технологии, Россия), фазово-контрастный лазерный интерференционный микроскоп, разработанном во ВНИИОФИ на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ФКМ) (ВНИИОФИ, Россия), ИК-Фурье спектрометр Spectrum Two (Perkin Elmer, США), 16-канальный коррелированный по времени спектрограф с

однофотонным счетом (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия), Flame UV/VIS (Ocean Insight, США).

2.1.3. Используемые растворы

Изотонический буфер Аллена (далее, буфер Аллена) готовили согласно методике расчета на 100 мл раствора: 145 мМ (841 мг) NaCl, 5 мМ (37 мг) KCl, 1 мМ (110 мкл 10%) раствора CaCl₂, 4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ (12 мг) MgSO₄, 5 мМ (180 мг) глюкозы, pH 7,4.

Аналогично, были приготовлены изотонический буфер Аллена с концентрацией 1 мкМ CaCl₂ (буфер А) и безкальциевый буфер Аллена (буфер Б), в который не вносился CaCl₂. Для определения влияния свободного Ca²⁺ также были приготовлены изотонические буферы Аллена с концентрацией CaCl₂ $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , 10^{-5} М (pH 7.4).

Раствор для гемолиза готовили согласно методике расчета на 100 мл раствора 4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, pH 7,4. При исследовании действия ионов свободного Ca²⁺ использовали буфер для гемолиза с добавлением CaCl₂ в концентрациях 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М соответственно.

Кислотность буфера Аллена, буфера А, буфера Б и растворов для гемолиза доводили до значения pH 7.4 с помощью 1 М раствора NaOH или 1 М раствора HCl и детектировали на лабораторном pH-метре pH410 (Аквилон, Россия). Для приготовления 100 мл 1 М раствора NaOH в дистиллированной воде разводили 4 г NaOH. Для приготовления 1 М раствора HCl, в дистиллированную воду добавляли 17,2 мл 36% раствора HCl, доводили до объема в 100 мл и тщательно перемешивали.

Раствор с концентрациями солей фосфатов 5 мкМ, 0,2–1,4 М (обозначено как H₂PO₄⁻) готовили смешиванием Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄, при pH 7,4.

Для приготовления образцов с убаином готовили стоковый раствор с исходной концентрацией 10 мМ убаина в буфере Аллена и 10 мМ убаина в растворе для гемолиза.

2.2. Объект исследования

Кровь здоровых людей

В работе использовали кровь, полученную из кубитальной (локтевой) вены доноров натошак (15 мужчин и 10 женщин, 35 ± 5 лет) из ГНЦ «Институт медико-биологических проблем». Эксперименты с кровью людей проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 Ед/мл крови). После забора, кровь хранили при $t = +4^{\circ}\text{C}$.

Кровь пациентов с подтвержденным ИЛГ

В настоящей работе, мы выбрали редкое заболевание неизвестной этиологии — идиопатическую легочную гипертензию (ИЛГ), которое характеризуется нарушением гемодинамики. Согласно исследованиям Национального института здоровья (НИИ, США) [200, 201], ИЛГ более распространен среди женщин (соотношение 1,7:1 женщин к мужчинам [200]), а так же, не имеет выраженного распределения от пола и возраста. Эпидемиология заболевания значительно изменилась за последние десятилетия. Так, средний возраст пациентов с ИЛГ составляет от 45 до 65 лет [202].

Известно, что ИЛГ характеризуется выраженным повышением легочного сосудистого сопротивления и давления в легочной артерии (≥ 20 мм рт. ст.) и

правожелудочковой недостаточностью [203, 204]. Поэтому, помимо стандартных процедур обследования (сбор анамнеза, общий анализ крови, электрокардиография [205], рентгенография органов грудной клетки [206, 207], трансторакальная эхокардиография [208, 209], магнитно–резонансная томография сердца [204, 210], тест «6–минутной ходьбы».[211], анализ газового состава артериальной крови) [212, 213]), «золотым стандартом» для верификации диагноза ИЛГ, оценки тяжести и решения вопроса о выборе и оценке эффективности патогенетической терапии, является катетеризация правых отделов сердца [214]. Кровь пациентов, с подтвержденным диагнозом ИЛГ была доставлена из отделения легочной гипертензии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии». В исследовании участвовало 70 пациентов, которые наблюдались в отделении легочной гипертензии с подозрением на ИЛГ, им была проведена катетеризация правых отделов сердца (КПОС) с целью выявления заболевания [215]. У всех пациентов было зафиксировано давление в легочной артерии (ЛА) > 25 мм рт.ст., что подтвердило диагноз («золотой» стандарт для определения ИЛГ) [216]. В исследовании участвовало 30 мужчин и 40 женщин. Для измерения давления в ЛА использовали катетер Сван–Ганца (110 см). Катетер имеет несколько каналов, что позволяет получить данные о давлении в правом предсердии, правом желудочке, давлении заклинивания легочной артерии, системном артериальном давлении, сердечном выбросе и сатурации смешанной венозной крови. В пробах венозной крови, с помощью анализатора газов крови и электролитов GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory, США) контролировали уровень компонентов крови (pH, pCO₂, pO₂, HCO₃, sO₂, TCO₂, Beecf). Минимальный возраст пациентов составлял 19 лет, максимальный 58. Медиана возраста составляла 50 [25; 54] года. КПОС у всех пациентов проведено впервые. На момент исследования пациенты не принимали лекарственную терапию. Нами были проклассифицированы пациенты с ИЛГ по функциональному классу (ФК, степень тяжести заболевания, таблица 1). В работе использовали кровь с 2ФК, для выявления отличий между группой здоровых доноров (контроль) и пациентов с подтвержденным ИЛГ в работе использовали кровь пациентов с 1–

4ФК. У пациентов с синдромом Гоше была так же диагностирована ИЛГ (2ФК). После подтверждения диагноза, проводили забор крови из кубитальной вены (КВ), правого желудочка (ПЖ), правого предсердия (ПП) и легочной артерии (ЛА) в вакуумные пробирки (Vacuette, Greiner Bio-One, Австрия), содержащие гепарин (20–50 Ед/мл крови). После забора, кровь хранили при $t = + 4^{\circ}\text{C}$

Таблица 1 — Классификация степеней тяжести ИЛГ [184]

Функциональный класс (ФК)	Характеристика симптомов
1	Ограничения физической активности: отсутствуют; Обычная физическая нагрузка: не вызывает клинических симптомов; Состояние покоя: симптомы отсутствуют
2	Ограничения физической активности: незначительные ограничения; Обычная физическая нагрузка: слабость, одышка, боль в груди; Состояние покоя: симптомы отсутствуют
3	Ограничения физической активности: выраженные ограничения; Обычная физическая нагрузка: слабость, одышка, боль в груди Состояние покоя: симптомы отсутствуют
4	Ограничения физической активности: выраженные ограничения; Обычная физическая нагрузка: симптомы право желудочной недостаточности, клинические симптомы; Состояние покоя: одышка

*при отсутствии лечения, продолжительность жизни с 3ФК составляет около 2,6 лет, 4ФК — не более полугода [217]

2.3. Выделение эритроцитарной массы из цельной крови

В экспериментах с выделенными эритроцитами использовали суспензию эритроцитов (СЭ), очищенную от плазмы и белых форменных элементов крови. Для этого, к цельной крови добавляли буфер Аллена в соотношении 1:3, тщательно перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R, ThermoScientific, США) при скорости 1500 g в течении 5 минут при $t = +4^{\circ}\text{C}$. Полученный супернатант отделяли от осадка. Процедуру осаждения эритроцитов повторяли дважды при тех же условиях центрифугирования. Полученную суспензию эритроцитов хранили на льду не более 3 часов.

2.4. Выделение гемоглобина из крови

Для выделения гемоглобина использовали стандартную методику гемолиза: предварительно отмытую СЭ от форменных элементов крови разбавляли в соотношении 1:10 буфером для гемолиза (с соответствующей концентрацией Ca^{2+}), после чего раствор тщательно перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R) в течении 10 минут при $t = +4^{\circ}\text{C}$ при 6000 g в буфере для гемолиза. Концентрацию гемоглобина в растворе определяли по оптической плотности, измеренной на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония) при длине волны 415 нм.

2.5. Выделение мембран эритроцитов (тени эритроцитов)

Для приготовления теней эритроцитов из цельной крови человека, были приготовлены буферы следующего состава:

Буфер В (из расчета на $V = 500$ мл): 5 мМ КСl (0,185 гр), 145 мМ NaCl (4,205 гр), 1 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,075 гр), 4 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (0,715) гр, 1 мМ CaCl₂ (550 мл 10% р-ра), 1 мМ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,060 гр), 10 мМ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (0,9 гр).

Буфер С (из расчета на $V = 500$ мл): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,075 гр), 4 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,715) гр, pH=7,4.

Выделенную кровь человека ночь хранили на льду, в качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 Ед/мл крови). После, пробирки с кровью (Vacuette, Greiner Bio-One, Австрия) центрифугировали (Laborfuge 400R, ThermoScientific, США) при 1500g в течении 10 минут при + 4 °С. После центрифугирования, супернатант и лейкоцитарную фракцию удаляли. К полученной суспензии эритроцитов добавляли буфер В в соотношении 1:1, аккуратно перемешивали и центрифугировали при тех же параметрах. Полученный супернатант удаляли. После, проводили отмывку СЭ еще раз. Полученную СЭ перемешивали и хранили на льду.

Буфер С разливали в 3 пробирки по 30 мл буфера в каждой, после чего, одну из пробирок помещали в морозильную камеру (-18 °С) до образования кристаллов льда, две оставшиеся пробирки хранили в холодильнике при + 4 °С.

В 30 мл ледяного буфера С вносили по капельно 1,5 мл СЭ при постоянном перемешивании. Полученный образец помещали в морозильную камеру на 10 минут, после чего хранили при + 4 °С в течении 20 минут.

После охлаждения образца, его аккуратно перемешивали и центрифугировали при 3500g (Laborfuge 400R, ThermoScientific, США), при + 4 °С в течении 40 мин. Полученный супернатант сливали до появления мутного осадка. Осадок переносили в пробирку с 30 мл буфера С, который хранили при + 4 °С. После чего повторяли дважды процедуры отмывки осадка.

После последнего центрифугирования, осадок переносили в пробирку типа эппендорф (1,5 мл) и центрифугировали при 13000g (Laborfuge 400R, ThermoScientific, США), при + 4 °С в течении 40 мин. Образовавшийся супернатант удаляли автоматической пипеткой.

Приготовленные аликваты теней эритроцитов распределяли по эппендорфам и хранили при температуре - 80 °С [218].

Далее, в работе использовали методы, которые позволили получить данные об изменении конформации гема и глобина Гб, состояния мембраны эритроцита, изменения морфологии эритроцита (рисунок 7).

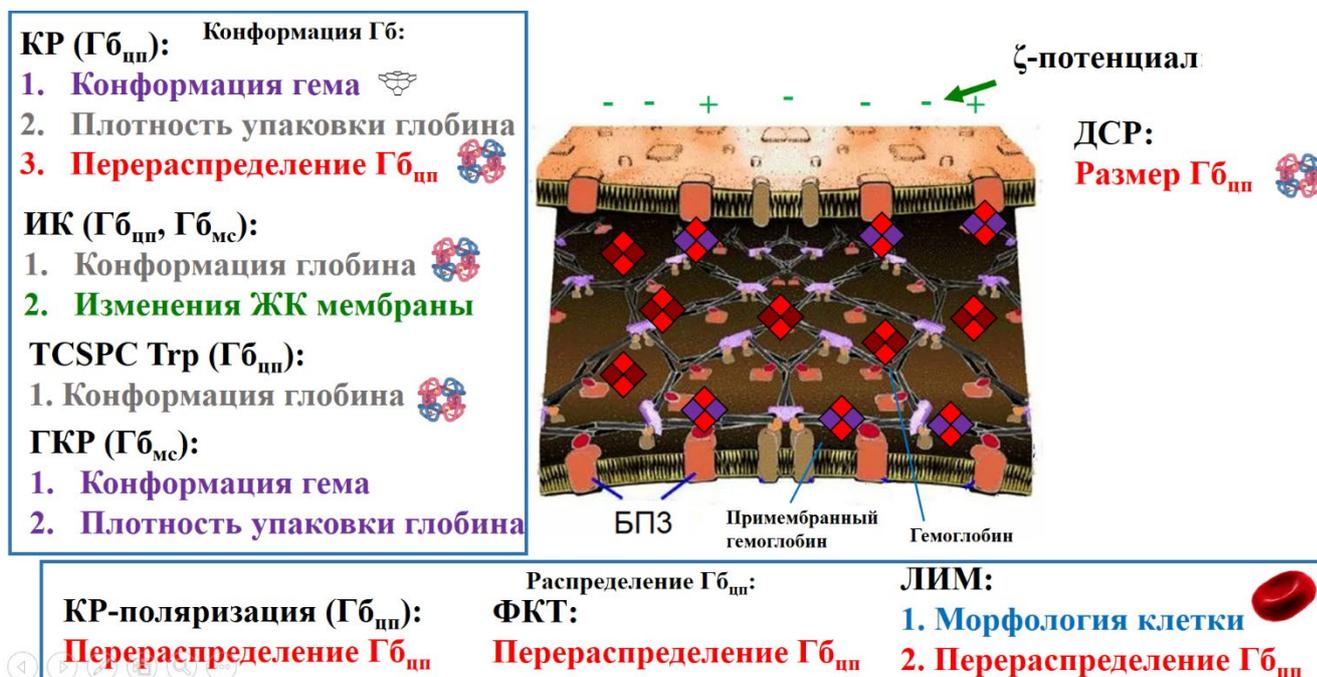


Рисунок 7 — Методы, используемые в работе, характеризуют изменения поверхностного потенциала мембраны и конформации гемоглобина (ромбами красно-бордового цвета схематически изображены молекулы Гб_{цп}, ромбами красно-фиолетового цвета схематически изображены молекулы Гб_{мс})

2.6. Приготовление фиксированного препарата эритроцитарной массы глутаровым альдегидом

Для фиксации эритроцитов использовали цельную кровь, либо СЭ объемом 5 мкл в 1 мл буфера Аллена. Фиксацию проб проводили согласно методике Г.И. Козинец и Ю.А. Симоварта (1984) без дополнительной фиксации 1% четырехокисью осмия и обезвоживания этанолом. После 15-минутной инкубации, к пробам добавляли 20 мкл 25%-глутарового альдегида (ГА) (Sigma, США) и

инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. После инкубации, пробы центрифугировали (Laborfuge 400R) при 5000 g в течение 4 минут, полученный супернатант удаляли [219]. После, к осадку добавляли 1 мл дистиллированной воды, ресуспендировали на Vortex и повторяли процедуру отмывки 4 раза при тех же условиях центрифугирования. Полученный осадок, который являлся эритроцитами, зафиксированными в 0,5%-ГА, наносили на предметное стекло с зеркальным слоем и накрывали покровным стеклом [220, 221].

2.7. Определение $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в эритроците

Для выделения СЭ к образцам цельной крови в соотношении 8:1 добавляли буфер, имитирующий плазму крови: 115 mM NaCl, 4 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,75 mM MgSO₄, 10 mM глюкозы, 0,015 mM ZnCl₂, 0,2 mM глицина, 0,2 mM глутамата Na, 0,1 mM аргинина, 0,6 mM глутамина, 0,2 mM аланина, 20 mM HEPES (pH 7,4 при 5% CO₂) [222]. Полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 1500g, после чего полученный супернатант отбирали и проводили отмывку СЭ от компонентов плазмы буфером, имитирующим плазму крови дважды. К отмытой СЭ добавляли 1,8 мл буфера, имитирующим плазму крови, после, ресуспендировали и аликвотировали смесь по 90 мкл в эппендорфы объемом 500 мкл. В пробы с СЭ добавляли по 10 мкл стокового раствора 10 mM уабаина в буфере, имитирующим плазму крови; в контрольные образцы добавляли 10 мкл буфера, имитирующего плазму крови. После трехчасовой инкубации эритроцитов с уабаином в CO₂ инкубаторе, пробы помещали на лед и вносили 1,5 мл ледяного 0,1 M MgCl₂ и центрифугировали образцы в течение 10 мин при 2000g. После центрифугирования отбирали супернатант и проводили отмывку осадка в ледяном 0,1 M MgCl₂ дважды. После, к полученному осадку добавляли 1,5 мл трихлоруксусной кислоты (MP Biomedicals, #152592) и оставляли образцы на ночь при + 4°C. После, образцы центрифугировали от осажденных клеточных белков

[223] в течение 10 мин при 13700g. Полученный супернатант переносили в пробирки и определяли $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ на атомно-абсорбционном спектрометре Квант-2М (КОРТЭК, Россия) [224]. Образующийся осадок растворяли в 1,5 мл 0,1 М NaOH и определяли содержание белка методом Бредфорд [225] с использованием Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-rad, #5000205) на спектрофотометре V560 (JASCO, Japan).

2.8. Изменение доли парциального давления кислорода в суспензии эритроцитов

Изменение доли парциального давления кислорода (pO_2) в пробе от 2 до 120 мм рт.ст. из СЭ и раствора выделенного гемоглобина осуществляли при помощи газовой смеси А: азот и 0,04% CO_2 (ООО «ПГС-сервис», РФ) при объеме 2 мл ($H_t = 40\%$). Снижение доли pO_2 в пробе проводили при комнатной температуре, в течении 20 минут при постоянном перемешивании при скорости потока 0,1 л/мин. Насыщение СЭ O_2 до 120 мм рт.ст. проводили параллельно с использованием атмосферного воздуха при скорости потока воздуха 0,1 л/мин.

Для изменения доли pO_2 в пробе СЭ и Гб, использовали смесь Б: для этого, внутри герметичного бокса проводили смешивание доли смеси А и атмосферного кислорода. В герметичном боксе постоянно поддерживали требуемое значение pO_2 в газовой смеси, которое контролировали при помощи электрода KE-25 (Figaro Engineering Inc., Япония). Для нормализации давления газовой смеси в боксе использовали воздушный клапан с порогом срабатывания около 1 атм. После установления требуемого уровня pO_2 в герметичном боксе, в течение двух минут продували стеклянные гематокритные капилляры (диаметр поперечного сечения 1 мм, ООО «Агат-Мед», Россия) смесью Б и только после этого помещали пробу в капилляры. После заполнения капилляры герметично запаивали и хранили при температуре 4°C не более 3 ч [226, 227].

2.9. Динамическое рассеяние света

Метод динамического рассеяния света (ДРС, (фотонная корреляционная спектроскопия, квазиупругое рассеяние света) используют в лазерной корреляционной спектроскопии для определения коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости. Суть метода заключается в измерении локальных неоднородностей показателя преломления среды, которые возникают из-за хаотического броуновского движения частиц [228]. Размеры частиц должно быть того же порядка, что и длина волны рассеиваемого света — только в таком случае возможно рассеяние света на частицах (рисунок 8).

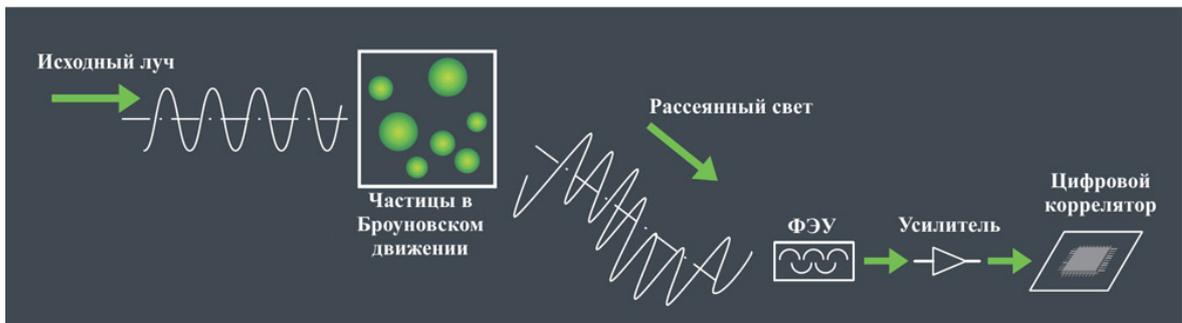


Рисунок 8 — Схема метода ДРС. Рассеяние света регистрируется фотоэлектронным умножителем [229]

Далее, из коэффициента диффузии и характерного времени флуктуации рассчитывают радиус наночастиц. Согласно закону Фика (уравнение диффузии):

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = -D \nabla^2 c(\vec{r}, t), \quad (1)$$

где $c(r, t)$ - концентрация, D - коэффициент диффузии частиц. Можно показать, что в такой системе автокорреляционная функция интенсивности рассеяния света экспоненциально затухает во времени. Корреляционная функция интенсивности рассеянного света:

$$G(\tau) = a \exp\left(\frac{-2\tau}{t_c}\right) + b, \quad (2)$$

где t_c , a и b могут быть найдены путем аппроксимации измеренной корреляционной функции теоретической экспоненциальной функцией. Используя

формулу Стокса–Эйнштейна можно рассчитать радиус (размер) сферических не взаимодействующих друг с другом частиц:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (3)$$

где k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура и η — сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса R [228, 230, 231].

Размер молекул гемоглобина определяли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Для проведения измерений, выделенный Гб разводили в 1000 раз от первоначальной концентрации в крови (из расчетов, что нормальная концентрация Гб в крови составляет 13,5 мг/мл) соответствующим раствором для гемолиза. После, 1 мл полученного раствора помещали в полистирольную одноразовую DTS0012 кювету для измерения динамического светорассеяния (Malvern, Великобритания) с толщиной поглощающего слоя 12 мм. Измерения проводили в термостатирующей ячейке при + 25 °С, время адаптации образца к температуре — 60 секунд, количество снятых измерений — 100. Методику измерений наночастиц и объектов размером до 1500 мкм обрабатывали на образцах экзосом [45].

Для оценки изменения *размера гемоглобина при температурном воздействии* в программном обеспечении Malvern изменяли температуру в термостатирующей ячейке с шагом в 2 °С в диапазоне от + 20 до + 50 °С. Дальнейшее увеличение температуры невозможно, что связано с ограничением по температуре плавления используемых полистирольных кювет. Время адаптации образца к температуре — 60 секунд, количество снятых измерений — 100.

Каждое измерение проводили не менее пяти раз. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в комплекте с прибором Zetasizer Nano ZS и MS Excel (2010).

2.10. Определение поверхностного (ζ) потенциала эритроцитов

Для изучения мембранного транспорта применяют биоэлектрохимические методы, которые позволяют зарегистрировать структурные перестройки в полярной области мембраны и могут служить индикатором изменения в распределении электрического поля на границе мембрана–раствор. При взаимодействии биомембран с неорганическими ионами, происходит изменение степени ионизации, гидратации и фазового состояния липидного бислоя. Схематичное представление изменения распределения электрического поля на границах биомембран представлено на рисунке 9 [232]. Современные электрохимические методы позволяют исследовать изменения средних величин электрического потенциала. Падение потенциала φ_s отражает состояние ионизации полярных групп и их экранирование ионами электролита. Падение потенциала в заштрихованной части рисунка 9 характеризует ориентацию дипольных моментов полярных групп липидов и ассоциированных с ними молекул воды и веществ, адсорбированных на поверхности мембраны [232].

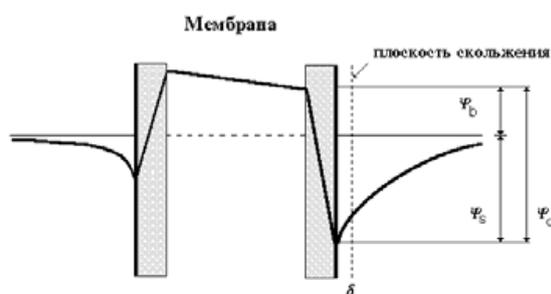


Рисунок 9 — Распределение электрического поля на границах липидной мембраны. Положение плоскости скольжения, где определяется заряд мембраны (ζ -потенциал) (пунктир), φ_b — граничный потенциал, φ_s — поверхностный потенциал, φ_d — дипольная компонента граничного потенциала [232]

Электрофоретическую подвижность, либо по-другому, ζ -потенциал, возможно зарегистрировать на частицах, размеры которых намного превышают длину дебаевского экранирования [233]. Сам по себе, ζ -потенциал характеризует степень и характер взаимодействия между заряженными частицами дисперсной

системы. То есть, ζ -потенциал — это потенциал поверхности скольжения частицы на границе фаз в коллоидном растворе. По величине ζ -потенциала возможно судить об агрегации частиц, либо об устойчивости дисперсной системы. Увеличение величины ζ -потенциала по модулю, характеризует увеличение силы отталкивания между частицами — при величине ζ -потенциала $> |\pm 30|$ мВ, частицы не агрегируют, а при величине $< |\pm 30|$ мВ количество агрегированных частиц в коллоидном растворе возрастает [234]. Регистрация ζ -потенциала на клетках характеризует изменение поверхностного заряда мембраны клетки. ζ -потенциал позволяет определить изменение заряда клетки в зависимости от адсорбции веществ и ионов на мембране эритроцита [235]. Так же, есть ряд работ, в которых отмечается, что при различных патологических состояниях происходит изменение электрофоретической подвижности эритроцитов [129, 236–239].

Для регистрации ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита 1 мл суспензии эритроцитов (Ht = 40%) разводили в 1000 раз от первоначальной концентрации в крови. Для этого, к 10 мкл СЭ добавляли 990 мкл буфера Аллена. После, 1 мл полученного раствора помещали в одноразовую капиллярную поликарбонатную U-образную кювету DTS1070 (Malvern, Великобритания) на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) с золотыми электродами и тщательно перемешивали во избежание образования пузырей воздуха или скопления СЭ в одной из частей кюветы. Измерения проводили в термостатирующей ячейке при + 25 °С. Время адаптации образца к температуре — 60 секунд, количество снятых измерений — 100.

Для регистрации ζ -потенциала Гб раствор Гб разводили в 1000 раз от первоначальной концентрации в крови (из расчетов, что нормальная концентрация Гб в крови составляет 13,5 мг/мл) соответствующим раствором для гемолиза. Измерения проводили в термостатирующей ячейке при + 25 °С. Время адаптации образца к температуре — 60 секунд, количество снятых измерений — 100. Методику измерений наночастиц и объектов размером до 1500 мкм отработывали на образцах экзосом [45].

Для оценки изменения ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита и молекул Гб при температурном воздействии, в программном обеспечении Malvern изменяли температуру в термостатирующей ячейке с шагом в 2 °С в диапазоне от + 20 до + 50 °С. Дальнейшее увеличение температуры невозможно, что связано с ограничением по температуре плавления используемых полистирольных кювет. Время адаптации образца к температуре — 60 секунд, количество снятых измерений — 100, Полученные значения ζ -потенциала эритроцитов совпадают с литературными данными для фосфатного буфера [240].

Каждое измерение проводили не менее пяти раз. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в комплекте с прибором Zetasizer Nano ZS и MS Excel (2010).

2.11. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Эффект комбинационного рассеяния (КР) был одновременно открыт при исследовании кристаллов отечественными учеными Г.С. Ландсбергом и Л.И. Мандельштамом и индийскими физиками при исследовании жидкостей и газов Ч.В. Раманом и К.С. Кришнаном в 1928 году. Однако, несмотря на то, что советские физики открыли эффект комбинационного рассеяния на неделю раньше, ученых из Индии, в мировой научной литературе закрепилось название Рамановская спектроскопия или эффект Рамана (от англ. Raman spectroscopy). Нобелевская премия за открытие эффекта КР в 1930 году была присвоена Чандрасекхара Венката Раману [241]. В русскоязычном сообществе в память о заслугах соотечественников, более распространено название метода «комбинационное рассеяние». КР — это неупругое рассеяние оптического излучения молекул веществ в различном агрегатном состоянии (твердое тело, жидкость, газ, плазма), которое сопровождается изменением частоты излучения относительно возбуждающего света, совпадающим по длине волны возбуждения с областью

поглощения образца, его молекулы поляризуются и рассеивают свет. В отличие от Рэлеевского (упругое) рассеяния, КР менее вероятный процесс, который определяется наличием спектральных линий, отличных от частоты возбуждающего (исходного) света на частоту нормальных колебаний исследуемой молекулы. Примечательно, что частотный сдвиг от частоты возбуждающего света всегда одинаков для химических связей каждого вещества вне зависимости от длины волны источника возбуждающего света [242].

Метод КР–спектроскопии широко применяется в металлургии, геологии, исследовании полупроводниковых сплавов и, в последнее время, широко применяется в медицинских и биологических исследованиях для оценки конформационных изменений исследуемых молекул и определения подлинности образцов [243, 244].

Для регистрации спектров КР важно наличие в молекулах двойных, тройных ненасыщенных связей или ароматических колец, содержащих неспаренные π -электроны. Одной из таких функционально важных молекул для живых организмов является гем, который входит в состав молекул Гб [242].

Гемопорфирин обладает интенсивным сигналом КР благодаря наличию гетероциклического металлопорфирина с сопряженными двойными связями в структуре Гб (рисунок 10), что позволяет характеризовать изменения структуры и конформации гема [245]. Однако, в литературе слабо освещено, как происходят изменения конформации глобиновой части молекулы Гб.

В настоящее время, спектр КР Гб хорошо изучен [130] и характеризуется выраженными областями [20, 27, 246–248]:

- 210–250 см^{-1} — колебания связей Fe–His, характеризующие погруженность Fe в протопорфирин;
- 800–1800 см^{-1} — так называемая область «отпечатков пальцев», характеризующая конформационные изменения гемовой части Гб;
- 2800–3000 см^{-1} — высокочастотная область, характеризующая валентные колебания CH_2 - и CH_3 - групп аминокислот глобина

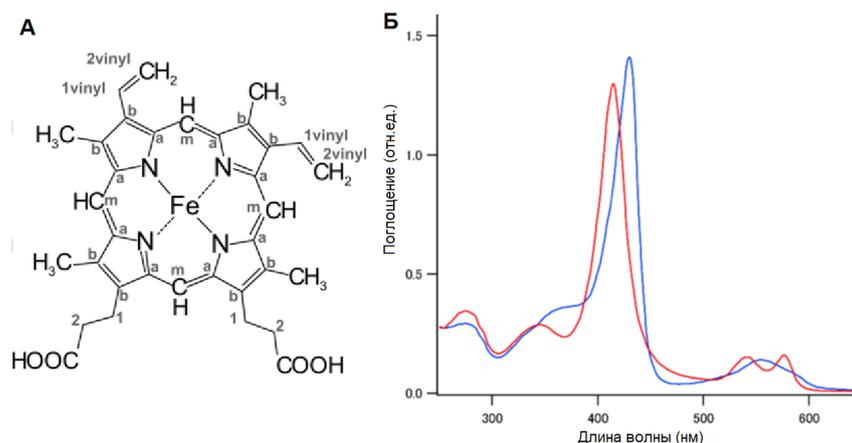


Рисунок 10 — А — Структурная формула гемопорфирина гемоглобина с нумерацией атомов, Б — спектр поглощения оксигемоглобина (красный) и дезоксигемоглобина (синий) в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,0 (адаптировано) [249]

Спектр поглощения Гб имеет выраженные максимумы в областях 410–430 нм и 520–560 нм с полосой Soret при 430 нм, что делает возможным использование лазеров с разной длиной волны возбуждающего света для исследования молекулы методом КР [249]. При этом, использование лазеров «синего» и «зеленого» спектрального диапазона, принадлежащих, соответственно, к областям 410–430 нм и 514–560 нм, оказывает влияние на наличие пиков и соотношение интенсивностей амплитуд пиков спектра КР. Дело в том, что интенсивность пиков КР-спектра зависит от поглощения данной связи при используемой длине лазера. Так, при использовании «синего» лазера, будет выражена низкочастотная область спектра в диапазоне «отпечатка пальцев» ($600\text{--}1800\text{ см}^{-1}$) и более выражена область высокочастотных колебаний спектра ($2800\text{--}3300\text{ см}^{-1}$). При использовании «зеленого» лазера, наоборот, будет более выражена высокочастотная область спектра диапазона «отпечатков пальцев» и менее выражена высокочастотная область валентных колебаний аминокислот (рисунок 11) [20, 250]. Использование лазеров с длиной волны более 680 нм («красный диапазон») позволяет детектировать деформации структуры при денатурации Гб [250].

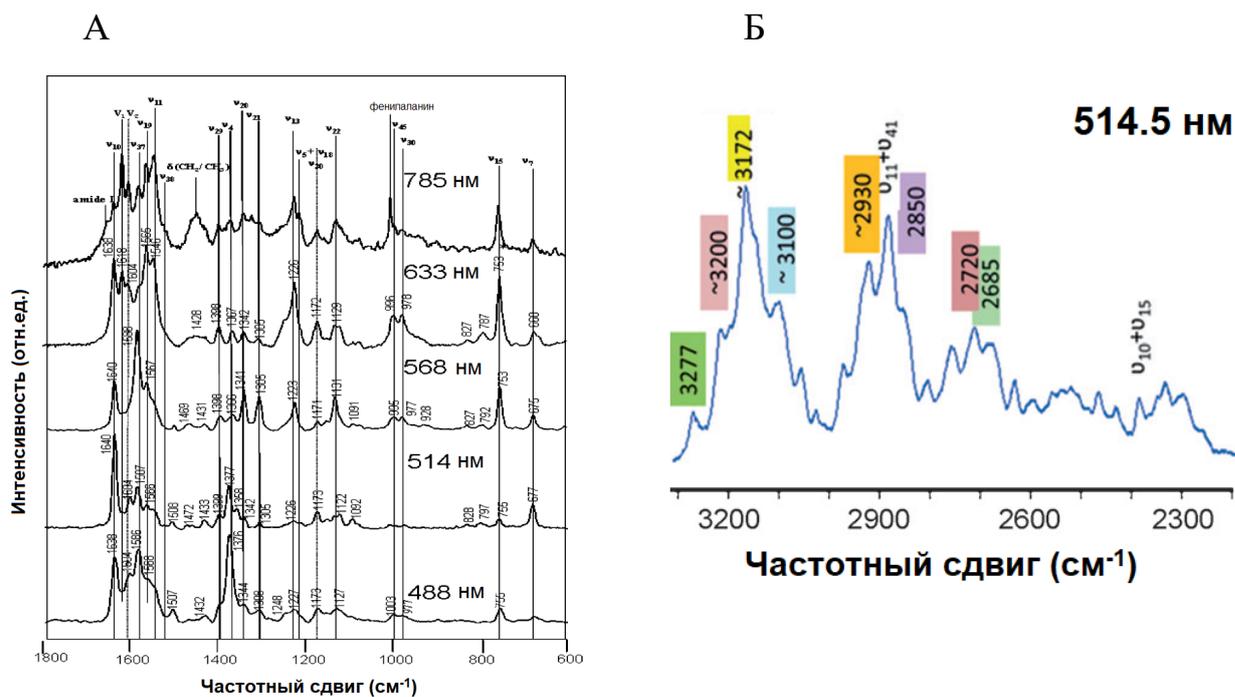


Рисунок 11 — Спектр КР интактных эритроцитов: А — в области «отпечатков пальцев» при использовании различных лазеров [250], Б — в высокочастотной области спектра КР 2300–3300 см⁻¹, лазер 514,4 нм [20] (адаптировано)

2.11.1. Спектроскопия комбинационного рассеяния гемоглобина

Большое количество пиков КР спектра Гб в области «отпечатков пальцев» возникает независимо от длины волны возбуждающего лазера (рисунок 11 А). Возникновение этих пиков связано прежде всего с колебаниями порфириновых связей с различными типами симметрий C_aC_b , C_aN , C_aNC_a (рисунок 10 А) [249], которые зависят от степени окисления атома железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) и косвенно зависят от наличия шестого лиганда (подробнее, см. главу 1.2.2 «Строение и функции гемоглобина эритроцита», стр. 25), которые оттягивают электронную плотность и смещают пики колебаний в высокочастотную область (например, смещение пика 1355 см⁻¹ в область высокочастотных колебаний 1375 см⁻¹). Для колебаний связей с типами симметрий, зависящих от растяжения и деформации геометрии порфиринового цикла C_aC_mH , CaC_m , при наличии шестого лиганда характерно

Таблица 2 — Полосы спектра КР гемопорфирина и глобина гемоглобина при возбуждении лазером 532 нм и соответствие полос с колебаниями связей порфирина (оГб — оксигемоглобин, дГб — дезоксигемоглобин) [27, 193, 250–253]

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Связь	Тип симметрии колебаний	Чувствительность колебания	Форма Гб
1127	C _b —CH ₃	B _{1g} , v ₅	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1172	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	v ₃₀ , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1355	C ₂ vinylH	v ₄ , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	дГб
1375	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	v ₄ , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1550	C _a C _m , C _a C _m H	A _{2g}	Спиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина	дГб
1565–1566	C _b C ₁ , C _b C _b	B _{1g} /A _{1g}	Редокс и спиновое состояние Fe	оГб
1580–1588	C _a C _m , C _a C _m H	v ₁₉ , A _{2g} асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Низкоспиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина	оГб
1618	C _a C _m , C _a C _m H, C _a C _b	v(C=C)	Редокс и спиновое состояние Fe присутствие лиганда	дГб
1620–1623	(C ₁ C ₂) винильный радикал	v(C=C)	Редокс и спиновое состояние Fe, присутствие лиганда	оГб дГб
1640	C _a C _m , C _a C _m H,	v(C=C)	Редокс и спиновое состояние Fe,	оГб

Продолжение таблицы 2 (окончание)

	$C_a C_b,$		присутствие лиганда	
2850	$2\nu_{28}$ или $\nu_3 + \nu_4$ (1357 + 1473)	A_{1g}	Симметричное растяжение СН	оГб, дГб
2880	$\nu_{11} + \nu_{41}$ (1547 + 1339)	A_{1g}	Асимметричное растяжение СН	оГб, дГб
2930	$2\nu_3$	A_{1g}	Симметричное CH_3	оГб
2940			— растяжение. Так же, С–Н–колебания от СН боковой цепи свободной аминокислотной группы. Зависит от изменения внешнего воздействия или температуры	дГб

смещение пика колебаний в низкочастотную область (например, смещение пика 1580 см^{-1} в область низкочастотных колебаний 1550 см^{-1} соответственно), что характеризует растяжение и деформацию гемопорфирина (более подробно изменения положений пиков КР–спектра представлены в таблице 3) [254]. Для оценки конформационных изменений гема и глобина Гб в литературе принято использование соотношений интенсивностей полос после предварительного вычитания базовой линии в спектрах КР (таблица 3).

В главе 1.2.2 «Строение и функции гемоглобина эритроцита» (стр. 25) представлено, что Т– и R–формы Гб, отличаются распределением электронов по внешним оболочкам атомов за счет изменения длины связей порфиринового макроцикла и их сопряжения с глобиновой частью молекулы. Метод спектроскопии КР позволяет зафиксировать изменения формы и конформации

молекулы, вызванные конформационными перестройками в гем–глобиновом комплексе (таблица 3).

В ряде работ предлагают использовать в качестве маркера внутриклеточной агрегации гема по интенсивности пика 1248 см^{-1} при использовании лазеров с длиной волны возбуждающего света 633 и 785 нм [28, 120, 245, 255, 256]. Так же, предлагают использовать положение пиков в области $1200\text{--}1250$ и $1500\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ как маркеры для деформации метиновых групп и изменения размера атома Fe^{2+} , соответственно. В других работах предлагают использовать для определения конформации гема, характерного для оГб и дГб пик 1355 (характерно для оГб) и 1375 см^{-1} (характерно для дГб) [255, 257, 258]. Для анализа конформации гема и глобина мы будем использовать пики с положением максимумов при 1127, 1172, 1357, 1375, 1548–1552 (далее, 1550), 1580–1588 (далее, 1580), 1600, 1618, 1640, 1668, 2850, 2880 и 2930 см^{-1} спектра КР.

Таблица 3 — Соотношение интенсивностей пиков КР–спектра гемоглобина [27, 35, 253, 259–261]. В зависимости от условий, при которых проводятся измерения (постоянная, либо различная доля насыщенности пробы кислородом), может иметь разную интерпретацию.

Отношение пиков спектра	Значение соотношений	
	$s\text{O}_2 = \text{const}$	$s\text{O}_2 \neq \text{const}$
I_{1375}/I_{1172}	<p>Групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине, зависит от белкового окружения глобина возле гемопорфирина.</p> <p>Характеризует выраженность симметричных и асимметричных колебания пиррольных колец.</p> <p>Снижение параметра характеризует увеличение подвижности гема</p>	<p>Доля оГб по отношению ко всему Гб</p>
I_{1170}/I_{1127}	<p>Используется в качестве показателя жесткости белкового микроокружения гема, что связано с затруднением колебаний боковых радикалов гема. Чем жёстче белковое микроокружение, тем выше соотношение</p>	

I_{1580}/I_{1375}	Вклад валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец. При увеличении, возрастает относительная способность Гб выделять лиганды в том числе, O_2)	—
$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	Относительное количество комплексов оГб. Характеризует долю оГб по отношению ко всему Гб в пробе.	
I_{1580}/I_{1550}	Вклад колебаний метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине, выраженных при деформации макроцикла. Чем выше соотношение, тем более выражено сродство к лигандам (в частности, к кислороду) и выше вероятность реализации «плоской» (R) конформации гема	Доля оГб к дГб. Характеризует вероятность реализации «плоской» конформации гема
I_{1618}/I_{1580}	Относительное число комплексов гемоглобина с NO(I)	
I_{2880}/I_{2850}	Вклад несимметричных колебаний по отношению к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот. При увеличении параметра, снижается плотность упаковки белка	
I_{2930}/I_{2850}	Вклад симметричных колебаний концевых метильных радикалов аминокислот по отношению к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот. Характеризует изменение полярности окружения аминокислот. Снижение величины соотношения характеризует снижение полярности окружения и плотности упаковки аминокислот.	
I_{2880}/I_{2930}	Вклад несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот глобина по отношению к колебанию концевых метильных радикалов. Увеличение параметра свидетельствует об увеличении упорядоченности CH_n -групп аминокислот	

При анализе спектра КР до и после воздействия, оценивают наличие и положение пиков, связанных с образованием комплексов Гб с лигандами и окислением Fe^{2+} до Fe^{3+} [255, 257]. Далее, анализируют соотношение

интенсивностей пиков КР–спектра гема и глобина (таблица 3). Так, соотношение интенсивностей пиков, связанных с колебаниями связей C_aC_mH и C_aC_m (I_{1580}/I_{1550} , I_{1618}/I_{1640}), характеризует соотношение количества гемоглобина с растянутым и компактным гемопорфирином, что так же связано со сродством Гб к лигандам.

Для оценки конформационных изменений гема и глобина Гб использовали метод резонансного комбинационного рассеяния. Для регистрации спектров, образец помещали в гематокритный капилляр с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия). Измерения проводили на конфокальном микроскоп-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (NT–MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига $1000\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 1 см^{-1} , охлаждение CCD камеры $-50\text{ }^\circ\text{C}$, объектив 5x с числовой апертурой 0,15, решетка 600, мощность лазера на образце 3мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра — 15–30 секунд, количество накоплений сигнала — 3.

После получения сигнала, спектр КР обрабатывали в программе OriginPro (<https://www.originlab.com>, OriginLab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии (рисунок 12). При необходимости, после проводили нормировку на величину максимального пика (далее, нормировка) спектра и сглаживание спектра по 12–20 точкам при использовании метода подбора полиномиальной кривой, учитывая влияние сглаживания спектра на возможность изменения формы пиков.

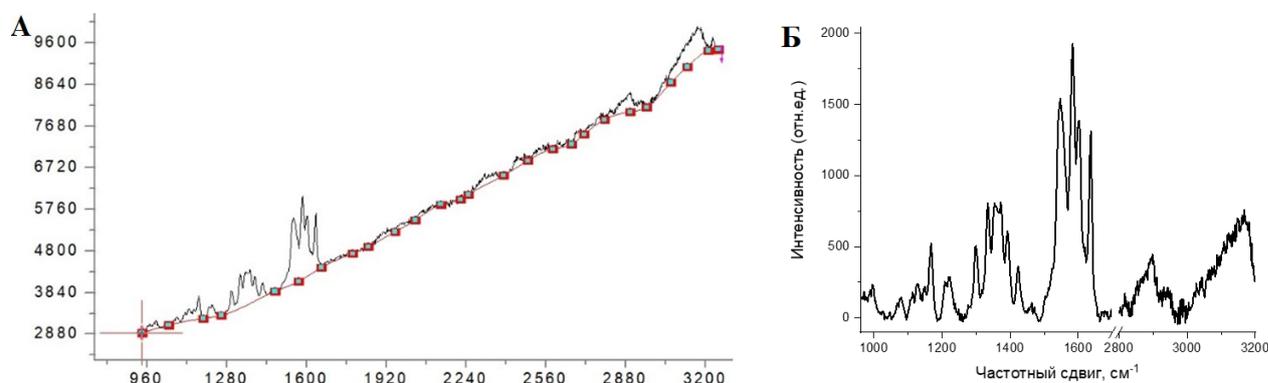


Рисунок 12 — КР–спектр выделенного гемоглобина: А — исходный спектр, Б — после вычета базовой линии. Красным обозначена полиномиальная кривая, по которой происходило вычитание базовой линии из исходного спектра (черный)

2.11.2. КР–изображение

Для регистрации КР–изображения эритроцита на КР–спектрометре NTEGRA-SPECTRA (NT-MTD, Россия), получали эритроцитарную массу, которую наносили методом мазка на предметное стекло. Сверху, мазок накрывали покровным стеклом, образец с СЭ при этом находился в буфере Аллена. После, предметное стекло с образцом помещали на предметный столик КР–спектрометра. Через 10 минут после нанесения мазка, в видимом свете при помощи встроенного микроскопа (увеличение 40х) осуществляли поиск зоны с неподвижными эритроцитами.

Регистрацию КР–изображения эритроцита осуществляли в диапазоне 920–3200 см^{-1} , увеличение 40х, длина волны возбуждения — 532 нм, мощность лазера — $5 \cdot 10^{-3}$ мВт, решетка 600, время регистрации одного спектра — 30 секунд, шаг измерения — 1,33 мкм, количество точек измерений — 16x16.

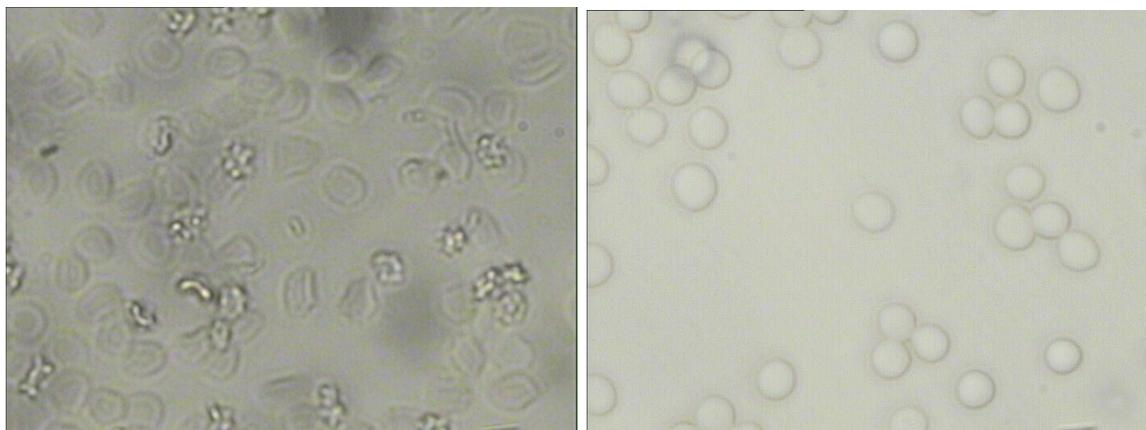


Рисунок 13 — Изображение эритроцитов в прямом свете, слева представлено изображение пробы эритроцитов не пригодное для получения КР–изображения, справа представлено изображение пробы эритроцитов, пригодных для получения КР–изображения с одиночных эритроцитов

2.11.3. Режим термостатирования

Регистрацию спектров КР проводили в оптически-прозрачной кювете с нагревательным элементом (NTEGRA-SPECTRA, NT-MDT, Россия) с последующим заполнением кюветы водой. В кювету помещали запаянный гематокритный капилляр с образцом. Изменение температуры в диапазоне + 20–50 °С с шагом 2 °С регулировали с помощью программного обеспечения (NT-MDT, Россия). Время адаптации образца к температуре — 60 секунд. Во время адаптации, объект не освещали лазером. Время регистрации сигнала — 15 секунд с трехкратным накоплением сигнала. Мощность лазера на образце менее 3 мВт.

2.11.4. Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР)

В КР-спектроскопии, помимо механизма спонтанного и резонансного КР, которые были описаны в предыдущих разделах, выделяют так же, вынужденное, гиперкомбинационное и гигантское комбинационное рассеяние. Перечисленные виды применяют в зависимости от исследовательских задач. Так, метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, в англоязычной литературе более известен под названием «Surface-enhanced Raman scattering» (поверхностно-усиленное Рамановское рассеяние) — SERS) используют для получения сигналов от низкоконцентрированных образцов, либо от слабо КР-активных соединений. Метод ГКР позволяет регистрировать слабые сигналы от ряда молекул, адсорбированных на шероховатой поверхности некоторых металлов, за счет увеличения до 10^5 – 10^6 раз интенсивности эффективного сечения рассеяния КР вещества [262].

Эффект ГКР впервые зарегистрировал М. Флейшман в 1974 году при наблюдении рассеяния молекул, осажденных на неровную серебряную

поверхность [263]. Объяснения природы усиления при регистрации сигнала были выдвинуты в 1977 году Д. Жанмером и Р. Ван Дайном (D. Jeanmaire & R.P. Van Duynе), которые связывали механизм усиления КР с электрическим полем [264]. Независимо от них, М. Альбрехт и Дж. Крехтон (M. Albrecht & J.A. Creighton) объясняли природу усиления КР сигнала, взаимодействием молекул исследуемого вещества с поверхностью серебра [265].

На настоящий момент установлено, что усиление сигнала КР связано с эффектом плазмонного резонанса — резонансного колебания электронов на границе раздела диэлектрической проницаемости материала, стимулированное падающим светом [262]. Таким образом, увеличение интенсивности сигнала КР зависит как от увеличения электромагнитного поля при возбуждении поверхностных плазмонов благородных и щелочных металлов, так и от изменения электронных структур молекул при химическом взаимодействии с металлом. Метод спектроскопии ГКР нашел широкое применение при анализе наноструктурных комплексов в полупроводниках. В биологии метод так же нашел широкое применение, но из-за особенностей работы с биологическими образцами (устойчивость, окисление, повреждение и деформируемость структуры клеток и тканей) постоянно ведется поиск в создании наиболее устойчивой и универсальной подложки для регистрации сигнала [244, 266]. Также, ведутся исследования, связанные с приготовлением коллоидных растворов наночастиц с необходимыми формами и размерами. Например, известно, что наночастицы в форме «ёжиков» (с выпирающими шипами) дают наибольшее усиление сигнала КР, но при этом, могут повредить структуру клеток [267].

В 2009 году было показано, что использование наноструктурированных подложек на эритроцитах, позволяет зафиксировать КР–сигнал от мембраносвязанного Гб, доля которого в клетке составляет около 1% [110]. Таким образом, комбинирование методов спектроскопии КР и ГКР позволяет получить информацию о конформационном состоянии молекул как примембранного, так и цитоплазматического Гб связанного с БПЗ. Важно отметить, что использование наноструктурированных подложек [268] (методика приготовления описана в главе

2.11.4.1 «Наноструктурированные подложки», стр. 70) не оказывает существенного влияния на структуру эритроцитов и конформацию Гб_{шт}. Так же, метод ГКР используют при определении конформации белков и липидов теней мембраны эритроцитов [87, 110, 269].

2.11.4.1. Наноструктурированные подложки

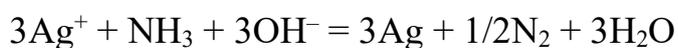
Для исследования биологических объектов, используются наноструктуры и подложки на основе Ag, Au, Cu, Pt и Al [270]. Чаще всего, для применения используют наночастицы из серебра или золота, что связано с их биосовместимостью, ценой, простотой взаимодействия с биологическими и органическими объектами, а также, высокой степенью усиления КР–сигнала. Отметим, что протоколы синтеза наноструктур, позволяют получать наночастицы различной формы, размера и структуры, что стоит учитывать при выборе объекта исследования. Обычно, в качестве материала для основы подложки используют гладкую поверхность, (стекло, кварц, кремний, алюминий), после, располагают зеркальный слой толщиной около 30 нм (золото, серебро, алюминий) и промежуточный слой оптически прозрачного диэлектрика (например, Al₂O₃), около 18 нм. На подготовленной основе располагают ГКР–активный слой из наночастиц и стабилизируют их оптически прозрачным диэлектриком [271].

2.11.4.2. Синтез наноструктур типа серебряных колец

В работе, для регистрации ГКР сигнала использовали серебряные наноструктуры, разработанные группой Е.А. Гудилина на факультете Наук о материалах МГУ имени М.В.Ломоносова [272].

Синтез наноструктур проводили по следующей схеме: 0,3 гр AgNO_3 растворяли в 100 мл воды MilliQ и перемешивали большим мешальником (Deltalab, Испания) при 300 об./мин. После полного растворения AgNO_3 , тонкой струей вливали 30 мл 5мМ NaOH (из расчета 7 гр NaOH на 30 мл воды), после чего наблюдали выпадение темного осадка. Выпавший осадок трижды аккуратно промывали 100 мл MilliQ. После отмывки, к осадку добавляли около 5 мл концентрированного раствора аммиака ч.д.а. под тягой, перемешивали стеклянной палочкой до полного растворения осадка и добавляли 20 мл MilliQ [272].

Покровные стекла, отмытые в детергенте, высушивали на воздухе. После, выдерживались в этиловом спирте ч.д.а. и ультразвуковой бане 3 минуты для обезжиривания поверхности. Высушенные на воздухе покровные стекла помещали в термически устойчивый стеклянный стакан объемом 1 л. Стакан с покровными стеклами устанавливали на предварительно разогретую до 340 °С нагревающую поверхность (ИКА C-mag HS 4, Германия). Контроль температуры дополнительно осуществляли при помощи теплового щупа. 20 мл аммиачного раствора серебра заливали в ультразвуковой распылитель Альбедро и равномерно напыляли на поверхность покровных стекол медленными круговыми движениями циклами с перерывами на каждые 5 минут. В процессе осаждения наноструктур на поверхность покровных стекол происходит реакция термического разложения комплекса аммиачного серебра, в результате чего формируются иерархические поверхности из наноструктур чистого серебра (рисунок 14):



Расстояние сопла Альбедро от покровных стекол составляло около 2 см. После распыления аммиачного раствора серебра, полученные пластинки выдерживали 15 минут при температуре 340 °С, после чего охлаждали и хранили в течении месяца в темном месте при комнатной температуре. Использование пластинок для измерений возможно через неделю после напыления наноструктур.

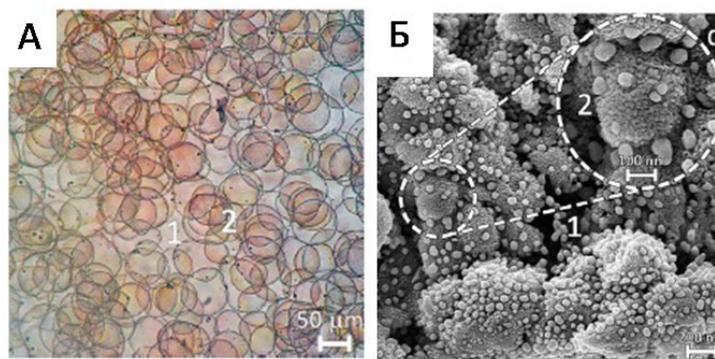


Рисунок 14 — Наноструктуры типа серебряных колец. А — фото наноструктурированной поверхности под микроскопом, увеличение 40х. 1 — область без наноструктур, 2 — область пересечения колец, в которой наблюдается наибольшее усиление сигнала. Б — микрофотография области пересечения серебряных колец, полученная методом сканирующей электронной фотографии [272]

Для регистрации спектров ГКР, СЭ разводили в 1000 раз буфером Аллена без добавления глюкозы. После, на покровное стекло наносили каплю образца объемом 5 мкл и накрывали сверху подложкой с наноструктурами типа серебряных колец. Регистрацию сигнала проводили на КР-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (NT-MTD, Россия) с использованием объектива 5х с числовой апертурой 0,15 при комнатной температуре. Диаметр пятна лазера составлял 400–500 нм. Время регистрации сигнала составило 20 секунд с трехкратным накоплением сигнала. Мощность лазера на образце менее 3 мВт. Перед измерением предварительно проверяли выгорание образца последовательным снятием спектров с образца в течении 5 минут. Обработку спектров проводили в программе OriginPro. Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии. Полученные результаты анализировали по соотношениям интенсивностей пиков КР-спектра (таблица 3).

2.12. Гемолиз

Для экспериментов с гемолизом, открытую кварцевую кювету объемом 2 мл заполняли 600 мкл СЭ в буфере Аллена. После измерения нулевых спектров (длина

волны возбуждения 532 нм, время регистрации сигнала — 10 секунд, накопление — 1 раз, объектив 5х), в кювету добавляли 400 мкл дистиллированной воды и перемешивали пробу. Сигнал регистрировали в течении 120 минут с интервалом в 60 секунд. Количество повторов — не менее 5 раз. В качестве контроля, использовали нулевой спектр (спектр до добавления воды в пробу) и спектр, снятый в другой точке кюветы через 120 минут после начала гемолиза.

2.13. Действие активных форм кислорода на мембрану эритроцита и раствор Гб

В 995 мл буфера Аллена с 30 мкл СЭ (или 995 мл раствора Гб) добавляли 5 мкл поликатионного боронированного амида хлорина еб (boronated chlorin еb amide, ВАСЕ, BS-23) (производное хлорина и бактериохлорина, некоторые из которых используются в клинической практике — борированное производное хлорина еб ВАСЕ (хлорин еб 13(1)-N-{2-[N-(1-карба-клозо-додекаборан-1-ил)метил]аминоэтил}амид-15(2), 17(3)-диметиловый эфир, борированный амид хлорина еб, ВАСЕ)) [273, 274]. ВАСЕ — ФС, обладающий высокой фотоцитотоксичностью с высокой фотодинамической активностью [194]. Будучи гидрофобным, ВАСЕ проявляет высокое сродство к липосомам [198] и эритроцитам [275]; длина волны максимума флуоресценции ВАСЕ — 690 нм [194, 199, 276]. После добавления ВАСЕ к пробе (концентрация исходного раствора составляет 5 мМ, перед добавлением к образцам, ВАСЕ хранился в темном месте для избежания возникновения АФК), полученный образец тщательно перемешивали и отбирали в гематокритный капилляр. Нулевой спектр регистрировали при длине возбуждающего света 532 нм. Для активации синтеза АФК, пробу освещали в течении 30 секунд лазером с длиной волны 633 нм, после, регистрировали сигнал (время регистрации сигнала — 5 секунд, количество накоплений — 2 раза, объектив 5х) при длине волны возбуждающего лазера 532

нм. После чего, пробу снова освещали лазером с длиной волны возбуждения 633 нм в течении 50 секунд. Время проведения эксперимента — 40 минут. После 40 минут, точку регистрации сигнала в гематокриуом капилляре смещали на 5 см и проводили измерение. Все манипуляции с ВАСЕ проводили в темноте.

2.14. Поляризационная спектроскопия комбинационного рассеяния

Регистрацию спектров КР в поляризованном свете, проводили на КР-спектрометре WITec alpha 300 в диапазоне 200–3100 см^{-1} с длиной волны возбуждения 532 нм, охлаждение CCD камеры $-75\text{ }^\circ\text{C}$, разрешение — 0,3 см^{-1} . Поляризацию осуществляли с помощью установки поляризатора (ThorLabs) под углом поляризации 0 и 90 градусов. Для регистрации сигнала, образец наносили на предметное стекло, время регистрации сигнала — 5 секунд, объектив — 20х, мощность лазера на образце — 5 мВт.

2.15. Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ)

Метод лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) позволяет неинвазивно проводить контроль изменения геометрических оптических свойств объектов, характеризующих внутриклеточные процессы (изменение объема, морфологии клетки, концентрации внутриклеточного вещества и т.д.) [277]. Преимуществом ЛИМ относительно других методов, позволяющих получить высокое изображение объекта (таких как растровая электронная микроскопия, атомно силовая спектроскопия, криоэлектронная микроскопия) является отсутствие необходимости предварительной подготовки объекта (возможность отслеживать изменения внутриклеточных процессов в живой клетке), его модификации и малые габариты прибора [278].

Принцип ЛИМ построен на измерении локальных фаз света, отраженных от опорного зеркала (контрольный луч) и зеркала, на котором расположен объект. При наложении контрольного луча и луча, прошедшего через объект, формируется фазовое изображение объекта, которое нормируется при построении по длине волны используемого лазера и оптической разности хода (ОРХ) контрольного и прошедшего через объект луча:

$$\text{ОРХ} = \frac{\theta}{2\pi} \times \frac{\lambda}{2}, \quad (4)$$

где θ — разность фаз, рад; λ — длина волны источника излучения, нм.

ОРХ так же характеризует фазовую высоту объекта (z), которая в каждой точке объекта связана с его геометрическими размерами [279, 280].

$$\text{ОРХ}(x, y) = \int_0^{z_{max}} (n(x, y, z) - n_0) dz, \quad (5)$$

где n_0 — показатель преломления среды, $n(x, y, z)$ — показатель преломления в точке клетки с координатами x, y, z .

Реконструкция фазового изображения позволяет получить значение ОРХ среднего (ОРХ_{mean}) эритроцита (средняя фазовая высота эритроцита), и площадь клетки (S), так как основной объем клетки занимает Гб, а вклад мембраны эритроцита составляет менее 1% [281]:

$$\text{ОРХ}_{mean} = (n_1 - n_0) \times z_{mean}, \quad (6)$$

где n_0 — показатель преломления среды (буфер — 1,335); n_1 — показатель преломления Гб (1,390) [279, 282]; z_{mean} — средняя геометрическая высота клетки. Площадь эритроцита рассчитывают методом наименьших квадратов по фоновому значению. 3D-распределение плотности ОРХ (объем) эритроцита рассчитывают по формуле:

$$V = \frac{\text{ОРХ}_{mean}}{n_1 - n_0} \times S, \quad (7)$$

где, S — площадь клетки, рассчитанная методом наименьших квадратов по фоновому значению [277, 283, 284]

Плотность распределения Гб в эритроците рассчитывают по формуле:

$$m_{Hb} = \frac{\rho_{Hb}}{(n_1 - n_0)} \times OPX_{mean} \times S, \quad (8)$$

где ρ_{Hb} — удельная плотность гемоглобина (1,36 г/см³), n_1 — показатель преломления Гб (1,605), n_0 — показатель преломления среды (буфер Аллена — 1,335, плазма — 1,340), S — площадь клетки [277, 283].

Исследование проводили на лазерном интерференционном микроскопе, разработанном во ВНИИОФИ (РФ) на базе микроинтерферометра Линника МИИ–4 (ЛОМО, Россия) с объективом 30х (NA = 0,65), с λ полупроводникового лазера — 650 нм с мощностью лазера на объекте менее 2 мВт. Размер регистрируемого кадра составлял 195×145 мкм. Для анализа полученных изображений использовали ПЗС видеокамеру VS-415U (NPK Videoscanner, Россия), с размером матрицы 6,5 · 4,83 мм и разрешением 782 · 582 точек. Общее время регистрации изображения составляло 10 сек [124, 285]. Для восстановления фазового изображения по 9 регистрируемым интерферограммам методом фазовых шагов, использовали программу WinPhast, для последующей работы с изображениями — программы FIJ (США) и OriginPro.

2.15.1. Подготовка образца

В работе, фазовые изображения мазка эритроцитов, получали на лазерном интерференционном микроскопе, разработанном во ВНИИОФИ на базе микроинтерферометра Линника МИИ–4 (ЛОМО, Россия) с объективом 30х (NA = 0,65). Размер регистрируемого кадра — 195х145 мкм. Образец наносили на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. Препарат с СЭ находился в буфере Аллена, препарат с СЭ, фиксированными в 0,5% ГА так же находился в буфере Аллена [220].

2.15.2. Гемолиз

Для экспериментов с гемолизом, в разведенный дистиллированной водой до 60% буфер Аллена объемом 1 мл вносили 10 мкл СЭ, ресуспендировали и наносили 5 мкл полученного образца на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. После чего, требовалось около 2–3 минут на остановку движения клеток и наведения на них объектива прибора. Интерферограммы снимали с интервалом в 60 секунд. Между снятием измерений, образец не освещали лазером.

2.15.3. Действие активных форм кислорода на мембрану эритроцита

В 995 мкл буфера Аллена с 30 мкл СЭ (или 995 мкл раствора Гб) добавляли 5 мкл ВАСЕ (длина волны максимума флуоресценции — 690 нм) [194, 199, 276]. После, 5 мкл предварительно перемешанного образца наносили на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. Через 2–3 минуты, необходимых на остановку движения клеток и наведения на них объектива прибора проводили съемку интерферограмм с интервалом 60 секунд в течении 40 минут. После 40 минут, точку регистрации сигнала смещали и проводили измерение. Все манипуляции при смешивании ВАСЕ с образцом проводили в темноте.

2.16. Микротомография на базе лазерноинтерференционной микроскопии

В настоящее время для исследования динамики процессов в клетке широко применяют оптический метод фазово-контрастной микроскопии (ФКМ, англ. Phase-contrast microscopy). Данный метод позволяет получать изображение преобразуя фазовые сдвиги света, проходящего через прозрачный образец [286]. Световые волны проходя через оптически прозрачную среду взаимодействуют с ней, что приводит к изменению амплитуды и фазы волны. Изменение амплитуды связано с рассеянием и поглощением света компонентами среды и выглядит на изображении как изменение яркости объекта. Изменение фазы характеризует изменение преломления клетки при функционировании клетки. Поэтому, фазово-контрастная микроскопия имеет важное значение для биологии — метод не требует окраски образцов (которая может приводить к гибели клетки) и позволяет зарегистрировать такие процессы живых клеток, как клеточное деление. За открытие метода, в 1953 году, Фринц Цернике (Frits Zernike) получил Нобелевскую премию [287].

Однако, данный метод имеет ряд недостатков, которые связаны с разрешением внутриклеточных структур, чувствительностью прибора и временным разрешением измерения. В связи с этим, для морфологического анализа клетки (и изменения клеточных структур) разрабатываются приборы для получения 3D-изображения за счет анализа клетки при изменении угла зондирования, то есть, применение многокурсного зондирования клетки (осуществляется благодаря изменению угла проходящего через объект света). Однако, при использовании этого метода возможно получить изображение только при ограниченном угле обзора (не более 180°), либо исследовать клетки размером не превосходящие область зондирования [288]. Если образец удовлетворяет перечисленным выше требованиям, то в нем удобно исследовать изменения

внутриклеточных компонентов (ядро, цитоплазма, митохондрии, изменения мембраны и т.д.).

2.16.1. Подготовка образца

В работе, фазовые изображения одиночного эритроцита, получали на экспериментальной установке, разработанной во ВНИИОФИ (РФ) [289]. Экспериментальная установка представляет собой дифференциальный микротомограф с источником света (точечный светодиод, с длиной волны 650 нм), широко апертурным объективом и размером площадки регистрируемого кадра 80 x 80 мкм. Для измерения, на покровное стекло (рисунок 15, O2) наносили 2 мкл СЭ в буфере Аллена (гематокрит 10%) и добавляли 5 мкл буфера Аллена. После, образец (рисунок 15, образец) накрывали вторым покровным стеклом (рисунок 15, O1), помещали на предметный столик прибора и освещали параллельным лучом (рисунок 15, источник освещения, 633 нм) угол которого меняли поворотом зеркала (рисунок 15, зеркало, изначально установленный угол составляет 45°) при помощи пьезоэлемента.

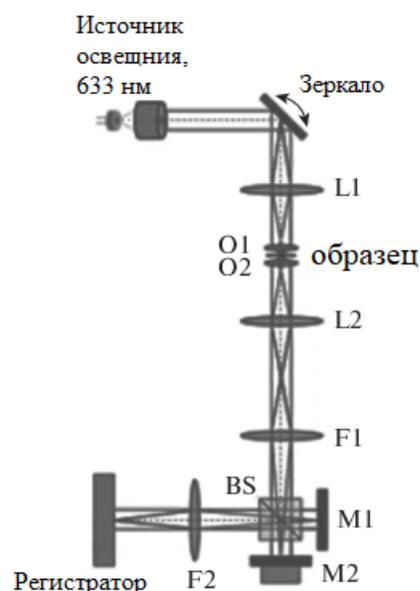


Рисунок 15 — Схема экспериментальной установки (дифференциальный микротомограф) [289]

Время регистрации одного изображения — 10 секунд. Размер вокселя восстановленного изображения составлял $0,1\text{мкм}^3$ (всего, размер регистрируемого изображения составлял 39×39 вокселей). Диапазон сканирования составлял $\sim \pm 60^\circ$, построение изображения и измерение рельефа проводилось в программе WINPhastM (ВНИИОФИ) по 60 снятым интерферограммам. Для построения 3D изображения использовали программу 3D Slicer (<https://www.slicer.org/>, США, открытый доступ), которая позволяет получить срезы клетки и 3D-изображение.

2.16.2. Гемолиз

Для экспериментов с гемолизом в 60% буфер Аллена объемом 1 мл вносили 10 мкл СЭ, ресуспендировали и наносили 7 мкл полученного образца на покровное стекло (рисунок 15, O2) наносили 2 мкл СЭ в буфере Аллена (гематокрит 10%) и добавляли 5 мкл 60% буфера Аллена. После, образец (рисунок 15, образец) накрывали вторым покровным стеклом (рисунок 15, O1), помещали на предметный столик прибора. После чего, требовалось около 2–3 минут на остановку движения клеток и наведения на них объектива прибора. Интерферограммы снимали с интервалом в 60 секунд. Между снятием измерений, образец не освещали лазером.

Мы предполагаем, что использование метода ФКМ позволит выявить изменения в цитоплазме эритроцита при изменении поверхностного заряда клетки. При анализе результатов мы будем считать, что эритроцит представляет собой клетку, в которой гомогенно распределены молекулы Гб. Таким образом, регистрируемые изменения цитоплазмы при отсутствии изменения морфологии клетки будут связаны с изменением структуры цитоплазмы и динамикой внутриклеточных процессов, то есть, перераспределением молекул Гб во внутриклеточном пространстве.

2.17. Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэмли— наиболее распространенный способ разделения белков по массе [290]. Электрофорез проводят в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) для разделения денатурированных пептидов по длине. Из-за разности потенциалов, заряженные денатурированные пептиды мигрируют в электрическом поле в акриламидном геле к аноду. Белки меньшего размера мигрируют быстрее, а белки более тяжелые по массе — медленнее, что в итоге приводит к разделению пептидов в соответствии с молекулярной массой [291].

При помещении образцов в карманы геля, первую «дорожку» оставляют под маркер молекулярной массы (PageRuler™ Unstained Protein, Thermo Scientific, США) в соответствии с которой определяют молекулярную массу протеина. Метод позволяет провести разделение протеинов с молекулярной массой от 5 до 250 кДа [290, 292]. Гель для электрофореза белков готовили согласно таблице 4.

Так же, были приготовлены:

Раствор мономеров для белкового фореа (AA / bis stock — 30% / 70%, Sigma) из расчета 58,4 гр акриламида и 1,6 гр бис-акриламида на 200 мл H₂O (mQ). После смешивания, к AA/bis stock добавляли 10 гр амберлита и оставляли перемешиваться на мешалке в течении часа при 1000 g. Через час, раствор пропускали через фильтр с диаметром пор 25 мм. Буфер хранили при 4 °C.

Буфер для верхнего слоя Tris/SDS: из расчета 36,33 гр TrisHCl, 0,30 гр SDS. Довести до объема 100 мл H₂O (mQ). После, доводили pH до 8,45 37% HCl. Буфер хранили при 4 °C.

Раствор инициатора полимеризации (10% персульфат аммония): из расчета 2 гр персульфата аммония, доводили до метки 20 мл H₂O (mQ). Раствор хранили при -16 °C.

Окрашивающий буфер для образцов (2x) готовили из расчета 0,121 гр Tris, 0,8 гр SDS, 4,8 мл 50% глицерина, 0,4 мл 2-меркаптоэтанола. Полученную смесь

доводили до объема 20 мл H₂O (mQ). После, доводили pH до 6,8 37% HCl. В полученный раствор вносили 1 мг кумаси (Coomassie Brilliant Blue G-250, CCB). Окрашивающий буфер хранили при температуре -16 °С.

Окрашивающий раствор для ПААГ–SDS, 0,25% CCB G–250, 40% этанол, 10% уксусная кислота, готовили из расчета 0,5 гр CCB, 80 мл этанола, 20 мл уксусной кислоты и доводили до объема 200 мл dH₂O.

Таблица 4 — Состав растворов для электрофореза в 12% Tris-Tricine/SDS PAGE

Стоковый раствор	Разделяющий гель		Концентрирующий гель, 2 мл
	7 мл	10 мл	
AA/bis stock (30% / 2.7%)	2,77 мл	3,96 мл	0,27 мл
Tris/SDS, pH 8.45 (3 M TrisHCl / 0,3% SDS)	2,31 мл	3,30 мл	0,50 мл
Глицерин, 50%	1,48 мл	2,12 мл	—
Вода, mQ	0,42 мл	0,6 мл	1.3 мл
PSA	50 мкл	50 мкл	25 мкл
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 мкл	10 мкл	10 мкл

После помещения разделяющего геля в камеру для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra (BioRad, США), его заливали сверху 1 мл этанола для равномерного застывания поверхности. Через 30 минут, этанол выливали из камеры и спустя 5 минут заливали концентрирующим гелем с гребенкой. После застывания концентрирующего геля, камеру заливали катодным буфером (приготовлен из расчета 12,11 гр Tris/HCl, 17,92 гр Tricine, 1 гр SDS, доводил до объема 1 л H₂O (mQ), pH 8,25) и анодным буфером (приготовлен из

расчета: 60,55 гр Tris/HCl, доводили до объема 500 мл H₂O (mQ), рН доводили до 8,9 37% HCl).

Подготовка образцов для электрофореза:

Гемоглобин: 5 мкл Гб + 20 мкл окрашивающего буфера + 15 мкл H₂O

СЭ: 1 мкл СЭ + 20 мкл окрашивающего буфера + 19 мкл H₂O

После смешивания образцов с окрашивающим раствором, полученные образцы инкубировали при температуре 95 °С в течении 5 минут («Гном», ДНК-Технология, Россия) после чего центрифугировали при 14000 g 2 минуты.

Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивающий раствор для ПААГ–SDS. Для этого, гель заливали окрашивающим раствором и прогревали на газовой горелке в течении 15 минут. После, окрашивающий раствор сливали и к окрашенному гелю добавляли 10% раствор уксусной кислоты, который нагревали на газовой горелке 15 минут. После, окрашенный раствор 10% уксусной кислоты сливали. Процедуру отмывки повторяли 3 раза.

2.18. Счет одиночных фотонов с корреляцией по времени (Time Correlated Single Photon Counting — TCSPC) триптофана

Флуоресцентная спектроскопия — чувствительный метод, который позволяет обнаруживать следовые количества веществ и даже одиночные молекулы. Метод нашел широкое применение в медицинских, биологических, биохимических и химических исследованиях органических соединений, в частности, белков. В основном, при исследовании биологических объектов используют собственную флуоресценцию образцов, либо флуоресцентные красители и зонды. В качестве источников возбуждения флуоресценции используют лазеры [293].

В 1966 и 1974 году, были созданы лазеры, генерирующие пикосекундные и фемтосекундные сверхкороткие световые импульсы. Их создание позволило

исследовать динамику сверхбыстрых процессов, ранее, считавшиеся экспериментально ненаблюдаемыми [294]. За последние десятилетия, при помощи сверхбыстрой флуоресценции были определены и изучены кристаллические структуры фотосинтетических пигментно-белковых комплексов [295].

Для диагностики конформационного состояния белка регистрируют флуоресценцию от смеси внутренних флуорофоров клетки — отдельных ароматических остатков аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина. Так, для возбуждения триптофановой флуоресценции используют лазер с длиной волны возбуждения при 260–280 нм и регистрируют сигнал флуоресценции в спектральном диапазоне 300–350 нм [293]. Известно, что в большинстве белков, собственная флуоресценция обусловлена флуоресценцией аминокислотных остатков триптофана и тирозина в связи с низким квантовым выходом флуоресценции фенилаланина [44]. Так же, флуоресценция тирозиновых остатков гасится вблизи аминогрупп, карбоксильных групп или остатков триптофана [296]. Известно, что на флуоресценцию триптофана так же оказывает влияние близость других аминокислотных остатков (например, аспарагиновая и глутаминовая кислоты вызывают тушение триптофановой флуоресценции). Таким образом, триптофановая флуоресценция весьма чувствительна к конформационным изменениям белка и аминокислотного окружения [293].

Глобин Гб имеет сильную триптофановую флуоресценцию, обусловленную наличием в каждой α - и β -цепи трех звеньев Trp ($\alpha 214\text{Trp}$, $\beta 215\text{Trp}$, $\beta 217\text{Trp}$) и наличием в цепи А $\alpha 14\text{Trp}$ (A12), $\beta 15\text{Trp}$ (A12), $\beta 37\text{Trp}$ (C3) (PDB 2h35) [297], ($\beta 37\text{Trp}$ может вступать в контакт внутри и/или между цепями со многими аминокислотными остатками даже в изолированной β -цепи [298] что делает возможным изучение конформационных изменений его глобиновой структуры [299].

Регистрацию *спектров флуоресценции* проводили с использованием спектрометра Flame UV/VIS (Ocean Insight, США). Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Для регистрации приблизительно 10^6 фотонов потребовалось 100 секунд, чтобы добиться надежного

отношения сигнал/шум, измерения повторяли три раза. Для измерений СЭ, пробу разводили в 1000 раз в буфере Аллена. Для измерений выделенного Гб, пробу разводили в 1000 раз в фосфатном буфере. Для измерений спектров флуоресценции ТЭ, к 5 мкл ТЭ добавляли 1 мл фосфатного буфера. Все измерения проводили в термостатирующей ячейке (диапазон температур 20–42 °С с шагом 2 °С), время адаптации образцов к температуре — 60 секунд, время регистрации сигнала — 100 секунд. Флуоресценцию образцов регистрировали в диапазоне 180–800 нм, возбуждая флуоресценцию триптофанов импульсным субнаносекундным УФ-светодиодом (EPLD 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм, Chroma, США),

Изменение структуры молекулы Гб исследовали путем измерения *собственной кинетики затухания флуоресценции триптофанов*, которую возбуждали импульсным субнаносекундным УФ-светодиодом (EPLD 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм, Chroma, США), выдающий импульсы длительностью 700 пс со средней мощностью 0,6 мкВт при частоте повторения 20 МГц.

Флуоресценцию образцов в диапазоне 300–400 нм с выделенным максимумом при 340 нм регистрировали перпендикулярно пути возбуждающего луча через коллимационную линзу, соединенную с оптическим волокном 16-канального коррелированного по времени спектрографа с однофотонным счетом (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия). Спектрограф оснащен детектором ПМЛ-16-С и решеткой 1200 штр/мм, что позволяет получить разрешение 6,25 нм для каждого отдельного спектрального канала. Регистрацию спектров проводили на одном спектральном канале при помощи коррелированной по времени и длине волны системы счета одиночных фотонов (TCSPC) на базе одного модуля TCSPC (SPC-130EM, Becker & Hickl GmbH, Германия). Синий светодиод управлялся драйвером светодиода (DC2200, Thorlabs, США), который также обеспечивал TTL-сигналы для синхронизации с системой TCSPC. Аппаратура TCSPC работала в

режиме FIFO, таким образом записывая поток спектрально меченных одиночных фотонов вместе с внешними маркерами в программном обеспечении для измерений SPCM 9.82 (<https://www.becker-hickl.com>, Becker & Hickl GmbH, Германия).

Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Для регистрации приблизительно 10^6 фотонов потребовалось 10 секунд, чтобы добиться надежного отношения сигнал/шум, измерения повторялось три раза. Для измерений, СЭ и выделенный Гб разводили в 1000 раз в буфере Аллена и ждали установления температуры в термостатирующей ячейке при + 25 °С. Время адаптации образца к температуре — 60 секунд. Все эксперименты проводили не менее трех раз.

Измерение температурных зависимостей времени жизни триптофановой флуоресценции СЭ и выделенного Гб осуществляли в диапазоне 20–42 °С с шагом 2 °С в термостатирующей ячейке с временем адаптации образца к температуре 60 секунд.

Изменения интенсивности, времени жизни и спектра флуоресценции обрабатывали с помощью пакета программ SPImage 8.0 (<https://www.becker-hickl.com>, Becker & Hickl, Германия). Все эксперименты, повторяли не менее шести раз. Кривая затухания пикосекундной флуоресценции триптофана представляет из себя кривую, которую можно аппроксимировать суммой экспонент (рисунок 16):

$$F(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}, \quad (9)$$

с амплитудами A_i и постоянными времени τ_i .

При выявлении неравномерного роста амплитуд A_i , можно сделать вывод, что два разных времени происходят от существования двух различных типов взаимодействий глобина [300].

Регистрацию спектров флуоресценции с помощью 16-канального детектора PML-16-1-C (Becker & Hickl, Берлин, Германия) в спектральном диапазоне 200–500 нм с шагом измерения 0,5 нм осуществляли в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Время регистрации сигнала составило 100 с. Для измерений, СЭ и тени эритроцитов разводили в 1000 раз в буфере Аллена.

Измерения проводили в термостатирующей ячейке при 20–42 °С. Время адаптации образца к температуре — 60 секунд. Все эксперименты проводились не менее трех раз.

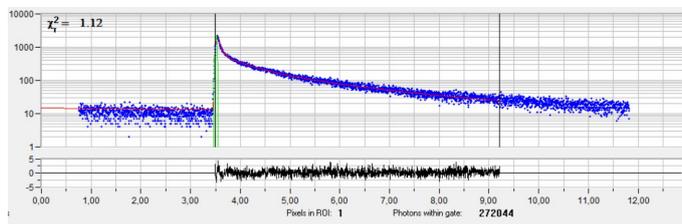


Рисунок 16 — Кинетика затухания флуоресценции триптофана (синяя кривая) и её аппроксимация суммой экспонент. Спектры обработаны с помощью пакета программ SPCImage

8.0

2.19. Инфракрасная спектроскопия (ИК)

Спектроскопия комбинационного рассеяния и инфракрасная спектроскопия (колебательная спектроскопия, ИК–спектроскопия) дополняют друг друга. Первые работы по ИК–спектроскопии были проведены У. Кобленцем в 1905 году и уже через 30 лет, метод получил широкое распространение как метод для количественного анализа. Позже, с созданием в 1939 году, Э. Лерером двухлучевого спектрометра, были изучены возможности ИК–спектроскопии для проведения быстрого качественного анализа веществ и определения строения вещества по колебаниям химических связей в молекулах. В основе работы ИК Фурье–спектрометра лежит изобретение 1887 года А. Майкельсона двухлучевого интерферометра, названного в его честь интерферометром Майкельсона. Уже в 1968 году был создан первый коммерческий ИК Фурье–спектрометр [301].

В настоящее время, ИК–спектроскопия является быстрым и чувствительным методом для проведения количественного и качественного анализа, позволяющим проводить прямые измерения. Однако, метод требует проводить дополнительную пробоподготовку образца для измерений (чаще всего, применяют помещение образца в KBr таблетку)

Принцип метода заключается в том, что образец поглощает только часть проходящего сквозь него инфракрасного излучения. При исследовании органических соединений, используют область ИК–поглощения 2–50 мкм, что соответствует интервалу колебаний волновых чисел 5000–200 см⁻¹. Средний ИК–диапазон (2–10 мкм или 4000–400 см⁻¹) содержит набор полос различной интенсивности, который представляет собой уникальный «молекулярный отпечаток» вещества из-за наличия большого количества колебательно — вращательных переходов молекул [302].

В ИК–спектроскопии органических соединений выделяют три области:

1. Валентные колебания простых связей X–H (4000–2500 см⁻¹);
2. Валентные колебания кратных связей X=Y (2500–1500 см⁻¹);
3. Валентные колебания простых связей X–H (1500–500 см⁻¹).

При этом, активными, являются колебания, сопровождающиеся изменением электрического дипольного момента связи. Поэтому, чаще всего в ИК–спектрах регистрируют колебания полярных связей (C–O, C=O, C–N, N=O, S=O, C=C, O–H, C–H, карбонильные, карбоксильные, амидные, аминные группы). Нормальные колебания полос ИК–спектра в свою очередь подразделяют на валентные (ν) и деформационные (δ). Валентные симметричные и антисимметричные колебания характеризуют изменение длины связи вдоль оси [303, 304]. В характерном спектре Гб вычета базовой линии (рисунок 17 Б) нами были выявлены полосы, характеризующие колебания в связях белка (таблица 5, 6).

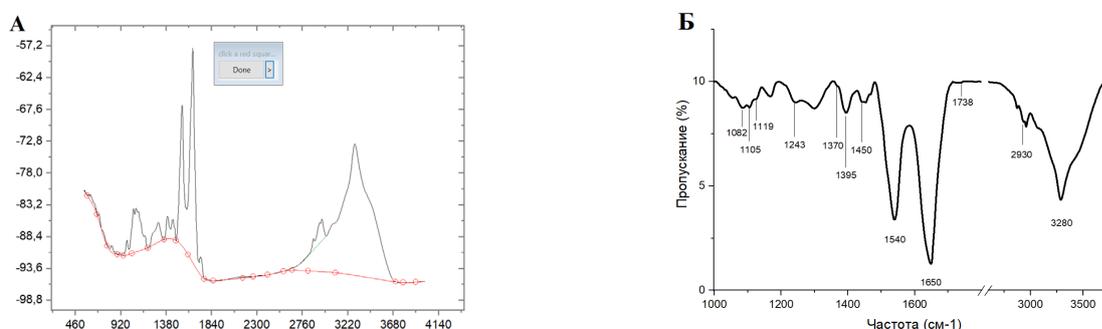


Рисунок 17 — ИК–спектр гемоглобина. А — до вычета базовой линии (черным — исходный спектр, красным — базовая линия). Б — после вычета базовой линии. Расшифровка пиков в тексте

Таблица 5 — Характеристика полос ИК–спектра Гб [305]

Частота, см ⁻¹	Характеристика максимума полосы
1107	O ₂ связанный с Fe ²⁺
1243	Фосфолипиды, нуклеиновые кислоты
1395	Amide IV
1402	Растяжение (stretching) COO ⁻ групп
1450	Amide III
1535	Amide II
1540	Деформация N–H связи в Amide II
1650	Растяжение амидных связей белка C=O, чувствителен к изменениям во вторичной структуре белка
1653	Amid I (характерный пик Гб)
1738	C=O растяжение фосфолипидов
2930	Жирные кислоты
3300	Вторичный амид
2800–3000	растяжение CH ₂ и CH ₃ –связей групп в ацильных цепях липидов (в меньшей степени в белках клеток)

Регистрацию спектров ИК проводили на жидких образцах с использованием приставки НПВО (неполное внутренне отражение) на ИК Фурье спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США). Для регистрации сигнала, наносили 2 мкл образца на приставку НПВО, который подсушивали до снижения вклада полос OH–групп воды в спектр в течении 5 минут при комнатной температуре. Перед регистрацией сигнала вычитали фон. Регистрацию сигнала проводили в диапазоне 550–4000 см⁻¹ с шагом сканирования 4 см⁻¹. Время регистрации сигнала — 20 секунд. Измерения проводили в количестве повторов не менее 12.

Таблица 6 — Соотношение интенсивностей полос спектра ИК гемоглобина [123, 306, 307]

Соотношение интенсивностей пиков	Значение соотношений
I_{1650}/I_{1540}	Характеризует изменение вклада AmideI/AmideII (растяжение COOH к деформационным колебаниям N–H групп). Смещение положения пика AmideI указывает на изменение общего конформационного состояния белка в клетке. AmideI (пик 1650 см^{-1} , обусловлен растяжением связей в COOH–группе, указывает на наличие в молекулах различного происхождения структур с водородными связями и на присутствие неупорядоченных участков [123])
I_{1650}/I_{1243}	Различия по белкам*
I_{1402}/I_{1243}	Различия по аминокислотам*
I_{2930}/I_{1243}	Различия по жирным кислотам*
I_{2850}/I_{2880}	Характеризует отношение несимметричных колебаний СН–связей метиленовых групп т к несимметричным колебаниям СН–связей метиленовых групп жирных кислот
I_{2880}/I_{2930}	Изменение упорядоченности хвостов жирных кислот липидов мембран, пропорционально упорядоченности жирных кислот в мембране. Определяет конформационную подвижность липидного бислоя. Параметр коррелирует с изменением упорядоченности липидов и плотности упаковки жирных кислот

* — если после вычета базовой линии, полоса с максимумом при 1243 см^{-1} одинакова, то её можно использовать в качестве внутреннего стандарта оценки количественных изменений

Для анализа положения максимумов пиков полос и построения соотношений полос, проводили вычет базовой линии в программе OriginPro 2020. Спектры не нормированы.

2.20. Статистический анализ

Выявление статистической значимости наблюдаемых различий в данных молекулярной спектроскопии (сравнение соотношений интенсивностей пиков, времени жизни пикосекундной триптофановой флуоресценции, величины ζ -потенциала) между результатами проводили с использованием теста Манна-Уитни (Mann–Whitney U test) или с использованием дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ изображений, полученных методом ЛИМ осуществляли в программе FIJI ImageJ. Разложение кривых затухания времени жизни пикосекундной флуоресценции проводили в пакете программ SPCImage 8.0, Данные считали удовлетворимыми при построении аппроксимационной кривой при распределении $\chi^2 = [0,88–1,11]$, что соответствует величине р-значения = $[0,90–0,80]$, то есть, кривая аппроксимации построенная по рассчитанным коэффициентам достаточно достоверно описывает экспериментальные значения.

ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Влияние парциального давления кислорода на конформацию гемоглобина

3.1.1. Особенности анализа КР–спектров молекул Гб

Известно, что спектр КР внутриклеточного Гб (далее, для удобства, будем понимать под конформацией *гема и глобина СЭ* (эритроциты), конформацию внутриклеточного гемоглобина) и молекул гемоглобина, выделенных в раствор (далее, для удобства, будем обозначать как конформация *гема и глобина выделенного Гб*) характеризуются аналогичным числом и расположением максимумов в спектре КР [120, 130, 247, 308, 309]. В спектрах КР, полученных для Гб_{цп} и Гб_{мс} набор пиков и положение их максимумов аналогичен [35, 87] (более подробно в главе 2.11.1 «Спектроскопия комбинационного рассеяния гемоглобина», стр. 61), что значительно упрощает анализ спектров КР и сравнение конформации Гб в СЭ и выделенного Гб. При исследовании конформационных изменений молекул Гб, как правило, оценивают изменения соотношений величин пиков [35, 87, 120, 130, 247, 308, 309]. Мы предполагаем, что конформации гемовой и глобиновой части молекул Гб в СЭ и в растворе (рассматривается как модельная гомогенная система, в которой расстояние между молекулами Гб велико) будут отличаться друг от друга, что косвенно подтверждает наше предположение о существовании упорядоченности молекул Гб внутри эритроцита. Мы предполагаем стадийность переноса молекул O₂ в в эритроците: после проникновения кислорода в липидный бислой плазматической мембраны эритроцита, O₂ формирует комплекс с атомом железа в гемопорфириновом цикле дГб, который находится в комплексе с БПЗ [124, 310]. Далее, происходит

десорбция $oГб_{мс}$ в цитоплазму клетки и сорбция $дГб_{мс}$ на сайт CDB3, где осуществляется перераспределение (или взаимодействие с O_2) $oГб/дГб$ (рисунок 18).

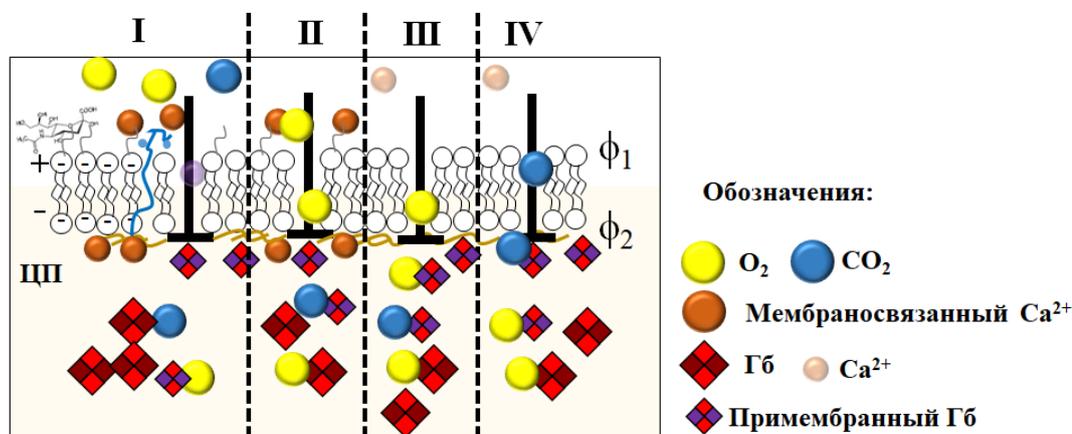


Рисунок 18 — Схема перераспределения $Гб_{мс}$ и $Гб_{ЦП}$ при десорбция $oГб_{мс}$ в цитоплазму клетки и сорбция $дГб_{мс}$ на сайт CDB3. На сайте связывания комплекса БПЗ осуществляется обмен молекулами O_2 и CO_2 за счет различия сродства $Гб_{мс}$ к CDB3 при изменении pO_2

3.1.2. Изменение конформации гема в области парциального давления кислорода (от 118 до 2 мм рт.ст.)

Ранее [91], было установлено, что полное вытеснение O_2 из проб с раствором Гб происходит за 20 минут при насыщении пробы с использованием газовой смеси А азота и 0,04% CO_2 . В связи с этим, в наших экспериментах мы меняли pO_2 (парциальное давление кислорода) в пробах с СЭ и выделенным Гб в течении 20 минут (рисунок 19). Контроль содержания кислорода в газовой смеси, осуществляли амперометрическим методом (см. главу 2.8 «Изменение доли парциального давления кислорода в суспензии эритроцитов», стр. 53), Конформационные изменения Гб при полном насыщении (высокое содержание O_2 , оксигенация пробы, $pO_2 = 118$ мм рт.ст.) и вытеснении (низкое содержание O_2 , дезоксигенация пробы, $pO_2 = 2$ мм рт.ст.) кислорода из проб СЭ и выделенного Гб осуществляли методом КР-спектроскопии. Известно, что при полном отсутствии

O_2 в среде в спектре КР Гб не выявлена полоса 1375 см^{-1} и снижается величина пика 1585 см^{-1} , а так же, наблюдается максимум 1355 см^{-1} и возрастает величина максимума 1550 см^{-1} (соответствует «плоской» конформации гема, оГб, таблица 2) [311, 312].

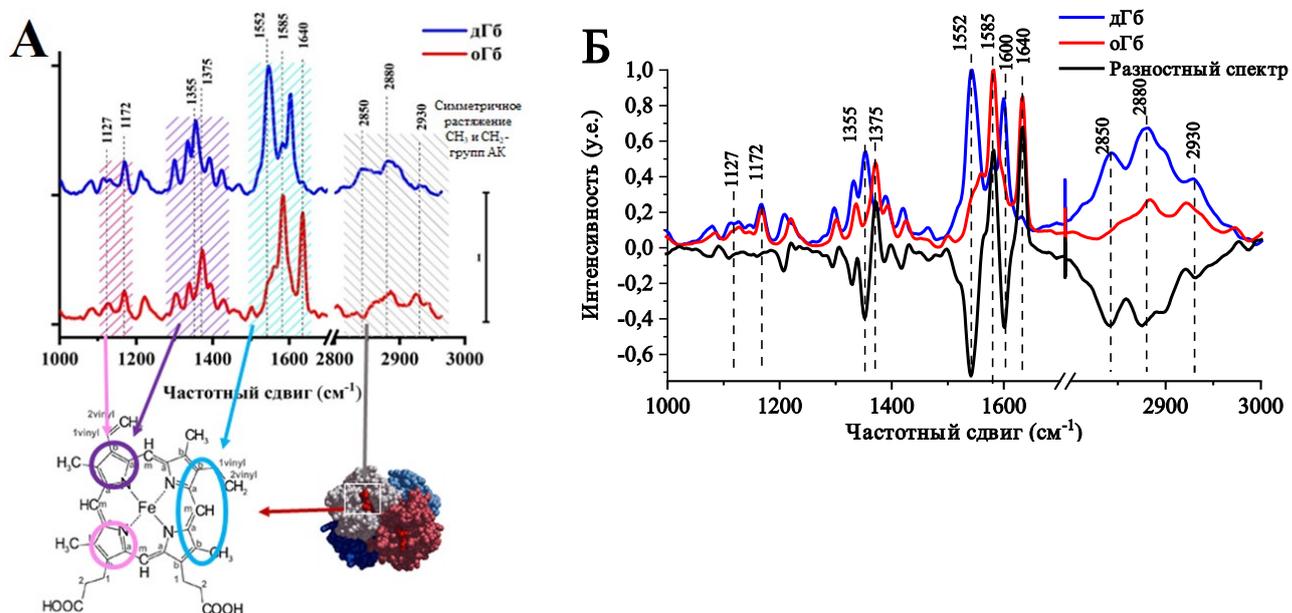


Рисунок 19 — Спектры КР оксигемоглобина (оГб, «плоская» конформация гема, красная кривая) и дезоксигемоглобина (дГб, «куполообразная» конформация гема, синяя кривая). А — спектры оГб и дГб характеризуют изменения колебаний связей гема (область $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) и глобина в высокочастотной части спектра ($2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$). Цветом выделены области на спектре, которые соответствуют валентным колебаниям пиррольных колец, винильных групп гема и колебания СН–связей аминокислот глобина (см. таблица 3). Спектры нормированы на максимум интенсивности КР–спектра и сдвинуты относительно друг друга. Б — разностный спектр между оГб и дГб (черная кривая) отражает изменения по интенсивности и положению полос при переходе Гб из окси– в дезоксиформу. Спектры нормированы на максимум интенсивности КР–спектра.

При снижении pO_2 , в спектрах КР выявлены характерные для оГб и дГб изменения (рисунок 19 Б). Основные изменения наблюдаются в «области отпечатков пальцев» ($1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) при 1127 , 1172 , 1355 , 1375 , 1550 , 1585 , 1600 , 1640 см^{-1} . Эти положения максимумов полос спектра КР характеризуют валентные колебания связей гема Гб. Изменения интенсивности валентных колебаний в указанной части спектра КР совпадают с данными литературы [311, 312]. Однако, в исследованиях, посвященных изучению высокочастотной области КР–спектра

явно не уделяется должного внимания возможности исследования конформации глобиновой части молекулы Гб, в которых мы выявили существенные изменения при изменении pO_2 [21, 259, 311, 313]. Таким образом, наши эксперименты могут свидетельствовать о том, что переход Гб из расслабленной (R) в напряженную (T) конформацию, сопровождается изменениями спектра КР, которые свидетельствуют об изменении конформации гема (переход из «плоской» в «куполообразную» форму), а также изменении плотности упаковки молекулы глобина в области гема, так и структуры глобина в целом [27, 97, 314].

В следующей серии экспериментов мы исследовали изменения конформации гема и глобина в СЭ и выделенном Гб при варьировании pO_2 (рисунок 20). Проведение модельного эксперимента с выделенным Гб должно было помочь выяснить, оказывает ли на конформацию молекулы Гб различное распределение Гб (в клетке и растворе: распределение молекул Гб в цитоплазме эритроцита и в растворе).

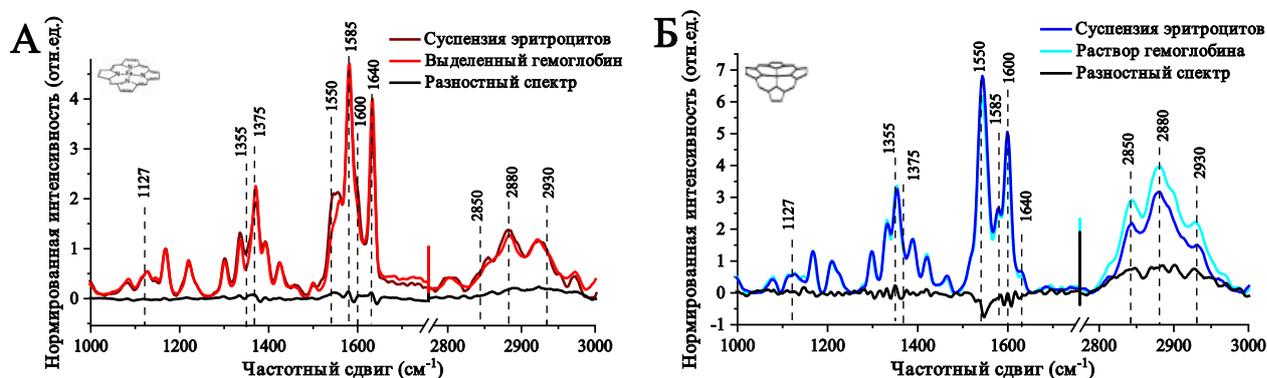


Рисунок 20 — Спектры КР Гб_{цп} СЭ и выделенного Гб в условиях: А — $pO_2 = 118$ мм рт.ст., Б — $pO_2 = 2$ мм рт.ст. в течении 20 минут, 25 °С и 1 атм. [91]. Черной кривой представлен разностный спектр между пробами СЭ и выделенным Гб. Слева на графиках схематично отображен вид гема, характерный для окси и дезоксиформы гема соответственно. Спектры нормированы на величину интенсивности пика с положением 1220 см^{-1} , что позволяет исключить вклад от концентрации Гб и доли оГб и дГб в пробе [308]

Установлено, что при изменении pO_2 , величины интенсивности максимумов пиков 1375 , 1550 и 1600 см^{-1} в области валентных колебаний гема различны (рисунок 20 А). Насыщение гема O_2 в пробе с выделенным Гб существенно выше. Отметим, что при низком содержании O_2 , максимальные различия между

спектрами КР выявлены в области валентных колебаний аминокислот глобина (рисунок 20 Б):

- При $pO_2 = 118$ мм рт.ст. — около 25–31% для СЭ и выделенного Гб;
- При $pO_2 = 2$ мм рт.ст. — 41–44% для СЭ, и 54–57% для выделенного Гб.

Отметим, что при увеличении времени инкубации СЭ с газовой смесью ($pO_2 = 118$ и 2 мм рт.ст.), изменения спектра КР гема, которые могли бы характеризовать большую степень насыщения пробы O_2 не выявлены (соотношение интенсивностей пиков I_{1375}/I_{1172} , I_{1580}/I_{1550} , $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$). Важно, что в области групповых колебаний атомов полуколец пирролов гема ($1300–1450$ cm^{-1}), при $pO_2 = 2$ мм рт.ст. для СЭ выявлен сдвиг полос в высокочастотную область, что характеризует снижение длины сопряжения двойных связей пиррольных колец гемопорфирина [255, 305, 315].

Для того, чтобы оценить долю изменения вклада колебания отдельных связей молекулы Гб (конформационные изменения молекул Гб) при изменении pO_2 , мы использовали соотношения интенсивностей пиков КР–спектра (рисунок 21).

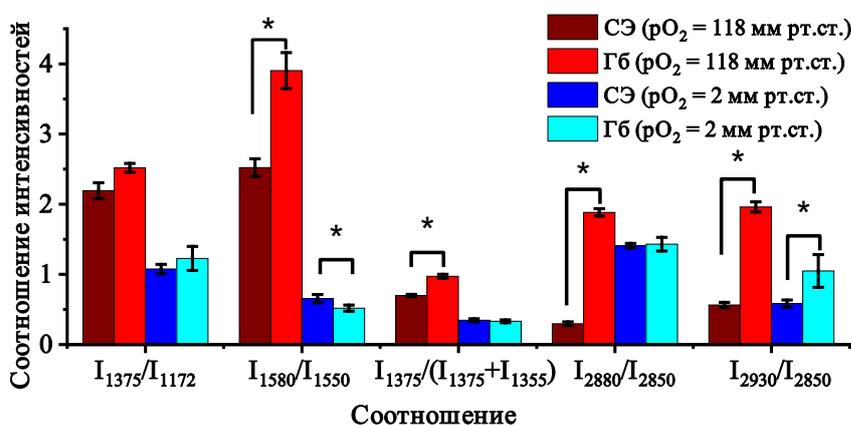


Рисунок 21 — Соотношение интенсивностей пиков КР–спектра для Гб в СЭ и выделенного Гб, при $pO_2 = 118$ мм рт.ст. и $pO_2 = 2$ мм рт.ст. в течении 20 минут, 25 °С и 1 атм. [91] (* обозначено статистически значимые различия между пробами СЭ и Гб в одинаковых условиях ($p < 0,05$))

Так, соотношения интенсивностей пиков КР–спектра $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$, которые характеризуют изменение вклада симметричных и несимметричных колебаний пиррольных колец в макроцикле гема и связаны с подвижностью гема

(за счет комплекса Fe–O) меняются только при высоком содержании O₂ (таблица 3) [35, 316]. При этом, отсутствуют различия для соотношения I₁₃₇₅/I₁₁₇₂ между СЭ и выделенного Гб. Однако, величина соотношения I₁₅₈₀/I₁₅₅₀ на 23 ± 5% выше для выделенного Гб при pO₂ = 118 мм рт.ст. и на 22 ± 4% ниже при pO₂ = 2 мм рт.ст.. При этом, для молекулы глобина выделенного Гб при pO₂ = 118 мм рт.ст. характерна менее плотная упаковка (вклад валентных колебаний аминокислот глобина, соотношения I₂₈₈₀/I₂₈₅₀, I₂₉₃₀/I₂₈₅₀). В то время, как для молекул выделенного Гб при pO₂ = 118 мм рт.ст. наблюдается большая плотность упаковки относительно СЭ.

Итак, различия между конформацией гема и глобина в Гб СЭ и выделенного Гб, более выражены при pO₂ = 118 мм рт.ст., что, вероятно, обусловлено большей упорядоченностью расположения молекул Гб в цитоплазме клетки по сравнению с гомогенным распределением Гб в растворе. Также, из величин соотношений интенсивностей пиков КР–спектра следует, что для молекулы Гб в клетке при pO₂ = 2 мм рт.ст. характерно изменение конформации гема, сопровождающееся увеличением вклада отношения симметричных колебаний концевых метильных радикалов аминокислот по отношению к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот (увеличение соотношения I₂₉₃₀/I₂₈₅₀, которое характеризует полярное окружение аминокислот), а также, снижается плотность упаковки глобина (увеличение величины соотношения I₂₈₈₀/I₂₈₅₀) (рисунок 23) [27]. Отметим, что обнаруженные изменения структуры молекулы глобина в классической модели (когда при переходе из оГб в дГб, возрастает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и увеличивается плотность упаковки глобина) [94, 97, 317] не характерны для молекулы Гб, однако, изменения плотности (другими словами, *компактности*, либо *рыхлости* белковой глобулы) глобина в условиях, когда молекулы выделены в раствор, не оказывают электростатического и межмолекулярного взаимодействия друг с другом и экранированы молекулами воды [94], что согласуются с имеющимися представлениями об изменении плотности упаковки глобина при осуществлении перехода T → R состояние [98]. Вероятно, молекулы Гб в цитоплазме эритроцита формируют структурные

объединения (олигомерные комплексы) и их функционирование регулируется молекулярным краудингом. Полученные результаты подтверждают наше предположение о существовании определенного порядка молекул Гб в цитоплазме эритроцита за счет высокой плотности молекул Гб и эффективных белок–белковых взаимодействиям между молекулами Гб [94]. Вероятно, комплексы Гб в клетке характеризуются упорядоченным распределением, а близкое расположение молекул, согласно теории макромолекулярного краудинга не оказывают влияние на относительное количество комплексов с оГб (по параметру $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$), но увеличивают вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и снижают плотность упаковки глобина, которая в цитоплазме более плотная, чем у выделенного Гб. Далее, мы рассмотрим изменения конформации глобиновой части Гб при $pO_2 = 118$ и 2 мм рт.ст., 25 °С и 1 атм. [91].

3.1.3. Конформационные изменения валентных колебаний аминокислот Гб в высокочастотной области КР–спектра 2800–3000 см⁻¹

В высокочастотной области спектра КР (2800–3000 см⁻¹) для СЭ и выделенного Гб обнаружены характерные полосы КР спектра для симметричных и ассиметричных валентных колебаний CH_2 – и CH_3 –радикалов аминокислот, которые в литературе описывают как валентные колебания глобиновой части Гб (рисунок 22) [27, 120, 318]. Однако, в литературе отсутствуют данные о том, колебания каких именно типов аминокислот оказывают существенный вклад в КР–спектр.

В *работе* [27] показано, что (при использовании лазера с длиной волны возбуждающего света 473 нм), в КР спектрах теней эритроцитов присутствуют полосы как колебаний молекулярных групп в липидах, так и белках мембраны. Для того, чтобы выяснить, природу пиков в высокочастотной области КР–спектров СЭ при использовании лазера с длиной волны возбуждающего света 532 нм, мы

выделили тени эритроцитов, в спектрах КР которых не были обнаружены полосы в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ (рисунок 22 А, черная кривая). Очевидно, что данный результат свидетельствует о связи положения и интенсивности полос в спектрах КР СЭ и выделенного Гб соответствуют колебаниям молекулярных СН–связей глобина Гб, которые зависят от конформации глобина. Отметим, что в КР–спектрах СЭ выявлена полоса 3009 см^{-1} , которая характеризует ($=\text{C}\text{--}\text{H}$) растяжение липидов, но отсутствует полоса 2917 см^{-1} , характерная для растяжения CH_3 –связей липидов (вероятно, пик в данной области перекрывают полосы от глобина) [319], что позволяет анализировать изменение упорядоченности расположения хвостов жирных кислот в липидах мембраны эритроцитов.

Вероятно, результаты работы [27] связаны с использованием лазера с длиной волны возбуждающего света 473 нм , которая резонирует с частотой колебания CH_3 –связей аминокислот. В наших условиях не использовался резонансный КР, что делает невозможным регистрацию сигнала от CH_3 –связей липидов и аминокислот мембраны эритроцита [320].

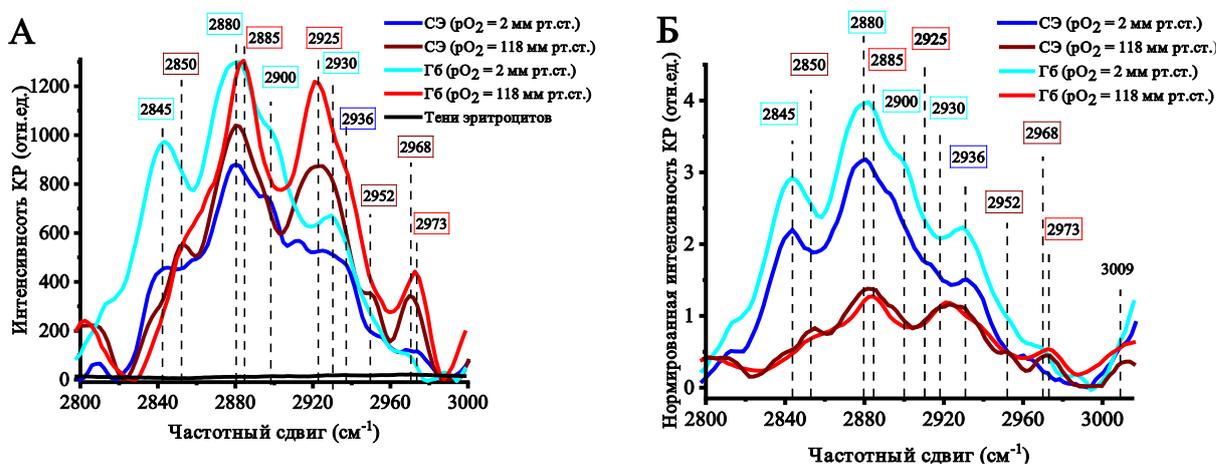


Рисунок 22 — Область КР спектра $2700\text{--}3050\text{ см}^{-1}$ валентных колебаний аминокислот. А — спектры не нормированы, Б — спектры нормированы интенсивности пика 1220 см^{-1} (в соответствии с [308]). Положения максимумов пиков КР–спектра и спектр указаны в одинаковых цветах

В соответствии с литературными данными, и сопоставления положения, количества и соотношения максимумов интенсивностей пиков аминокислот, мы предполагаем, что основной вклад в валентные колебания области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$

вносят колебания CH_2 - и CH_3 -связи аминокислот гистидина ($2850, 2860, 2900 \text{ см}^{-1}$) и тирозина ($2880, 2860 \text{ см}^{-1}$) [120, 249, 253, 313, 321, 322]. В соответствии с [313], колебания CH -связей тирозина и гистидина характеризуются максимумом спектра КР при 1622 см^{-1} , а триптофана при 1556 см^{-1} , что трудно анализировать параллельно с высоким вкладом колебаний молекул гема. Поэтому, далее в работе, для анализа изменений триптофанов, использовали метод пикосекундной флуоресценции (TCSPC). Другие эффекты, например вклад в КР-спектр молекулярных колебаний фермента супероксиддисмутаза, содержание которой увеличивается в эритроците в 1,5 раза в условиях гипоксии [323] не учитываются в связи с существенным отличием её КР-спектра в области $2800\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$ [21]. Отметим, что при снижении величины $p\text{O}_2$ со 118 до 2 мм рт.ст. наблюдается смещение положения максимумов полос КР-спектра (рисунок 22), а так же, изменение величины интенсивностей пиков (рисунок 23).

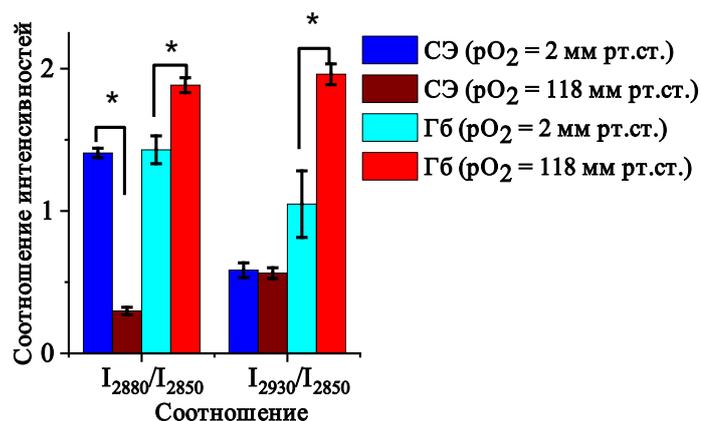


Рисунок 23 — Соотношения интенсивностей пиков КР-спектра глобина Гб при $p\text{O}_2 = 118$ и 2 мм рт.ст. в пробах (* обозначено статистически значимые различия между пробами СЭ и выделенного Гб в различных условиях ($p < 0,05$))

При этом, положение максимумов пиков для внутриклеточного Гб и молекул выделенного Гб различна. Так, при высоком $p\text{O}_2$, положение полос 2850 и 2880 см^{-1} смещено в высокочастотную область спектра, а полосы 2930 см^{-1} , наоборот, в низкочастотную (более подробный анализ положения максимумов представлен в таблице 3). Также, для СЭ характерны более широкие пики (на 5% по изменению величины полуширины на полувысоте пика (FWHM)) по сравнению с выделенным Гб.

Мы предполагаем, что изменение положения пиков спектра КР вызваны в первую очередь изменением конформации глобина за счет увеличения упорядоченности расположения молекул в клетке (по сравнению с Гб в растворе) [20] (рисунок 23). Этот вывод согласуется с данными по изменению длины сопряжения связи между Fe–His в низкочастотной области КР–спектра (от 200 до 500 см^{-1}) [322]. С другой стороны, различия между положениями полос в высокочастотной области КР–спектра объясняется еще и тем, что:

- Низкое pO_2 , оказывает значительный эффект на метаболизм эритроцитов, меняя эффективность фосфорилирования тирозиновых остатков мембранных белков, оказывая влияние на внутриклеточную сигнализацию, форму, накопление мембранный транспорт, объем клеток, их форму а также, накопление 2,3–бисфосфоглицерата (2,3–БФГ), которые встраиваются в центральную катионную полость дГб, образованной β –цепями (одновременно является сайтом связывания 2,3–БФГ и анионного участка БПЗ (CDB3)) между субъединицами Гб в клетке [124, 310];

- Возможно, на конформацию внутриклеточного Гб оказывает влияние поверхностный потенциал клетки (величина ζ –потенциала при $pO_2 = 118 \text{ мм рт.ст.}$ составляет $-20,8 \pm 0,5 \text{ мВ}$, при $pO_2 = 2 \text{ мм рт.ст.}$ — $-16,7 \pm 1,3 \text{ мВ}$, рисунок 24), который, вероятно, меняет локализацию анионного участка белка БПЗ в катионной полости дГб, вызывая формирование дополнительных ионных связей между димерами $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. В результате структура Гб переходит в Т–форму, с «куполообразной» конформацией гема, а центральная полость глобина расширяется [61, 310].

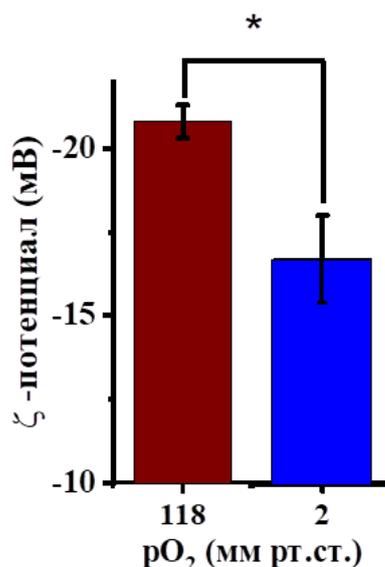


Рисунок 24 — Изменение ζ-потенциала эритроцитов при $pO_2 = 118$ мм рт.ст. (бардовый столбец) и $pO_2 = 2$ мм рт.ст (синий столбец) (* обозначено статистически значимые различия, $p < 0,05$)

Таким образом, нами впервые установлено, что величины максимумов валентных колебаний аминокислот КР-спектра глобина зависят от pO_2 и величины поверхностного потенциала мембраны. Отсутствие сигнала КР в спектрах теней эритроцитов (при использовании лазера с длиной волны возбуждающего света 532 нм) позволяет регистрировать конформационные изменения структуры глобина в СЭ без вклада компонентов мембраны. Важно, что соотношение интенсивностей пиков валентных колебаний аминокислот, анализируемые в нашей работе характеризуют только изменения конформации молекулы глобина Гб.

При этом, снижение pO_2 в экстраклеточной среде СЭ сопровождается увеличением упорядоченности глобина и снижением плотности упаковки глобина (увеличение величины соотношения I_{2880}/I_{2850}), вызванные, вероятно, вкладом радикалов в главной оси белка [27, 311]. Отметим, что для молекул выделенного Гб, снижение pO_2 приводит к снижению плотности упаковки как по изменению вклада колебаний связей радикалов как в главной оси белка (I_{2880}/I_{2850}), так и колебаниям боковых радикалов (I_{2930}/I_{2850}). Данный эффект может свидетельствовать о различной плотности упаковки глобина в клетке и растворе.

3.1.4. Парциальное давление кислорода как фактор регуляции конформации гемоглобина

Мы предполагаем, что перенос молекул O_2 через мембрану эритроцита осуществляется следующим образом: после проникновения кислорода в липидный бислой плазматической мембраны, он координируется (когда к гему присоединены два аксиальных лиганда — он находится в шестикоординированном состоянии: молекула кислорода с дистальной стороны и имидазольная группа гистидина с проксимальной, через которую гем связан с полипептидной цепью белка, что соответствует «плоской» конформации гема (подробнее, см. главу 1.2.2 «Строение и функции гемоглобина эритроцита», стр. 25) в гемопорфириновом цикле дГб, взаимодействующего с БПЗ. Далее, происходит десорбция оГб в цитоплазму клетки, где осуществляются белок–белковые взаимодействия (из–за изменения плотности упаковки глобина), меняющие способность гема связывать молекулу кислорода. Вероятно, в ходе процесса переноса O_2 , должна сначала меняться конформация гема, а затем конформация глобина. Для проверки этого предположения, мы использовали последовательное вытеснение кислорода из СЭ и выделенного Гб. Таким образом, оценивая изменение конформации гемовой и глобиновой части Гб при различной pO_2 можно оценить, конформационные изменения Гб при вытеснении кислорода из пробы. Отметим, что известно, какие изменения характерны для гема Гб при изменении pO_2 в крови, суспензии эритроцитов и выделенного Гб, в присутствии и отсутствии 2,3–БФГ, различном рН и т.д. [324–327]. Однако, в литературе отсутствуют данные, характеризующие конформационные переходы гема и глобина при последовательном вытеснении O_2 из пробы.

В связи с этим мы анализировали кривые изменения доли оГб в пробах при уменьшении pO_2 , рассчитанное по изменению соотношения интенсивностей пиков КР–спектра (в соответствии с [121]):

$$sO_2 = \frac{oГб}{\Sigma oГб + dГб} = \frac{I_{1580}}{\Sigma I_{1580} + I_{1550}}, \quad (10)$$

где I_{1550} и I_{1580} — максимумы интенсивностей пиков КР–спектра. В соответствии с расчетами по формуле (10), был построен график (рисунок 25), характеризующий степень насыщения (sO_2) от величины парциального давления кислорода (pO_2) в пробе. Установлено, что изменение конформации гема, характеризующее степень насыщения гема кислородом различна для СЭ и выделенного Гб. Так, для СЭ характерна S–образная кривая насыщения, с выходом на плато насыщения около 80 мм рт.ст., в то время как, для выделенного Гб наблюдается иной характер зависимости.

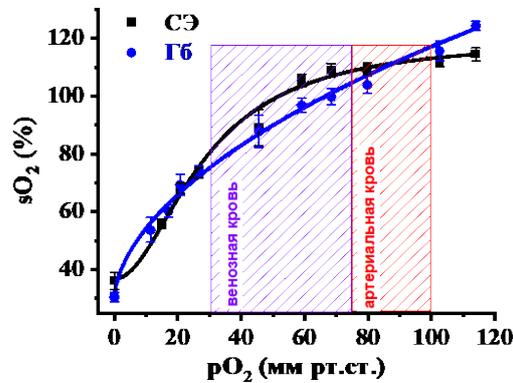


Рисунок 25 — Зависимость изменения величины насыщения гема кислородом (sO_2) от pO_2 для СЭ (черная кривая) и выделенного Гб (синяя кривая). Фиолетовым прямоугольником выделена область, с характерным pO_2 для венозной крови, красным прямоугольником — для артериальной крови. Рассчитано по (10), в соответствии с [121]

Известно, что эффективность связывания O_2 эритроцитами и выделенным Гб, различно при 40–60 мм рт.ст., но имеет одинаковые величины при pO_2 более 100 мм рт.ст, что согласуется с полученными нами результатами [324–328]. Поэтому, с нашей точки зрения, при проникновении молекулы кислорода через липидный бислой мембраны и насыщения Гб O_2 , важную роль играет конформация как Гб_{цн} так и Гб_{мс}. Для проверки этого предположения, мы исследовали изменение конформации гема и глобина Гб в СЭ и выделенного Гб при изменении содержания pO_2 в пробе.

Из соотношения величин интенсивностей пиков $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$ следует, что Гб в клетке эффективнее насыщается кислородом при более низких pO_2 , чем

выделенный Гб, с большей вероятностью нахождения гема в «куполообразной» конформации относительно Гб (рисунок 26 А).

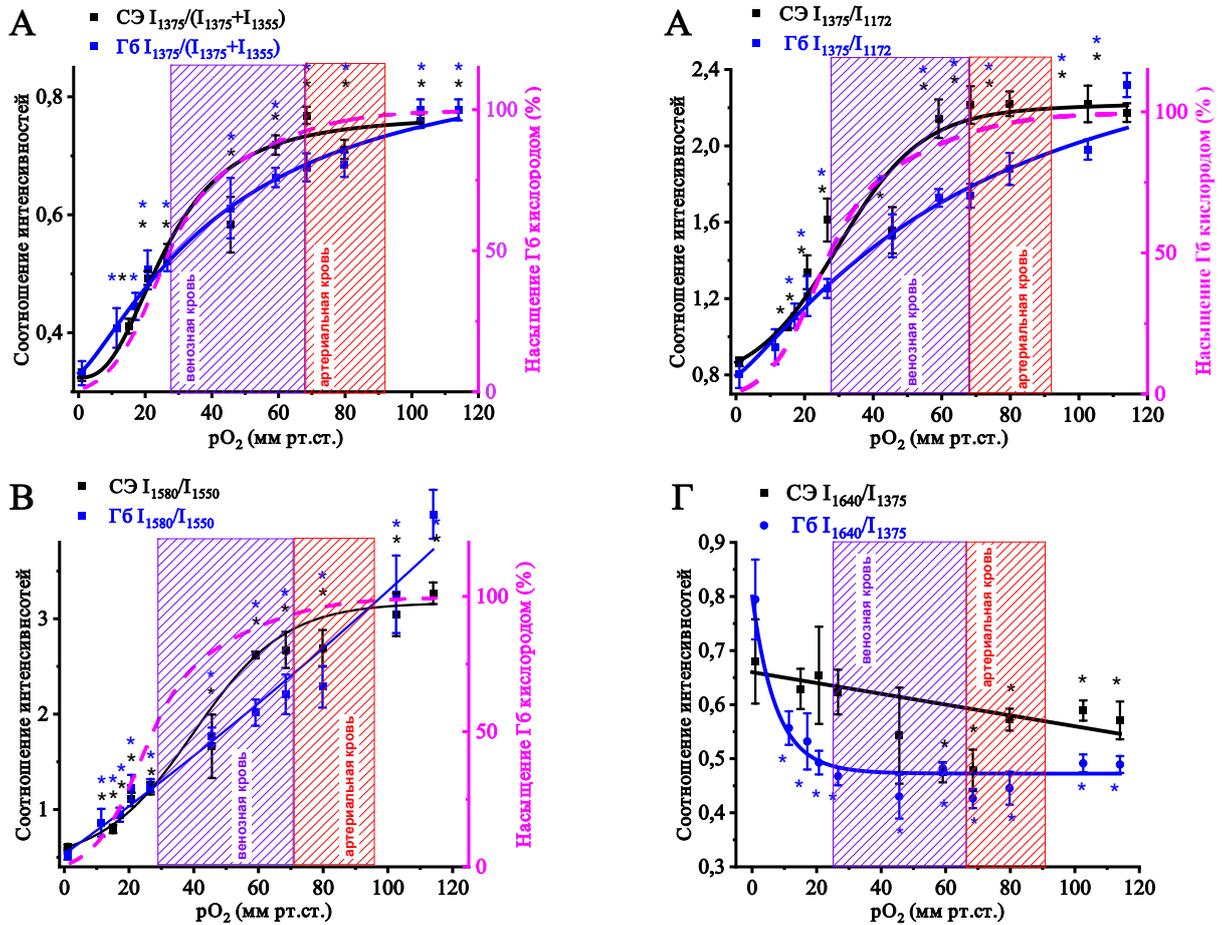


Рисунок 26 — Изменение конформации гема при изменении pO_2 для СЭ (черная кривая) и выделенного Гб (синяя кривая). Фиолетовым прямоугольником выделена область, с характерным pO_2 для венозной крови, красным прямоугольником — для артериальной крови: А — характеризует долю оГб от общего количества Гб, Б — изменение вклада валентных колебаний связей пиррольных полуколец гема, В — изменение вклада валентных колебаний винильных групп гема, Г — изменение вероятности нахождения гема в «плоской» конформации. Пунктирной фиолетовой линией указана расчётная величина кривой Бора [329].

Данные представлены как среднее \pm SE (* обозначено статистически значимые различия относительно $pO_2 = 2$ мм рт.ст., черным цветом — для СЭ, синим цветом — для выделенного Гб ($p < 0,05$))

Итак, выделенный Гб имеет большее насыщение кислородом, относительно внутриклеточного Гб. Мы предполагаем, что данный процесс имеет физиологическое значение — эритроцит не имеет возможности полностью оксигенироваться при движении по кровеносным сосудам, таким образом, в клетке

всегда присутствует доля дГб (например, дГб, связанный с БПЗ) [94, 97, 121, 316]. Так же, из соотношений интенсивностей пиков, характеризующих конформационные изменения гема (от «куполообразной» к плоской), а именно: изменение вклада валентных колебаний связей пиррольных полуколец гема (I_{1375}/I_{1172}) и изменение вклада валентных колебаний винильных групп гема (I_{1550}/I_{1580}) (рисунок 26 Б, В) следует что изменения конформация для СЭ и выделенного Гб обусловлены тремя стадиями конформационных изменений гема [42]:

1. 2–15 мм рт.ст. pO_2 , характеризуется слабым изменением конформации («лаг–период»);
2. 15–60 мм рт.ст. pO_2 , характеризуется немонотонным изменением конформации («линейная зависимость»);
3. 70–120 мм рт.ст. pO_2 , характеризуется выходом на плато («насыщение»).

Отметим, что для области «насыщения» отсутствуют достоверные изменения между конформацией гема в указанной области для СЭ, так же, эта область соответствует значениям парциального давления в артериальной крови. Зона «лаг–периода» соответствует значениям pO_2 в скелетных мышцах [7]. Соотношение I_{1640}/I_{1375} указывает на то, что для величины pO_2 , при величинах капиллярного давления, вероятность нахождения гема в «плоской» конформации изменяется максимально, что обусловлено необходимостью эффективного газообмена. Так же, нами установлено, что увеличение pO_2 снижает сродство к NO (I_{1618}/I_{1580}) в как в СЭ, так и в выделенном Гб.

Изменения конформации глобина Гб при различном pO_2 , свидетельствуют о том, что вклад колебаний симметричных концевых метиленовых групп аминокислот (увеличение величины соотношения I_{2930}/I_{2850}) для выделенного Гб не меняется при значениях pO_2 в диапазоне 40–60 мм рт.ст., а основные изменения этого параметра наблюдаются в области 2–20 мм рт.ст. (рисунок 27 А). При этом, для СЭ выявлено немонотонное увеличение величины данного соотношения, что может свидетельствовать о наличии изменения конформации белка. Аналогично, в

данной области наблюдается нелинейное падение величины соотношения I_{2880}/I_{2930} спектра КР, что характеризует изменения вклада колебаний N–метиновых групп аминокислот, в то время, как для Гб СЭ наблюдается снижение величины этого соотношения во всем диапазоне pO_2 (рисунок 27 Б). Итак, выявленные изменения плотности упаковки молекулы глобина свидетельствуют о том, что глобин в клетке и растворе имеет различную конформацию и, соответственно, гем имеет различную чувствительность к изменениям pO_2 .

Прежде всего, мы связываем данные изменения с воздействием поверхностного потенциала мембраны на конформацию Гб_{мс}. Так, ζ –потенциал выделенного Гб в оксиформе ($pO_2 = 118$ мм рт.ст.) составляет $-33,4 \pm 2,1$ мВ и $-28,2 \pm 2,6$ мВ в дезоксиформе ($pO_2 = 2$ мм рт.ст.), что, вероятно, способствует образованию комплексов у молекул Гб при снижении pO_2 до 2 мм рт.ст. [232, 234]. Хотя, в этих условиях, изменения ζ –потенциала мембраны незначительны ($pO_2 = 118$ мм рт.ст. — $-20,8 \pm 0,5$ мВ, $pO_2 = 2$ мм рт.ст. — $-15,7 \pm 1,3$ мВ), вероятно, это приводит к деполяризации плазматической мембраны [50, 330], регулируя Гб_{цп} за счет сорбции–десорбции дГб (дГб связывается с БПЗ за счет электростатического взаимодействия, ковалентно сшивается с мембранными компонентами дисульфидными связями, гидрофобные взаимодействия с мембранными липидами, может связываться с белками цитоскелета) (рисунок 24) [59, 97, 331]. Частично оГб связывается с мембраной и в примембранной области происходит его восстановление НАДФН–зависимой метГб–редуктазой, в результате чего, происходит изменение трансмембранной разности потенциалов [118]. Таким образом, для глобина Гб_{цп} характерны конформационные изменения как за счет упорядоченности, так и полярного окружения аминокислот белка (изменение полярности может быть вызвано изменением заряда компонентов цитоплазмы и доли бикарбонат ионов внутри клетки) [79, 94–97]. Таким образом, снижение pO_2 в пробе приводит к увеличению доли Гб в состоянии дГб (соотношение $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$, рисунок 26 А–В) и, в свою очередь, приводит к значительным конформационным перестройкам глобина (рисунок 27) вызванным потенциалозависимым связыванием дГб с БПЗ [332–334], а так же, вероятно, играет

большую роль ковалентная сшивка дисульфидных связей с компонентами мембраны [335] и последующим связыванием дГб с мембраной клетки (известно, что содержание Гб в мембране, т.е. имеющий тесный контакт с мембраной без взаимодействия с БПЗ составляет $1,740 \pm 0,074\%$ от общего количества мембранных белков) [336], а контакт Гб с мембраной приводит к образованию внутриклеточного, примембранного слоя из молекул дГб, что, вероятно, компенсирует изменение поверхностного заряда мембраны эритроцита, увеличивая проницаемость мембраны [331], что в конечном итоге приводит к изменению структуры цитоскелета эритроцита и способствует выделению CO_2 в капиллярах и венах [118, 310].

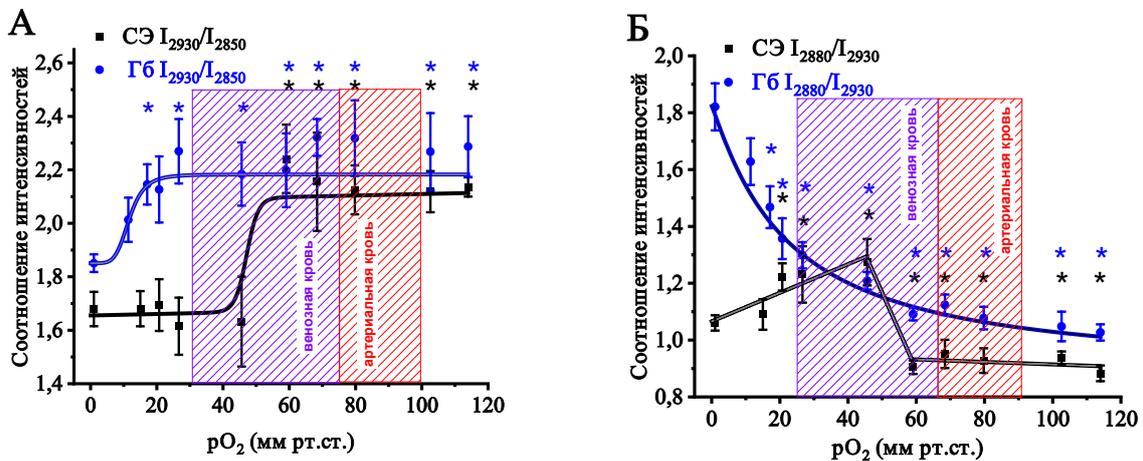


Рисунок 27 — Зависимость изменения конформации глобина от $p\text{O}_2$ для СЭ (черная кривая) и выделенного Гб (синяя кривая). Фиолетовым прямоугольником выделена область, с характерным $p\text{O}_2$ для венозной крови, красным прямоугольником — для артериальной крови: А

— Вклад симметричных колебаний концевых метильных радикалов аминокислот по отношению к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот, Б — Вклад несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот глобина по отношению к колебанию концевых метильных радикалов. Данные представлены как среднее \pm SE (* обозначены статистически значимые различия относительно $p\text{O}_2 = 2$ мм рт.ст., черным цветом — для СЭ, синим цветом — для выделенного Гб ($p < 0,05$))

Полученные нами данные по изменению конформации гема и глобина в СЭ дополняют перечисленные выше данные. Так, резкое снижение плотности упаковки глобина в СЭ происходит при $p\text{O}_2$, соответствующих давлению в

артериальной (90 мм рт.ст.) и венозной (28 мм рт.ст.) крови [124, 337, 338]. Вероятно, молекулы Гб в клетке расположены не гомогенно, а гетерогенно:

1. Слой ориентированных молекул Гб — мембраносвязанный Гб, связанный с БПЗ и/или мембраной.
2. Ориентированный слой Гб в цитоплазме клетки, который принимает участие в компенсации ζ -потенциала клетки [34, 339].

Важно, что после конформационного перехода при 45–50 мм рт.ст. при дальнейшем снижении величины pO_2 отсутствуют изменения величины соотношения I_{2930}/I_{2850} , однако, конформация гема продолжает меняться. Мы предполагаем, что молекулы Гб СЭ реагируют на изменение поверхностного заряда цитоплазматической мембраны клетки и прежде всего за счет увеличения плотности упаковки белковой глобулы: происходит взаимодействие молекул дГб с БПЗ и компонентами мембраны (1). Далее, при снижении pO_2 (до величин pO_2 в венах и скелетных мышцах (2–40 мм рт.ст.)), плотность упаковки глобина не меняется, что связано с возможным перераспределением ориентированного слоя Гб в цитоплазме клетки (2).

Доказано, что изменения конформации гема и глобина в СЭ и выделенного Гб различно, что может быть так же связано с наличием систем регуляторной, сигнальной и буферной функции в клетке. Нами установлено, что при связывании O_2 , выделенным Гб конформация гема имеет менее выраженные изменения, чем в СЭ. При этом, вероятность нахождения гема в «куполообразной» форме меньше, чем в СЭ. Нами доказано, что вклад боковых $-NH_2$ групп колебаний полуколец пиррола гема и валентных колебаний винильных и метиновых мостиков более выражено для Гб с СЭ, чем для выделенного Гб. Изменения положения полос валентных колебаний аминокислот характеризует изменение конформации близлежащих к гему аминокислот (гистидин, лизин), что меняет локализацию анионного сегмента БПЗ, в связи с изменением расположения аминокислот или увеличением плотности отрицательного заряда в центральной полости Гб.

Мы предполагаем, что на изменение конформации гема в СЭ оказывает влияние не только связывание кислорода с атомом железа, в результате чего

величина связи Fe–N снижается от 2,06 до 1,98 Å, а порфириновый макроцикл характеризуется «плоской» формой, но и плотность упаковки глобина, которая реагирует на изменение поверхностного заряда клетки [101, 102]. Таким образом, Гб в цитоплазме СЭ представляет собой, вероятно, сложно организованную и упорядоченную систему с возможным образованием кластеров (упорядоченных структур) Гб в цитоплазме, что будет более детально рассмотрено в разделе 3.5.

3.2. Влияние температуры на конформацию гема и глобина

За время полного кругооборота крови, которое составляет 20–25 секунд у взрослого человека [340], клетка эритроцита испытывает множество изменений среди которых существенную роль играет воздействие температуры в различных участках тела (прохождение крови через внутренние органы, печень и кончики пальцев (диапазон температур 42–20 °С); изменение парциального давления кислорода (pO_2) при прохождении через лёгкие и ткани. В предыдущем разделе нами было показано, что pO_2 оказывает существенное влияние на конформацию гема и глобина и её изменение различно в Гб СЭ и выделенного Гб.

В данном разделе будет рассмотрено влияние температуры в диапазоне 20–42 °С для исследования механизма конформационных переходов в молекуле Гб и влияния на гомогенность распределения молекул Гб в цитоплазме клетки. В связи с комплексным действием температуры на клеточные процессы (скорость диффузии ионов, активность ферментов, вязкость липидов мембраны [72, 147]), вероятно существует другое взаимодействие молекул дГб с мембраной эритроцита за счет связи между дГб и БПЗ, а так же, изменение гомогенности распределения Гб в цитоплазме. В связи с этим, мы предполагаем, что при изменении температуры среды, гем–глобиновые конформационные перестройки будут иметь различный характер в молекулах Гб СЭ и выделенного Гб [320, 341]. Отметим, что температурное воздействие на СЭ и выделенный Гб, будет осуществляться в

физиологическом диапазоне температур СЭ при котором отсутствуют изменения в липидах мембраны [72], а молекулы Гб не переходят в состояние «расплавленной глобулы» [342].

3.2.1. Конформационные изменения гема и глобина в физиологическом диапазоне температур (20–42 °С)

При увеличении температуры в КР–спектрах СЭ выявлено снижение величины интенсивности сигнала КР (снижение в 2,6 раза) и увеличение вклада в спектр колебаний в высокочастотной области КР–спектра (интенсивность колебаний составляет 50% от общей интенсивности спектра). Это может указывать на изменение конформации глобина. При увеличении температуры, выявлено снижение интенсивности КР–спектра выделенного Гб (снижение в 1,7 раз), а интенсивность высокочастотной области спектра увеличился незначительно (на 4%). Отметим, что для рассматриваемого диапазона температур не наблюдается состояние расплавленной глобулы Гб наблюдается в диапазоне 45–65 °С, а денатурация — при 70,85 °С, поэтому, мы предполагаем что выявленные изменения в конформации глобина и интенсивности сигнала полос КР–спектра связаны с изменением конформации глобина и гема, которые различны в клетке и растворе (рисунок 28) [343]. Отметим, что измерения проводились в полностью герметичном гематокритном капилляре, запаянном с обоих концов, что препятствует выходу газа из капилляра, и исключает возможность изменения pO_2 в пробе.

Установлено, что при увеличении температуры с 22 до 36 °С изменения величины ζ –потенциала не выявлены, хотя различны при pO_2 118 и 2 мм рт.ст. Это свидетельствует о том, что регулятором изменения ζ –потенциала при изменении температуры является величина pO_2 (рисунок 29). Отметим, что при увеличении температуры до 38 °С наблюдается увеличение ζ –потенциала СЭ (до $-11,2 \pm 0,3$ мВ)

с дальнейшим увеличением при достижении температур выше 44 °С (до $-9,2 \pm 0,4$ мВ). Вероятно, это связано с изменениями цитоскелета, и фазовыми переходами липидов мембраны при температурах выше 42–44 °С [72, 260].

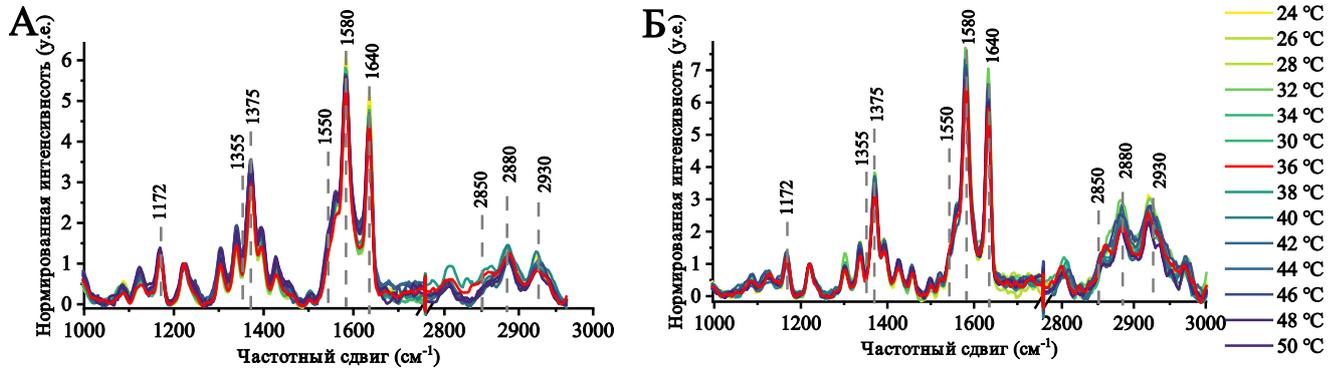


Рисунок 28 — КР–спектры при изменении температуры в диапазоне 20–50 °С. Красным обозначена температура 36 °С для: А — СЭ, Б — выделенного Гб. Спектры нормированы интенсивность пика 1220 см^{-1} , что позволяет исключить вклад от концентрации Гб и доли оГб и дГб в пробе (в соответствии с [308])

Таким образом, полученные нами данные по изменению величины ζ -потенциала СЭ согласуются с литературными данными о том, что фазовые переходы мембраны и изменения цитоскелета (44 °С) не оказывают существенного влияния на поверхностный потенциал эритроцита [72, 260]. Таким образом, мы считаем, что изменения, наблюдаемые при увеличении температуры могут быть обусловлены изменением активности работы ионных каналов и вязкости липидного бислоя мембраны эритроцита [72].

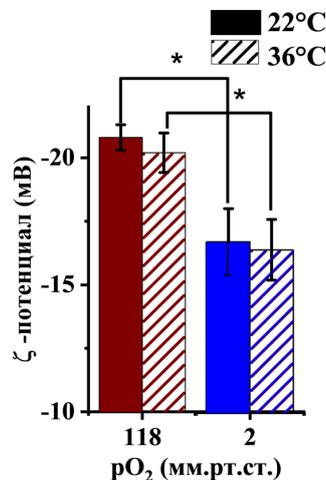


Рисунок 29 — Изменение ζ -потенциала мембраны эритроцита при различных $p\text{O}_2$ (118 и 2 мм рт.ст.) и температуры (22 и 36 °С) (* $p < 0,05$)

Из анализа спектров КР следует, что с увеличением температуры, при $pO_2 = 2$ мм рт.ст., конформация боковых радикалов полуколец пиррола (зависит от белкового окружения гема) различна, что может быть связано с большей вероятностью нахождения гема Гб в «куполообразной» конформации. Установлено, что к изменению температуры чувствительны колебания пирролов выделенного Гб при $pO_2 = 118$ мм рт.ст. (относительно СЭ). Вероятно, это может быть связано с различным расстоянием между молекулами Гб в цитоплазме и растворе и, соответственно, меньшим электростатическим и гидрофобным взаимодействием между молекулами Гб (рисунок 30 А) [94, 151]. Нами установлено, что изменения конформации гема в СЭ и выделенном Гб аналогичны, но более выражены для гема выделенного Гб, в то время, как для Гб_{цп} (Гб СЭ) более выражены изменения в глубине, что, вероятно, связано с различным распределением Гб в цитоплазме (рисунок 30 Б) [158].

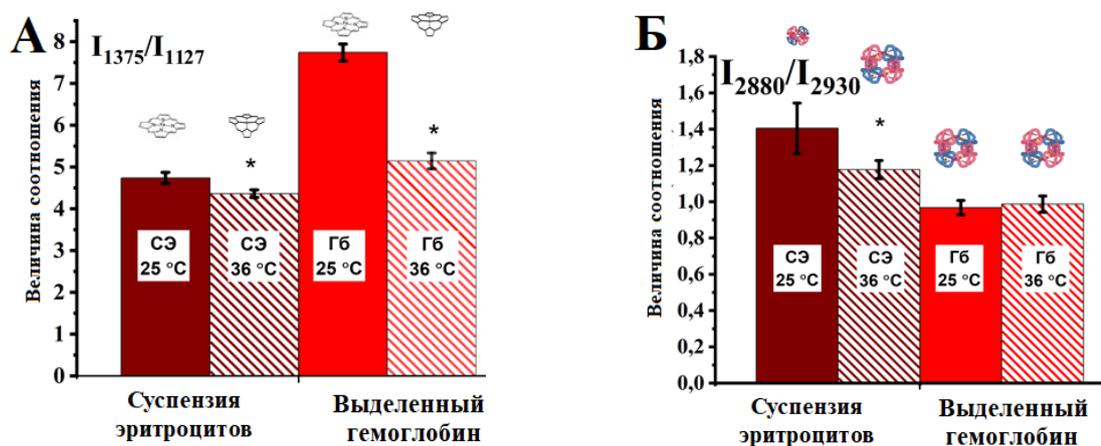


Рисунок 30 — Изменение величины соотношения интенсивностей пиков КР-спектра гема (А) и глобина (Б) при различных температурах (25 и 36 °C). Данные представлены как среднее \pm SE (* отмечены статистически значимые различия относительно 25 °C, $p < 0,05$)

Установлено, что увеличение температуры ($pO_2 = 118$ мм рт.ст.) существенно меняет величину соотношения пиков спектра КР I_{1375}/I_{1127} выделенного Гб (рисунок 30 А), что свидетельствует об изменении конформации за счет колебаний боковых радикалов в гемопорфирине гемоглобина (снижение I_{2880}/I_{2930} на $32,86 \pm 0,45\%$) и, вероятно, зависит от гидродинамического радиуса молекул Гб и расстояния между молекулами Гб. При этом конформация гема выделенного Гб при $pO_2 = 118$ мм

рт.ст. имеет максимальную устойчивость к воздействию в диапазоне 25–36 °С, и полное отсутствие изменения в плотности упаковки глобина (рисунок 31, 34). Отметим, что при $pO_2 = 2$ мм рт.ст., конформация гема групповых колебаний пиррольных колец возрастает в СЭ на $11,08 \pm 0,54\%$, а при $pO_2 = 118$ мм рт.ст. аналогичные изменения обнаружены в выделенном Гб. При этом, с увеличением температуры, в СЭ отмечено разнонаправленное изменение валентных колебаний винильных групп гема (на $26,73 \pm 1,47\%$): для $pO_2 = 118$ мм рт.ст. с увеличением температуры возрастает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации; для $pO_2 = 2$ мм рт.ст., с увеличением температуры, вероятность «куполообразной» конформации гема снижается. Для выделенного Гб при $pO_2 = 118$ мм рт.ст. выявлено снижение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации (рисунок 31).

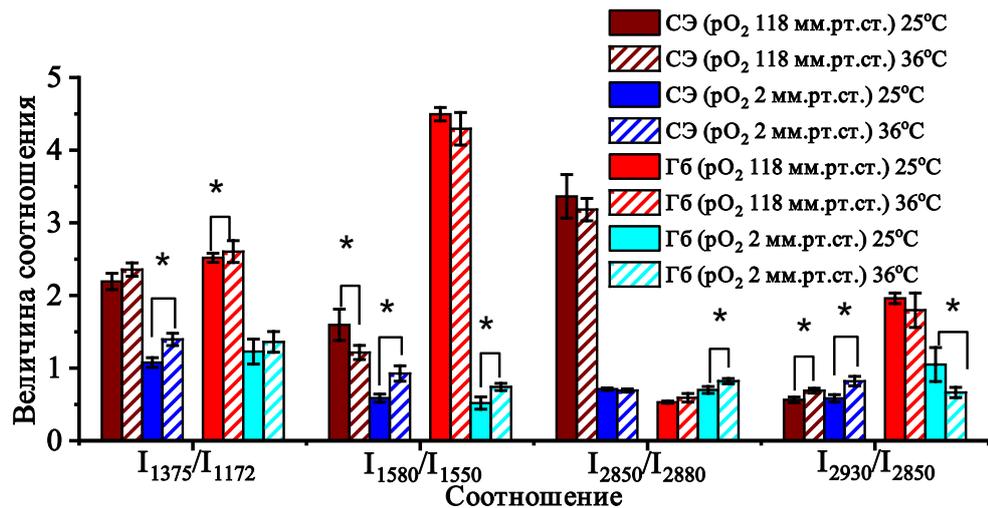


Рисунок 31 — Соотношения интенсивностей пиков КР–спектра при температурах 25 и 36 °С для СЭ и выделенного Гб при $pO_2 = 2$ и 118 мм рт.ст. (* соответствующего для каждой группы цвета отмечены статистически значимые различия относительно 25 °С, $p < 0,05$)

В связи с тем, что нами установлен различный характер изменения плотности упаковки глобина в СЭ и выделенном Гб при различной насыщенности sO_2 : при увеличении температуры до 36 °С, увеличивается для СЭ и снижается для выделенного Гб (на $23,83 \pm 0,75\%$), далее мы исследовали конформацию Гб методами КР–спектроскопии и триптофановой флуоресценции при одинаковой насыщенности $sO_2 = 60\%$. Снижение величины соотношения интенсивностей полос

I_{1580}/I_{1375} КР–спектра свидетельствует о том, что с увеличением температуры (от 20 до 42 °С), возрастает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации. Таким образом, с увеличением температуры, сродство Гб к O_2 снижается и возрастает вероятность выделения O_2 (рисунок 32 А). В спектрах флуоресценции Trp в СЭ с увеличением температуры от 20 до 42 °С наблюдается смещение положения максимума пика флуоресценции Trp в коротковолновую область на 3 нм для СЭ, уменьшение величины полуширины пика флуоресценции на полувысоте (FWHM) на $5,2 \pm 0,7$ нм и увеличение симметричности спектра флуоресценции Trp СЭ (рисунок 33 А, Б). Смещение максимума флуоресценции может быть связано с тем, что при уменьшении взаимодействия Trp с микроокружением в белке уменьшается энергия, которую Trp тратит на тепловую релаксацию перед актом испускания кванта флуоресценции [44, 298]. При этом тушение флуоресценции какой–либо ротамерной формы Trp и связанный с этим многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Trp в белках обычно связывают с дополнительной возможностью дезактивации возбужденного состояния Trp — переносом электрона с возбужденного индольного кольца на амидные группы Trp, либо на электрон–акцепторные боковые связи белка. Изменение τ_{fl} Trp может быть связано с переносом протона с ближайших аминокислот, например с тирозина на индольное кольцо [344, 345]. Для выделенного Гб изменений в спектре флуоресценции не выявлено, но наблюдается тенденция к смещению положения максимума в длинноволновую область на 1,1 нм. В телях эритроцитов, положение максимума и FWHM не изменяется (рисунок 33 А, таблица 7), что указывает на то, что, изменения в спектре и τ_{fl} Trp в СЭ определяются главным образом Гб_{цп} в эритроците, а не флуоресценцией компонентов мембран и белков цитоскелета. Время жизни пикосекундной триптофановой флуоресценции (τ_{fl}) для Trp остатков гемоглобина в СЭ возрастает с увеличением температуры, оставаясь при этом ниже аналогичного значения для выделенного Гб (ниже на 62% при 20 °С, на 27% при 38 °С и на 15% при 42 °С) (рисунок 33 В).

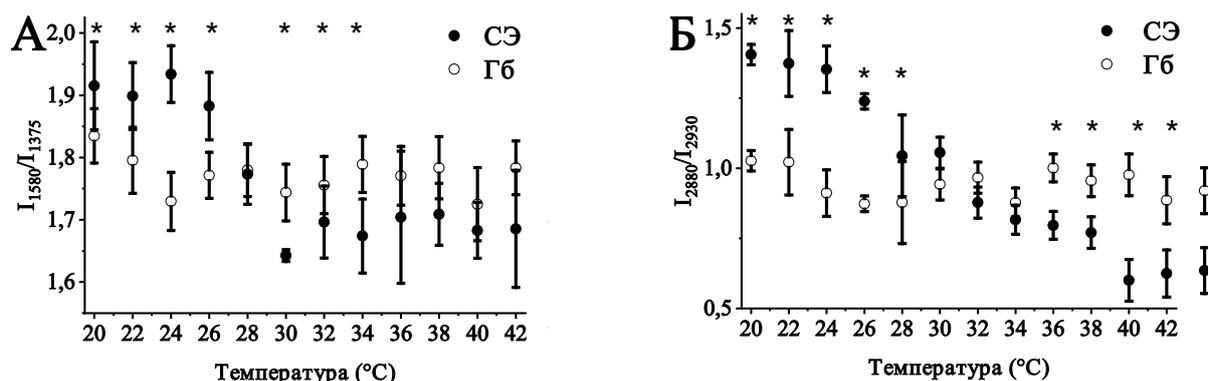


Рисунок 32 — Изменение соотношения интенсивностей пиков КР-спектра гема (А) и глобина (Б) в СЭ и выделенном Гб при увеличении температуры в диапазоне 20–42 °С. С увеличением температуры, для Гб в СЭ характерно увеличение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации (снижение соотношения I_{1580}/I_{1375}) и снижение плотности упаковки глобина (снижение соотношения I_{2880}/I_{2930}). Для выделенного Гб изменений конформации и плотности упаковки в температурном диапазоне 20–42 °С не выявлено (*— статистически значимые различия СЭ относительно выделенного Гб, $p < 0,05$)

Так, нами показано, что для выделенного Гб, отсутствуют статистически значимые изменения в спектрах флуоресценции триптофана, τ_{fl} , и соотношениях КР-спектра (I_{1580}/I_{1375} , I_{2880}/I_{2930}) (рисунок 33 А, таблица 7). При этом, величина τ_{fl} для Гб_{цп} при 20–42 °С меньше τ_{fl} Trp выделенного Гб при аналогичной температуре, что указывает на возможность тушения флуоресценции триптофана вследствие более «тесных» взаимодействий Trp с микроокружением в молекулах Гб эритроцитов по сравнению с выделенным гемоглобином (рисунок 33 В) [344]. Наши предположения об уменьшении взаимодействия Trp с микроокружением Гб в эритроците по сравнению с выделенным Гб согласуется с тем, что для Гб_{цп} в СЭ снижается величина соотношения I_{2880}/I_{2930} (снижение плотности упаковки глобина). Важно отметить, что с увеличением температуры, соотношение I_{2880}/I_{2930} и τ_{fl} в СЭ приближается к значению величин для выделенного Гб (рисунок 32, 33 Б). В то время, как для медленной (Trp в положении $\alpha 214$, $\beta 215$, $\beta 217$ — удалены от гема в глобине) и быстрой (Trp в положении $\alpha 14$, $\beta 15$, $\beta 37$ — расположены рядом с локализацией гема в глобине) компоненты τ_{fl} , изменения с увеличением температуры имеют одинаковый характер изменения, что указывает на одинаковую плотность упаковки белковой глобулы с увеличением температуры в

области локализации гема в глобине, так и на поверхности белковой глобулы (рисунок 33 Г) [298, 299].

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что с увеличением температуры в эритроците происходит перераспределение молекул Гб, снижение их взаимодействия друг с другом и, как результат, снижается плотность упаковки белковой глобулы Гб.

Таблица 7 — Параметры спектра флуоресценции триптофана: λ_{\max} — положение максимума пика, FWHM — полуширина пика на полувисоте, $\tau_{\text{п}}$ — время жизни триптофановой флуоресценции. Полужирным выделены значения, имеющие статистически значимые отличия от величины параметра при 20 °С ($p < 0,05$)

T, °C	Суспензия эритроцитов			Выделенный гемоглобин			Тени эритроцитов	
	λ_{\max} , нм	FWHM, нм	$\tau_{\text{п}}$, пс	λ_{\max} , нм	FWHM, нм	$\tau_{\text{п}}$, пс	λ_{\max} , нм	FWHM, нм
20	337,3 ± 1,6	49,97 ± 0,8	132,4 ± 9,9	339,8 ± 0,4	50,2 ± 0,8	290,9 ± 2,2	340,9 ± 1,4	49,3 ± 0,8
25	335,9 ± 1,4	48,19 ± 0,7	135,8 ± 5,9	339,7 ± 1,9	50,2 ± 0,9	290,3 ± 2,2	340,9 ± 1,4	51,0 ± 1,1
30	335,5 ± 1,4	46,06 ± 0,8	147,2 ± 4,8	338,2 ± 1,5	49,1 ± 1,3	289,3 ± 3,8	341,4 ± 1,5	49,5 ± 0,7
36	336,1 ± 1,6	45,62 ± 0,9	211,5 ± 9,9	340,1 ± 2,7	51,08 ± 1,3	292,7 ± 2,9	340,5 ± 1,4	49,3 ± 0,9
40	335,1 ± 1,6	45,63 ± 0,4	243,5 ± 2,6	340,3 ± 1,6	50,6 ± 0,9	288,1 ± 2,8	340,8 ± 1,6	49,6 ± 1,1
42	334,3 ± 1,4	44,43 ± 0,7	257,7 ± 7,4	341,0 ± 1,4	51,9 ± 0,6	291,5 ± 4,3	340,5 ± 1,7	50,0 ± 0,8

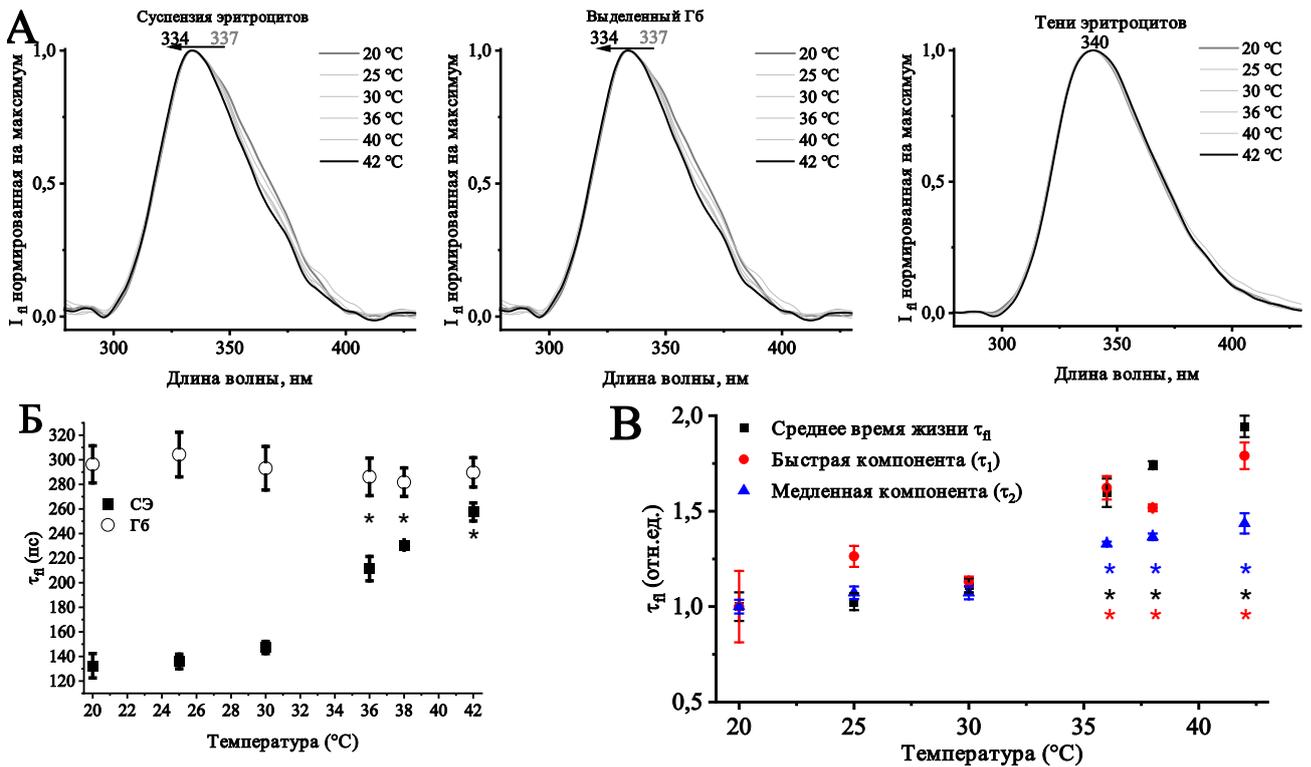


Рисунок 33 — А — Спектр флуоресценции триптофановых остатков в СЭ, выделенном Гб и тенях эритроцитов при $\lambda_{\text{возб}} = 261$ нм и $\lambda_{\text{л}} = 340$ нм, время регистрации сигнала — 100 мс, количество накоплений сигнала — 100, количество повторов — 5. Время адаптации образца к температуре составило 5 мин. Б — Среднее время жизни пикосекундной триптофановой флуоресценции для СЭ и выделенного Гб, В — зависимость изменения быстрой ($\alpha 14$, $\beta 15$, $\beta 37$ — расположены рядом с локализацией гема в глобине) и медленной (Trp $\alpha 214$, $\beta 215$, $\beta 217$ — удалены от гема в глобине) компонент триптофановой флуоресценции СЭ, нормированное на величину соответствующего параметра при 20 °C (* — $p < 0,05$ относительно 20 °C). Пояснения в тексте

В следующей серии экспериментов нами были выявлены различия в динамике изменения конформации гема и глобина в Гб СЭ и выделенного Гб, при увеличении температуры (рисунок 34). Отмечено, что наиболее чувствительным к изменению температуры (и, вероятно, поверхностного заряда мембраны клетки) является дГб ($pO_2 = 2$ мм рт.ст.).

Нами установлено, что существуют определенная последовательности изменений конформации глобина (КР спектрах) (рисунок 34 В, Г) — в глобине изменения наблюдаются раньше, чем для гема (рисунок 34 А, Б). Для глобина характерно снижение плотности упаковки белка с 26 °C, а далее, при 28 °C

выявлены изменения конформации гема (колебаниями винильных групп для $pO_2 = 2$ мм рт.ст., для СЭ при $pO_2 = 118$ мм рт.ст. — после 32°C) (рисунок 34 Б, В). Вероятно, что выявленные различия могут быть связаны с кооперативным взаимодействием 4 субъединиц гема с полипептидной цепью, а так же, к конформационным изменениям БПЗ, что снижает сродство дГб_{мс} с CDB3 [320, 341]). Следующим этапом (32°C), является снижение плотности упаковки глобина (I_{2850}/I_{2880}) и колебаний связей полуколец пирролов, которые характеризуют увеличение подвижности гема — его способности связываться с лигандами (I_{1375}/I_{1172} , рисунок 34 А, Г).

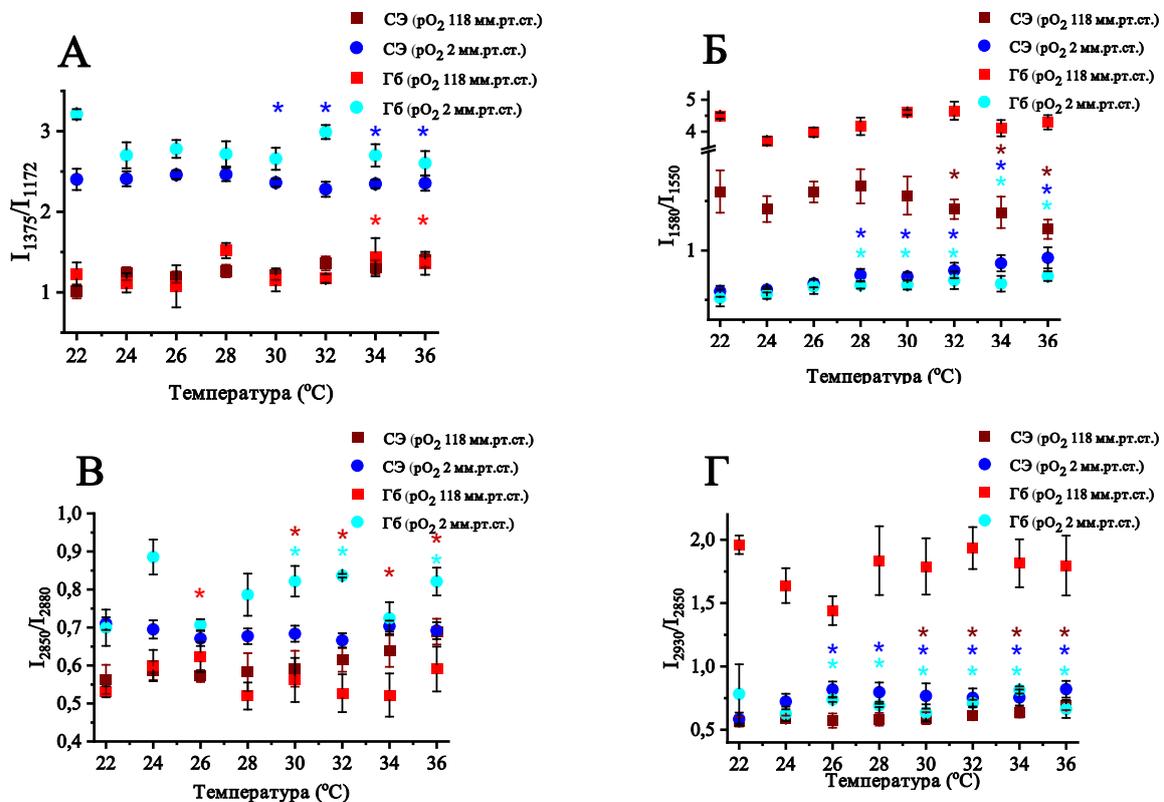


Рисунок 34 — Зависимость изменения соотношения интенсивностей пиков КР-спектра от температуры (22–36 °C) для СЭ и выделенного Гб при pO_2 118 и 2 мм рт.ст. (* соответствующего для каждой группы цвета отмечены статистически значимые различия относительно 22°C , $p < 0,05$)

Таким образом, с помощью метода КР нами установлено, что при изменении температуры в диапазоне $20\text{--}36^\circ\text{C}$ вклад симметричных колебаний молекулярных связей $-\text{C-H}$ метиленовых групп аминокислот глобина и пиррольных колец гема выделенного и внутриклеточного Гб характеризуется различной динамикой.

Отметим, что выявленные нами изменения конформации Гб не коррелируют с удельной растворимостью O_2 в растворе при изменении температуры [346]. Ввиду того, что дальнейшее увеличение температуры может приводить к разрушению цитоскелета и изменению конформации Гб, связанной с олигомеризацией молекул Гб, которая также зависит от температуры инкубации эритроцитов, мы не анализируем дальнейший диапазон температур

Таким образом, при изменении температуры, выявлено существование существенных различий в изменении конформации гема и глобина в СЭ и выделенном Гб: при изменении конформации Гб вклад пиррольных колец и винильных групп снижается в Гб СЭ, а в глобине СЭ, существенно увеличивается плотность упаковки белка. При этом, можно отметить кооперативный эффект изменения конформации глобина и гема. Таким образом, изменения конформации гема и глобина Гб зависят не только от величины pO_2 , но и от белкового микроокружения (гидрофобного взаимодействия между молекулами) (таблица 8).

Таблица 8 — Изменение конформации гема и глобина в физиологическом диапазоне температур 22–36 °С при различном парциальном давлении O_2

Температура	$pO_2 = 118$ мм рт.ст.		$pO_2 = 2$ мм рт.ст.	
	СЭ	Выделенный Гб	СЭ	Выделенный Гб
I_{1375}/I_{1127} (вклад колебаний пиррольных групп)	Без изменений	Увеличение подвижности гема	Снижение подвижности гема	Без изменений
I_{1580}/I_{1550} (вклад валентных колебаний винильных групп)	Без изменений	Увеличение вероятности нахождения гема в «плоской» конформации	Увеличение вероятности нахождения гема в «плоской» форме	Без изменений
I_{2850}/I_{2880} (Вклад валентных колебаний СН–радикалов аминокислот)	Снижение плотности упаковки глобина	Без изменений	Без изменений	Без изменений
I_{2930}/I_{2850}	Снижение полярности окружения (плотности упаковки боковых радикалов)	Без изменений	Увеличение полярности окружения (плотности упаковки боковых Н)	Без изменений

В нашей работе мы показали, что «экзотермический тепловой эффект» связывания кислорода происходит благодаря изменению конформации гема и снижению плотности упаковки глобина с ростом температуры. Суммируя, мы предполагаем, что с увеличением температуры в цитоплазме эритроцита происходит снижение взаимодействия Гб с соседними молекулами Гб и формирование более гомогенной среды в цитоплазме эритроцита, что подтверждается изменением спектра флуоресценции Тгр (по параметру FWHM), снижением тушения флуоресценции Тгр и снижением плотности упаковки глобина. Вероятно, при более низких температурах между молекулами Гб в клетке присутствует более «тесное» взаимодействие, чем при более высоких температурах [94, 347]. Это приводит к образованию олигомерных структур и, возможно, к появлению «неоднородностей» в распределении Гб в эритроците, что приводит к увеличению компактности глобина, увеличению вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации и снижению времени жизни флуоресценции триптофана в результате более плотной упаковки глобина и более тесного взаимодействия между Тгр и микроокружением (рисунок 35). Вероятно, «экзотермический тепловой эффект» связывания кислорода, который характеризует снижение сродства Гб к O_2 с ростом температуры, обусловлен обнаруженными нами конформационными изменениями гема и глобина [59, 132, 133].

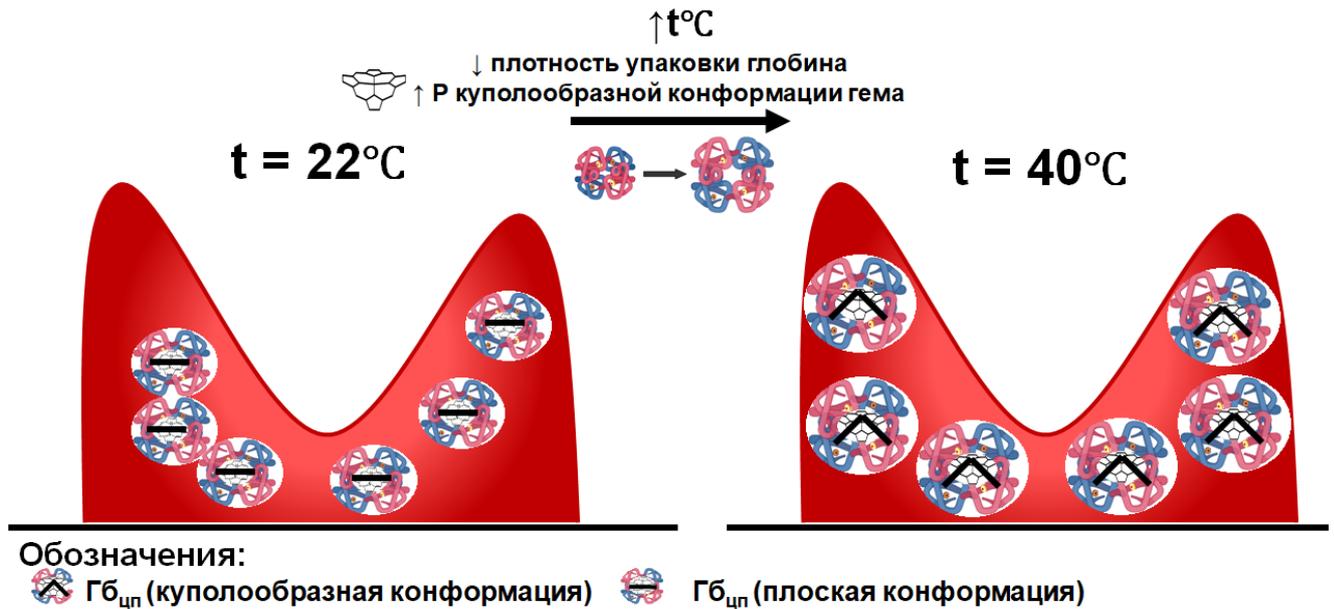


Рисунок 35 — Схема изменения распределения Гб_{цп} при изменении температуры с 20 до 42 °С: увеличивается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, снижается плотность упаковки глобина и вероятность образования олигомерных структур — то есть, увеличивается гомогенность распределения Гб_{цп} в клетке

3.2.2. Исследование влияния циклических изменений температуры на конформацию Гб в эритроците

Мы предполагаем, что в цитоплазме, Гб расположен упорядоченно, и этот параметр циклически меняется при изменении температуры. В данной серии экспериментов, мы исследовали влияние циклических изменений температур (20–42 °С) на конформацию глобина в СЭ.

Вязкость цитоплазмы, в основном, обусловлена двумя факторами: концентрацией гемоглобина и содержанием воды для поддержания ионного гомеостаза клетки. Рельеф мембраны обусловлен локализованными белками, фазовым состоянием липидов и расположением примембранных белков цитоскелета (спектрина, анкирин, БПЗ и актин) [348]. Известно, что Гб_{мс} и примембранный слой Гб оказывают значительное стабилизирующее воздействие

на морфологию эритроцитов и участвуют в компенсации заряда мембраны за счет явления молекулярного краудинга. В настоящее время мало данных о роли примембранного слоя Гб не только в поддержании структуры клетки, но и в обеспечении связывания и перераспределения кислорода в клетке с помощью перераспределения Гб_{мс} и Гб_{цп}. Для проверки этого утверждения, мы проводили циклическое изменение температуры в диапазоне 20–42 °С. При этом, сначала образец нагревался до температуры 42 °С, после чего охлаждался до 20 °С. При достижении температуры 20 °С, вновь проводили цикл нагревания и остывания образца (рисунок 36).

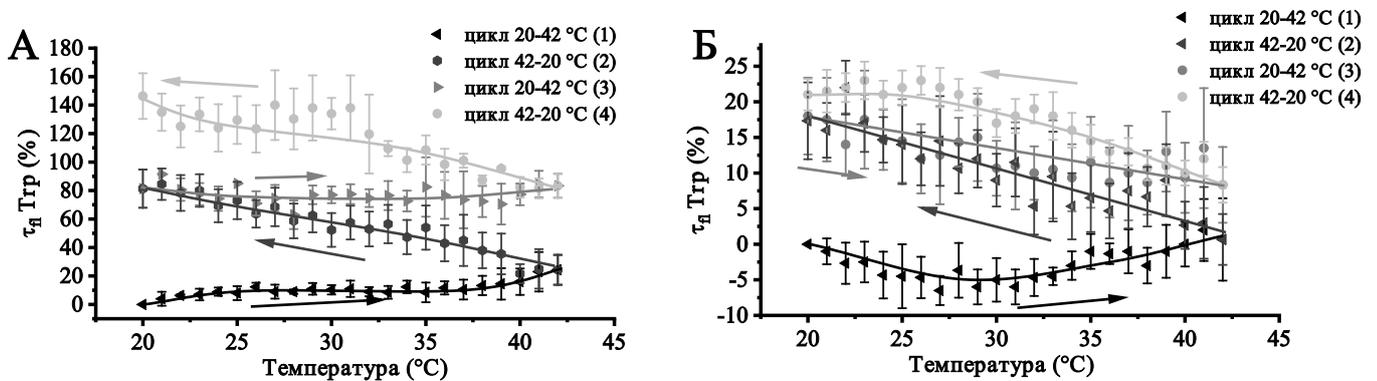


Рисунок 36 — Изменения времени жизни триптофановой флуоресценции (величина амплитуды — время жизни флуоресценции относительно 20 °С первого цикла) при изменении температуры: А — СЭ, Б — выделенный Гб. Регистрацию сигнала осуществляли при достижении в ячейке заданной температуры. Время на адаптацию образца к температуре составило 10 секунд.

Установлено, что для СЭ, после первого цикла 20–42–20 °С при дальнейшем нагревании образца отсутствует достоверное изменение конформации глобина (времени жизни триптофановой флуоресценции). В то время как для выделенного Гб при циклическом изменении температуры 20–42–20 °С наблюдается увеличение времени жизни триптофановой флуоресценции: на 25% при нагреве до 42 °С и на 63% при охлаждении до 20 °С. При повторном нагревании (3–4) увеличение времени жизни триптофановой флуоресценции составило 23%, а при охлаждении время жизни дополнительно увеличилось на 58%. Вероятно, процессы, вызванные фазовым переходом липидов в мембранах эритроцитов [72] и увеличение

ζ -потенциала мембраны на $2,8 \pm 0,5$ мВ оказали существенное влияние на эффективность связывания Гб_{цп} с компонентами мембраны и Гб_{мс} и с БПЗ.

Таким образом, нами показано что в эритроците существуют механизмы, направленные на периодические изменения конформации глобина. Вероятно, эти процессы связаны с тем, что в клетке существует перераспределение Гб_{цп} при изменении ζ -потенциала. Доказано, что Гб расположен в цитоплазме упорядоченно, и этот параметр циклически меняется при изменении температуры.

3.3. Поверхностный заряд плазматической мембраны как фактор регуляции конформации Гб

Известно, что Гб_{мс} главным образом связан с БПЗ, который имеет NH₂-терминальный участок с гибким анионным сегментом и может входить в катионную центральную полость дГб [320, 341]. В данной серии экспериментов исследовали роль изменений поверхностного заряда плазматической мембраны эритроцита путем снижения концентрации экстраклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_{out}$). Известно, что данный механизм участвует в регуляции ряда процессов [349]:

1. Величина поверхностного заряда и мембранного потенциала клетки;
2. Упорядоченность фосфолипидов липидного бислоя мембраны;
3. Конформация белков плазматической мембраны клетки.

Внутриклеточный Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{in}$) регулирует метаболизм, активность ионтранспортных систем (Са-АТФаза, Са-зависимый K^+ каналы и т.д.). Отметим, что для человека, $[Ca^{2+}]_{out}$ в норме составляет 1,0–1,5 мМ, а $[Ca^{2+}]_{in}$ в норме составляет 1 мкМ [137, 350], поэтому, в качестве контроля, для образца СЭ использовали пробу с $[Ca^{2+}]_{out}$ 1 мМ, а для выделенного Гб — 1 мкМ $[Ca^{2+}]$.

Мы предполагаем, что при связывании молекулы кислорода, изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб увеличивают плотность отрицательного заряда в центральной полости дГб,

способствуя смещению анионного сегмента в БПЗ. Таким образом, модификация отрицательного заряда плазматической мембраны эритроцита приведет к изменению заряда на поверхности БПЗ, что в свою очередь повлияет на модификацию БПЗ и связанного с ним дГб_{мс} [337, 341].

3.3.1. Исследование влияния $[Ca^{2+}]_{out}$ на морфологию эритроцита

В данной серии экспериментов, с помощи метода ЛИМ были выявлены изменения морфологии и фазовый профиль эритроцитов. Установлено, что при снижении величины $[Ca^{2+}]_{out}$ изменения морфологии эритроцита, их площади и объема (дискоцитарная форма) постоянно, но наблюдаются изменения ОРХ (рисунок 37, таблица 9 [351]), например соотношение ОРХ_{центр}/ОРХ_{край}, свидетельствующее о перераспределении молекул Гб в центральной и периферической части клетки. Так же, было установлено, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ наблюдается тенденция к уменьшению величины ОРХ в клетке, что может быть также следствием процесса перераспределения Гб_{цп} из примембранной области в цитоплазму клетки. Возможно, этот процесс важен для компенсации изменения поверхностного заряда мембраны. Отметим, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ происходит увеличение величины ζ -потенциала с $-15,4 \pm 0,2$ мВ (контроль, 1 мМ) до $-14,5 \pm 0,3$ мВ при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ.

Отметим, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ количество эритроцитов в форме стоматоцитов возрастает на 5–7%, что свидетельствует о незначительной роли изменения морфологии клетки при изменении ее поверхностного заряда. Величина ОРХ_{ср}, площадь и объем не меняются у эритроцитов, которые инкубировали при $[Ca^{2+}]_{out}$ 1 мкМ–0,1 мМ, и наблюдается снижение величины ОРХ_{ср} и объема клеток на 4% относительно 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$. Вероятно, клетка сама регулирует компенсацию ζ -потенциала мембраны при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$, что позволяет сохранить форму (таблица 9).

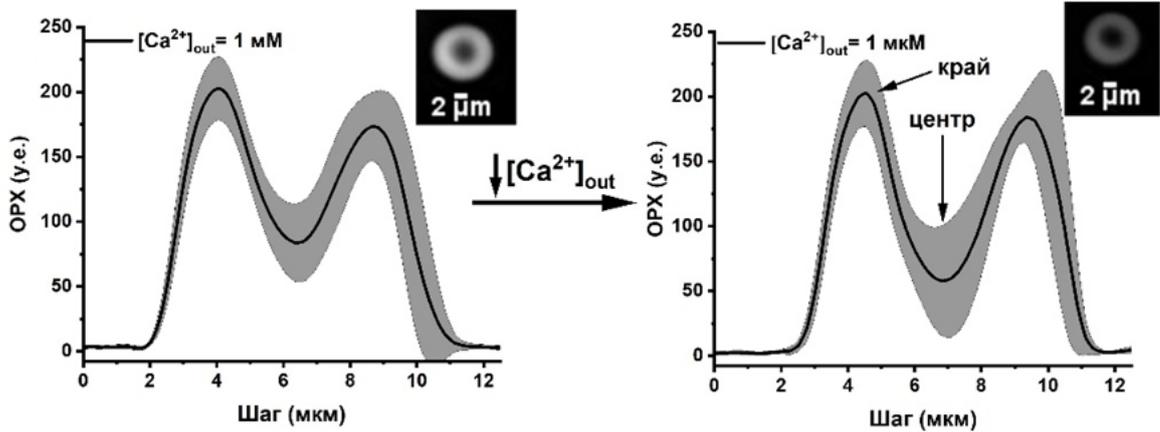


Рисунок 37 — Зависимость величины ОРХ от локализации Гб в клетке при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ с 1 мМ до 1 мкМ. Данные усреднены по 40 клеткам

Таблица 9 — Морфология и ОРХ цитоплазмы эритроцита при инкубации в течении 60 минут с различным $[Ca^{2+}]_{out}$ (* обозначены статистически значимые различия от контроля ($p < 0,05$))

$[Ca^{2+}]$, М	Scp, мкМ ²	ОРХср, нм	Vcp, мкМ ³	ОРХцентр/ ОРХкрай	ζ-потенциал, мВ	Потенциал Нернста, мВ
10^{-6}	$45,50 \pm 0,46$	$131,56 \pm 0,65$	$108,80 \pm 1,60$	$0,18 \pm 0,03$ *	$-14,32 \pm 0,38$ *	-29
10^{-5}	$44,52 \pm 0,96$	$134,44 \pm 0,57$	$108,61 \pm 1,31$	$0,25 \pm 0,06$ *	$-14,12 \pm 0,29$ *	-60
10^{-4}	$44,62 \pm 0,47$	$131,86 \pm 1,39$	$109,15 \pm 1,18$	$0,35 \pm 0,04$	$-14,19 \pm 0,18$ *	-80
5×10^{-4}	$44,52 \pm 0,38$	$132,24 \pm 2,74$	$110,78 \pm 1,47$	$0,36 \pm 0,04$	$-14,37 \pm 0,39$ *	-110
10^{-3}	$44,86 \pm 0,60$	$138,06 \pm 0,80$	$112,55 \pm 1,99$	$0,39 \pm 0,05$	$-15,23 \pm 0,36$	-120

Примечание: величина потенциала Нернста (мембранного потенциала) рассчитана как

$E = \frac{0,059}{Z} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}}$, где Z — валентность иона, c_{in} и c_{out} — концентрации положительно заряженных ионов Ca^{2+} внутри (10^{-7} М) и снаружи клетки при температуре 298 К) при изменении $[Ca^{2+}]_{out}$.

Из величин мембранного потенциала, рассчитанному по уравнению Нернста следует, что со снижением концентрации экстраклеточного Ca^{2+} происходит снижение электрохимического градиента, который может влиять на активность работы Ca^{2+} -насоса, работа которого зависит от уровня его фосфорилирования. При исследовании изменения поверхностного потенциала (ζ-потенциал) эритроцита при снижении, концентрации Ca^{2+} в среде с 1 мМ до 10 мкМ ζ-потенциал увеличивается с $-15,4 \pm 0,2$ до $-14,5 \pm 0,3$ мВ (таблица 9). Известно, что

увеличение ζ -потенциала клетки свидетельствует о формировании более «жестких» эритроцитов (т.е. эритроцитов, для которых характерно снижение индекса деформируемости, повышению способности к агрегации [352]), а стареющие эритроциты имеют на 30% больший ζ -потенциал мембраны относительно молодых эритроцитов — то есть, имеют ослабленный электростатический барьер, необходимый для захвата клеток макрофагами [331]. Таким образом, снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ приводит к увеличению поверхностного потенциала мембраны эритроцита, что может вызывать процессы в эритроците, характерные для старения клетки.

Для оценки изменения содержания Гб_{цит} и его возможной олигомеризации в цитоплазме, использовали электрофорез белков в полиакриламидном геле, который так же не выявил изменений содержания белка, либо изменения комплексов Гб по весу (рисунок 38).

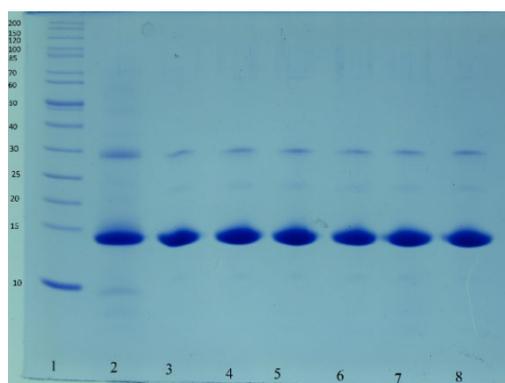


Рисунок 38 — Электрофорез белков в ПААГ, слева обозначен молекулярный вес маркера. 1 — маркер молекулярного веса, 2 — Гб (Sigma), 3 — 6 — СЭ с $[Ca^{2+}]_{out}$ 1 мМ — 1 мкМ, 7 — выделенный Гб, при $[Ca^{2+}] = 1$ мМ, 8 — выделенный Гб при $[Ca^{2+}] = 1$ мкМ

Таким образом, нами установлено, что при изменении экстраклеточного поверхностного заряда мембраны за счет снижения концентрации Ca^{2+} в экстраклеточной среде, происходит перераспределение молекул Гб в структуре цитоплазмы эритроцита. Мы предполагаем, что в ответ на увеличение ζ -потенциала мембраны, молекулы Гб_{цит} перераспределяются в центральную тороидальную часть клетки (рисунок 37). Известно, что тесный контакт Гб с мембраной приводит к образованию внутриклеточного слоя из молекул дГб,

которые компенсируют изменение поверхностного заряда мембраны эритроцита, что приводит к увеличению проницаемости для K^+ , снижению деформируемости клетки [331].

3.3.2. Исследование влияния $[Ca^{2+}]_{out}$ на конформацию гема и глобина Гб

В данной серии экспериментов исследовали изменения конформации Гб СЭ при вариации поверхностного потенциала клетки. В спектрах КР СЭ (рисунок 39) были выявлены характерные изменения в «области отпечатков пальцев» для колебаний пирролов и валентных колебаний винильных колец. Так же, при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ обнаружено снижение вклада валентных колебаний аминокислот в высокочастотной области спектра ($2800–3000\text{ см}^{-1}$) на 7%. В связи с тем, что изменения в спектрах КР СЭ были менее выражены, чем для выделенного Гб, выделенного в раствор, предположено, что выявленное снижения интенсивностей полос при 1355 и 1550 см^{-1} и изменения в глобиновой части прежде всего обусловлены изменением ζ -потенциала эритроцита (на 6%), но в большей степени с увеличением мембранного потенциала (на 25%), а не изменением работы Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы [16, 131, 138–141].

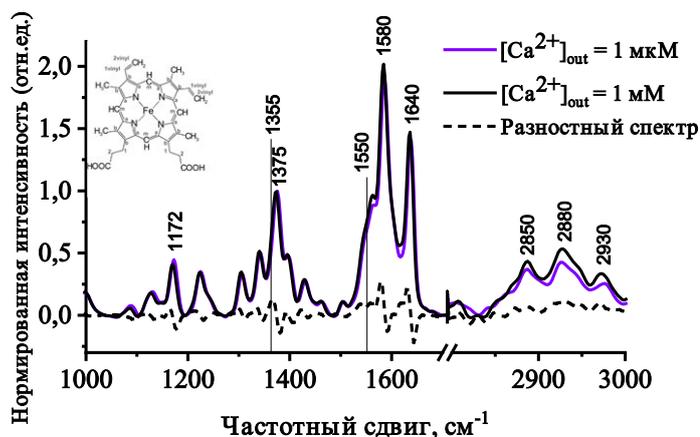


Рисунок 39 — Спектры КР СЭ при $[Ca^{2+}]_{out} = 1\text{ мкМ}$ (оранжевая кривая) и 1 мМ (синяя кривая, контроль). Спектры нормированы на интенсивность пика 1220 см^{-1} , что позволяет

исключить вклад от концентрации Гб и доли оГб и дГб в пробе (в соответствии с [308]).

Пунктирной линией обозначен разностный спектр

Из анализа КР–спектра следует, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ с 1 мМ до 1 мкМ наблюдается изменение конформации гема Гб СЭ (снижение симметричных колебаний боковых СН–групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1172}), увеличение валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}) и сродства к лигандам (I_{1375}/I_{1580}), а также колебания боковых радикалов становятся затруднены (I_{1170}/I_{1127}) (рисунок 40). Полученные данные свидетельствуют о том, что вероятность нахождения гема в «плоской» конформации (I_{1640}/I_{1127}) не зависит от поверхностного заряда мембраны ($[Ca^{2+}]_{out}$). Вероятно, конформация глобина более чувствительна к изменениям поверхностного заряда мембраны, вызванным снижением $[Ca^{2+}]_{out}$: обнаружено снижение величины соотношения I_{2850}/I_{2880} , которое характеризует увеличение плотности упаковки глобина при снижении полярности окружения (колебания водородных связей на внешнем слое глобина) (I_{2930}/I_{2850}) и снижение упорядоченности СН–групп аминокислот глобина, что может быть вызвано изменением поверхностного заряда мембраны и присоединением молекул Гб к БПЗ (I_{2880}/I_{2930}) [40].

При этом, чувствительность к изменению $[Ca^{2+}]_{out}$ различна: изменения конформации глобиновой части гемоглобина в эритроците выявлены при $[Ca^{2+}]_{out}$ ниже 10^{-4} М, а изменения конформации гема — при $[Ca^{2+}]_{out}$ 10^{-5} М. Установлено, что величина ζ –потенциала незначительно уменьшалась (на 6%), что свидетельствует о снижении индекса деформируемости эритроцита, вызванные десорбцией кальция с поверхности. Изменение индекса деформируемости мембраны может быть связано с прикреплением Гб с внутренней части мембраны, что в свою очередь приводит к значительным конформационными перестройкам глобина вызванным связыванием дГб с БПЗ за счет электростатических взаимодействий [13, 15, 31, 235, 331]. Важно, что в условиях наших экспериментах, в спектрах КР отсутствует вклад белковых и липидных компонентов мембраны

эритроцита, что позволяет характеризовать изменения спектра как изменения валентных колебаний аминокислот глобина [27, 43]

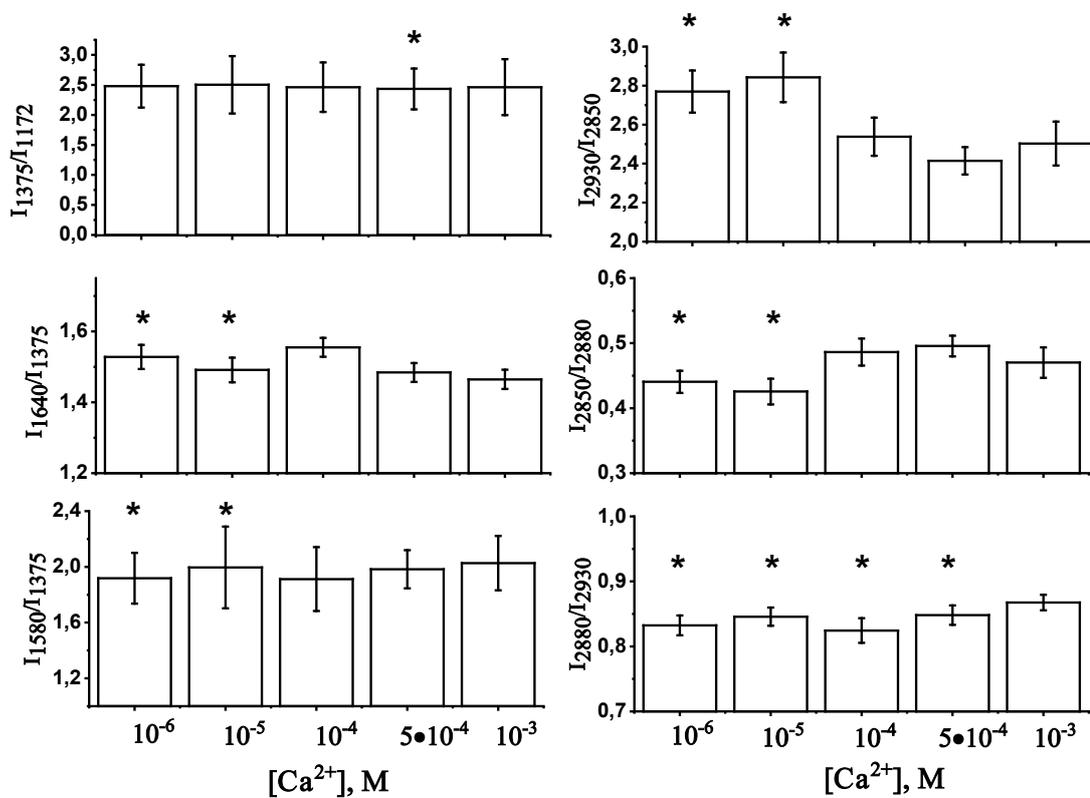


Рисунок 40 — Изменение соотношений интенсивностей пиков КР–спектра для гема (слева) и глобина (справа) при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$. Данные представлены как среднее \pm SE (* — обозначены статистически значимые различия относительно образцов с 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$)

Таким образом, вероятно, изменения плотности упаковки глобина Гб с СЭ зависят от ζ -потенциала мембраны эритроцита. При увеличении *in vitro* концентрации Ca^{2+} более 10^{-7} М/л [137, 350], диаметр Гб уменьшается от $7,92 \pm 0,18$ нм до $7,21 \pm 0,26$ нм (при 1 мМ) (рисунок 41 А), а величина ζ -потенциала превышает $|\pm 30|$ мВ (при 1 мкМ/л Ca^{2+}), что, свидетельствует об агрегации молекул или образовании комплексов молекул Гб (олигомеризация) [234]. Известно, что при увеличении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и их связывании с внутриклеточными компонентами или мембраной, уменьшается заряд мембраны, что приводит к увеличению количества свободных ОН–групп тирозина, который входит в состав ряда интегральных белков мембраны, таких как БПЗ [88, 353]. Возможно, именно изменение поверхностного заряда молекул дГб приводит к

возможности их взаимодействия с БПЗ мембраны эритроцита. Скорость активного транспорта ионов Ca^{2+} в эритроците не зависит от концентрации ионов Ca^{2+} в плазме, на нее влияют одновалентные ионы [149].

В спектрах КР выделенного Гб увеличение $[\text{Ca}^{2+}]$ с 1 мкМ до 1 мМ приводит к снижению симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}), и, при этом, не меняется вероятность нахождения гема в «плоской» конформации (I_{1640}/I_{1127}) и колебания боковых радикалов его белкового окружения (I_{1170}/I_{1127}) (рисунок 41 Б). Отметим, что при увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$ с 10 мкМ до 1 мМ, происходит снижение плотности упаковки глобина (I_{2850}/I_{2880}), а полярность окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}) не меняется.

Нами установлено, что при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ в среде инкубации, Гб_{мс} имеет отличимые характеристики от Гб_{цп} по конформации гема и глобина (рисунок 42) — групповые колебания полуколец пирролов гема более выражены для Гб_{мс} СЭ и мембран эритроцитов (теней эритроцитов, ТЭ) относительно Гб_{цп}, при этом, отсутствуют статистически значимые различия между колебаниями винильных групп (I_{1580}/I_{1550}) для и доли дГб в пробе СЭ. Для глобиновой части молекулы выявлено снижение плотности упаковки для Гб_{мс}, как для СЭ, так и для ТЭ. При этом, важно отметить, что плотность упаковки глобина Гб_{мс} не имеет статистически значимых различий между пробами СЭ и ТЭ, но выявлена для конформации гема (увеличение вероятности гема в «куполообразной» конформации для ТЭ).

Нами доказано, что изменение поверхностного потенциала клетки при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ коррелируют как с конформацию гема, так и глобина Гб_{мс} — групповые колебания полуколец пирролов гема более выражены, а валентные колебания винильных групп менее выражены. Вероятно, это свидетельствует об увеличении вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации гема. В то же время, нами выявлено увеличение доли дГб в пробе ТЭ, что

свидетельствует об увеличении доли Гб_{мс}. Для глобина характерно увеличение плотности упаковки как в пробе СЭ, так и ТЭ.

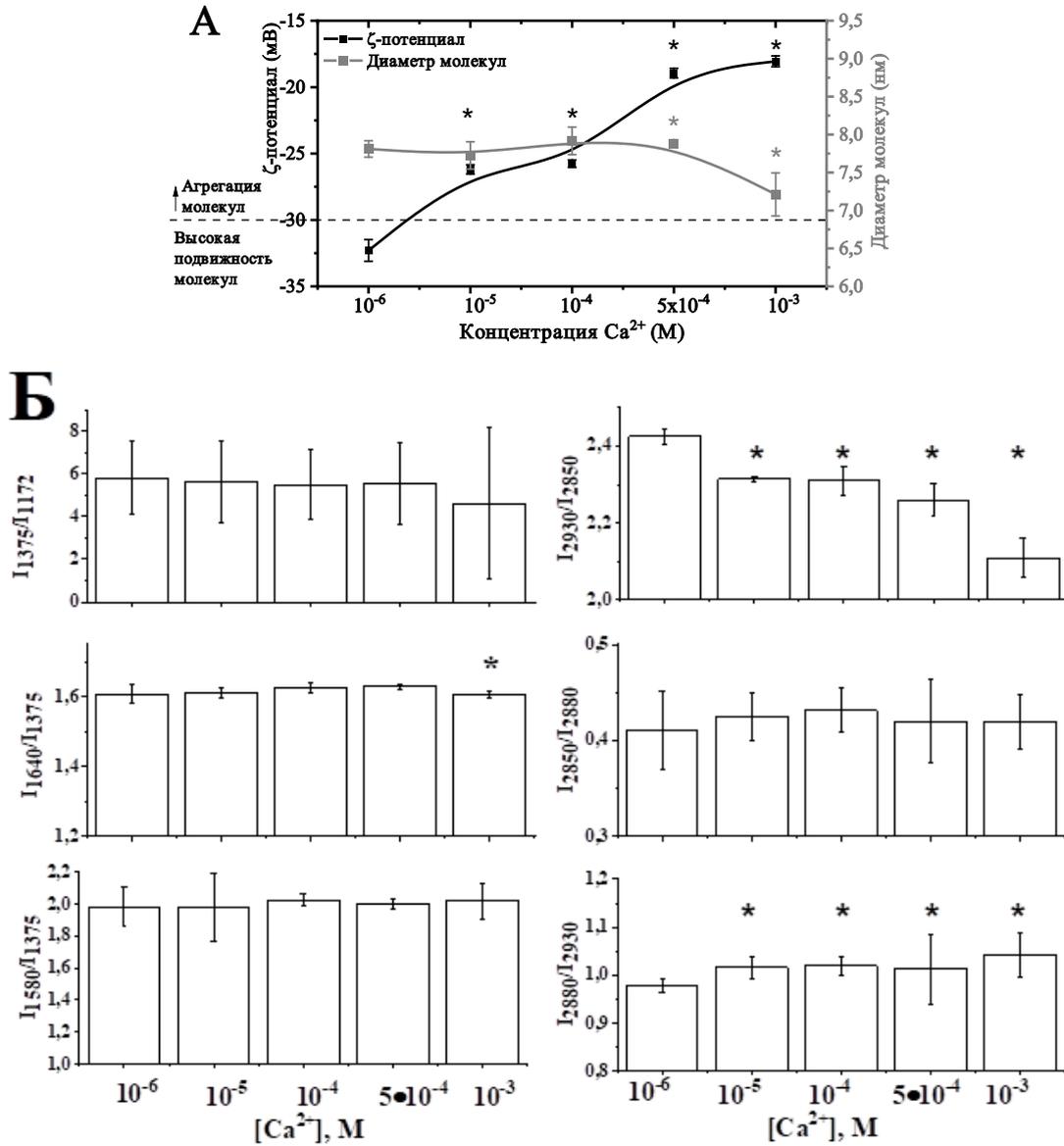


Рисунок 41 — А — изменение величины ζ-потенциала и диаметра выделенного Гб, при увеличении [Ca²⁺] до 1 мМ, Б — изменение соотношений интенсивностей пиков КР-спектра гема (слева) и глобина (справа) для выделенного Гб. Пунктиром обозначена граница агрегации белковых комплексов [234]. Данные представлены как среднее ± SE (* — обозначены статистически значимые различия относительно образца при [Ca²⁺] до 1 мкМ, p < 0,05)

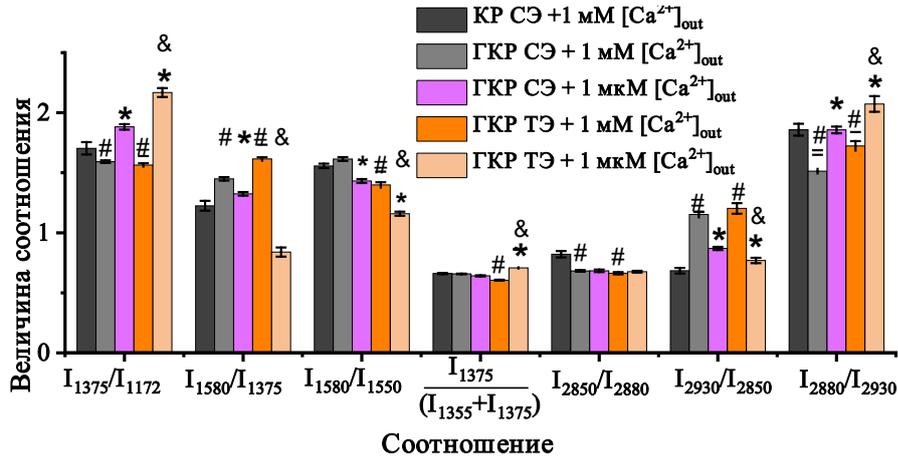


Рисунок 42 — Соотношения интенсивностей пиков ГКР–спектра для СЭ и ТЭ (теней эритроцитов) в среде с различной $[Ca^{2+}]_{out}$; КР СЭ+1 мМ Ca^{2+} обозначены соотношения пиков ГКР–спектра для СЭ в среде 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$. Данные представлены как среднее \pm SE (* — обозначены статистически значимые различия между одним типом образцов для 1 мМ и 1 мкМ $[Ca^{2+}]_{out}$, & — статистические значимые различия между СЭ и ТЭ при одинаковой концентрации $[Ca^{2+}]_{out}$, # — обозначены статистически значимые различия между образцами ГКР Гб_{мс} СЭ и ТЭ при 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$ (серый и оранжевый столбец) относительно КР Гб_{цп} СЭ 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$ (черный столбец), $p < 0,05$)

Таким образом, нами показано, что на конформацию глобина Гб_{мс} изменение поверхностного заряда мембраны оказывает существенное влияние как на гем, так и на глобин. При этом, изменения Гб_{мс} в ТЭ более выражены (величины соотношения I_{1650}/I_{1540} на 30%, что указывает на существенные изменения во вторичной структуре α -спиралей и β -структур, подробнее, см. рисунок 43). Вероятно, снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ в плазме крови (связывание белками и липидами плазмы, при патологии), увеличивает поверхностный заряд и потенциал на мембране эритроцита, что сопровождается изменением конформации гема и глобина, а также олигомеризацией (снижение упорядоченности цитоплазмы и уровня примембранного Гб) комплексов Гб.

Для оценки влияния изменения ζ -потенциала на изменение конформации глобина и жирных кислот мембраны эритроцитов мы использовали метод ИК–спектроскопии (рисунок 43–44) на СЭ и тенях эритроцитов (ТЭ) (рисунок 44). Нами получено, что увеличение $[Ca^{2+}]$ для образцов выделенного Гб характерно снижением вклада Amide I (пик 1650 см^{-1} , обусловлено растяжением C=O связи в –

COO⁻, указывает на изменение в пептидах водородных связей [123]), что указывает на конформационные перестройки молекулы глобина. При этом, в СЭ, снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ не вызывает достоверных изменений во вкладе Amide I.

Методом пикосекундной триптофановой флуоресценции показано увеличение времени жизни триптофановой флуоресценции, что характеризует снижение тушения флуоресценции Trp и плотности упаковки глобина, и указывает на снижение взаимодействия Гб с соседними молекулами Гб и формирование более гомогенной среды в цитоплазме эритроцита (рисунок 43 В).

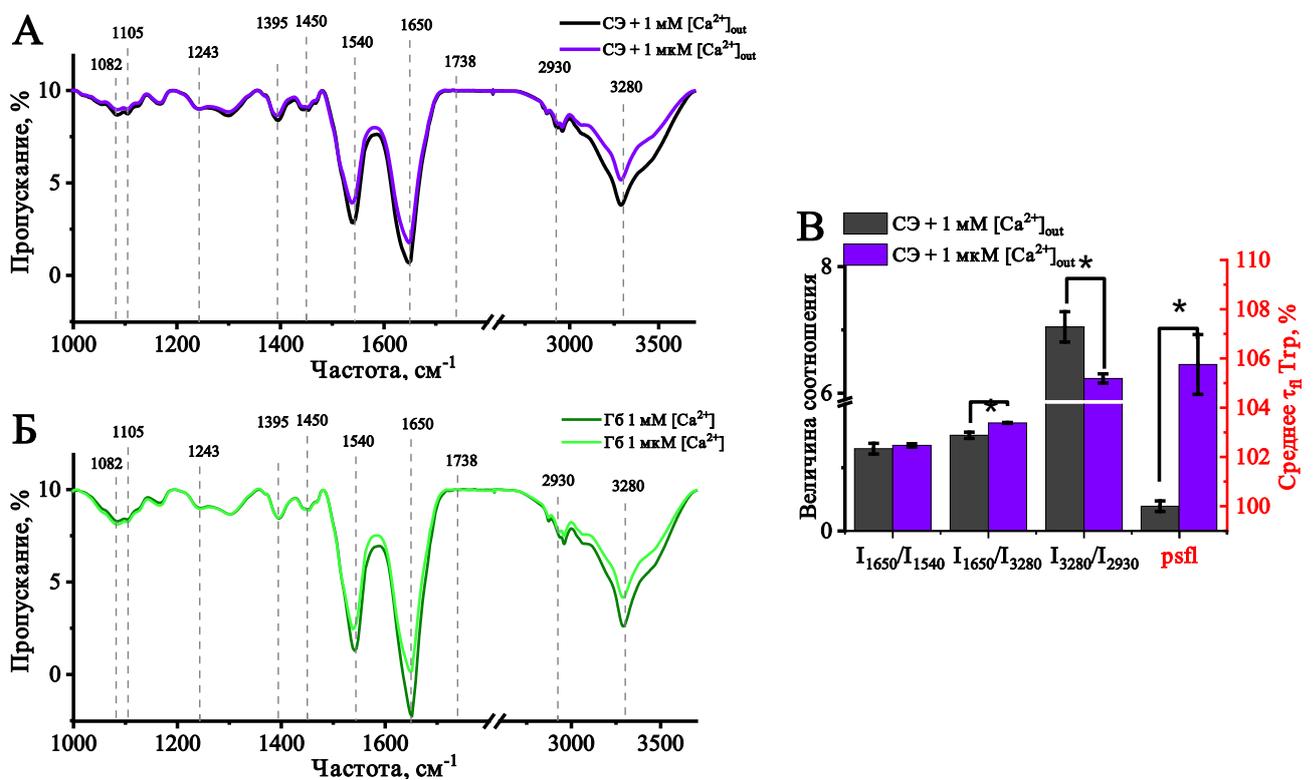


Рисунок 43 — А — ИК-спектры СЭ в среде с различной $[Ca^{2+}]_{out}$, Б — ИК-спектры выделенного Гб в среде с различной $[Ca^{2+}]_{out}$, В — Соотношения интенсивностей пиков ИК-спектра и среднее время жизни триптофанов глобина. Спектры нормированы на интенсивность пика 1243 cm^{-1} . Данные представлены как среднее \pm SE (* $p < 0,05$)

Таким образом, мы можем предположить, что изменения в конформации глобина вызваны изменениями в жирных кислотах мембран — изменение поверхностного потенциала клетки индуцирует снижение индекса деформируемости эритроцита [15, 235] (снижение упорядоченности фосфолипидов липидного бислоя мембраны (соотношение I_{2880}/I_{2930} , рисунок 44)), что в свою

очередь приводит к перераспределению Гб в цитоплазме эритроцита и, вероятно, формирует электростатический контакт Гб с мембраной (взаимодействие дГб с БПЗ, гидрофобные взаимодействия с мембранными липидами, электростатическое связывание с белками цитоскелета) [310, 331], что приводит к образованию слоя из молекул дГб. Этот процесс может компенсировать изменение поверхностного заряда цитоплазматической поверхности мембраны эритроцита (увеличение поверхностного (ζ -) потенциала приводит к снижению упорядоченности липидов бислоя мембраны (!)) [331].

В спектрах ТЭ не выявлено колебаний гема методом КР-спектроскопии, что указывает на отсутствие Гб_{цит} в препарате. Однако, в спектрах ИК выявлены полосы, характерные для гема и глобина, что делает возможным исследование влияния изменения ζ -потенциала на примембранный Гб (рисунок 44). Так, нами установлено, что в спектрах ИК ТЭ происходит смещение максимумов интенсивностей пиков в высокочастотную область спектра, что свидетельствует об увлечении длины растяжения амидных связей белка C=O (таблица 5) и характеризуют изменения во вторичной структуре глобина. Были обнаружены следующие изменения положения максимумов полос: 1450 см⁻¹ до 1463 см⁻¹, 1540 см⁻¹ до 1545 см⁻¹ и 1650 до 1656 см⁻¹, а также, для ТЭ выявлено резкое снижение интенсивности и FWHM (величина полуширины на полувывсоте пика) пиков в области 3100–3700 см⁻¹, которая характеризует изменение колебаний связей вторичного амида и растяжение СН₂ и СН₃-связей групп в ацильных цепях липидов (в меньшей степени в белках клеток). Все это делает нецелесообразным сравнение соотношению интенсивностей пиков ИК-спектра с 3200 см⁻¹ между СЭ и ТЭ.

Нами установлено, что снижение $[Ca^{2+}]_{out}$ оказывает существенное влияние на изменение вклада AmideI/AmideII (растяжение COOH к деформационным колебаниям N–H групп [123]), которое отсутствовало в СЭ. Изменения AmideI/AmideII связано с изменениями белков мембран и глобина. Важно отметить, что для СЭ выявлены (I_{2930}/I_{1240}) различия по вкладу жирных кислот, которые не выявлены у ТЭ.

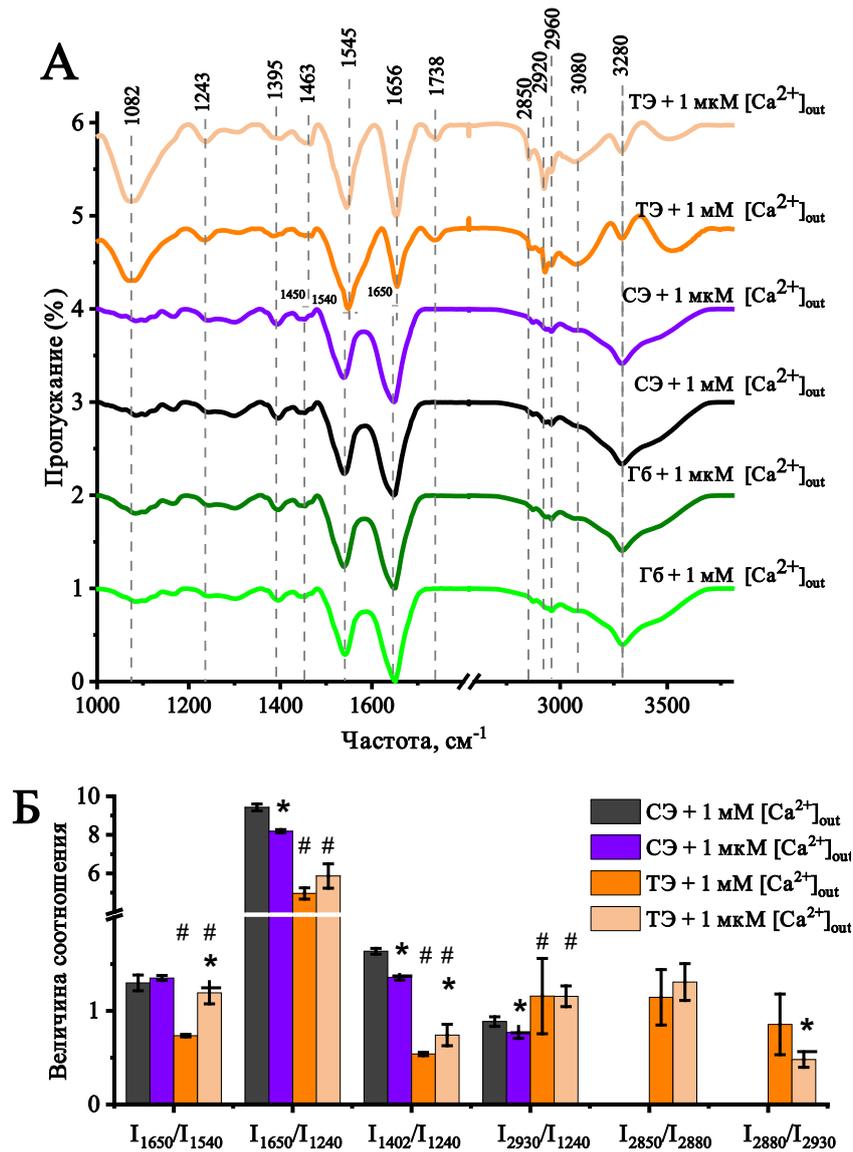


Рисунок 44 — А — ИК–спектры СЭ и ТЭ (теней эритроцитов) при различном [Ca²⁺]_{out}, Б — соотношения интенсивностей пиков ИК–спектра и среднее время жизни триптофанов глобина. Спектры нормированы на интенсивность пика 1243 см⁻¹ и сдвинуты друг относительно друга. Данные представлены как среднее ± SE (* — обозначены статистически значимые различия между одним типом образцов для 1 мМ и 1 мкМ [Ca²⁺]_{out}, # — статистические значимые различия между СЭ и ТЭ при одинаковой концентрации [Ca²⁺]_{out} p < 0,05)

Таким образом, выявленные нами изменения указывают на то, что в клетке, конформационные изменения Гб менее выражены чем в растворе. Снижение [Ca²⁺]_{out} сопровождается увеличением поверхностного потенциала мембраны эритроцита, а также, снижением упорядоченности фосфолипидов мембраны. В этих условиях установлено изменение электрохимического градиента (изменение

активности потенциал зависимых каналов [354, 355]) плазматической мембраны (таблица 9). Для стабилизации примембранного цитоскелета и ослабления трансмембранной разности потенциалов мембраны, молекулы Гб в СЭ олигомеризуются и связываются с цитоплазматической поверхностью мембраны эритроцита, взаимодействия с БПЗ и цитоскелетом. Изменения в глобиновой части эритроцитарного Гб могут свидетельствовать об изменении упорядоченности Гб внутри клетки при его прикреплении к мембране при изменении поверхностного заряда мембраны. Установлено, что при варьировании ионов экстраклеточного Ca^{2+} происходит изменение поверхностного заряда и потенциала мембраны эритроцита, при этом, конформационные изменения Гб происходят главным образом в глобиновой части молекулы, в то время, как кислород–транспортные свойства гема меняются на 15% (оценено по изменению величины соотношения I_{1580}/I_{1375}). При этом, в растворе, при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} кислород–транспортные свойства гема практически не меняются (менее 5%). Обратимое связывание Гб с мембранами может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран и/или регуляцию его упруго–механических свойств и осуществляется за счет электростатических взаимодействий Гб с БПЗ [313, 356]. Известно, что NH_2 –терминальный участок БПЗ имеет гибкий анионный сегмент и может входить в катионную центральную полость дГб, которая значительно сужается при связывании O_2 (это снижает сродство O_2 к Гб). Предполагается, что при связывании кислорода изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб (например, лизин) меняет локализацию анионного сегмента БПЗ, который выходит из катионной центральной полости дГб в связи с изменением расположения лизина или увеличением плотности отрицательного заряда в центральной полости дГб [42].

Вероятно, снижение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ меняет конформацию гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб (например, гистидин) и локализацию анионного сегмента БПЗ за счет увеличения ζ –потенциала и потенциала Нернста, в

результате чего, CDB3 выходит из катионной центральной полости дГб [310]. Этот процесс сопровождается десорбцией мембраносвязанного Гб и последующей олигомеризацией цитоплазматического Гб, что меняет кислородтранспортные свойства эритроцита.

3.3.3. Исследование влияния фотоповреждения мембраны на конформацию гема и глобина Гб_{шп}

Добавление гидрофобного ФС ВАСЕ к СЭ приводит к его встраиванию в мембрану эритроцитов [199], что, даже в отсутствии фотодинамического возбуждения оказывает существенное влияние на конформацию липидов, AmideII и снижает упорядоченность липидов (I_{2880}/I_{2930}) СЭ (рисунок 45). Согласно ИК–спектрам, при инкубации СЭ с ВАСЕ наблюдается увеличение интенсивности полосы ИК–спектра 1738 см^{-1} , которая характеризует С=О растяжение фосфолипидов в СЭ [305, 357] и растяжение С–О и С=О связей в структуре молекулы Гб [305, 357, 358], и подтверждает его способность локализоваться в клеточной мембране [199]. Помимо этого, добавление ВАСЕ к СЭ приводит к значительному увеличению ζ –потенциала мембраны (таблица 10) до $-12,54 \pm 0,32$, что приводит к увеличению доли эхиноцитов в пробе и согласуется с результатами измерения поверхностного потенциала дискоцитов и эхиноцитов, представленных в работе [359]. Тем не менее, в присутствии фотодинамического воздействия наблюдается возвращение эритроцитов в форму дискоцитов (гематокрит 0,1%) (рисунок 46 А–Г), а при гематокрите выше 5%, ВАСЕ вызывает агрегацию эритроцитов через 4 часа после инкубации (рисунок 46 Д). А при инкубации СЭ с ВАСЕ на протяжении 4 часовой инкубации и отсутствии фотодинамической активации ВАСЕ, наблюдается агрегация эритроцитов во всем исследуемом объеме (рисунок 46 Е). Таким образом, отсутствие изменений морфологии эритроцитов без фотоактивации ВАСЕ, не гарантирует полного сохранения

функциональной активности клетки при фотоактивации ВАСЕ. Кроме того, необходимо оценивать предполагаемый эффект от образования тромбов при использовании ВАСЕ в фотодинамической терапии.

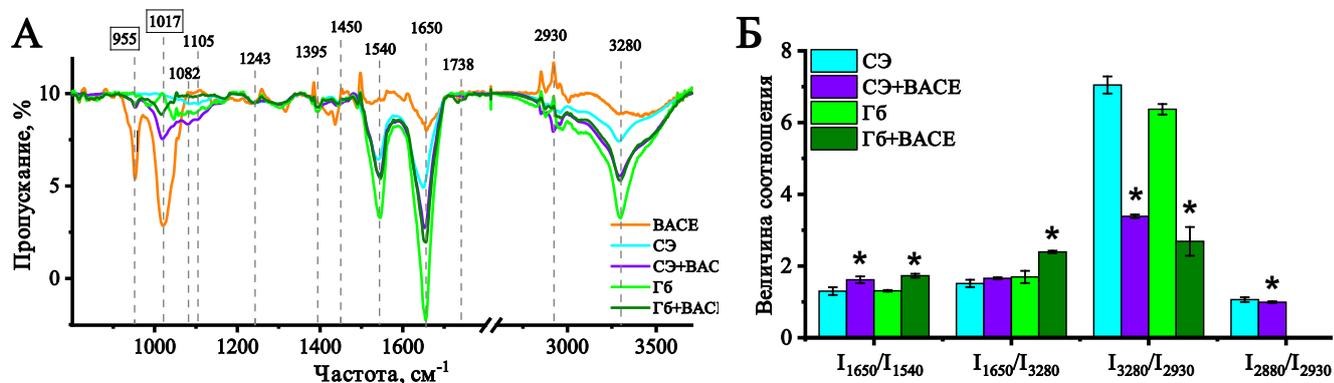


Рисунок 45 — А — ИК–спектр СЭ и выделенного Гб при добавлении 5 мкл ФС ВАСЕ, Б — соотношение интенсивностей пиков ИК–спектра СЭ и выделенного Гб при добавлении ФС ВАСЕ в отсутствие фотодинамического воздействия. Данные представлены как среднее \pm SE (* относительно пробы без ВАСЕ, $p < 0,05$)

В следующей серии экспериментов с помощью гель–электрофореза в ПААГ (рисунок 47) установлено, что столь значительные изменения ζ –потенциала приводят к резкому увеличению мембраносвязанного Гб, так как при инкубации СЭ с ВАСЕ (без фотоактивации) происходит снижение интенсивности окрашивания проб на 20% (таблица 10)

Таблица 10 — Изменение ζ –потенциала и размера СЭ и молекул выделенного Гб

	СЭ (контроль)	Выделенный Гб (контроль)	ВАСЕ	СЭ + 5 мкМ ВАСЕ	Выделенный Гб + 5 мкМ ВАСЕ
ζ –потенциал, мВ	$-15,23 \pm 36$	$31,38 \pm 0,83$	$30,30 \pm 0,78$	$-12,54 \pm 0,32 *$	$-19,12 \pm 0,36*$
ДСР, нм	4295–1908	$7,93 \pm 0,02$	$75,43 \pm 1,71$	$2761,60 \pm 625,23$	$175,34 \pm 5,70*$

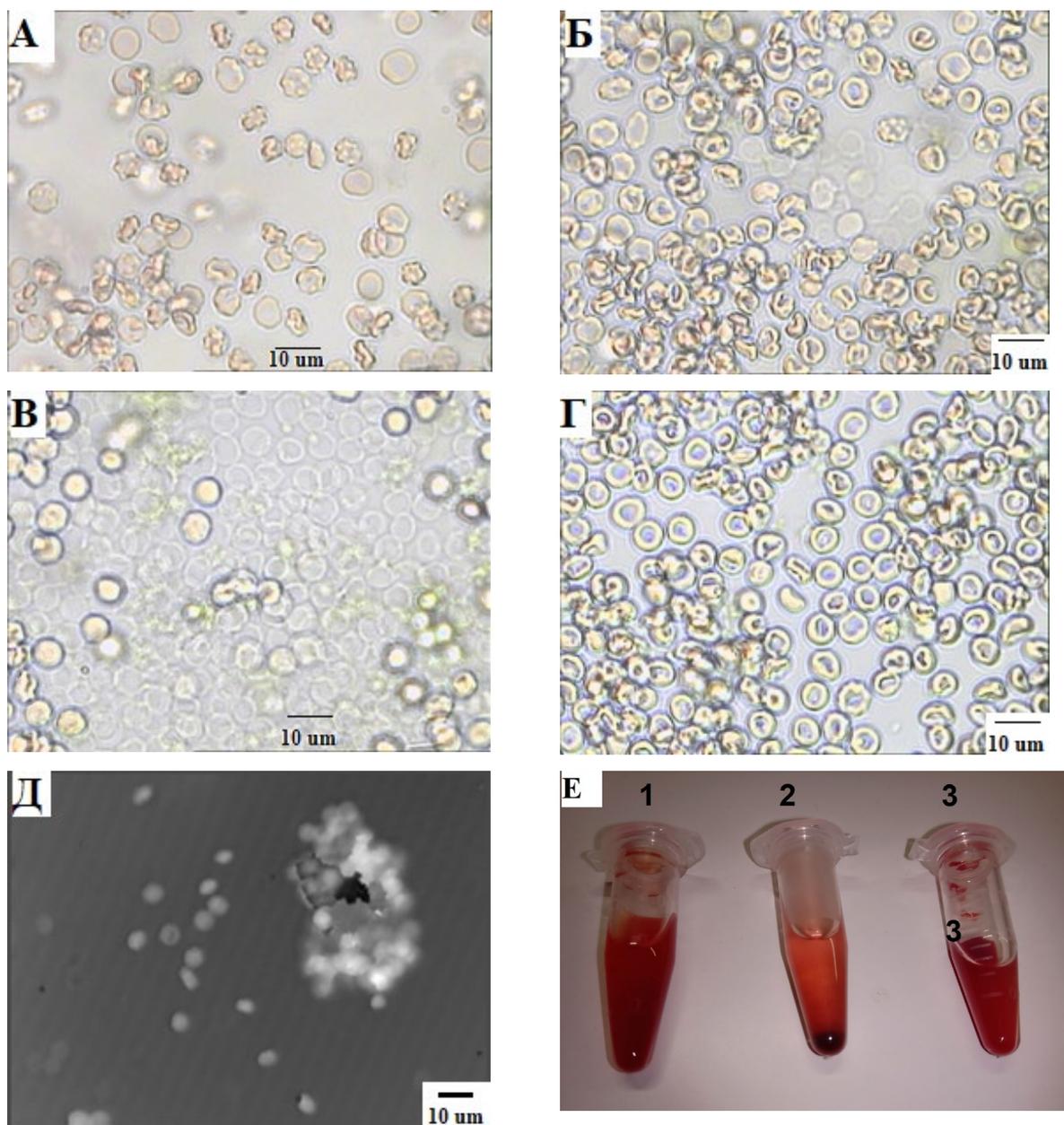


Рисунок 46 — Фотографии в оптический микроскоп: А — СЭ с ВАСЕ, доля эритроцитов в форме эхиноцитов увеличивается, Б — СЭ с ВАСЕ через 5 минут после начала фотоактивации, В — СЭ с ВАСЕ через 30 минут после начала фотоактивации, заметно увеличение доли гемолизированных эритроцитов, Г — СЭ после 30 минутной инкубации с ВАСЕ, эритроциты имеют дискоцитарную форму, Д — фотография СЭ с ВАСЕ при помощи ЛИМ через 10 минут после начала фотоактивации, образование скоплений эритроцитов начинается на 3 минуте, однако, ввиду высокой подвижности не осевших на подложку эритроцитов при фотоактивации, их регистрация не представляется возможной, Е — фотография эппендорфов с образцами после 4 часового нахождения в темном месте при +4 °С: 1 — Гб, выделенный в раствор, 2 — СЭ (гематокрит 5%) после 4 часовой инкубацией с ВАСЕ (отсутствие фотоактивации), темный осадок в нижней части эппендорфа представляет собой скопление агрегировавших эритроцитов, 3 — СЭ (гематокрит 5%) без добавления ВАСЕ

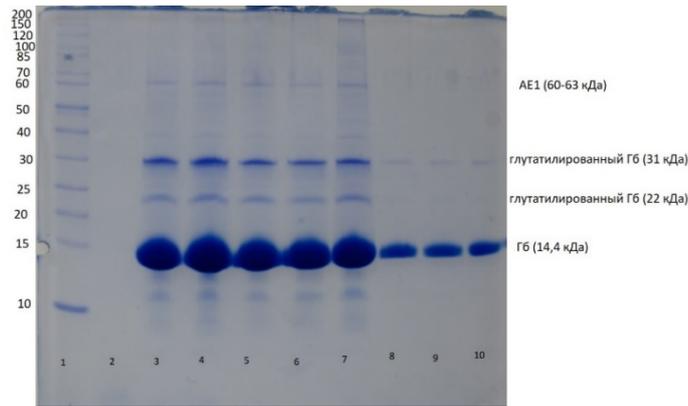


Рисунок 47 — Белковый гель-электрофорез Гб в ПААГ, слева обозначен вес маркера. 1 — маркер, 2 — ВАСЕ, 3 — Гб (контроль, Sigma), 4 — выделенный Гб + 0,5 мкл ВАСЕ, 5 — выделенный Гб + 2,5 мкл ВАСЕ, 6 — выделенный Гб + 5 мкл ВАСЕ, 7 — СЭ-контроль, 8 — СЭ + 0,5 мкл ВАСЕ, 9 — СЭ + 2,5 мкл ВАСЕ, 10 — СЭ + 5 мкл ВАСЕ

При фотодинамическом воздействии (рисунок 48 Б) отмечено равномерное падение всех показателей, указывающих на сродство гема к O_2 . Таким образом, при исследовании ФС важно обращать внимание на молекулярные изменения, которые может оказывать вещество на компоненты крови, а не только на оценку токсичности и морфологии эритроцитов, как было описано в литературе ранее [199]

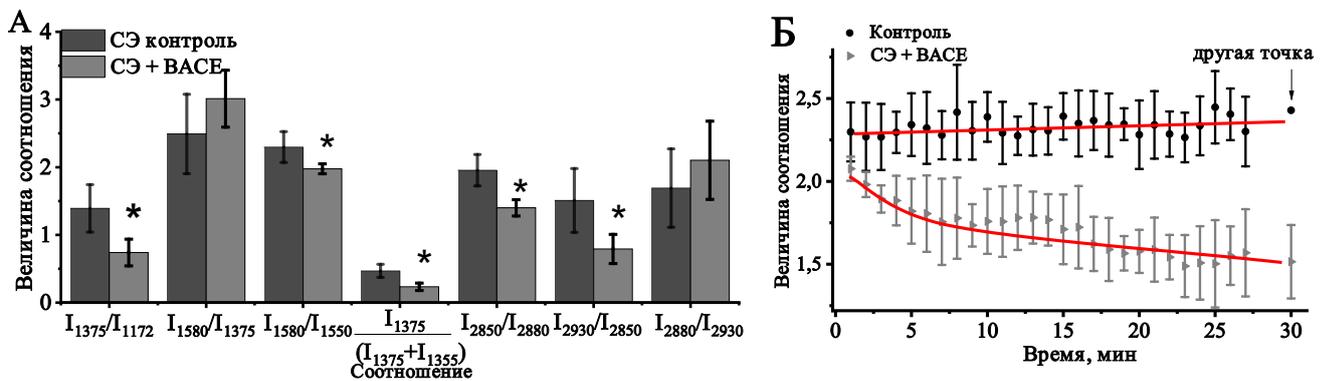


Рисунок 48 — Соотношение интенсивностей пиков I_{1580}/I_{1550} КР-спектра: А — при изменении 5 минутной инкубации СЭ с ВАСЕ без фотоактивации, Б — при фотодинамическом воздействии ВАСЕ на СЭ на протяжении 27 минут. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p < 0,05$)

Таким образом, мы показали, что увеличение ζ -потенциала оказывает существенное влияние на электростатическое взаимодействие Гб с компонентами мембраны (рисунок 47), снижает индекс деформируемости, повышает способность

к агрегации клеток [15, 235], увеличивает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и увеличивает плотность упаковки глобина. Изменения, которые оказывает изменение поверхностного потенциала мембраны эритроцита на перераспределение молекул Гб в цитоплазме будет более подробно рассмотрено в главе 3.5 «Исследование распределения молекул Гб в эритроците» (стр. 162).

3.3.4. Изменение конформации гема в зависимости от распределения эритроцитов в SiO₂ капилляре

Проведение экспериментальных исследований оценки моделирования кислород–транспортных процессов и диффузии кислорода через ткани и распределения эритроцитов в капилляре, затруднено значительными методическими трудностями, обусловленных сложностью пространственно временной организации анализируемых процессов и отсутствием надежных теоретических представлений о транспорте O₂ в системе микроциркуляции.

Обычно, для решения этой проблемы применяют методы математического моделирования, однако, такие системы, для удобства расчетов имеют ряд упрощений, таких как, гомогенное распределение эритроцитов по плотности среды (является достаточным для приближенной оценки процессов массопереноса в системе микроциркуляции [360, 361], капилляр представляют наполненным эритроцитами различной формы и плазмой крови [362], либо одиночными эритроцитами [363], а эритроцит представляют в виде трехкомпонентной среды: цитоплазмы с растворенным O₂, Гб, не связанным с O₂ и оГб [364], количество которого варьируется в соответствии с кривой оксигенации Бора [107, 248]. Однако, ввиду того, что эритроцит имеет различную величину поверхностного потенциала в зависимости от степени оксигенации (рисунок 25), а также, стенки капилляра имеют заряд (моноунитарный тип гладкомышечных клеток,

характеризуются низким потенциалом покоя и высокой проницаемостью для Na^+ [13]) мы предполагаем, что эритроциты могут иметь различное распределение в кровотоке ввиду различного поверхностного потенциала эритроцитов (рисунок 24) и неоднородности насыщения кислородом [308, 365]. Простой системой для моделирования происходящих процессов представляется гематокритный капилляр (1 мМ, Агат–Мед), в который помещают образец СЭ при регистрации КР–спектров. Гематокритный капилляр, изготовленный из нейтрального диэлектрика в идеале не имеет заряда на своей поверхности, однако, нельзя исключать из рассмотрения модели тот факт, что в результате разрушения кристаллической структуры кремния из которого изготавливают стекло и приводит к образованию положительного заряда на границе SiO_2 [366, 367]. Для проверки нашего предположения о гетерогенном распределении эритроцитов в крупных сосудах ввиду их различной степени оксигенации и, соответственно, поверхностного потенциала мы регистрировали спектры КР с разной глубины гематокритного капилляра, наполненного СЭ. Полученные данные, в виде соотношений интенсивностей пиков КР–спектра свидетельствуют о том, что распределение эритроцитов в капилляре в зависимости от глубины регистрации неравномерно по степени оксигенации, чего не было показано ранее и движение эритроцитов представлялось как турбулентное неравномерное движение (рисунок 49) [7]. Так, при движении от стенок капилляра к центральной части возрастает величина соотношений I_{1580}/I_{1550} , I_{1375}/I_{1172} и $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$, что соответствует изменению вклада колебаний метиновых мостиков между пирролами и групповых колебаний связей полуколец пиррола в гемопорфирине. Ввиду этого, вероятность нахождения гема в «плоской» конформации в центральной части капилляра выше, чем на его стенках. Таким образом, мы предполагаем, что величина ζ –потенциала оказывает существенное влияние на распределение эритроцитов в капилляре: в центральной части капилляра выше вероятность расположения эритроцитов с плоской конформацией гема, которая снижается к краям капилляра.

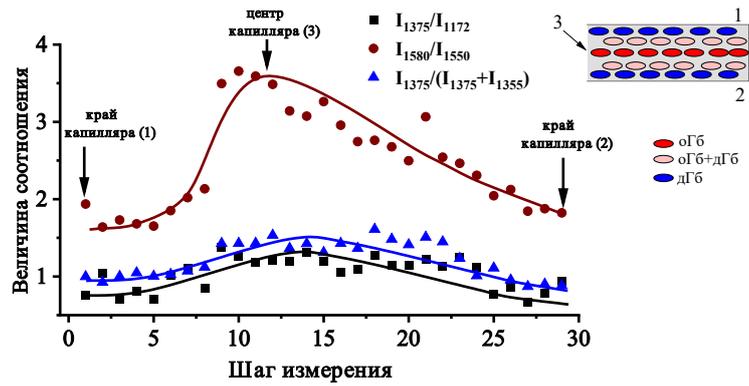


Рисунок 49 — Соотношение интенсивностей пиков КР–спектра, полученные при прохождении капилляра, наполненного СЭ от одной стенки (1) до противоположной стенки (2).

Справа сверху представлено схематичное изображение капилляра (серым) и расположение в нем эритроцитов, имеющих различную степень насыщения кислородом (синим — эритроциты, с преобладанием дезокси–формы, красным — эритроциты с преобладанием окси–формы Гб)

Таким образом, мы предполагаем, что ζ –потенциал мембраны оказывает воздействие не только на кислород–транспортную функцию эритроцита и конформацию Гб, но и на взаимодействие клеток с эндотелием сосудов [13], что может оказывать существенную роль в осуществлении газообмена при патологиях.

3.4. Исследование роли изменения объема и поверхностного потенциала эритроцита в регуляции конформации гема и глобина

В условиях гемодинамики эритроцит подвержен различным воздействиям (белки плазмы, межклеточные контакты и т.д.), а также изменениям морфологии и объема. Очевидно, что внутриклеточный гомеостаз ионов в клетке (регуляция содержания ионов солей и воды) оказывает существенное влияние на конформацию гема и глобина и распределение Гб. Нарушение осмотического давления приводит к преждевременной гибели и повреждениям эритроцитов (например, серповидно-клеточная анемия, наследственный сфероцитоз) [151]. Известно, что при нахождении эритроцита в капилляре (с диаметром канала $1,3 \pm 0,2$ мкм (диаметр эритроцитов 7–8 мкм), обеспечивающим перепад давления 2,3 кПа), наблюдается уменьшение объема клетки вдвое, снижается содержание воды на 55%, а концентрация внутриклеточного Гб возрастает в 1,7 раз (по мнению G.Artmann, при втягивании эритроцита в капилляр, концентрация Гб возрастает до 500 мг/мл за счет выхода воды из клетки). Вероятно, что данные процессы могут осуществляться в кровеносных сосудах в организме при входе эритроцита из сосудов в капилляры [155].

Ранее, мы показали, что изменения конформации гема и глобина коррелируют с изменениями ζ -потенциала и pO_2 [40, 43]. Известно, что объем эритроцита может регулироваться путем изменения внутриклеточной концентрации ионов натрия ($[Na^+]_{in}$) при функционировании насоса. Параллельно, данный процесс меняет трансмембранный потенциал [53, 59, 97]. Мы предположили, что при изменении объема клетки, за счет увеличения содержания внутриклеточного Na^+ , на конформацию Гб оказывает существенное влияние как изменение плотности распределения молекул Гб (увеличение гидродинамического радиуса этой молекулы, а также расстояние между молекулами Гб (которое увеличится при входе воды в клетку и встраивания молекул воды в гидрофобные

карманы Гб [94]) так и взаимодействие между молекулами Гб, за счет изменения трансмембранного потенциала при увеличении $[Na^+]_{in}$.

В связи с этим, мы исследовали изменения конформации гема и глобина и распределения Гб при увеличении $[Na^+]_{in}$ в следствии специфического блокирования насоса при действии убаина [177, 368]. Действительно, регуляция внутриклеточного объема осуществляется за счет изменения соотношения концентраций Na^+/K^+ [369]. Известно, что Na^+/K^+ -АТФаза участвует в регуляции объема, формы и трансмембранного потенциала эритроцита за счет АТФ-зависимого переноса 3 Na^+ из клетки и 2 K^+ в клетку против градиента концентрации [151, 174, 175]. Для изменения объема мы использовали гемолиз эритроцита осмотическим шоком при помещении клетки в гипоосмолярную среду [14]. Блокирование Na^+/K^+ -АТФазы эритроцита убаином приводит к накоплению Na^+ внутри клетки и увеличения объема за счет входа воды, либо изменению трансмембранного потенциала. Отметим, что, так как Гб имеет 54 центра связывания катионов, с максимальным сродством к Na^+ , вероятно накопление Na^+ меняет эффективность олигомеризации молекул Гб и их упорядоченность [368].

3.4.1. Изменение конформации Гб при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы эритроцита

Мы отмечали, что Na^+/K^+ -АТФаза участвует в регуляции гомеостаза ионов натрия в клетке, мембранного потенциала и внутриклеточного объема [151, 174, 175]. Блокирование активности этого фермента приводит к увеличению объема клетки за счет накопления Na^+ внутри клетки и увеличению выхода K^+ [354]. В связи с этим, в данной серии экспериментов мы исследовали зависимость конформации и распределения Гб в эритроците в условиях накопления Na^+ в клетке, изменения мембранного потенциала и объема эритроцита.

Установлено, что в течение 60 мин инкубации СЭ с 3 мМ убаином наблюдаются изменения ОРХ клетки (увеличение величины 3D-распределения плотности ОРХ клеток, уменьшение амплитуды ОРХ). Вероятно, эффект обусловлен перераспределением Гб при увеличении содержания воды в клетке или $[Na^+]_{in}$ (рисунок 50 А, Б) [370]. При этом, нами не выявлены изменения формы эритроцита, хотя, в центральной части тора дискоцитов обнаружена область с высокой плотностью локализации молекул Гб (рисунок 50 Г). Мы связываем отсутствие существенных изменений с молекулами, локализованными на цитоплазматической поверхности мембраны, а именно, фосфорилированием спектрина Ca^{2+} и АТФ, что оказывает существенное влияние на вязкость мембраны, трансмембранный потенциал и поверхностный заряд плазматической мембраны эритроцита [355]. Например, при блокировании Na^+/K^+ -насоса эритроцита, нами зафиксировано увеличение ζ -потенциала мембраны с $-15,2 \pm 0,2$ до $-13,2 \pm 0,2$ мВ, а трансмембранного потенциала с -130 ± 10 до -170 ± 10 мВ (Рисунок 50 В, 34).

В качестве контроля, для определения возможности проникновения блокатора в клетку и взаимодействия с Гб, мы установили, что при добавлении убаина к выделенному Гб уменьшается гидродинамический диаметр молекул Гб с $7,2 \pm 0,1$ до $5,5 \pm 0,3$ нм, а также, ζ -потенциал молекулы возрастает с $-32,06 \pm 0,04$ до $-8,25 \pm 0,03$ мВ, что, вероятно, свидетельствует об агрегации молекул и их способности образовывать кластеры или олигомеризоваться (рисунок 52 В, Г) [234]. Важно, что изменение величины ζ -потенциала мембраны при инкубации СЭ с убаином (0,1, 1 и 3 мМ) коррелирует с изменениям величины ζ -потенциала выделенного Гб (Рисунок 52В) Вероятно, изменения ζ -потенциала мембраны эритроцита могут сопровождаться и за счет перераспределения Гб_{цп} (рисунок 52 В). Например, в главе 3.5.1 «Исследование конформации гемоглобина при его олигомеризации» (стр. 179), рассматривается, как увеличение концентрации солей фосфатов приводит к увеличению степени агрегации эритроцитов. При этом, в растворе, наблюдается высаливание молекул Гб или, другими словами, образование олигомерных комплексов. Отметим, что убаин не проникает в клетку

через мембрану, но, вероятно, оказывает на выделенный Гб эффект, аналогичный H_2PO_4^- .

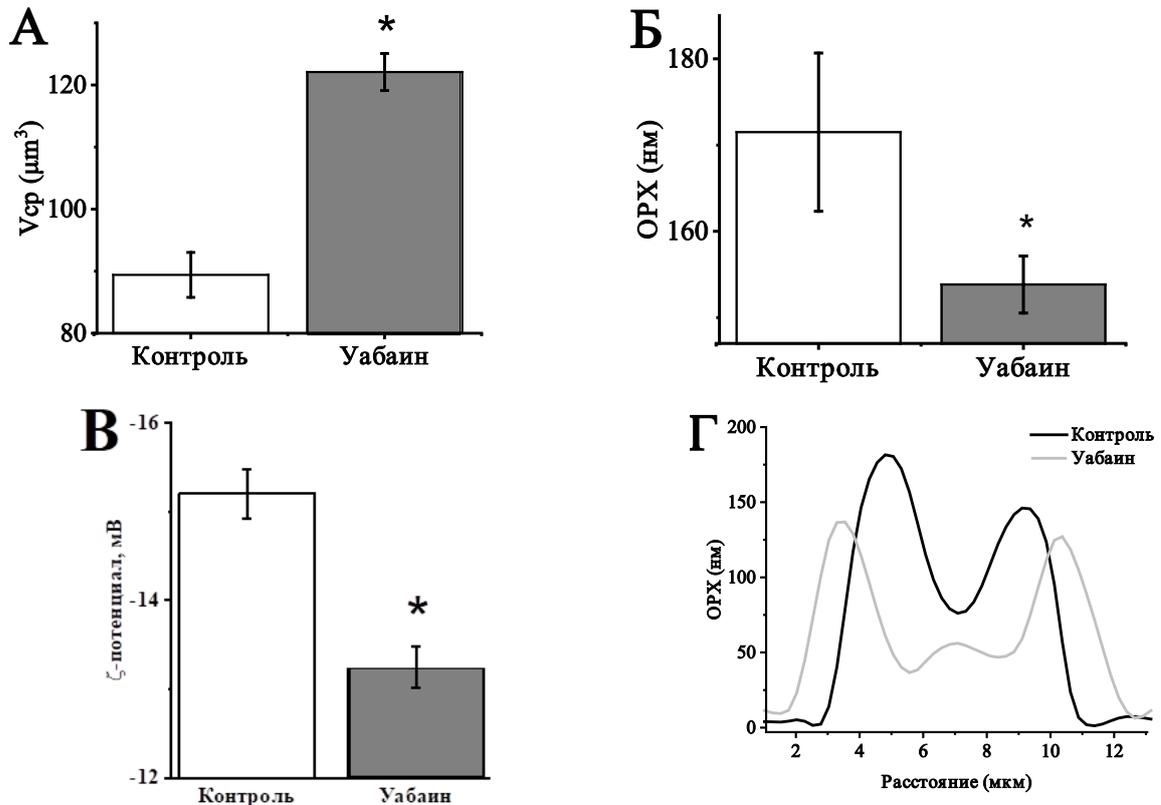


Рисунок 50 — Изменение ОРХ эритроцита при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы. А — 3D распределение плотности эритроцита, Б — среднее ОРХ, В — ζ -потенциал мембраны эритроцитов, Г — фазовый профиль эритроцита при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы (60 минутная инкубация с 3 мМ убаина). Данные представлены как усредненная по 60 клеткам величина \pm SE (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и убаина ($p < 0,05$))

Таким образом, изменения конформации гема и глобина Гб_{цп} связаны главным образом с увеличением $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и изменением поверхностного потенциала эритроцита при необратимом связывании убаина с Leu111 и Asn122 первичной структуры α -субъединицы N-конца Na^+/K^+ -АТФазы [371]. При выбранных нами концентрациях убаина не наблюдается процесс гемолиза, но возможен выход молекул Гб в экстраклеточную среду из-за образования пор в мембране эритроцита, в связи с чем мы регистрировал изменение конформации и заряда выделенного Гб при различных концентрациях убаина (рисунок 50 Б). Это также подтверждается отсутствием изменения величины соотношения пиков КР СЭ $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$ при

инкубации СЭ с 3 мМ убаином. Действительно, отсутствие изменение доли дГб (т.е. изменение доли связанного O_2 с Гб) свидетельствует о зависимости изменений конформации Гб и ионным составом цитоплазмы. Мы доказали, что блокирование Na^+/K^+ -АТФазы убаином увеличивает содержание $[Na^+]_{in}$ (почти на $33 \pm 2\%$) в эритроците, при этом, наблюдается тенденция к снижению содержания $[K^+]_{in}$ (рисунок 51). Полученные данные подтверждают увеличение соотношения содержания Na^+ и K^+ в эритроците при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы [372].

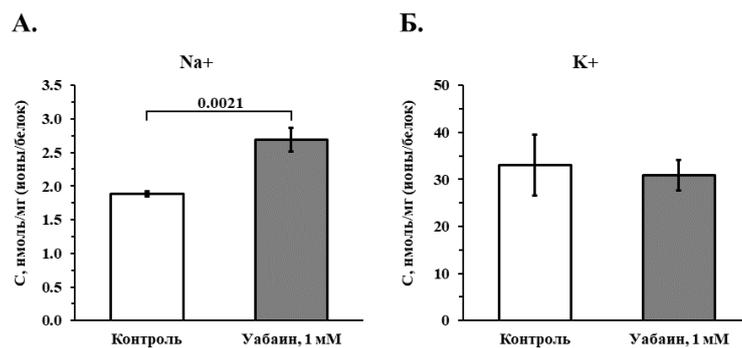


Рисунок 51 — Изменение содержания $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ при инкубации эритроцитов в течении 60 минут с 1 мМ убаином. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p < 0,05$)

Установлено, что изменение величины соотношений интенсивностей пиков КР-спектра различно при инкубации выделенного Гб и СЭ на протяжении 20-ти и 60-ти минут с убаином (рисунок 52 Б). Вероятно, это свидетельствует об отсутствии прямого воздействия убаина на Гб в эритроците. Таким образом, изменения, конформации гема и глобина Гб в СЭ, которые будут рассмотрены далее обусловлены только изменением объема клетки и (или) деполяризации мембраны при увеличении $[Na^+]_{in}$.

Установлено, что при инкубации СЭ с убаином, существенные изменения в конформации гема выявлены для валентных колебаний связей, характеризующих снижение подвижности гема (увеличение величины соотношения I_{1375}/I_{1172}) и снижение способности Гб сбрасывать лиганды (снижение величины соотношения I_{1580}/I_{1375}). Возможно, что данный эффект вызван деполяризацией мембраны (изменение трансмембранного потенциала на 60 ± 10 мВ), перераспределением Гб_{мс} и Гб_{цп}, а также за счет увеличения межмолекулярных расстояний между

молекулами Гб при входе воды, экранированием молекул Гб молекулами воды, а также, селективного связывания Na^+ с Гб (рисунок 52 А) [94, 370]. Увеличение $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ сопровождается снижением величины ОРХ клетки, а также плотности упаковки глобина за счет перераспределения CH_n -групп (снижение величины соотношения I_{2880}/I_{2930} , изменения во вторичной структуре белка за счет колебаний CH_n -групп аминокислот, локализованных на поверхности белковой глобулы) (рисунок 52 А).

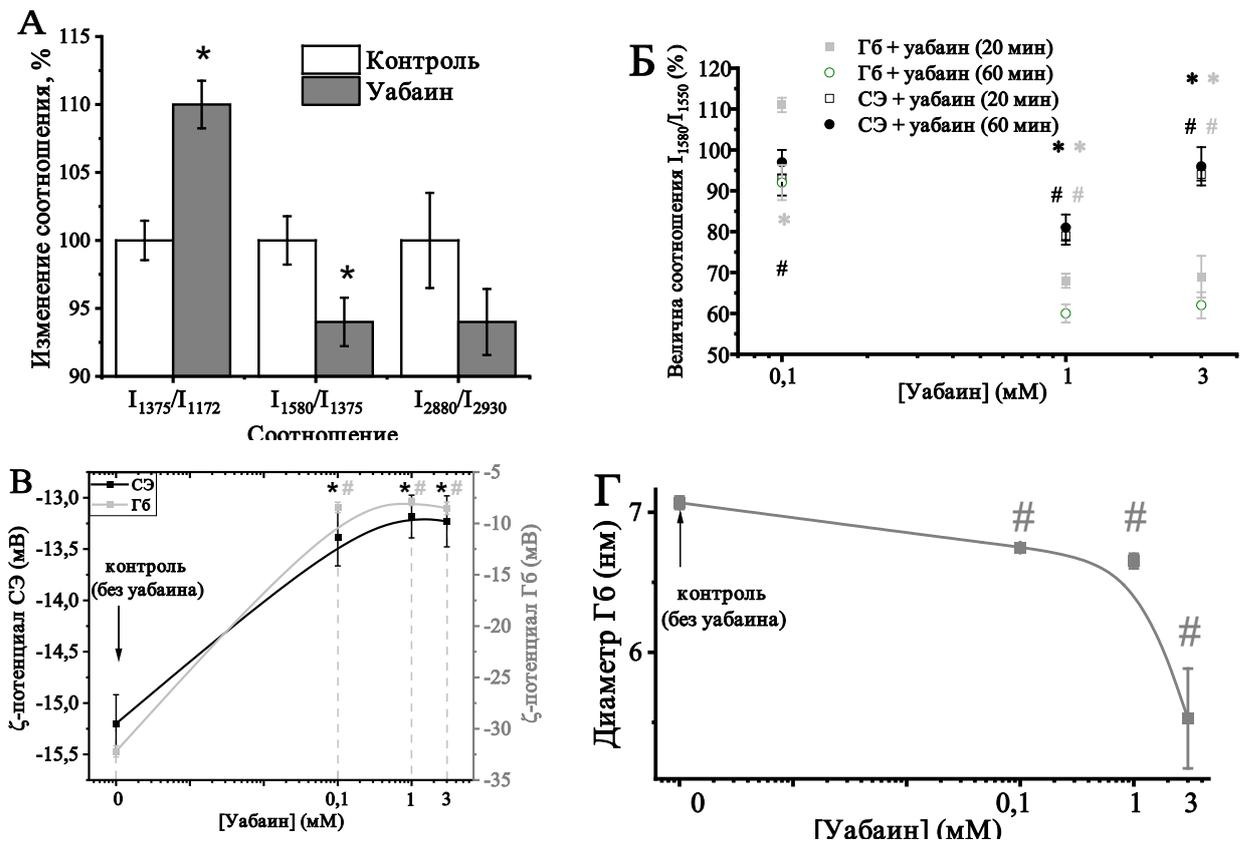


Рисунок 52 — Изменения соотношения величин интенсивностей пиков КР-спектра при действии уабайна: А — СЭ, при 60-минутной инкубации с 3 мМ уабайном, Б — изменение соотношения пиков КР-спектра I_{1580}/I_{1550} для СЭ и выделенного Гб при 20-ти и 60-минутной инкубации в растворах с указанной концентрацией уабайна. Данные представлены как процентное изменение по отношению к контролю \pm SE, В — ζ -потенциал СЭ (черная кривая) и молекул выделенного Гб (зеленая кривая, характеризует величину агрегации молекул) при 60-минутной инкубации в растворах с указанной концентрацией уабайна, Г — диаметр молекул выделенного Гб. Данные представлены среднее \pm SE (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и уабайна, # — для выделенного Гб ($p < 0,05$))

Отметим, что при инкубации СЭ с убаином доля Гб с гемом в «куполообразной» конформации и сродство Гб к лигандам не меняется, что может быть связано с компенсацией заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны клетки при деполяризации мембраны. Например, известно, что активация внутриклеточных фосфолипаз, приводит к изменению упорядоченности жирнокислотных хвостов мембранных липидов и снижению доли Гб_{мс} в комплексе с БПЗ [68, 373]. Данный процесс может играть важную роль при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$, что увеличивает количество кластеров отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот на поверхности мембраны эритроцита и свободных ОН-групп тирозина БПЗ [88]. Однако, остается не понятным, какое влияние данные процессы оказывают на конформацию Гб_{мс}.

Далее, для выявления более детальных изменения конформации гема и глобина Гб_{мс} мы использовали метод ГКР на СЭ [35]. Показано, что с увеличением времени инкубации СЭ (20 и 60 минут) СЭ с 3 мМ убаином наблюдается увеличение вероятности изменения конформации молекул Гб_{мс} (и малой доли примембранного Гб_{цп}): снижается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации ($I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$, I_{1580}/I_{1150} , I_{1580}/I_{1375}) и снижение плотности упаковки глобина. Важно отметить, что обнаруженные изменения вклада колебаний СН₂-групп порфириновых колец гемопорфирина отличаются от Гб_{цп} (I_{1375}/I_{1172}), хотя валентные колебаний связей винилов (I_{1580}/I_{1150}) аналогичны изменениям Гб_{цп}. Так же, для глобина Гб_{мс} характерно снижение плотности упаковки молекулы глобина при длительном времени инкубации, что не выявлено при более коротких сроках (20 минут) — времени, при котором наступает блокирование Na^+/K^+ -АТФазы (рисунок 53).

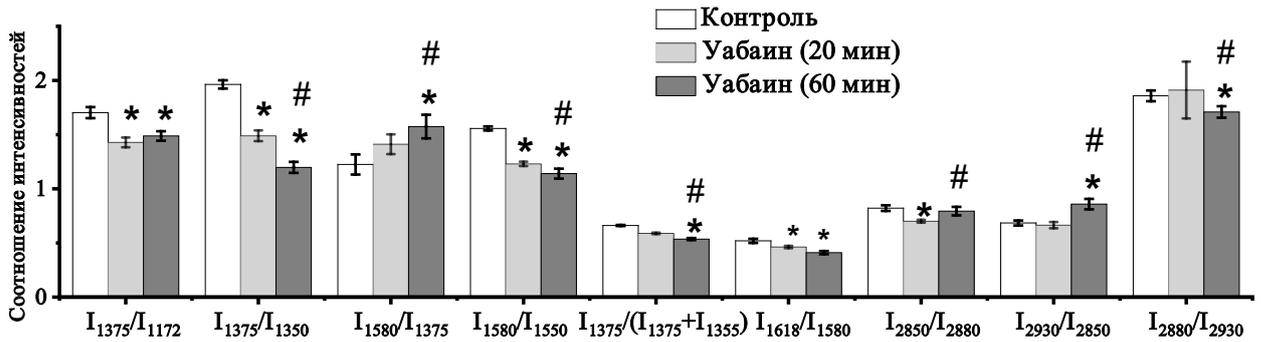


Рисунок 53 — Изменение соотношения величин интенсивностей пиков ГКР–спектра для примембранного Гб СЭ (20-ти и 60 минутная инкубация с 3 мМ убаина). Данные представлены как усредненная величина \pm SE (* обозначено статистически значимые различия между контролем и инкубацией с убаином, # обозначено статистически значимые различия между пробами с инкубацией убаином на протяжении 20-ти и 60 минут ($p < 0,05$))

Таким образом, блокирование Na^+/K^+ -АТФазы эритроцита оказывает влияние на конформацию гема главным образом за счет изменения валентных колебаний пирролов. С помощью метода ИК–спектроскопии установлено, что инкубация СЭ с 3 мМ убаином не оказывает существенных изменений на конформацию белков и аминокислот (соотношения I_{1650}/I_{1540} (отношение AmideI к AmideII) и I_{1650}/I_{1243}) (рисунок 54 Б) [123]. Отметим, что присутствие убаина в среде с выделенным Гб, оказывает существенное влияние на конформацию белков (I_{1650}/I_{1540} (отношение AmideI к AmideII) (рисунок 54 В)) [123]. Вероятно, смещение полосы в ИК–спектре с 1650 до 1647 см^{-1} свидетельствует об изменении вторичной структуры белка Гб в клетке (растяжение амидных связей белка $\text{C}=\text{O}$ в СЭ с 3 мМ убаином) (рисунок 54 А). В аналогичных условиях эксперимента, нами выявлено изменение вклада Н–связей аминокислот (I_{1450}/I_{1243}) и снижение упорядоченности фосфолипидов липидного бислоя мембраны (увеличение величины соотношения пиков I_{2930}/I_{1243}). Отметим, что при увеличении времени инкубации СЭ с 3 мМ убаином возрастает интенсивность полосы 1738 см^{-1} , что характеризует $\text{C}=\text{O}$ растяжение мембранных фосфолипидов (рисунок 54 А) [357, 358].

Вероятно, обнаруженное нами снижение времени жизни триптофановой флуоресценции белков (в том числе и глобина Гб) эритроцита и величины

соотношения I_{2880}/I_{2930} глобина свидетельствует о уменьшении плотности упаковки глобина и (или) изменение белкового окружения молекул Гб за счет увеличения количества связанной воды и (или) электростатического взаимодействия Na^+ с молекулой Гб (рисунок 54 Б, Г). Вероятно, снижение времени жизни триптофановой флуоресценции может свидетельствовать и об образовании олигомерных комплексов молекул Гб в цитоплазме. При этом, важно отметить, что в отличие от экспериментов с воздействием температуры или снижения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (рисунок 33, 36), основной вклад в изменение флуоресценции оказывает ее быстрая компонента (обозначено незакрашенными квадратами на рисунке 54 Г).

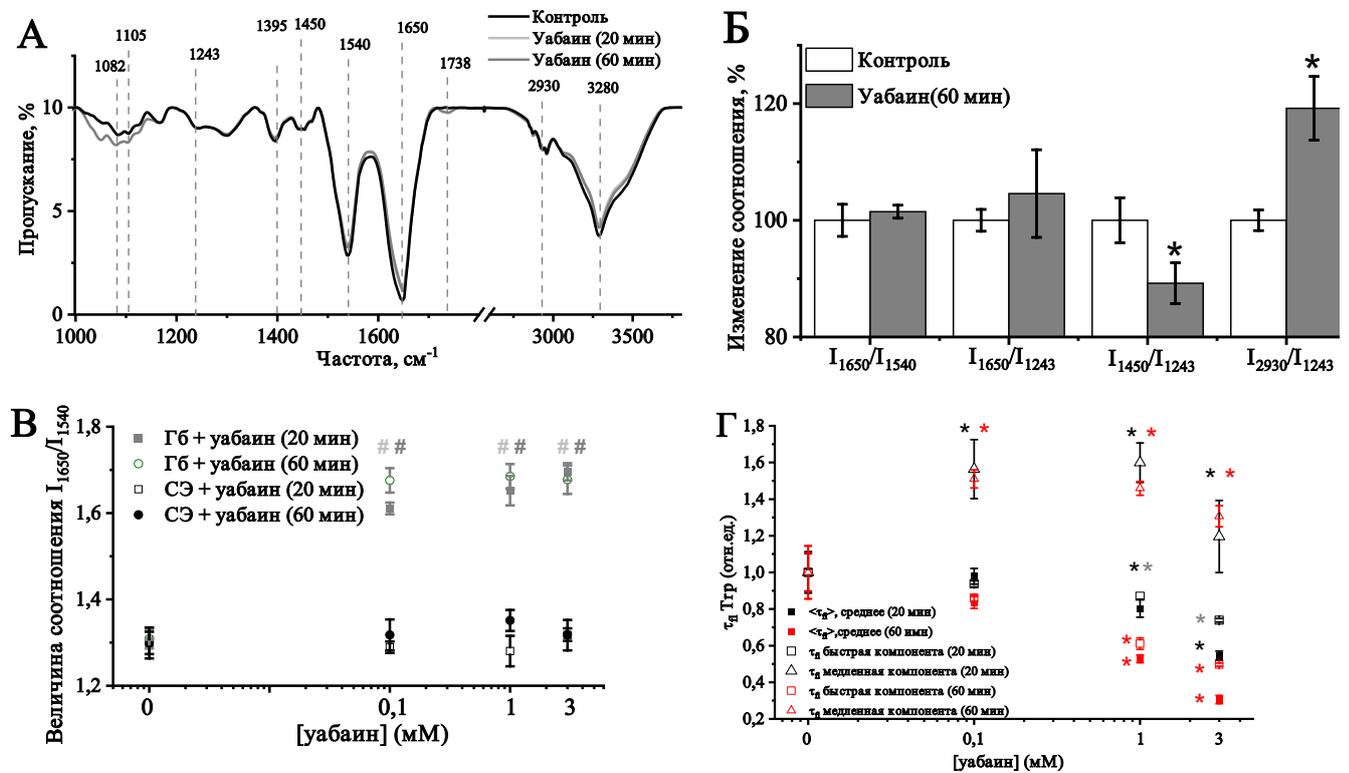


Рисунок 54 — Исследование изменений структуры глобина Гб СЭ при действии уабаина: А — ИК-спектр в области $1000\text{--}4000\text{ см}^{-1}$, Б — соотношения величин интенсивностей пиков КР-спектра, В — Соотношения интенсивностей пиков ИК-спектра, Г — время жизни триптофановой флуоресценции. Данные представлены как процентное изменение по отношению к контролю \pm SE (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и уабаина для СЭ, # — для выделенного Гб ($p < 0,05$))

Таким образом, при увеличении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и увеличении объема клетки за счет входа воды, изменение плотности упаковки глобина происходят не равномерно, а в некоторых участках глобина Гб. Вероятно, для триптофанов $\alpha 14$, $\beta 15$, $\beta 37$

(расположены рядом с локализацией гема в глобине) характерно снижение времени жизни флуоресценции, а для Trp $\alpha 214$, $\beta 215$, $\beta 217$ (удалены от гема в глобине) — увеличение. Вероятно, ионы натрия связываются с молекулами Гб в цитоплазме, образуя комплексы, в результате, молекулы Гб снижают плотность упаковки и отдельные молекулы Гб расходятся [138, 180, 354], а молекулы воды меняют гидродинамический радиус молекулы Гб, увеличивая расстояние между молекулами Гб в цитоплазме эритроцита [94].

Известно, что деформируемость отдельной клетки эритроцита определяется вязкостью плазматической мембраны, цитоплазмы и упругостью цитоскелета [374]. Внутриклеточная вязкость в основном обусловлена двумя факторами: концентрацией гемоглобина и содержанием воды. На рельеф поверхности мембраны влияет как распределение мембранных белков, так и каркас цитоскелета, который образован спектриновыми связями между ассоциированными с мембраной белковыми комплексами, включающими анкирин, БПЗ и актин [348]. Нами показано, что эритроциты, являясь клетками с высокой степенью деформации (от нормальной формы двояковогнутого диска из-за изменений условий потока в кровотоке) сохраняют свою форму при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы, а вход воды в клетку и накопление ионов натрия приводит к изменению поверхностного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны (рисунок 52 В). В этих условиях выявлены изменения конформации как гема, так и глобина Гб, а именно, снижение плотности упаковки глобина Гб, которые могут быть связаны с сорбцией Na^+ с Гб, увеличением количества молекул воды в клетке, деполяризацией мембраны и перераспределением Гб в клетке (рисунок 55). Вероятно, перераспределение Гб и увеличение вероятности нахождения гема Гб в «куполообразной» конформации увеличивает способность Гб связывать O_2 . При этом, снижается плотность упаковки глобина в эритроците при увеличении объема клетки и изменении водородных связей гидрофильной поверхности глобина, образующие связи между глобулами Гб, а также, снижения времени жизни флуоресценции, что может связано со снижением плотности упаковки глобина, увеличением гомогенности

распределения молекул Гб и увеличения расстояния между молекулами Гб в цитоплазме эритроцита [94]. Нами показано, что при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы, конформация цитоплазматического и примембранного Гб различна. При этом, вероятность изменения конформации Гб_{мс} зависит от времени инкубации клетки с убаином. Вероятно, выявленные изменения обусловлены главным образом изменениями во вторичной структуре белка — глобина близ центров локализации гема в Гб.

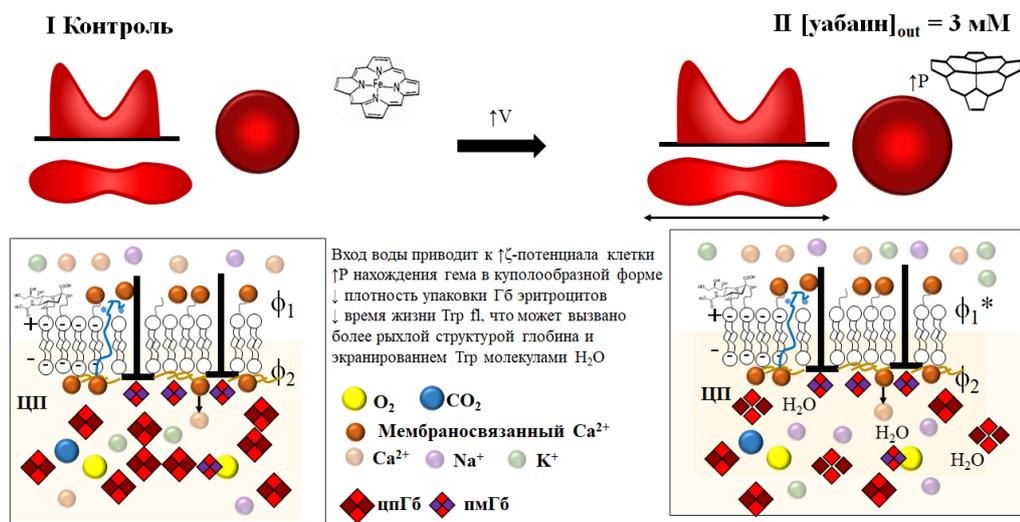


Рисунок 55 — Схема, поясняющая изменения конформации Гб и его перераспределение внутри клетки при изменении объема клетки. При входе воды в клетку увеличивается её объем, вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, а снижение плотности упаковки обусловлено изменениями плотности боковых групп глобина

3.4.2. Исследование конформации Гб при переходе из гетерогенного к гомогенному распределению

Известно, что инкубация эритроцитов в гипоосмотической среде вызывает вход воды по градиенту концентрации в клетку (гемолиз). Мы использовали процесс гемолиза в качестве модели, позволяющей исследовать динамику изменения конформации Гб при переходе молекулы Гб из упорядоченной среды (клетка) в раствор.

Очевидно, что при гемолизе и входе воды в клетку снижается доля Гб/вода в клетке, что приводит к увеличению гидратной оболочки из молекул воды вокруг молекул Гб [94, 151]. В связи с возможностью регистрации методом КР Гб как в клетке, так и в растворе, мы измерили изменение конформации гема и глобина при снижении концентрации Гб в растворе. При этом, мы учитываем, что после выделения Гб в экстраклеточную среду, доля оГб в пробе не меняется, а изменения конформации могут быть вызваны изменением доли связанной воды, изменением плотности упаковки и изменения расстояния между молекулами выделенного Гб.

Установлено, что при увеличении доли воды в пробе (разведение проводили в соотношении до $\frac{1}{4}$ от исходной концентрации Гб), соотношение сигнал/шум КР-спектра снижается, что является следствием снижения концентрации молекул Гб в пробе, но различий между величинами соотношений пиков КР-спектра не выявлены, что свидетельствует об отсутствии изменений конформации выделенного Гб (рисунок 56).

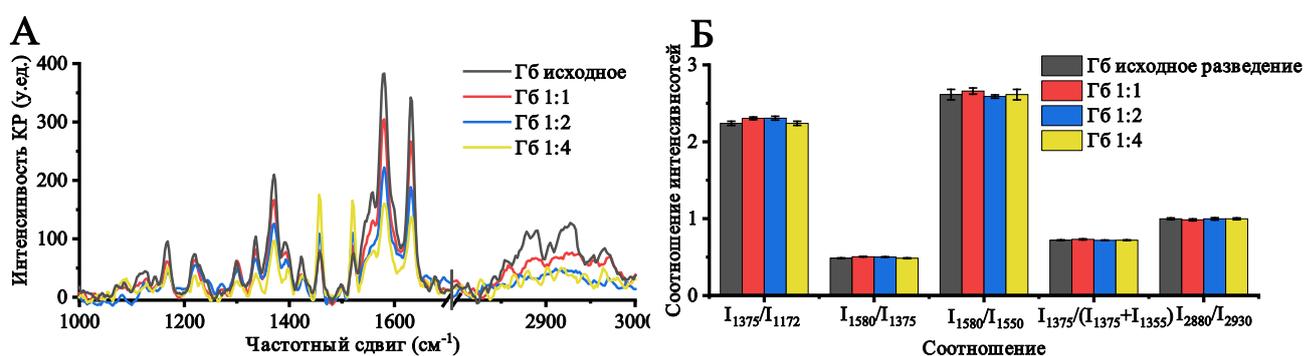


Рисунок 56 — Изменения конформации выделенного Гб от доли (концентрации) в растворе. А — КР-спектр, Б — соотношения интенсивностей пиков КР-спектра. Спектры не нормированы (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$))

Таким образом, нами доказано, что изменение конформации гема и глобина, в СЭ при увеличении доли молекул воды в клетке не связаны с разбавлением молекул Гб в цитоплазме, а обусловлены другими процессами (содержанием связанной воды, изменением трансмембранного потенциала или содержания Na^+).

Установлено, что в гипоосмотической среде, происходит резкое увеличение площади клетки, а также интенсивности ОРХ при снижении размеров клетки, что

указывает на вход воды и перераспределение молекул Гб в центр клетки (см. изменение величины ОРХ на рисунке 57 А) Важно, что с 45 по 65 минуту наблюдается увеличение ОРХ, после чего вновь наблюдается ее падение, что связано с повреждениями мембраны и выходом молекул Гб из клетки.

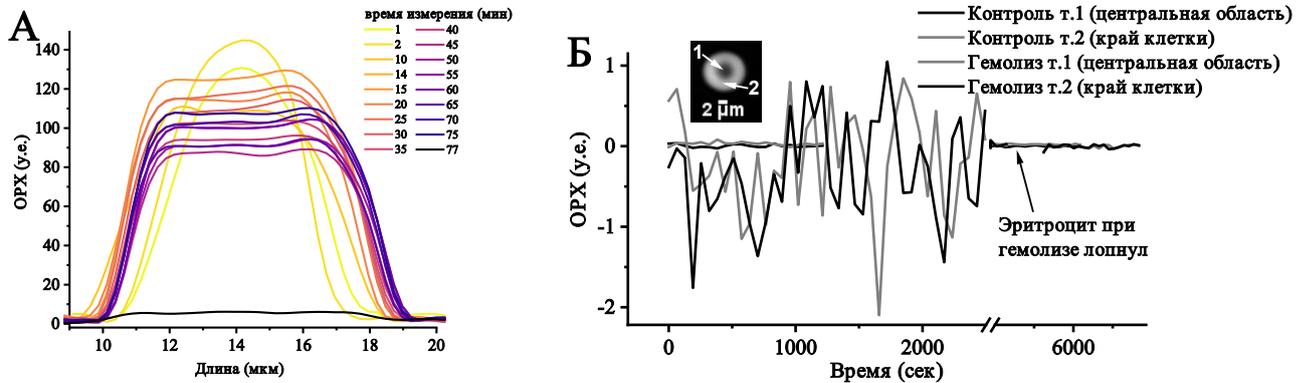


Рисунок 57 — А — Изменение величины ОРХ при гемолизе эритроцита. Изменения ОРХ измеренные по площади всей клетки характеризуют изменения морфологии клетки. На легенде представлено минута регистрации изменений. Измерения начинали осуществлять через 5 минут после начала гемолиза, Б — изменение величины ОРХ в центральной части клетки и на её крае при гемолизе, полученные методом ФКМ

Установлено, что изменения величины ОРХ в ходе гемолиза происходят не равномерно, а наблюдаются изменения (флуктуации) как в центральной, так и на внешней части тора (рисунок 58 А). Максимально выраженные флуктуации величины ОРХ обнаружены на 10–30 минутах гемолиза, что коррелирует со снижением и последующим увеличением объема клетки. Снижение объема клеток связано с выходом воды (и Гб) из клетки через аквапориновые каналы и образование пор в мембране по градиенту концентрации ионов [154]. Вероятно, в данный период времени, количество молекул воды, поступивших в клетку недостаточно для разрыва мембраны, и Гб хаотично перемещается внутри клетки.

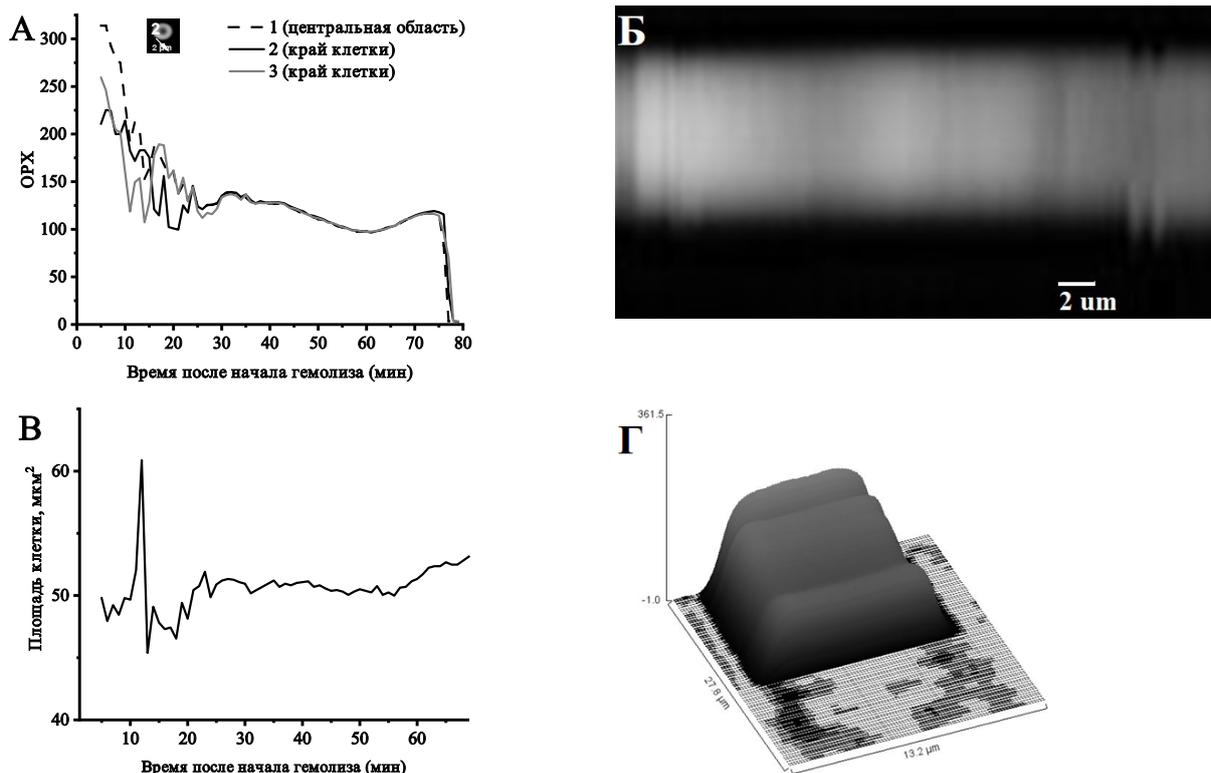


Рисунок 58 — А — изменение величины ОРХ клеток в разных участках (край слева, центральная область и край справа) до момента гибели, Б — срезы клетки во времени при гемолизе до момента гибели, В — изменение площади клетки до момента гибели, Г — 3D-визуализация распределения ОРХ по центральному профилю клетки до момента гибели

При этом, согласно данным ФКМ (фазово-контрастная микротомография, более чувствительный метод, чем ЛИМ), изменения величина ОРХ эритроцитов, претерпевает изменения на протяжении всего времени гемолиза (рисунок 57 Б). Вероятно, выявленные изменения ОРХ могут быть связаны с:

1. Перераспределением молекул Гб внутри клетки при увеличении внутриклеточного объема клетки;
2. Деформация эритроцита за счет флуктуации и флиппинга мембраны без существенных изменений формы целой клетки (membrane tanktreading), что в сочетании с небольшими колебаниями способствует выталкиванию эритроцитов в центр сосудов [375].

Для оценки изменения конформации глобина Гб_{цп} в СЭ и выделенном Гб, Гб_{цп} экстрагировали в раствор (т.е. в условиях снижения гидрофобного взаимодействия, увеличения расстояния между молекулами и увеличения

неоднородности окружающей среды) для оценки перехода из *упорядоченного в гомогенное состояние*. Мы предполагаем, что помещение эритроцитов в гипоосмотическую среду вызовет рост входа воды в клетку по градиенту концентрации, изменение концентрации внутриклеточных ионов и величины трансмембранного потенциала. При переходе Гб из упорядоченной в неупорядоченную среду будут наблюдаться изменения конформации гема и плотности упаковки глобина. Ранее (см. раздел 3.3.3 «Исследование влияния фотоповреждения мембраны на конформацию гема и глобина Гб_{цп}», стр. 138) нами было показано, что увеличение поверхностного потенциала (на 3 мВ) приводит к значительным изменениям конформации гема и глобина Гб_{цп}, которые усиливаются при фотоповреждении мембраны и поступлении воды в клетку (рисунок 48).

Нами установлено, что изменение конформации Гб в СЭ чувствительно к изменению осмотического давления (изменение объема, деполяризация мембраны [32]), а при входе воды наблюдается увеличение величины броуновского движения молекул Гб внутри клетки (до 30 минут, рисунок 58), а изменения конформации гема и глобина различны (рисунок 59):

1. В период от 0–45 секунд (0 минута на рисунке отмечена синим цветом) наблюдается резкое увеличение вклада валентных колебаний винильных групп и пиррольных колец гема Гб, что вероятно для нахождения гема в «куполообразной» форме. При этом наблюдается резкое снижение упорядоченности глобина. Происходит вход воды в клетку до достижения ее максимального объема.

2. В период 45–60 секунд происходит резкое изменение конформации гема. Мы предполагаем, что за это время происходят следующие процессы: в гипоосмотической среде эритроцит сначала выделяет во внеклеточное пространство ионы против градиента концентрации, снижая тем самым свой объем. После, происходит вход воды в клетку через аквапориновые каналы [33], что является началом увеличения объема клетки.

3. В течении 1–20 минут наблюдается изменение конформации гема и глобина до величины, превышающей исходные значения соотношений (при

отсутствии гипоосмотического воздействия на СЭ). При этом, наиболее чувствительными к входу воды в клетку и увеличению объема являются групповые колебания пиррольных колец в гемопорфирине (I_{1375}/I_{1172}) гема Гб. Отметим, что соотношение I_{1375}/I_{1172} не выходит на плато, а имеет тенденцию к снижению во время всего измерения. Для данного процесса характерно образование пор в мембране и выход Гб_{цп} в экстраклеточную среду.

Для проверки эффекта неспецифического влияния лазера на фотоповреждение клеток и конформацию гема и глобина, мы проводили аналогичный эксперимент с Гб в буфере Аллена. Полученные данные свидетельствуют о том, что на протяжении 90 минут изменения конформации гема и глобина незначительны как в области клетки, подвергшейся освещению, так и в другой точке образца (смещено относительно места регистрации на 2 см, данные не представлены).

Таким образом, конформация гема и глобина СЭ зависит от макромолекулярного окружения, что подтверждает необходимость обсуждения состояния и функции Гб в цитоплазме клетки с помощью модели молекулярного краудинга [39] к рассмотрению протекания процессов даже в таких однородных по компонентам цитоплазмы клеток, как эритроцит, который на 97% внутреннего объема приходится Гб, из которых 72% принадлежит воде [37, 146, 166]. Нами показано, что при переходе из гетерогенной среды (цитоплазма) в гомогенную (раствор), молекулы Гб претерпевают изменения конформации гема и глобина: снижается вероятность нахождения гема в куполообразной конформации и плотность упаковки глобина. При этом, снижение плотности распределения молекул Гб в цитоплазме при входе воды в клетку приводит к изменению конформации гема и глобина. В растворе отсутствуют изменения конформации гема и глобина при изменении доли Гб в пробе (рисунок 56).

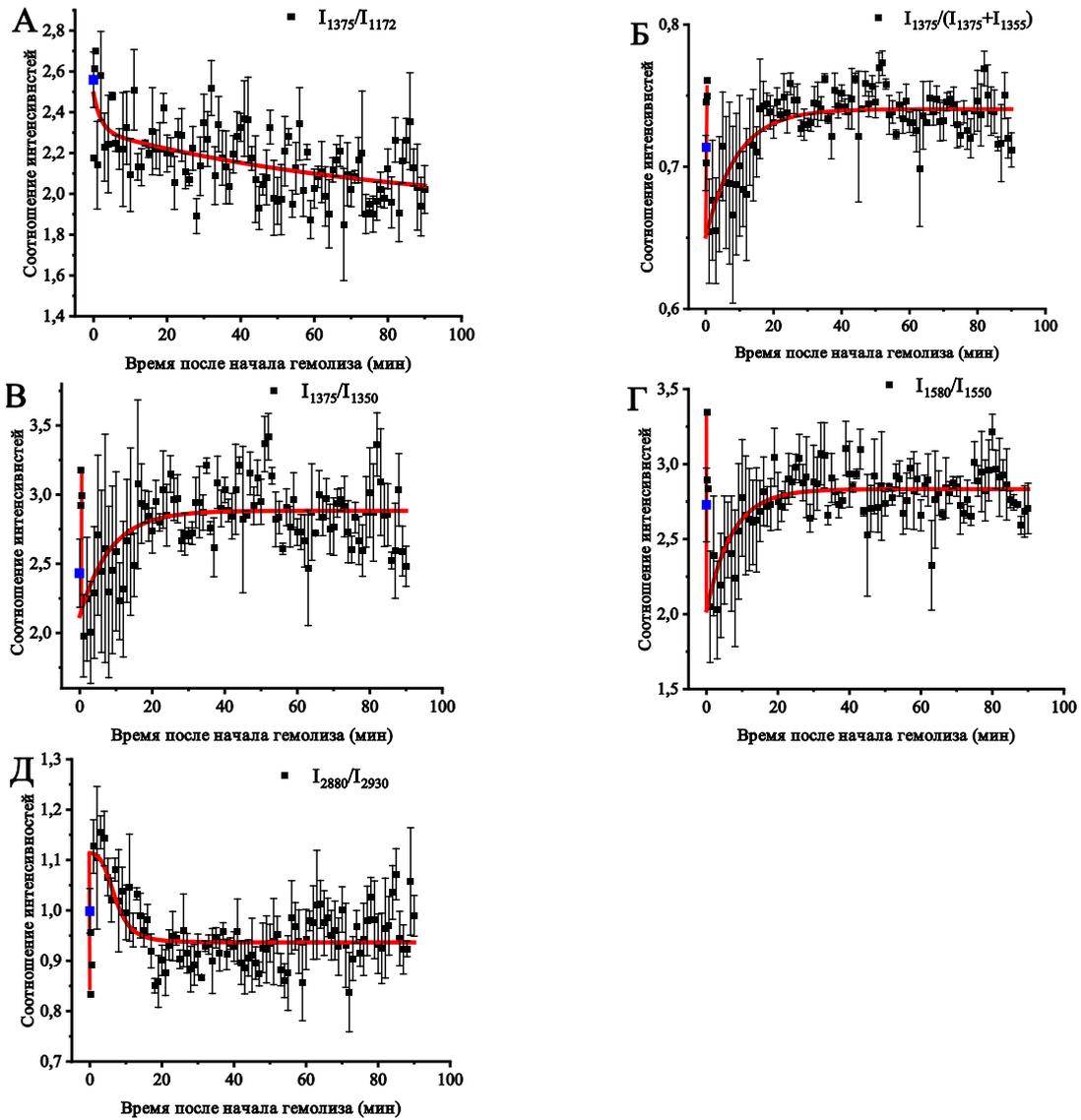


Рисунок 59 — Изменение соотношений пиков КР-спектра, характеризующих изменение конформация гема (А–Г) и плотности упаковки глобина (Д) при инкубации эритроцита в гипоосмотической среде. Данные представлены как усредненная величина \pm SE. Красным обозначена аппроксимирующая кривая, описываемая экспоненциальной функцией на участке 1–90 минут и линейной функцией на участке 0–1 минута. Нулевая точка (до помещения СЭ в гипоосмотическую среду) отмечена синим

3.5. Исследование распределения молекул Гб в эритроците

Известно, что цитоплазма эритроцита представляет собой неомогенную среду, в которой, в основном, распределены молекулы Гб, которые связывают кислород и углекислый газ [79, 94]. Однако, существует предположение, что в цитоплазме клетки молекулы Гб распределены не хаотично, а гетерогенно. Известно, что при старении эритроцитов, Гб_{цп} в большей степени локализован на краях клетки [15, 31], а в условиях дезоксигенации клетки, Гб_{цп} максимально локализован ближе к цитоплазматической поверхности мембраны [331], а Гб_{мс} образует комплекс с БПЗ [320]. Однако, четкие сведения о локализации и перераспределении Гб_{цп} при различных функциональных состояниях эритроцита отсутствуют.

В связи с этим, мы исследовали конформацию и распределение Гб_{цп} в эритроците с помощью методов колебательной спектроскопии (КР–спектроскопия, поляризационная КР–спектроскопия) и оптической микроскопии (ЛИМ, ФКМ).

3.5.1. Изменение распределения молекул Гб_{цп} в эритроците при изменении $[Ca^{2+}]_{out}$

В разделе 3.3, стр. 124 было показано, что при изменении $[Ca^{2+}]_{out}$ в среде инкубации СЭ, отсутствуют изменения морфологии клеток (эритроцит сохраняет дискоцитарную форму), но выявлено перераспределение цитоплазматических структур (молекул Гб) (изменение параметра ОРХцентр/ОРХкрай клетки). В связи с этим, в данной серии экспериментов мы исследовали перераспределение Гб_{цп} с помощью регистрации КР–изображения клетки (по изменению величины интенсивности спектра (параметр коррелирует с различной концентрацией КР–активных веществ — Гб_{цп})), и изменению конформации молекул Гб_{цп} (вклад Гб_{мс} в

общий спектр ничтожно мал, что позволяет его не учитывать; оценить изменение конформации и доли Гб_{мс} возможно при помощи метода ГКР [110]).

Из изменений интенсивности КР–спектра следует, что в центре дискоцита и на внешней части дискоцитарного тора клетки, амплитуда КР менее интенсивна, что указывает на различное содержание молекул Гб в данных областях цитоплазмы клетки (рисунок 60). Важно отметить, что при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ (изменение поверхностного заряда плазматической мембраны клетки), уменьшается амплитуда КР, что указывает на изменение интенсивности сигнала от молекул Гб и может быть связано с изменением конформации (гемолиз эритроцитов отсутствовал). Известно, что в условиях гипоксии или старении эритроцитов, снижается интенсивность КР–сигнала и происходит перераспределение Гб_{ши} к цитоплазматической поверхности мембраны [13, 15, 31, 331]. Вероятно, что изменение поверхностного потенциала эритроцита приводит к перераспределению молекул Гб в цитоплазме эритроцита.

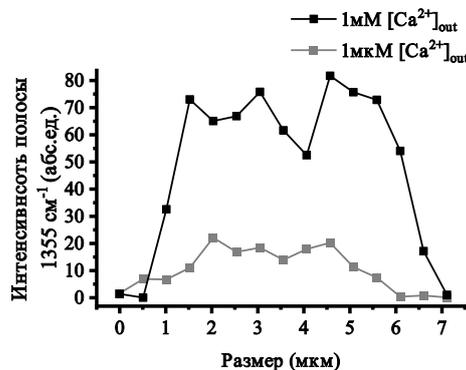


Рисунок 60 — Изменение интенсивности сигнала КР вдоль эритроцита при различных $[Ca^{2+}]_{out}$. Измерение проведено вдоль клетки с шагом 0,625 мкм. Оценку результатов проводили согласно [15]

Для проверки данного предположения, мы исследовали изменение конформации гема и глобина Гб в эритроците при увеличении ζ –потенциала клетки. Нами установлено, что снижение величины $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ (увеличение ζ –потенциала эритроцита с $-15,4 \pm 0,2$ мВ (контроль, 1 мМ) до $-14,5 \pm 0,3$ мВ) приводит к перераспределению молекул Гб_{ши} в клетке при отсутствии изменения её формы и объема (рисунок 61, 37). Действительно, при инкубации СЭ в среде с 1

мМ $[Ca^{2+}]_{out}$ максимальная величина интенсивности сигнала обнаружена ближе к краям клетки, а в среде с 1 мкМ — ближе к центру клетки. При этом, оценивая величины соотношений I_{1580}/I_{1375} , I_{1640}/I_{1375} , I_{2880}/I_{2850} КР спектра, для $\Gamma_{бцп}$ выявлено различное распределение в клетке:

- при 1 мМ $[Ca^{2+}]_{out}$ в центральной области клетки наблюдается большая вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, с низкой плотностью упаковки глобина, в то время, как на краях клетки выше вероятность нахождения гема в «плоской» конформации, с высокой плотностью упаковки глобина.
- при 1 мкМ $[Ca^{2+}]_{out}$, как для центральной области клетки, так и на ее краях характерна одинаковая вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и глобина с высокой плотностью упаковки.

Таким образом, изменение конформации и распределение $\Gamma_{бцп}$ может регулироваться изменением поверхностного потенциала клетки.

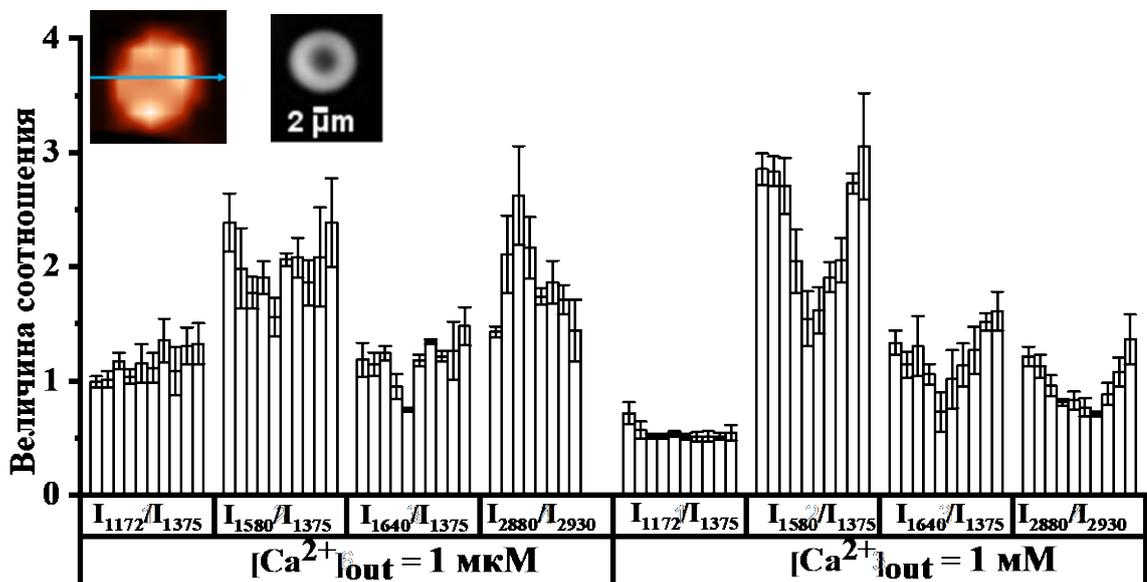


Рисунок 61 — Изменение величины соотношения полос спектра КР, характеризующих конформацию гема и плотности упаковки глобина при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$. Сверху (на вставке) слева на КР-изображении эритроцита стрелкой обозначено направление движения регистратора при измерении КР-сигнала в клетке и изменение распределения ОРХ в клетке (метод ЛИМ). Данные представлены как среднее \pm SE. Измерение проводили с шагом 0,625 мкм при увеличении 40х

Аналогично, при исследовании изменения конформации в различных участках эритроцита с помощью КР–спектроскопии (увеличение объектива 100х позволяет точно снять спектры с различных участков клетки) установлено, что конформация гема и глобина отлична как на различных участках клетки (обозначено как 1, 2, 3 (рисунок 62), так и от конформации Гб_{цп} в СЭ при регистрации сигнала КР с использованием объектива с увеличением 5х. Таким образом, нами получено, что спектр, зарегистрированный со скопления клеток в СЭ отличен от спектра с различных участков клетки.

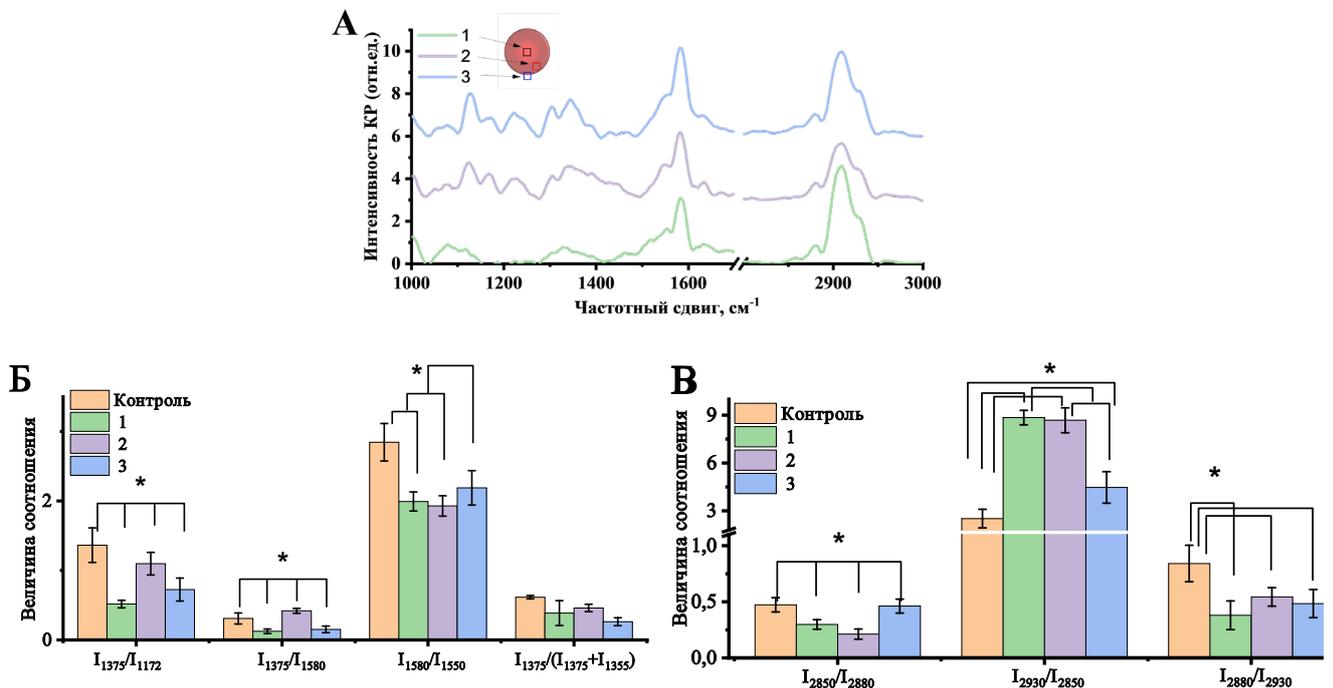


Рисунок 62 — А — КР–спектры, различных участков одиночного эритроцита (увеличение объектива 100х) — центральная область (1, область с минимальным ОРХ,) край клетки (2, область с максимальным ОРХ) и граница клетки (3 область с минимальным ОРХ на внешней стороне клетки), Б — соотношения интенсивностей пиков КР–спектра гема, В — соотношения интенсивностей пиков КР–спектра глобина. В качестве контроля, представлены соотношения интенсивностей пиков КР–спектра того же образца, зарегистрированных при увеличении 5х. Данные представлены как среднее \pm SE (* обозначены статистически значимые различия между измерениями в различных участках клетки относительно контроля ($p < 0,05$))

Установлено, что конформация гема и глобина зависит от места локализации в клетке: в «центральной» части (обозначено как 1, зеленая кривая) клетки и на «внешней» части (обозначено как 3, синяя кривая) (рисунок 62 А) конформация

гема не имеет различий по групповым колебаниям связей полуколец пирролов гемопорфирина (I_{1375}/I_{1172}) и валентным колебаниям пиррольных колец, которые характеризуют вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации (I_{1375}/I_{1580}), но имеют достоверные различия от области между областью 1 и 3 (обозначено как 2, фиолетовая кривая) клетки. Установлено, что увеличение ζ -потенциала сопровождается изменением распределения конформации Гб_{цп} в эритроците: ближе к краю клетки (выпуклая часть тора) снижается вероятность нахождения гема с «плоской» конформацией за счет увеличения вероятной нахождения гема в «куполообразной» конформации в цитоплазме клетки. При этом, вероятно, Гб_{цп} перераспределяется из центральной в примембранную область клетки, о чем свидетельствует изменение интенсивности сигнала КР-спектра. Возможно, что наблюдаемое перераспределение Гб и конформации гема связано с необходимостью компенсации электростатического заряда на внутренней поверхности мембраны, вследствие чего, молекулы Гб локализуются в примембранной области цитоплазмы эритроцита [33, 235, 376], что так же сопровождается изменением плотности упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}) (рисунок 61, 63).

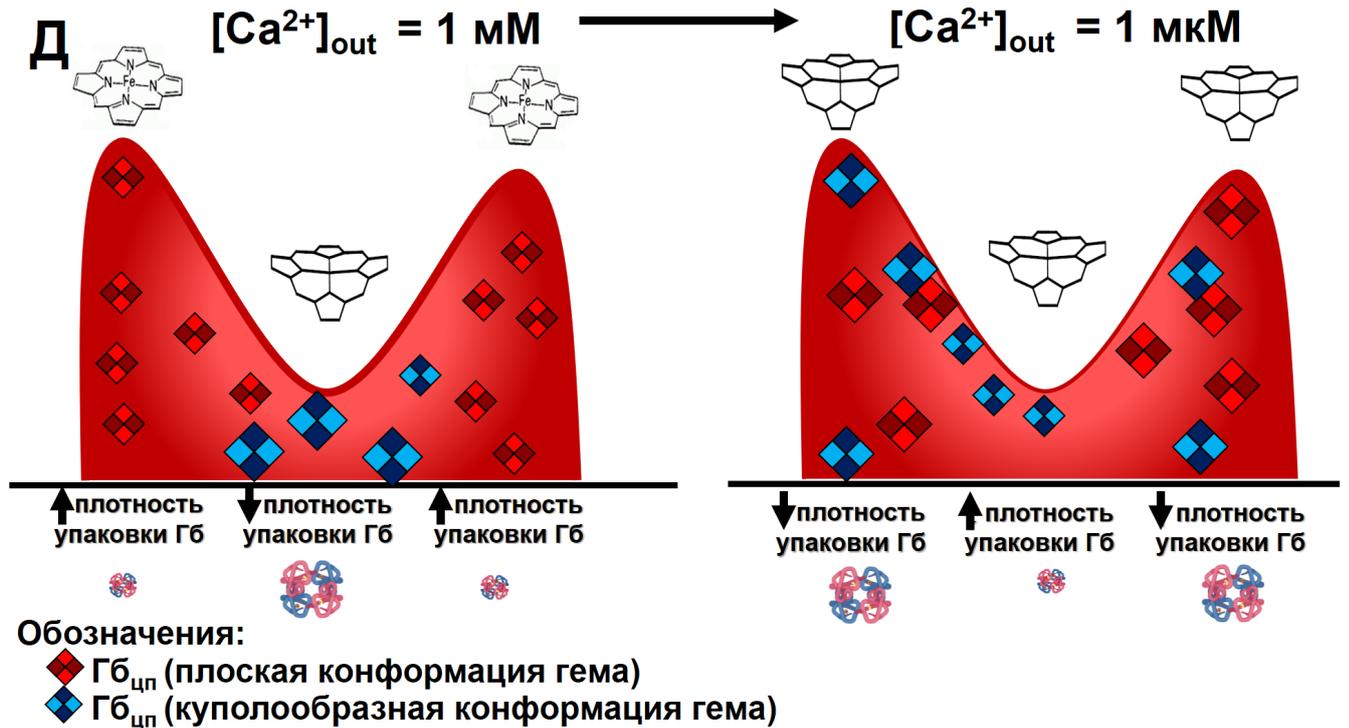


Рисунок 63 — Перераспределение молекул Гб_{цп} в цитоплазме эритроцита при изменении $[Ca^{2+}]_{out}$. Сверху над клеткой указана наиболее вероятная конформация гема Гб_{цп}: в контроле ($[Ca^{2+}]_{out} = 1 \text{ mM}$, ζ -потенциал $-15,3 \text{ мВ}$) в центральной части тора эритроцита выше вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации с плотностью упаковки меньшей, чем на краях тора эритроцита. При увеличении величины ζ -потенциала до $-14,5 \text{ мВ}$ вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации выравнивается по всему объему клетки, что указывает на перераспределение молекул Гб в цитоплазме. Одновременно с этим, зарегистрировано увеличение плотности упаковки глобина в центральной части тора относительно края клетки, что может указывать на образование олигомерных структур и более компактное расположение молекул Гб в центральной части клетки ввиду особенности морфологии двояковогнутого диска (толщина эритроцита в центральной части — $0,8 \text{ мкм}$, на краю — $2,6 \text{ мкм}$ [53])

3.5.2. Исследование изменения ориентации Гб_{цп} при изменении поверхностного потенциала клетки

Известно, что с помощью метода поляризации КР исследуют изменения как конформации, так и упаковки молекул [20, 377]. Мы использовали этот подход для

исследования как для выявления образования комплексов (или олигомеризации) гемоглобина, так и изменения конформации гема и глобина в условиях при снижении $[Ca^{2+}]_{out}$ до 1 мкМ [120, 378]. Поляризация молекул Гб обусловлена тем, что железо–порфириновый комплекс присоединяется к глобину только с помощью имидазола, а содержание низкоспинового Fe (II), делает молекулы Гб диамагнитными [247, 356, 379]. Изменение плоскости поляризации света при регистрации КР сопровождается изменениями соотношения интенсивностей пиков спектра КР Гб, что вызвано различной упорядоченностью (и распределением) Гб внутри клетки. Установлено, что изменения КР–спектра, вызванные увеличением поверхностного потенциала мембраны эритроцита, при перпендикулярной (I_{\perp}) и параллельной (плоско поляризованный свет, I_{\parallel}) поляризации различны. Ранее уже были высказаны предположения о том, что молекулы Гб_{цп} должны иметь упорядоченное распределение в эритроците [115, 116, 120] в связи с тем, что это обеспечивает передачу O₂, а ориентация гема является важным фактором эстафетной передачи O₂ от одной молекулы Гб к другой молекуле Гб в эритроците (при этом, диамагнетизм конфигурации комплекса Гб–O₂ возникает из-за того, что единственный неспаренный электрон на супероксид-радикале кислорода антиферромагнитно выравнивает магнитные моменты с единственным неспаренным электроном железа (состояние d₅, низкий спин). Переход железа в более высокую степень окисления при образовании комплекса Гб–O₂ уменьшает размер атома Fe и позволяет ему перемещаться в плоскость порфиринового кольца гема, вытягивая скоординированный остаток гистидина и инициируя аллостерические изменения, наблюдаемые в субъединицах глобина молекулы Гб [115, 116]. Отметим, что исследования упорядоченности Гб в клетке затруднены отсутствием возможности создать подходящую модель, используя выделенный Гб, который располагается монослоем (и имеет низкую интенсивность плоско перпендикулярной поляризации) [120]. Нами установлено, что при исследовании выделенного Гб с помощью регистрации КР в поляризованном свете интенсивность пиков КР, характеризующих колебания порфиринового макроцикла имеют разную амплитуду, что характерно для групповых колебаний связей

полуколец пирролов гема (I_{1375}/I_{1172} , I_{1580}/I_{1375}) (рисунок 64 А, В). При этом, при увеличении $[Ca^{2+}]$ с 1 мкМ до 1 мМ в среде инкубации выделенного Гб отсутствуют изменения соотношений интенсивностей пиков КР–спектра, что свидетельствует об отсутствии изменений конформации гема и глобина в гомогенной среде и увеличению упорядоченности Гб в цитоплазме клетки.

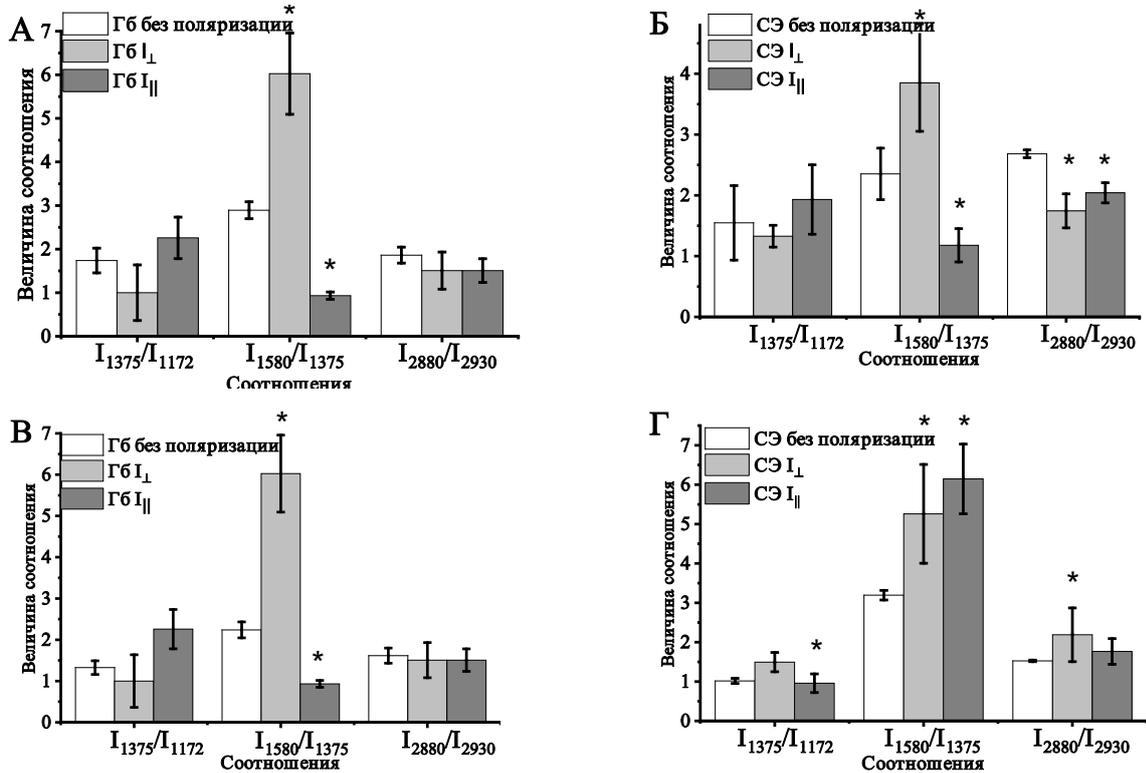


Рисунок 64 — Изменение соотношения интенсивностей пиков КР–спектра в поляризованном свете для: А, В — выделенного Гб с $[Ca^{2+}]_{out}=1$ мМ (А) и 1 мкМ (В), Б, Г — суспензии эритроцитов в буфере Аллена с $[Ca^{2+}]_{out}=1$ мМ (Б) и 1 мкМ (Г). Данные представлены как среднее \pm SE (* обозначены статистически значимые различия между образцами в поляризованном свете относительно образца без поляризации ($p < 0,05$))

Важно, что использование КР для исследования гемоглобина СЭ в поляризованном и неполяризованном свете показало, что в условиях низкой $[Ca^{2+}]_{out}$, у гема цитоплазматического Гб наблюдается различная конформация валентных колебаний винильных групп гема (I_{1580}/I_{1375}), а конформация глобина различна только в случае использования КР с перпендикулярно направленным поляризованным светом (рисунок 64 Б, Г). При $[Ca^{2+}]_{out} = 1$ мМ, достоверно различаются колебания винильных групп и пиррольных колец, а также, плотность

упаковки глобина. Таким образом, при помощи поляризации, удалось выявить наличие различной ориентации Гб_{цп} при изменении ζ-потенциала мембраны. Данный эффект связан с возможностью $[Ca^{2+}]_{in}$ (изменение в ответ на изменение $[Ca^{2+}]_{out}$) активировать ряд АТФаз и, взаимодействуя с кальмодулином, изменять поверхностный потенциал мембраны и конформацию Гб, связываясь с отрицательно заряженными аминокислотными остатками белков и сиаловых кислот на поверхности мембраны [17, 18]. Так же, изменение $[Ca^{2+}]_{out}$ приводит к увеличению величины поверхностного потенциала на 0,9 мВ и мембранного потенциала на 91 мВ (таблица 9), что в свою очередь приводит к изменениям в глобиновой части Гб из-за изменения эффективности взаимодействия глобина со структурами мембраны клетки, например, БПЗ. Таким образом, при помощи поляризации, можно выявить изменения структуры молекул Гб или их олигомеризацию при изменении поверхностного потенциала эритроцита

3.5.3. Исследование распределения цитоплазматического Гб с помощью использования фазово-контрастной микроскопии (3D-микротомография клетки)

В разделе 3.5.1 «Изменение распределения молекул Гб_{цп} в эритроците при изменении $[Ca^{2+}]_{out}$ » (стр. 162) было показано, что изменение поверхностного потенциала клетки сопровождается изменением конформации Гб_{цп} в эритроците, что согласуется с данными, литературы [13, 15, 31, 331]. Однако, отсутствуют данные, которые бы показывали изменение в распределении Гб_{цп}. Нами предложена методика визуализации изменений распределения Гб с помощью фазово-контрастной микроскопии и микротомографии (ФКМ). Данные измерения целесообразны ввиду однородного содержания цитоплазмы эритроцита — 97% белков цитоплазмы приходится на молекулы Гб, при этом, 72% от общего объема клетки принадлежит воде (подробнее — см. раздел 1.3.2 «Роль воды в

функционировании эритроцита», стр. 36) [146]. С помощью ФКМ, нами впервые получено изображение эритроцита (рисунок 65 А). Согласно нашим результатам, полученным в главе 3.5.2 «Исследование изменения ориентации $\Gamma_{\text{цп}}$ при изменении поверхностного потенциала клетки» (стр. 167), в которых представлены данные, свидетельствующие о наличии ориентации в расположении молекул $\Gamma_{\text{б}}$ [40, 120], мы использовали ФКТ в поляризованном свете для выявления гетерогенной (неоднородной) структуры в цитоплазме эритроцита (рисунок 64). Установлено, что при изменении поляризации света изменения интенсивности ОРХ клетки не выявлены, хотя величины ОРХ в плоскополяризованном и перпендикулярнополяризованном свете достоверно отличалось на 15% (рисунок 65 Б) от контроля (интенсивности ОРХ эритроцита без поляризации). При изменении поляризации, в фазовом профиле клетки и её 3D изображении света гетерогенные структуры цитоплазмы (рисунок 65 В), что может указывать на различную ориентацию молекул в цитоплазме эритроцита. Это, также подтверждается 3D-изображением распределения $\Gamma_{\text{цп}}$ в эритроците (рисунок 68–71).

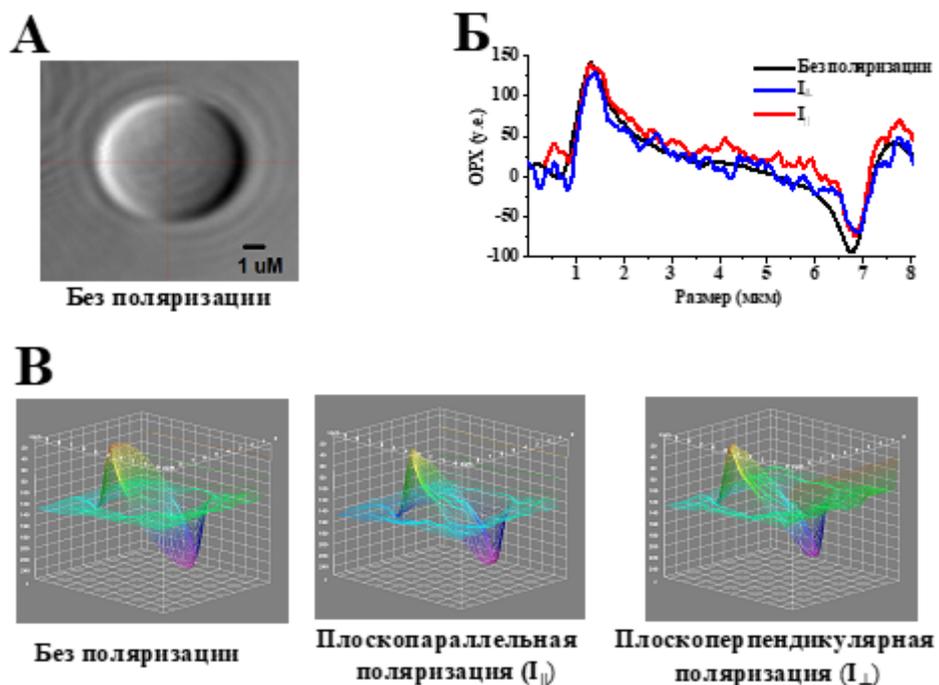


Рисунок 65 — Изменение ОРХ эритроцита, полученного методом фазово-контрастной микроскопии

Ранее в работе (глава 3.1.2 и 3.5.1), было показано, что при изменении ζ -потенциала эритроцита в клетке происходит перераспределение Гб и отсутствуют изменения морфологии клетки.

С помощью метода ФКМ установлено, что в эритроците в течение 20 минут (ограничение по времени вызвано тем, что с увеличением времени регистрации сигнала происходило изменение морфологии эритроцита под воздействием лазера) наблюдаются флуктуации ОРХ, которые могут быть обусловлены перераспределением Гб_{цп} (отметим, что на рисунке 45 отсутствуют изменения конформации Гб на протяжении 30 минут в аналогичных условиях) (рисунок 66). При этом, важно отметить, что динамика изменений величины ОРХ в области вне клетки отличались от изменений ОРХ в эритроците в течение 20 минут регистрации (обозначено как 1 и 2 на рисунке 66). Таким образом, динамика величины ОРХ в клетке (максимальные величины ОРХ составляют от -0,2–1,4), связано с изменением распределения Гб в клетке, которые отличны от флуктуаций в экстраклеточной среде (максимальные величины ОРХ составляют -1,2–0,7, могут быть вызваны тепловым воздействием лазера, флуктуацией клеточных мембран и т.д.).

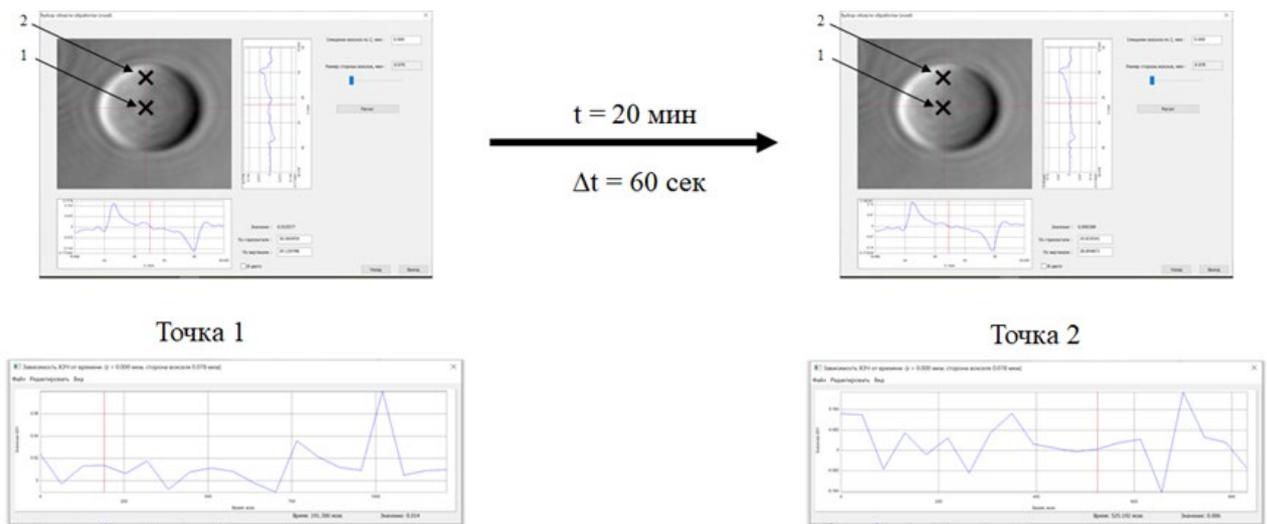


Рисунок 66 — Динамика изменения величины ОРХ Гб в эритроците в течении 20 минут (интервал измерения (шаг) — 1 минута) методом фазово-контрастной микроскопии. На графиках снизу указано изменение интенсивности ОРХ в выбранной точке (номер точки указан на фазово-контрастном изображении эритроцита в верхней части рисунка). Слева представлено изображение эритроцита в начале измерений, справа — через 20 минут после начала измерения

В следующей серии экспериментов исследовали изменения дифференциальных проекций клеточных томограмм с помощью программы 3D Slicer (рисунок 67) [380].

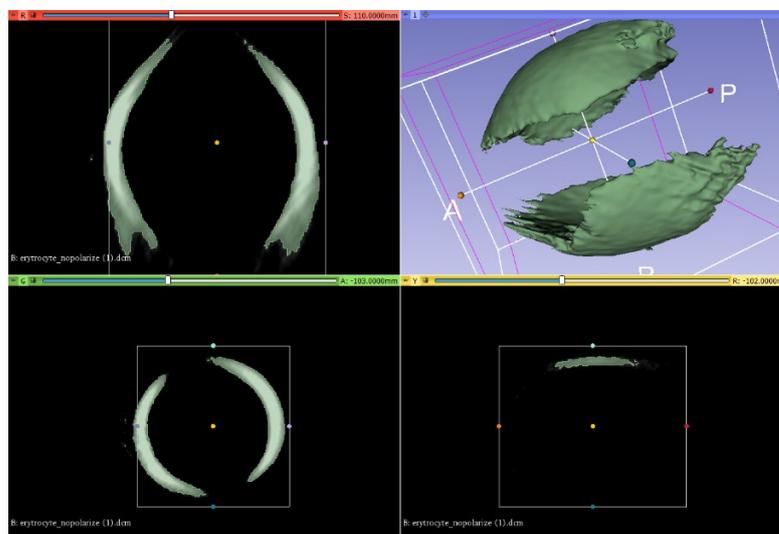


Рисунок 67 — ФКМ–изображение эритроцита (объектива 100x). Зеленым выделены границы клетки, которые обладают наибольшей интенсивностью величины дифференциации (изменение величины производной второго порядка). Центральная область клетки не отображается ввиду особенностей метода (вычисление производной функции второго порядка, т.е. в «пустых» местах внутри эритроцита отсутствуют точки перегиба, и соответственно, не выявлены изменения в распределении Гб в центральной области двояковогнутого диска. При трансформации 2D–изображения в 3D получено изображение в трех проекциях (правый верхний угол), считая из горизонтального, профильного и фронтального изображения (отображены на черно–зеленых изображениях)

Ввиду тороидального строения эритроцитов млекопитающих и отсутствия внутренних структур, при восстановлении 3D–изображения клетки, невозможно отобразить центральную область клетки, в которой отсутствуют точки перегиба (черная область на рисунке 67), необходимые для построения изображения при обработке исходного сигнала производной второго порядка [287]. Мы предполагаем, что таким образом, изменения в центральной части клетки, выявленные ФКМ позволяют оценить возможность образования гетерогенных структур из молекул Гб (комплексов олигомерных структур Гб_{цп}) и увеличения доли Гб_{цп} в примембранной области (например, при изменении поверхностного потенциала эритроцита). После восстановления 3D–изображения выделяли слой с

трехмерной структурой клетки, чтобы избавиться от случайных выбросов, зарегистрированных в растворе.

Согласно полученным 3D–изображениям эритроцита (рисунок 68–71), установлено, что в среде с нормальными физиологическими условиями Гб имеет равномерное (гомогенное) распределение в цитоплазме клетки с небольшими изменениями величины ОРХ (характеризует слабые изменения в точках перегиба кривой распределения Гб) без выявления олигомерных структур (рисунок 68).

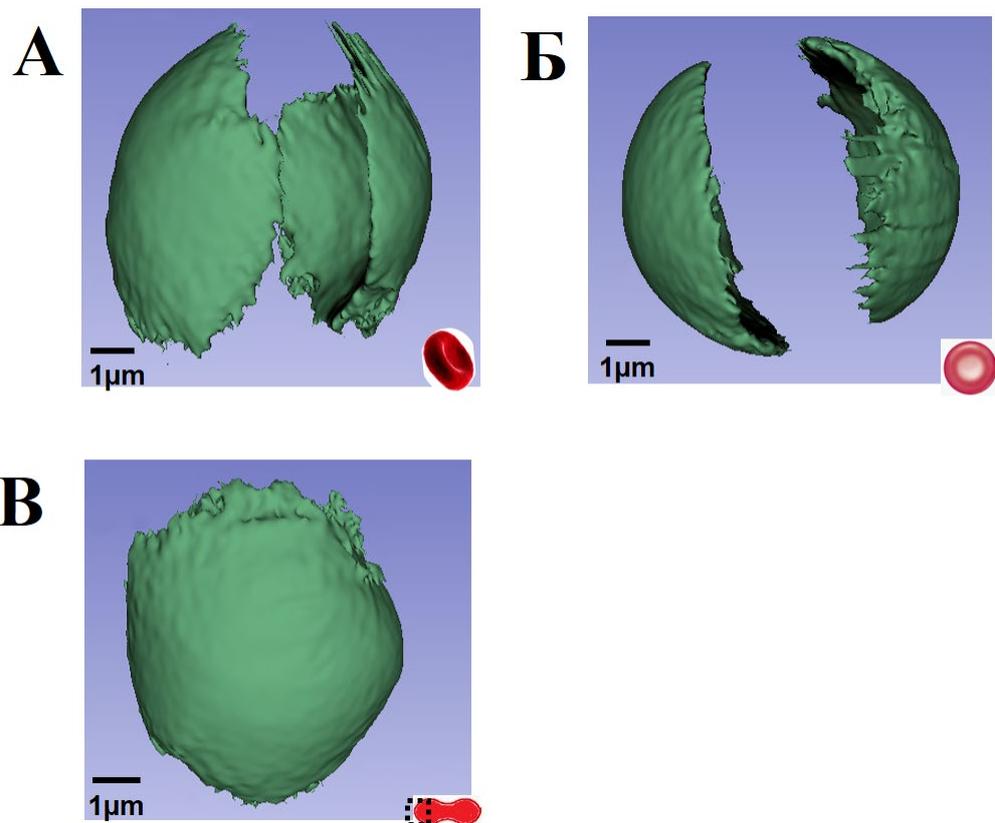


Рисунок 68 — 3D–изображение эритроцита при $[Ca^{2+}]_{out} = 1$ мМ (без поляризации), полученное при восстановлении 2D–проекций в программе 3D Slicer: А — изображение под углом, Б — изображение сбоку, В — изображение сверху

Ввиду того, что конформация гема и глобина различна в плоско и параллельно поляризованном свете, мы использовали поляризацию для выявления изменения распределения Гб_{цп} в зависимости от поляризации света (рисунок 62). Показано, что при плоскопараллельной поляризации распределение Гб, ориентированного вдоль поляризованного света значительно меньше Гб, ориентированного вдоль плоскоперпендикулярного света (рисунок 69, 70). При этом, для Гб, зарегистрированного при плоскоперпендикулярной поляризации

света характерна значительная гетерогенность распределения. Таким образом, нами впервые показано на живых эритроцитах, что в клетках существует не только отчетливое упорядочение гема [40, 120], но и упорядоченное распределение Гб в цитоплазме. Мы предполагаем, что упорядочение гема и Гб является важным фактором механизма передачи молекул O_2 и CO_2 в эритроците [320, 338].

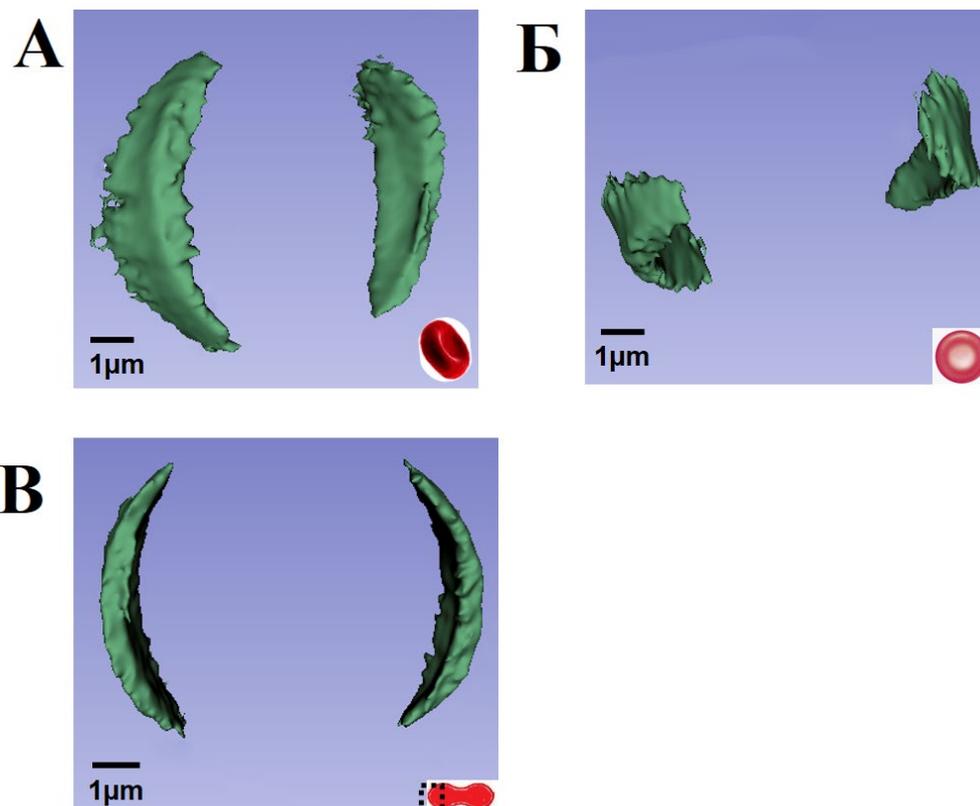


Рисунок 69 — 3D-изображение эритроцита при $[Ca^{2+}]_{out} = 1$ мМ (плоскопараллельная поляризация), полученное при восстановлении 2D-проекций в программе 3D Slicer: А — изображение под углом, Б — изображение сбоку, В — изображение сверху

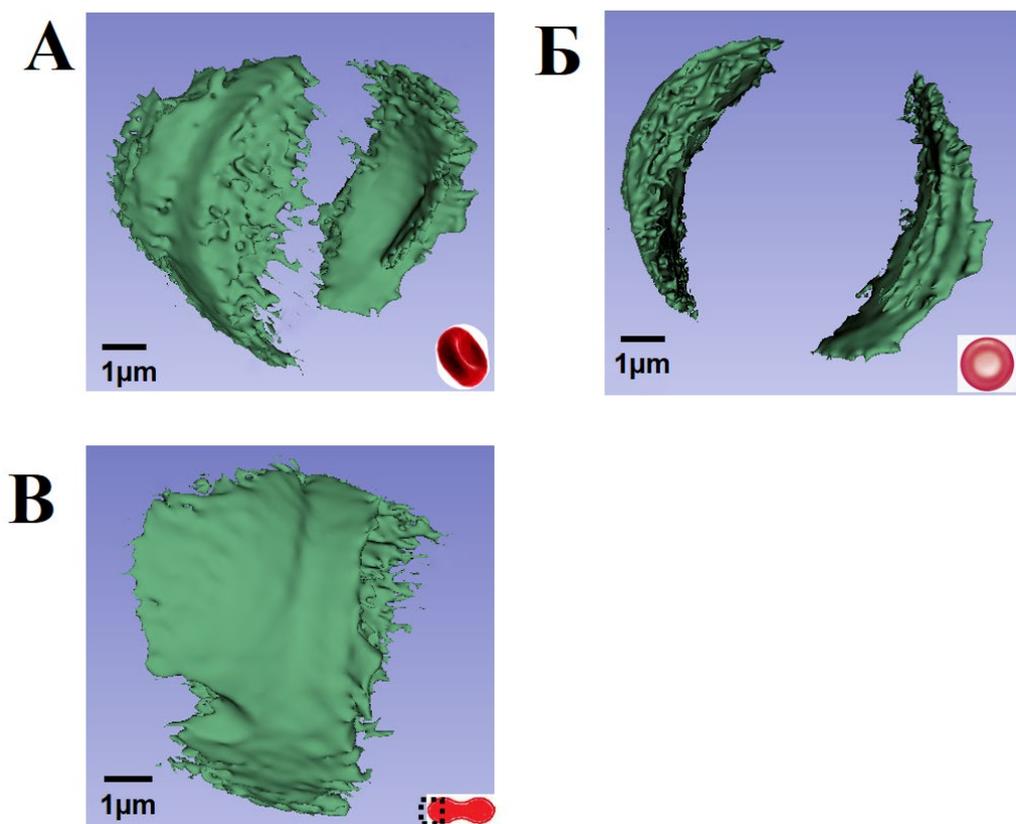


Рисунок 70 — 3D–изображение эритроцита при $[Ca^{2+}]_{out} = 1 \text{ mM}$

(плоскоперпендикулярная поляризация), полученное при восстановлении 2D–проекций в программе 3D Slicer: А — изображение под углом, Б — изображение сбоку, В — изображение сверху

Сравнение 3D–изображений для эритроцитов в среде с $[Ca^{2+}]_{out} = 1 \text{ mM}$ (рисунок 68) и $[Ca^{2+}]_{out} = 1 \text{ мкМ}$ свидетельствует о том, что при увеличении ζ –потенциала до $-14,5 \text{ мВ}$, помимо изменения жесткости мембраны, вызванной десорбцией Ca^{2+} с поверхности мембраны [235], взаимодействия Гб_{мс} с БПЗ [341], меняется распределение Гб в клетке (в цитоплазме и примембранном слое) (рисунок 71). Например, при $[Ca^{2+}]_{out} = 1 \text{ мкМ}$ нами выявлено наличие гетерогенных структур в центральной части эритроцита. При этом, на боковых проекциях клетки выявлены изменения величины производной второго порядка, (изменение ОРХ на рисунках 70 и 71 Б) что указывает на изменение упорядоченности и возможное образование олигомерных структур Гб в цитоплазме эритроцита [15, 118].

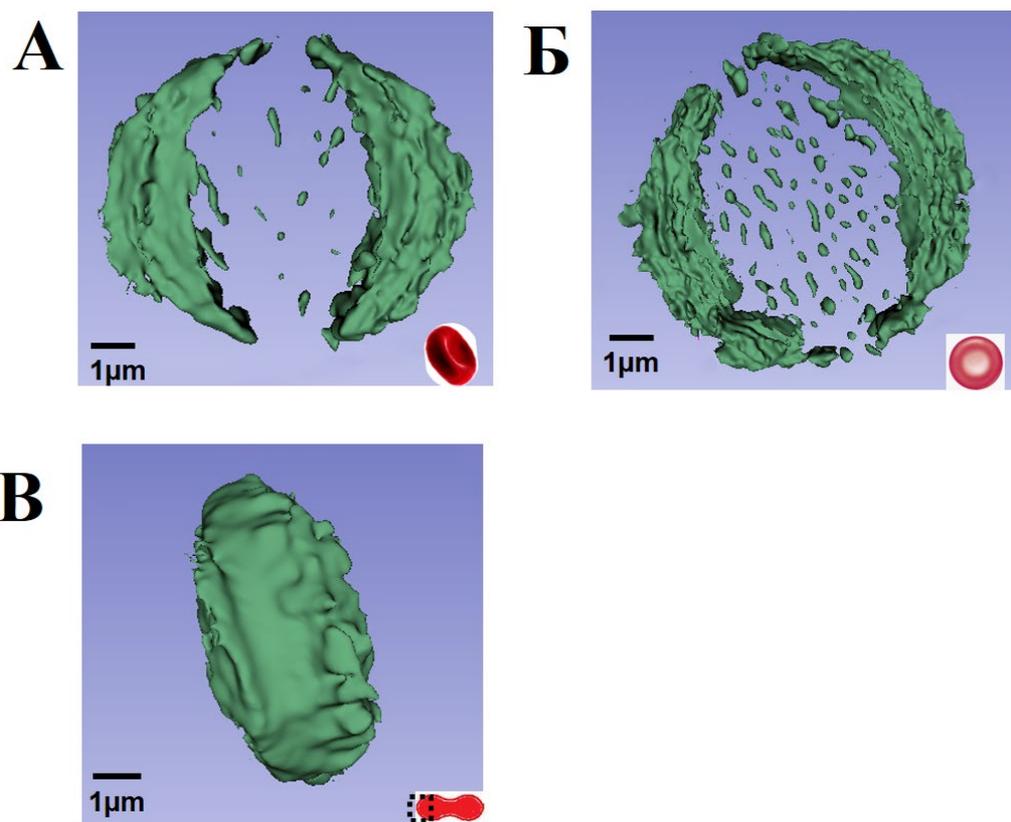


Рисунок 71 — 3D–изображение эритроцита при $[Ca^{2+}]_{out} = 1$ мкМ (без поляризации), полученное при восстановлении 2D–проекций в программе 3D Slicer: А — изображение под углом, Б — изображение сбоку, В — изображение сверху

С помощью восстановленных 3D–изображений фиксированных эритроцитов (инкубация клеток с 0,5% глутаровым альдегидом), установлено, что величина второй производной по распределению ОРХ снизилась. Вероятно, это обусловлено повышением гомогенности цитоплазмы, за счет образования связей между глутаровым альдегидом, аминами и тиоловыми группами молекул Гб (рисунок 68). Наше предположение подтверждается тем, что глутаровый альдегид повышает однородность среды ввиду отсутствия изменений морфологии, не изменяет структуру липидного бислоя мембраны клеток, но увеличивает жесткость мембраны клетки, оказывая влияние на подмембранный цитоскелет [381].

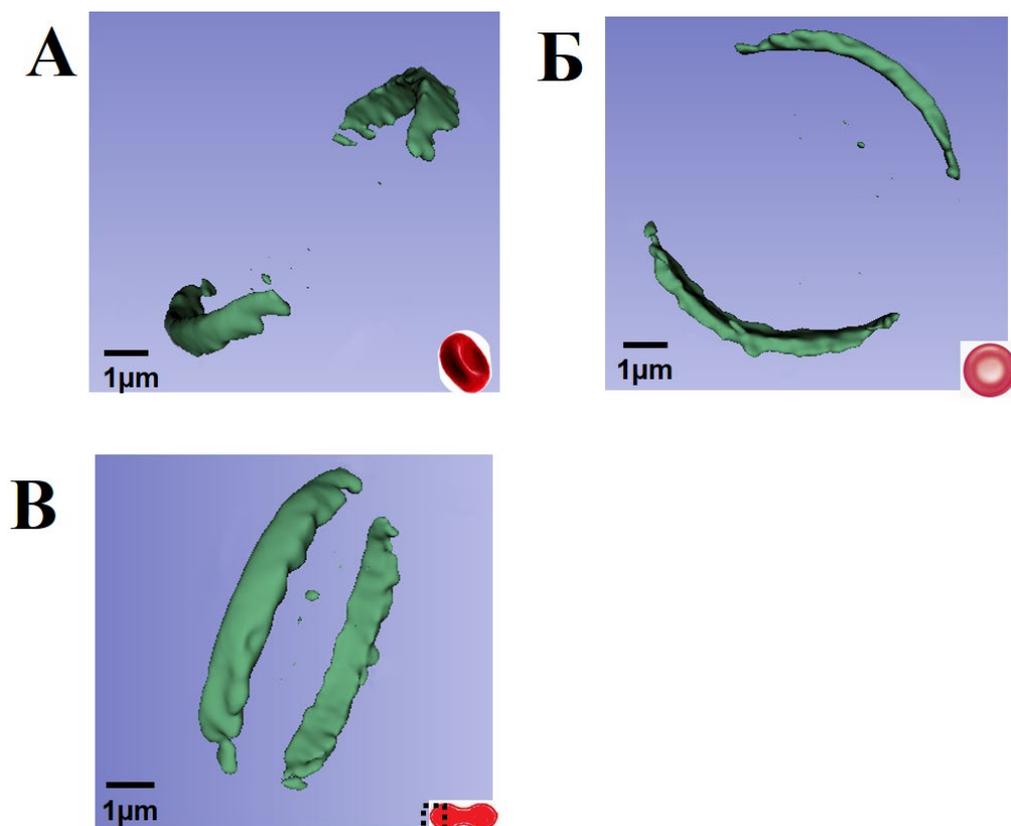


Рисунок 72 — 3D–изображение эритроцита, фиксированного глутаровым альдегидом (без поляризации), полученное при восстановлении 2D–проекций в программе 3D Slicer: А — изображение под углом, Б — изображение сбоку, В — изображение сверху

Таким образом, мы доказали, что изменения производной второго порядка величины ОРХ, выявленные методом ФКМ обусловлены изменениями структуры цитоплазмы при разной величине поверхностного потенциала мембраны клетки. Итак, по изменению производной второго порядка величины ОРХ цитоплазмы эритроцита можно доказать, что распределение молекул в цитоплазме эритроцита гетерогенное за счет формирования олигомерных структуры в ответ на изменения ζ –потенциала. Важно, что распределение Гб в цитоплазме и изменение конформации Гб (как гемовой, так и глобиновой части молекулы) тесно связаны друг с другом и одновременно меняются при различных функциональных состояниях клетки (например, с изменением ζ –потенциала эритроцитарной мембраны). Предполагаемая схема перераспределения Гб_{цп} при изменении поверхностного заряда эритроцита представлена на рисунке 73.

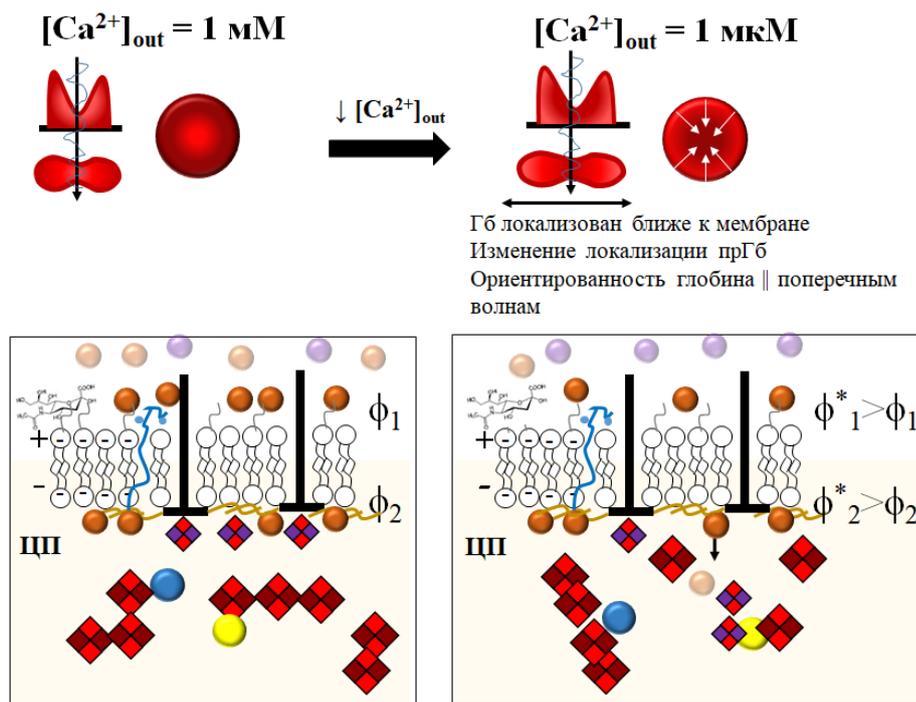


Рисунок 73 — Схема предполагаемого перераспределения и олигомеризации Гб_{цп} при изменении ζ -потенциала эритроцита

3.5.4. Исследование конформации гемоглобина при его олигомеризации

При изменении ζ -потенциала эритроцита, методами ЛИМ и ФКМ было показано, что молекулы Гб перераспределяются внутри эритроцита и образуют олигомерные структуры; методом КР-спектроскопии было показано, что молекулы Гб_{цп} перераспределяются внутри эритроцита и меняют свою конформацию. Для исследования влияния изменения размера молекул Гб на его конформацию использовали соли фосфатов [44]. Согласно концепции Коллинса, противоионы образуют прочную контактную пару только тогда, когда оба иона либо космотропы (малые, слабо поляризуемые ионы с большими гидратными оболочками), либо хаотропы (большие, легко поляризуемые ионы с малыми гидратными оболочками) [382]. Изначально, деление ионов на космотропы (стабилизирует белки и мембраны, имеют высокую плотность заряда) и хаотропы (дестабилизируют белки и мембраны, имеют низкую плотность заряда) основано

на их различном влиянии на гидратирующую способность — то есть, влияние иона на трансляционную подвижность ближайших к нему молекул воды, оказывая стабилизацию или дестабилизацию внутримолекулярных взаимодействий в макромолекулах [383].

С помощью метода фемтосекундной флуоресцентной спектроскопии было доказано, что введение больших концентраций космотропов или хаотропов не влияет на динамику протекания биохимических процессов, оказывая влияние только на величину водородных связей, а выявленные изменения обусловлены особенностями взаимодействия ионов солей с компонентами мембраны клеток или образования ионных взаимодействий с пептидами [384]. К космодромами относятся все ионы с $Z > 1$, а также малые однозарядные ионы, например, цитраты, оксалаты, SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Ca^{2+} [385]. Ввиду того, что в ответ на увеличение количества дГб в клетке, эритроцит выделяет 2,3-БФГ и АТФ в цитоплазму, а также, увеличение АТФ в эритроцитах может быть вызвано такими заболеваниями, как кардиомиопатия, мы использовали соли фосфатов [349, 386, 387]. Таким образом, мы предполагаем, что увеличение концентрации H_2PO_4^- в среде с выделенным Гб будет оказывать влияние на его конформацию, размер и поверхностный заряд.

Установлено, что при увеличении концентрации H_2PO_4^- в среде с выделенным Гб, происходит снижение гидродинамического диаметра белковой глобулы с $7,02 \pm 0,12$ до $4,33 \pm 0,21$ нм при концентрациях H_2PO_4^- более 0,8 М (рисунок 74). При этом, в диапазоне 0,2–0,6 М H_2PO_4^- отсутствуют статистически значимые различия между величиной ζ -потенциала Гб, а более значительное снижение величины диаметра Гб коррелируют с увеличением величины ζ -потенциала вплоть до величин, для которых характерна высокая агрегация молекул [234].

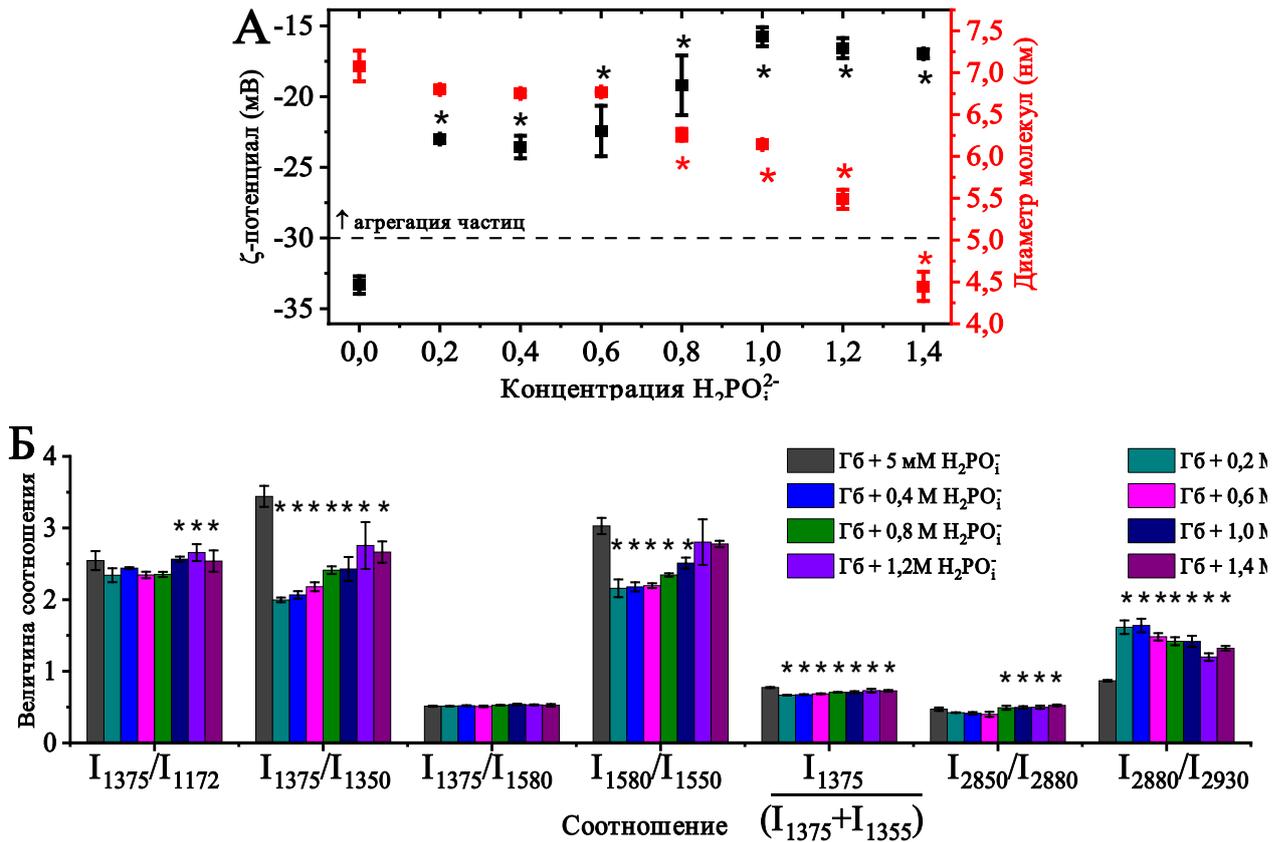


Рисунок 74 — А — Изменение величины поверхностного потенциала (обозначено черным) и диаметра выделенного Гб; соотношения интенсивностей пиков КР-спектра выделенного Гб при изменении концентрации H₂PO₄⁻ в среде с 0 до 1,4 М (* обозначено статистически значимые различия от пробы Гб с 5 мМ H₂PO₄⁻ (p < 0,05))

Установлено, что при наличии в среде инкубации H₂PO₄⁻ наблюдается изменение величины соотношений I₁₃₇₅/I₁₃₅₀ и I₁₅₈₀/I₁₅₅₀, которые характеризуют изменение колебаний связей пиррольных и вильных групп. При этом, дальнейшее увеличение концентрации H₂PO₄⁻ приводит к изменению конформации гема в исходное состояние, что, вероятно, может быть вызвано снижением плотности упаковки глобина (для 0,8–1,4 М H₂PO₄), которое оказывает влияние на конформацию гема. Вероятно, при увеличении величины H₂PO₄⁻ до 0,2 мМ, когда величина ζ-потенциала увеличивается до -23 мВ (величина меньше |± 30 мВ| характеризует образование комплексов в системе [234]), в среде возрастает количество комплексов молекул Гб размером 270–380 нм (53 ± 5%) (на рисунке 71 представлено изменение размера отдельных молекул Гб). При дальнейшем увеличении концентрации H₂PO₄⁻ до 0,8 М, доля комплексов Гб с характерным

размером 270–380 нм составляет $88 \pm 7\%$. При концентрациях H_2PO_4^- выше 1,0 М, образуются комплексы Гб с характерным размером 1950–4190 нм ($70 \pm 10\%$), 405–478 нм (12–24%). Сопоставление полученных данных свидетельствует о том, что КР–спектр (параметр I_{2850}/I_{2880}) зависит от размера молекулы Гб, а изменения параметра I_{2930}/I_{2850} коррелируют с изменением величины ζ –потенциала и плотности упаковки глобина, а также, расстоянием между молекулами глобина.

3.6. Изменение конформации гемоглобина в эритроцитах при ИЛГ

Известно, что идиопатическая легочная гипертензия (ИЛГ), характеризуется состоянием гипоксии. Заболевание ИЛГ — редкая форма легочной гипертензии с неустановленной этиологией, и сложным патогенезом. ИЛГ характеризуется выраженным повышением общего легочного сосудистого сопротивления и давления в легочной артерии (ЛА), с развитием декомпенсации правого желудочка (ПЖ) и отсутствием явных изменений биохимических и гематологических параметров кровеносной системы [204, 388].

Цель данного этапа работы состояла в изучении конформационных изменений гема и плотности упаковки глобина Гб в эритроцитах цельной крови и СЭ у доноров с ИЛГ разного функционального класса (ФК).

3.6.1. Исследование влияния ИЛГ на конформацию гема и глобина эритроцита

В разделе 3.1 «Влияние парциального давления кислорода на конформацию гемоглобина» (стр. 92) было показано, что при снижении pO_2 до 2 мм рт.ст., для эритроцитов характерно увеличение ζ -потенциала клетки на 1,5 мВ. Нами установлено, что величина ζ -потенциала СЭ доноров с подтвержденным ИЛГ (далее, для удобства будем обозначать пробы, принадлежащие группе доноров, с подтвержденным диагнозом ИЛГ согласно сбору данных для формирования анамнеза, оценку симптомов и синдромов, осмотра и инструментального обследования [215], (подробнее — см. главу 2 «Материалы и методы» раздел 2.2 «Объект исследования», стр. 46), как «ИЛГ») и контрольной группы здоровых доноров (далее, будем обозначать как «контроль») имеет статистически значимые различия: величина ζ -потенциала СЭ ИЛГ составляет $-12,3 \pm 0,3$ мВ в то время, как

в контроле — $-18,4 \pm 0,6$ мВ. Вероятно, тот факт, что для СЭ пациентов при ИЛГ выявлены изменения ζ -потенциала (по сравнению с контролем), обусловлен изменениями в плазматической мембране эритроцита, характерной для ИЛГ. Отметим, что при ИЛГ, так же, выявлены молекулярные изменения Гб: диаметр выделенных молекул Гб больше для группы ИЛГ относительно контроля, но оба образца не образуют олигомерных комплексов (величина ζ -потенциала контроля составляет $-35,9 \pm 0,4$ мВ, ИЛГ — $-33,1 \pm 0,6$ мВ) (таблица 11) [234, 235].

Таблица 11 — Характеристики СЭ и выделенного Гб эритроцитов пациентов с ИЛГ (* обозначены статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$))

Параметр	Образец			
	СЭ		Выделенный Гб	
	Контроль	ИЛГ	контроль	ИЛГ
Диаметр молекул, нм	—	—	$6,61 \pm 0,06$	$6,88 \pm 0,13$ *
ζ -потенциал клетки, мВ	$-18,4 \pm 0,6$	$-12,3 \pm 0,3$ *	—	—
Подвижность молекул	—	—	Высокая [234, 235]	

Известно, что важную роль в патогенезе ИЛГ играет гипоксия, за счет снижения сердечного выброса и нарушения переноса O_2 в ткани [389, 390]. Мы предполагаем, что изменения кислород-транспортной функции эритроцитов при ИЛГ, обусловлена изменением конформации гема и глобина Гб, что может быть одним из основных факторов заболевания. Так же, мы предполагаем, что увеличение жесткости мембраны при ИЛГ (согласно исследованиям методом АСМ), вызывает изменения в цепочке последовательных процессов при $R \rightarrow T$ переходе гема внутриклеточного Гб. Отметим, что ранее, были опубликованы результаты, полученные на СЭ [32, 391, 392].

Методом КР-спектроскопии нами установлено, что для цельной крови пациентов с ИЛГ характерны следующие изменения: высокоамплитудные значения максимумов полос при $1355, 1550, 1600 \text{ см}^{-1}$ и снижение амплитуды валентных колебаний аминокислот глобина ($2800\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$) (рисунок 75 А).

Установлено, что для спектра КР СЭ характерна большая интенсивность полос при 1355, 1550 см^{-1} и снижение амплитуды валентных колебаний аминокислот глобина (рисунок 75 Б). Отметим, что у выделенного Гб отличия в КР-спектре и соотношений интенсивностей пиков КР-спектра не выявлено (рисунок 75 В). Таким образом, для внутриклеточного Гб эритроцитов пациентов с ИЛГ характерна большая вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, характерной для дезоксиформы Гб, а изменения конформации связаны с изменениями порфиринового макроцикла гемопорфирина.

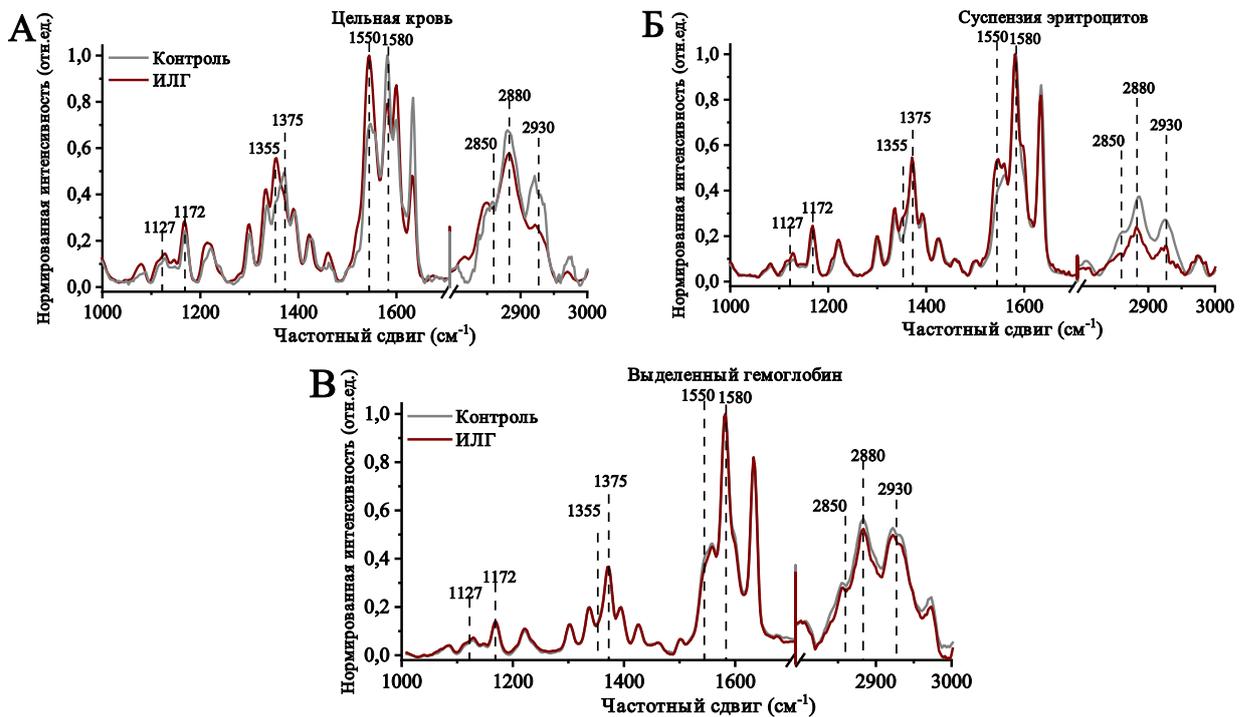


Рисунок 75 — КР-спектры (1000–3000 см^{-1}) здоровых доноров (контроль, черная кривая) и доноров с подтвержденным ИЛГ (ИЛГ, красная кривая): А — цельная кровь, Б — СЭ, В — выделенный Гб. Представленные спектры нормированы на максимум интенсивности полос спектра. Пояснения в тексте

Анализ соотношений интенсивностей пиков КР-спектра Гб из кубитальной вены (КВ) не выявил изменений в конформации гема, вклада пиррольных колец (I_{1580}/I_{1375}) для образцов цельной крови, что выявлено в СЭ. Вероятно, это свидетельствует о влиянии компонентов плазмы (например, D-димер) на состояние и конформации Гб в клетке (например, вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации) (рисунок 76). Отметим, что нами были выявлены изменения в соотношении интенсивностей пиков КР-спектра I_{1618}/I_{1580}

(характеризуют относительное число комплексов Гб с NO_x [124]), но данное соотношение не будет анализироваться в данной работе в связи с использованием пациентами азот-содержащих вазорелаксантов перед забором крови [204, 393]. Помимо изменений конформации пиррольных колец гема Гб в цельной крови (величина соотношения амплитуд данных полос спектра КР, $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$), нами выявлены отличия в соотношениях амплитуд полос спектра КР, характеризующих колебания боковых $-\text{CH}_3$ радикалов (I_{1375}/I_{1172}). Установлено, что в цельной крови у пациентов отсутствуют изменения в конформации пиррольных колец (I_{1580}/I_{1375}), которые наблюдаются в СЭ. Вероятно, этот факт свидетельствует об изменении конформации гема от «плоской» к «куполообразной» при ИЛГ.

Для образцов цельной крови и СЭ характерны отличия между валентными колебаниями винильных колец гема (I_{1580}/I_{1550}), а для глобина Гб пациентов с ИЛГ характерна более плотная упаковка (I_{2880}/I_{2930}) в цельной крови и менее плотная у СЭ (рисунок 76). Мы предполагаем, что изменения плотности упаковки глобина могут быть вызваны высоким содержанием в плазме крови пациентов с ИЛГ D-димера [202–204, 393, 394], которое коррелирует с изменением плотности упаковки глобина (высокая корреляция с прямой связью ($r \geq 0,7$) с величиной соотношения I_{2880}/I_{2930} , I_{1580}/I_{1550} , I_{1580}/I_{1375} , $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$, I_{1375}/I_{1172}).

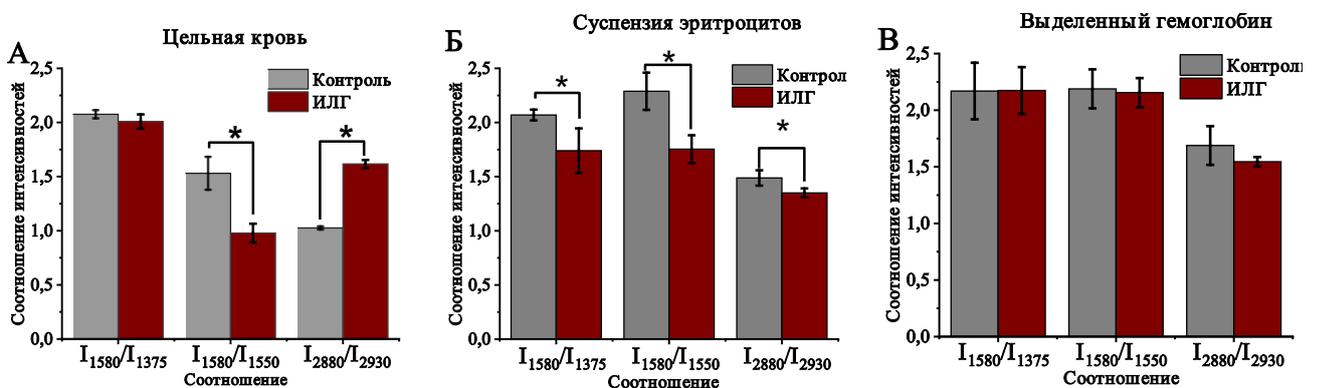


Рисунок 76 — Изменение соотношения интенсивностей пиков КР–спектра здоровых доноров (контроль, серые столбцы) и доноров с подтвержденным ИЛГ (красные столбцы) для:

А — цельная кровь, Б — СЭ, В — выделенный Гб (* обозначены статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$))

Отметим, что для образцов ИЛГ выделенного Гб наблюдается тенденция к снижению плотности упаковки у ИЛГ, что согласуется с данными изменения диаметра Гб (рисунок 74 В, таблица 11). Установлено, что конформация Гб_{мс} меняется при патологии: глобин Гб при ИЛГ имеет менее плотную упаковку (I_{2880}/I_{2930}), а также, большее количество молекул Гб характеризуется «куполообразной» конформацией гема (I_{1580}/I_{1550}). Вероятно, относительное число комплексов гемоглобина с лигандами в пробах достоверно не различимо ($I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$). Отметим, что для конформации ИЛГ Гб_{мс}, характерно увеличение вклада симметричных колебаний пиррольных колец в гемопорфирине (I_{1375}/I_{1172}), чего не наблюдалось в геме Гб_{цп}. Важно, что групповые колебания полуколец пиррола гемопорфирина (I_{1375}/I_{1172}) и плотность упаковки белка (I_{2850}/I_{2880}) при ИЛГ не меняются как для Гб_{цп}, так и для Гб_{мс} (Рисунок 76 Б, 77).

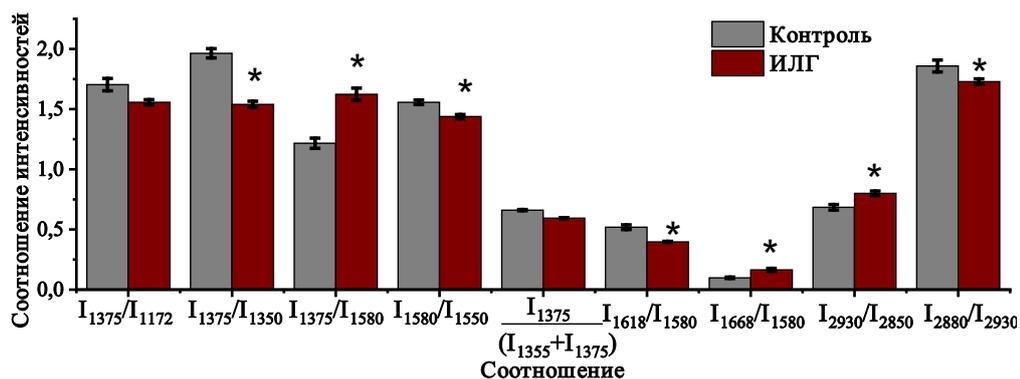


Рисунок 77 — Изменения соотношения величины пиков ГКР-спектра Гб_{мс} СЭ здоровых доноров (контроль, серые столбцы) и доноров с подтвержденным ИЛГ (красные столбцы) при насыщении проб кислородом (* обозначены статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$))

Таким образом, вероятно, что более плотная упаковка глобина Гб пациентов с ИЛГ связана с большей плотностью распределения Гб у внутренней поверхности мембраны в ответ на изменение поверхностного потенциала мембраны до $-18,4 \pm 0,6$ - $-12,3 \pm 0,3$ мВ. (это подтверждается аналогичными изменениями, показанными нами в главе 3.1 «Влияние парциального давления кислорода на конформацию гемоглобина», стр. 92). Так же, выявленное изменение конформации гема Гб

больных может быть обусловлено и воздействием на клетку увеличения при патологии ряда компонентов плазмы крови.

3.6.2. Исследование изменения гем–глобиновых взаимодействий в Гб при ИЛГ

Ранее, нами было показано, что при изменении pO_2 в пробах с СЭ и выделенным Гб происходит изменение конформации гема и глобина (глава 3.1.4 «Парциальное давление кислорода как фактор регуляции конформации гемоглобина», стр. 103) [43]. Известно, что величины sO_2 в пробах цельной крови пациентов с ИЛГ соответствуют значениям соответствующим линейному участку S–образной кривой насыщения Бора [395]. Нами установлено, что при сравнении изменений соотношений интенсивностей пиков КР–спектра для гема и глобина Гб в зависимости от sO_2 для СЭ контрольной группы и эритроцитов цельной крови пациентов с ИЛГ изменения конформации гема и глобина эритроцитов при ИЛГ различны (рисунок 78). Установлено, что помимо статистически значимой разницы между величинами соотношения, величина тангенса угла наклона аппроксимирующей кривой в контроле отличаются почти в два раза (0,0023 и -0,0027 для контроля; 0,0042 и -0,0043 для ИЛГ соответственно) от эритроцитов ИЛГ: Гб контрольной группы «более чувствительный» к изменению sO_2 , чем Гб при ИЛГ. Вероятно, помимо снижения sO_2 в кровеносном русле, при патологии происходят изменения метаболизма эритроцитов (увеличение синтеза 2,3–БФГ в ответ на условия гипоксии) [325, 387]).

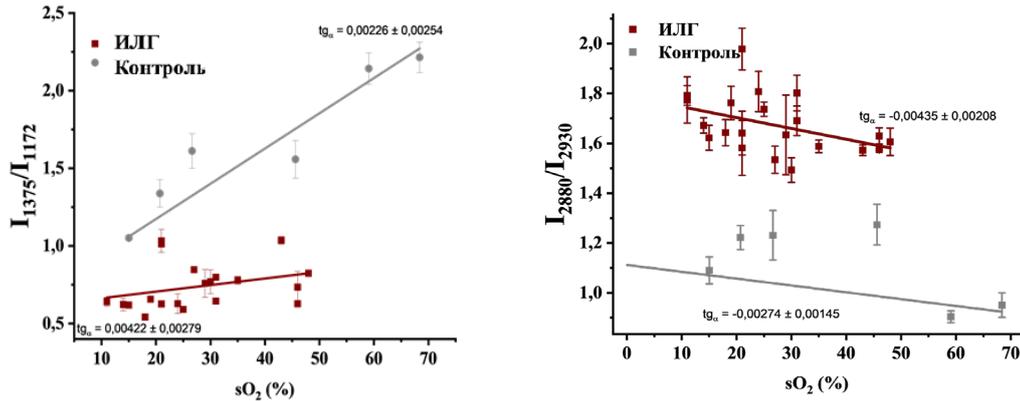


Рисунок 78 — Зависимость изменения соотношений интенсивностей пиков КР–спектра Гб от парциального давления (sO_2) в цельной крови. А — конформация пиррольных колец гема, Б — плотность упаковки глобина. Аппроксимация выполнена линейными функциями

Проведенное нами сопоставление изменений конформации гема (отношение 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 контрольной группы и пациентов с ИЛГ изменения упаковки глобина и конформации гема имеет разнонаправленную корреляцию (рисунок 79); при аппроксимации зависимости изменений конформации гема от плотности упаковки глобина, тангенс угла наклона аппроксимирующей кривой составил $-0,17 \pm 0,26$, а для ИЛГ $0,41 \pm 0,14$). Таким образом, в контрольной группе, увеличение плотности упаковки глобина коррелирует со снижением вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации, а для группы с ИЛГ наоборот, увеличение плотности упаковки коррелирует с увеличением вероятности нахождения гема в «куполообразной» форме.

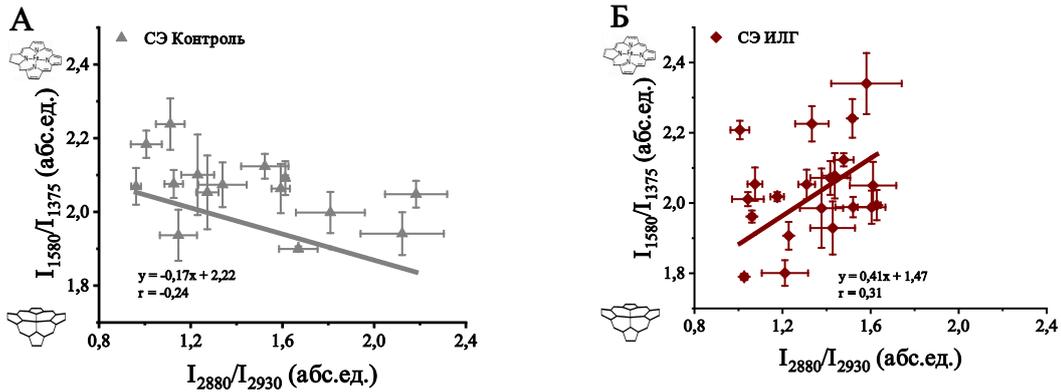


Рисунок 79 — Зависимость изменения величины соотношения интенсивностей пиков КР–спектра I_{1580}/I_{1375} (характеризует вероятность реализации «куполообразной» конформации гема) относительно изменения I_{2880}/I_{2930} (характеризует плотность упаковки глобина). А — здоровые доноры, Б — доноры с подтвержденным ИЛГ. Аппроксимация выполнена линейными функциями. На оси ординат указано схематичное изображение изменения конформации гема при изменении величины параметра (соотношение пиков КР–спектра I_{1580}/I_{1375} характеризует вклад валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец. При увеличении параметра, возрастает относительная способность Гб выделять лиганды (в том числе, O_2); соотношение пиков КР–спектра I_{2880}/I_{2930} характеризует вклад несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот глобина по отношению к колебанию концевых метильных радикалов. Увеличение параметра свидетельствует об увеличении упорядоченности CH_n –групп аминокислот)

Таким образом, доказано, что при патологии, в условиях, при которых наблюдается увеличение вероятности локализации Гб в примембранной области (для стабилизации мембранного цитоскелета, а так же, связыванию молекул дГб с белком полосы 3 [118]), возрастает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации, а глобин имеет менее плотную упаковку относительно контроля. Вероятно, все это является причиной снижения относительной способности связываться с лигандами (в том числе, O_2 , снижение величины соотношения интенсивностей пиков КР–спектра I_{1580}/I_{1375} для ИЛГ [120]). Возможно, что изменения конформации как гема, так и глобина Гб могут быть вызваны изменениями на поверхности мембраны клетки, ввиду разного заряда плазматической мембраны эритроцита в условиях гипоксии и нормоксии [42].

Итак, в норме (контрольная группа), вероятность нахождения гема в «куполообразной» форме коррелирует с увеличением плотности упаковки глобина, а в ИЛГ наоборот, коррелирует со снижением плотности упаковки глобина.

3.6.3. Оценка конформационных изменений гема в зависимости от функционального класса заболевания

При движении по кровеносному руслу, эритроцит испытывает разные физиологические воздействия. Так, в легочной артерии (ЛА), происходит активное насыщение крови кислородом. При этом, для ИЛГ характерно увеличение давления в ЛА («золотой стандарт» при определении патологии), что в свою очередь приводит к дисфункции и развитию недостаточности правого желудочка (ПЖ), которая приводит к неблагоприятному исходу в патогенезе болезни [206]. Помимо увеличения давления в ЛА, наблюдается увеличение окисления жирных кислот [396], которое может оказывать существенное влияние на интенсивность колебаний полос в высокочастотной области спектра ($2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$). Энергетическое истощение ПЖ обусловлено переходом на анаэробный метаболизм глюкозы, в результате чего, для увеличения генерации АТФ увеличивается поглощение глюкозы ПЖ [397].

В связи с этим, мы предполагаем, что конформация гема и глобина эритроцитов цельной крови и СЭ будет различна в КВ, ЛА, ПП и ПЖ в связи с различным pO_2 в месте кровеносного русла из которого было проведен забор крови (для ПП и ПЖ характерно снижение pO_2 ; для КВ характерно pO_2 около 40 мм рт.ст.; для ЛА характерно pO_2 около 60 мм рт.ст.) [5, 47].

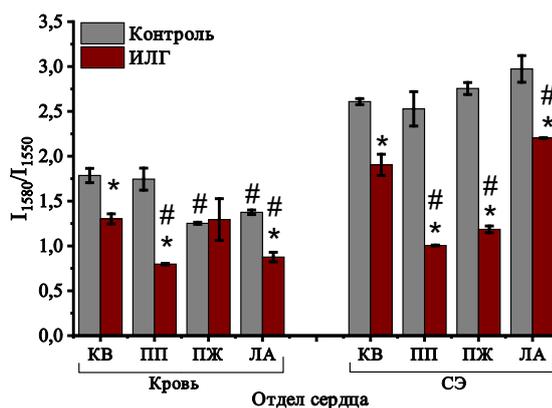


Рисунок 80 — Изменение соотношения интенсивностей пиков КР–спектра здоровых доноров (серый столбец) и доноров с подтвержденным ИЛГ (красный столбец) образцов цельной крови и СЭ из кубитальной вены (КВ), разных отделов сердца (ПП — правое предсердие, ПЖ — правый желудочек) и легочной артерии (ЛА) (* обозначены статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ, # обозначены статистически значимые различия между отделами сердца и ЛА относительно КВ ($p < 0,05$)).

Установлено, что (рисунок 80), для эритроцитов цельной крови пациентов с подтвержденным ИЛГ, вклад групповых колебаний связей полуколец пирролов (I_{1375}/I_{1172}) и валентных колебаний метиновых мостиков (I_{1580}/I_{1550}) не меняются в ПП, ПЖ и ЛА относительно КВ. При этом, для КВ характерна большая амплитуда интенсивности колебаний связей пиррольных колец ($I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$), что вероятно, свидетельствует об увеличении относительной способности Гб выделять лиганды (в том числе O_2) и снижении вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации. При этом, сродство к O_2 (параметр КР спектра — I_{1375}/I_{1580}) отличалось в ПП, что указывает на большую вероятность нахождения гема в «куполообразной» форме относительно КВ. Относительное число комплексов гемоглобина с NO_x в ПП, ПЖ, ЛА не отличались друг от друга, но существенно отличалось от КВ (увеличение величины соотношения I_{1618}/I_{1580}). Повышение вероятности нахождения Гб R–форме в ПП обусловлено, вероятно, его ролью в кровообращении — ПП получает венозную (дезоксигенированную) кровь из нижних и верхних полых вен [398]. Важно отметить, что для контрольной группы, статистически значимых различий между конформацией в отделах сердца и ЛА от КВ не выявлено.

Отметим, что для обеих групп характерен низкий разброс по величинам соотношений вне зависимости от степени тяжести (другими словами, функционального класса, ФК) заболевания ИЛГ, что может указывать на перераспределение молекул Гб в цитоплазме эритроцита при повышенной оксигенации крови в связи с изменением pO_2 , температуры и сродством Гб_{мс} с БПЗ [61, 227, 334]. Доказательством нашего предположения служит то, что, при насыщении пробы СЭ контрольной группы и ИЛГ атмосферным кислородом, отсутствовали статистически значимые различия между конформацией гема и глобина в СЭ (рисунок 81).

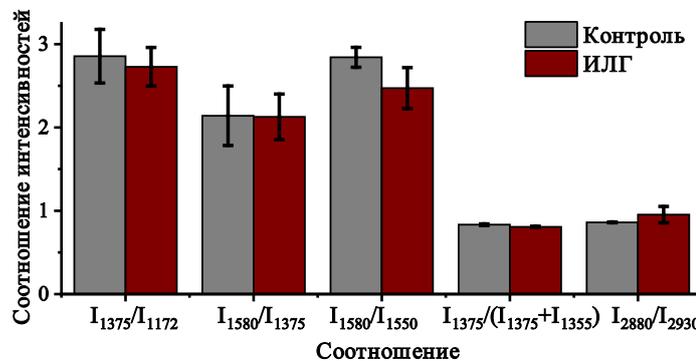


Рисунок 81 — Соотношение интенсивностей пиков КР-спектра СЭ здоровых доноров (контроль, серые столбцы) и доноров с подтвержденным ИЛГ (красные столбцы) при насыщении проб кислородом (* обозначены статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$))

Установлено, что для ИЛГ характерно отсутствие различий между КВ, ПП и ЛА групповых колебаний связей полуколец пиррола гема (I_{1375}/I_{1172}). В группе ИЛГ характерно увеличение плотности упаковки глобина относительно контроля. Интенсивность колебаний связей пиррольных колец ($I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$) в СЭ имело статистические различия в ПЖ относительно КВ, ПП и ЛА, что указывает на большую вероятность нахождения Гб в «куполообразной» конформации. Для образцов ЛА группы ИЛГ характерно большая вероятность связывания Гб с кислородом относительно других исследуемых образцов (увеличение параметров I_{1580}/I_{1555} , $I_{1355}/(I_{1375}+I_{1355})$ и I_{1580}/I_{1375} на 5–7%). Для глобина характерно снижение плотности упаковки при ИЛГ (I_{2880}/I_{2850}) относительно контроля. Важно отметить,

что в контрольной группе не выявлено статистически значимых различий между КВ, ПП, ПЖ и ЛА.

Таким образом, нами показано, что в группе контроля и ИЛГ существуют различия в конформации гема и глубина Гб, которые характерны не только между образцами КВ, но и между конформации КВ, отделами сердца и ЛА. При этом, для ИЛГ характерно увеличение плотности упаковки молекул Гб_{цп}.

Мы считаем, что наиболее информативным с точки зрения диагностики ИЛГ является контроль за изменениями величины соотношения I_{1580}/I_{1555} — оно оказалось самым чувствительным для данного типа патологии. Так, нами отмечено, что после отмывки эритроцитов от компонентов плазмы, отсутствует полное насыщение СЭ кислородом, что будет более детально рассмотрено дальше в разделе.

Для ИЛГ характерно 4 ФК, диагностика которых является важным фактором при лечении патологии [184]. На сегодняшний день, единственным критерием, который позволяет точно диагностировать ИЛГ является измерение давления в ЛА при проведении КПОС, что требует проведения сложной операции на сердце пациента [393]. Мы предполагаем, что по изменениям КР–спектра можно диагностировать ИЛГ без проведения КПОС, а только по измерениям, осуществленным на образцах, полученных из КВ.

Нами доказано, что характер изменения конформации Гб в зависимости от ФК отличны как в цельной крови, так и в СЭ. Так, соотношения полос КР–спектра $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$ и I_{1580}/I_{1550} , в цельной крови снижен на 20–25% относительно контроля для 1–4 ФК. При этом, для СЭ, наоборот, отмечено увеличение величины соотношения на 10% для 2 ФК, на 14% для 3 ФК и на 20% для 4 ФК относительно контроля. На основании полученных данных можно предположить, что на способность Гб связывать O_2 при ИЛГ оказывают существенное влияние компоненты плазмы, воспалительные процессы и увеличение жесткости сосудистой стенки [204, 393].

Итак, нами предложен способ оценки ФК ИЛГ по величине соотношения интенсивности пиков КР–спектра I_{1580}/I_{1555} , которое отлично как от контрольной группы в образцах цельной крови, так и между ФК в образцах СЭ (рисунок 82).

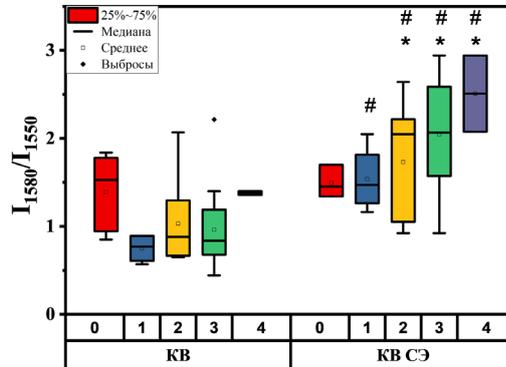


Рисунок 82 — Изменение величины соотношения интенсивностей пиков КР–спектра для образцов цельной крови (KB) и СЭ (KB СЭ) доноров с подтвержденным ИЛГ различных функциональных классов 1–4. 0 обозначены здоровые доноры (статистически значимые различия обозначены между: * — функциональными классами внутри группы, # — пробами KB и KB СЭ соответствующих функциональных классов ($p < 0,05$))

При первичной оценке ФК с помощью метода КР–спектроскопии, мы предполагаем использовать параметры, представленные в таблице 12.

Таблица 12 — Характеристика величины соотношения I_{1580}/I_{1555} при диагностике ИЛГ

Характеристика	Величина соотношения пика I_{1580}/I_{1555} , у.е.	
	KB, цельная кровь	KB, СЭ
Норма, отсутствие ИЛГ	1,98–1,68	3,16–2,82
Начальная стадия ИЛГ, 1–2 ФК	1,67–1,04	2,81–2,64
Высокая вероятность ИЛГ, 3–4 ФК	$\leq 1,03$	$\leq 2,63$

Таким образом, использование величин соотношений пиков КР–спектра позволяет провести первичную оценку ФК ИЛГ у пациентов без необходимости проведения КПОС [204]. В связи с тем, что для подтверждения диагноза требуется проведение КПОС, предложенный нами метод позволяет снизить количество операций, требуемых для проведения диагностики.

3.6.4. Исследование влияния вазорелаксантов при лечении патологий гипоксической природы на конформацию гема и глобина Гб

При лечении патогенеза ИЛГ применяют препараты, обладающие вазодилатирующими, цитопротективными, антипролиферативными, антиагрегационными свойствами. Эти препараты способны не только стабилизировать (не дать болезни прогрессировать), но и улучшить функциональное состояние (снизить тяжесть заболевания или ФК) и качество жизни пациентов [390, 399]. При лечении ИЛГ широко применяется медикамент Илопрост, который имеет ряд побочных действий (рвота, головные боли и т.д.) [399]. Ввиду этого, при лечении пациентов с ИЛГ рекомендуется использовать медикамент Селексипаг — специально созданный селективный антагонист IP-рецепторов простаглицина (мощное сосудорасширяющее средство) для перорального применения. Положительный эффект от применения Селексипага уже доказан и выражается в улучшении показателей давления в легочной артерии, частоте сердечно-сосудистых сокращений и тесте 6-минутной ходьбы [201, 400].

Мы предполагаем, что изменение конформации гема и плотности упаковки глобина Гб эритроцитов позволит оценить эффективность применения вазорелаксантов при терапии пациентов в клинике.

В ходе проведенного исследования было установлено, что применение Селексипага, не оказывает влияния на изменение конформации гема и плотности упаковки глобина Гб, но увеличивает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации (относительно ИЛГ). Данный результат может свидетельствовать об увеличении эффективности кислород-транспортной функции Гб у больных при терапии Селексипагом.

При использовании Илопроста выявлено увеличение плотности упаковки глобина и снижение вероятности нахождения гема в «куполообразной» форме (до значений, близких к контрольной группе, рисунок 83).

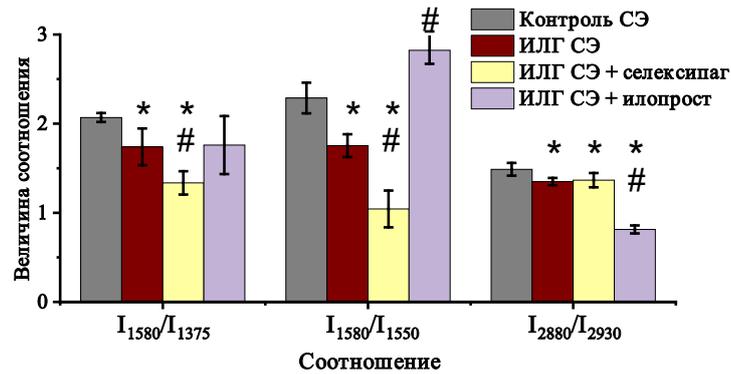


Рисунок 83 — Изменение соотношения интенсивностей пиков КР–спектра для СЭ здоровых доноров (контроль, серые столбцы), доноров с подтвержденным ИЛГ (красные столбцы) и доноров с подтвержденным ИЛГ после лечения селексипагом (желтые столбцы) и илопростом (фиолетовые столбцы) (* — обозначены статистически значимые отличия от контроля, # — статистически значимые отличия между донорами с подтвержденным ИЛГ и донорами с подтвержденным ИЛГ после лечения препаратом (изменения считаются достоверными при $p < 0,05$)

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать следующий вывод: применение вазорелаксантов оказывает существенное влияние не только на тонус кровеносных сосудов, но и на конформацию гема и глобина Гб эритроцитов. Важно отметить, что в зависимости от природы препарата вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации меняется и может быть связана с изменением поверхностного потенциала мембраны эритроцита.

3.6.5. Исследование роли вязкости мембраны на плотность упаковки молекул гемоглобина в эритроците при патологии

Для пациентов с диагностированным ИЛГ характерно увеличение жесткости мембраны (за счет изменения в составе сфинголипидов [184, 393]), в то время, как для пациентов с синдромом Гоше, наоборот, характерно снижение жесткости мембраны в следствие накопления липидов в цитоплазме макрофагов и клеточных стенках [189].

Нами исследован редкий случай диагностики синдрома Гоше 1 типа у пациента, который был впервые госпитализирован в ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Министерства здравоохранения в июле 2021 года. На момент госпитализации пациент находился на двойной ИЛГ-специфической терапии Мацитентаном в дозе 10 мг 1 раз в сутки и Риоцигуатом в дозе 0,5 мг 1 раз в сутки. При дообследовании был поставлен диагноз «первичная легочная гипертензия, ассоциированная с болезнью Гоше 1 типа», что позволяет провести сравнение влияния жесткости мембраны при длительном пребывании в условиях гипоксии.

При помощи метода ЛИМ, получено, что морфологические показатели эритроцитов отличны (рисунок 84):

1. Для всех трех групп эритроциты имеют форму дискоцитов;
2. Для пациентов с синдромом Гоше характерно увеличение площади и объема эритроцита относительно контрольной группы на 58%, что может указывать на большую проницаемость мембраны для воды в связи с изменением её липидного состава у пациентов с синдромом Гоше [189];
3. Для пациентов с подтвержденным ИЛГ характерно снижение площади эритроцита на 33% без изменения 3D-распределения плотности ОРХ ($V_{ср}$) клетки, но с увеличением $ОРХ_{ср}$, что так же подтверждает наше предположение о перераспределении Гб в эритроците.

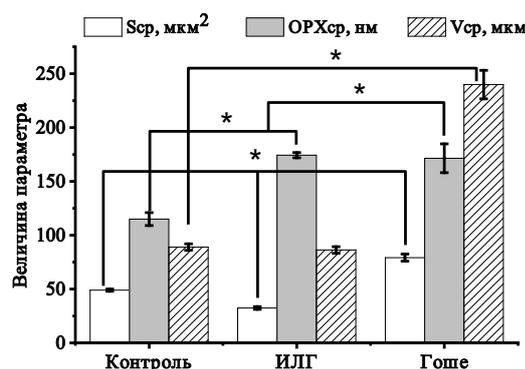


Рисунок 84 — Изменение площади клетки ($S, \mu\text{m}^2$), $ОРХ_{ср}$ (нм) и 3D-распределения плотности ОРХ ($V, \mu\text{m}^3$), эритроцитов, полученных методом ЛИМ.; Представлены усредненные данные по 180 клеткам (* — обозначены статистически значимые различия между образцами (изменения считаются достоверными при $p < 0,05$))

Для эритроцитов цельной крови пациента с синдромом Гоше были выявлены следующие изменения конформации гема Гб: снижение величины колебаний пиррольных колец (I_{1375}/I_{1172}), что указывает на снижение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации. При этом, величина соотношения максимумов пиков КР–спектра $I_{1375}/(I_{1375}+I_{1355})$ указывает на снижение количества относительного количества комплексов Гб с O_2 (снижение вероятности погруженности железа в гем в связи с образованием связи Fe–O) в КВ и ЛА относительно контроля и пациентов с подтвержденным ИЛГ. Отметим, что величина соотношения I_{1375}/I_{1580} (характеризует вероятность реализации «куполообразной» конформации гема Гб) была меньше относительно величин контроля и ИЛГ. При этом, характер изменения соотношения I_{1580}/I_{1550} (валентные колебания метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине) для ИЛГ и ИЛГ с синдромом Гоше аналогична, что указывает на различный эффект изменений вязкости мембраны на конформацию гема Гб (рисунок 85). Так, у пациентов с синдромом Гоше выявлены изменения в конформации пиррольных групп гема, которые связаны со сродством к лигандам и напряженностью порфиринового макроцикла, а колебания связей, характеризующих погруженность Fe^{2+} в гем и его связь с O_2 не зависят от вязкости мембраны. Так же, при увеличении вязкости мембраны, выявлено снижение плотности упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}), что может быть связано с увеличением размера клетки, и, вероятно, сопровождается увеличением доли воды в цитоплазме и увеличением расстояния между молекулами Гб в цитоплазме эритроцита (увеличение величины фазового объема при равном ОРХ (рисунок 84)).

Для СЭ ИЛГ характерно большее количество Гб в R–форме по сравнению с контролем, что может быть вызвано изменением состояния эритроцита. При этом, для больных с синдромом Гоше (увеличение вязкости мембраны эритроцита) в ЛА данные изменения аналогичны, а в КВ, наоборот, количество Гб в R-форме на 13% меньше, чем в контрольной группе. Так же, связь с лигандами у больных Гоше I_{1375}/I_{1580} ниже для СЭ КВ, относительно контроля и больных ИЛГ. Установлено,

что для СЭ, изменения колебаний аминокислотных остатков более выражены и указывают на снижение плотности упаковки Гб.

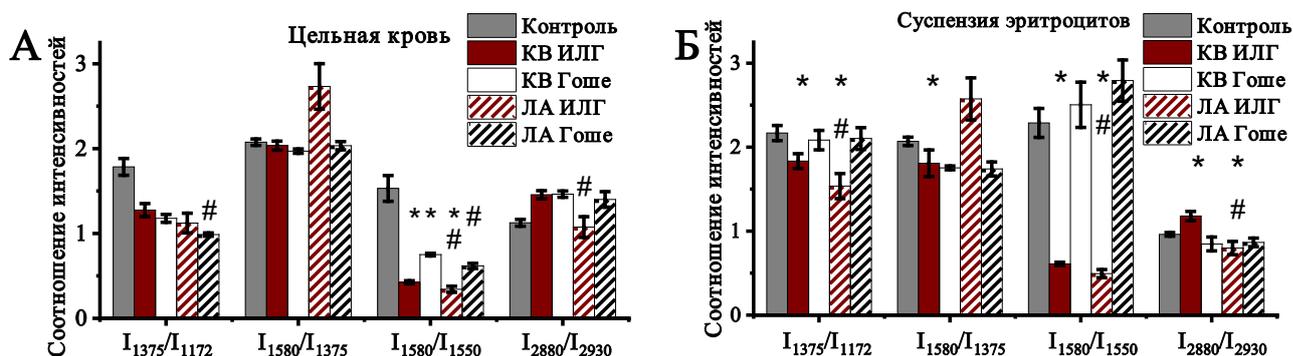


Рисунок 85 — Изменения конформации гема и плотности упаковки глобина Гб_{цп} из проб кубитальной вены (КВ) и легочной артерии (ЛА) здоровых доноров (контроль), пациентов с подтвержденным ИЛГ 2 ФК (ИЛГ) и пациентов с подтвержденным синдромом Гоше с ИЛГ 2 ФК (Гоше) для: А — образцов цельной крови, Б — СЭ (* — обозначены статистически значимые отличия от контроля, # — статистические значимые отличия между донорами с ИЛГ и донорами с синдромом Гоше (изменения считаются достоверными при $p < 0,05$))

Таким образом, нами показано, что увеличение вязкости мембраны за счет изменения состава сфинголипидов (синдром Гоше) [189] приводит к увеличению площади эритроцитов и 3D-распределения плотности ОРХ, при отсутствии изменения формы эритроцитов. При этом, у Гб_{цп} ИЛГ с синдромом Гоше менее выражена связь с лигандами (O_2) и увеличение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации в цельной крови и СЭ относительно контроля и больных ИЛГ. Важно отметить, что для ИЛГ характерно снижение плотности упаковки глобина, в то время, как для синдрома Гоше с подтвержденным ИЛГ наблюдается, наоборот, увеличение плотности упаковки, что может указывать на то, что состав липидной мембраны оказывает влияние не только на поверхностный потенциал эритроцита, но и на конформацию гема и плотность упаковки глобина.

Так, в условиях гипоксии, конформация гема Гб_{цп} и Гб_{мс} в цельной крови пациентов с ИЛГ отлична от контроля, а конформация Гб_{цп} с выраженной R-формой отлична от конформации дГб контроля: при снижении sO_2 , для гема характерно изменение колебаний связей пиррольных колец и винильных групп [250], а для ИЛГ выявлены изменения только в валентных колебаниях винильных

групп (I_{1580}/I_{1555}) и колебаниях, связанных с изменением плотности упаковки глобина, что может быть связано с перераспределением молекул Гб в эритроците от центра к внутренней поверхности мембраны [331]. Установлено, что конформация пиррольных колец в КВ контрольной группы достоверно отличалась от КВ ИЛГ для Гб эритроцитов цельной крови и СЭ, а изменения в конформации винильных групп связано со сниженной способностью насыщения O_2 эритроцитов. Вероятно, на конформацию гема и глобина оказывает жесткость мембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты исследования, свидетельствующие о том, что изменение морфологии, объема (и/или увеличение концентрации внутриклеточного натрия), температуры и ζ -потенциала оказывают влияние как на конформацию гема и глобина Гб, так и на распределение Гб_{цп} в цитоплазме клетки (таблица 13).

В кровеносных сосудах эритроцит находится под влиянием изменений pO_2 , температуры, $[Ca^{2+}]_{out}$, что меняет не только долю оГб/дГб, но конформацию Гб и степень олигомеризации Гб_{цп} в клетке (рисунок 86) [165, 347].

Таблица 13 — Изменение конформации гема и плотности упаковки глобина при изменении pO_2 , температуры, ζ -потенциала и объема

Воздействие	Изменения внутриклеточного Гб _{цп} (СЭ)	
	Гем	Глобин
Изменение pO_2 ($\downarrow pO_2$ со 118 до 2 мм рт.ст.)	\uparrow вероятности «куполообразной» конформации	\uparrow плотности упаковки
Изменение температуры (20 \rightarrow 40 $^{\circ}C$)	\uparrow вероятности «куполообразной» конформации	\downarrow плотности упаковки
Перераспределение ζ -потенциала клетки ($\downarrow [Ca^{2+}]_{out}$)	\uparrow вероятности «куполообразной» конформации	\uparrow плотности упаковки
Изменение объема эритроцита ($\uparrow [H_2O]$ в клетке, $\uparrow [Na^+]_{in}$) [369]	\uparrow вероятности «куполообразной» конформации	\downarrow плотности упаковки

Внешнее воздействие (pO_2 , температура, $[Ca^{2+}]_{out}$), за счет изменения ζ -потенциала эритроцита, модифицирует электростатические взаимодействия комплекса дГб с БПЗ (аллостерическая регуляция с анионным участком БПЗ (СДВЗ) катионной центральной полости дГб, образованной β -цепями), 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 поверхностного заряда мембраны эритроцита [32, 118, 331]. Нами показано, что при снижении pO_2 (до величин pO_2 в венах и скелетных мышцах (2–40 мм рт.ст.)), плотность упаковки глобина не меняется (рисунок 87) [310].

О важной роли олигомеризации и перераспределения Гб можно судить из анализа 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.

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

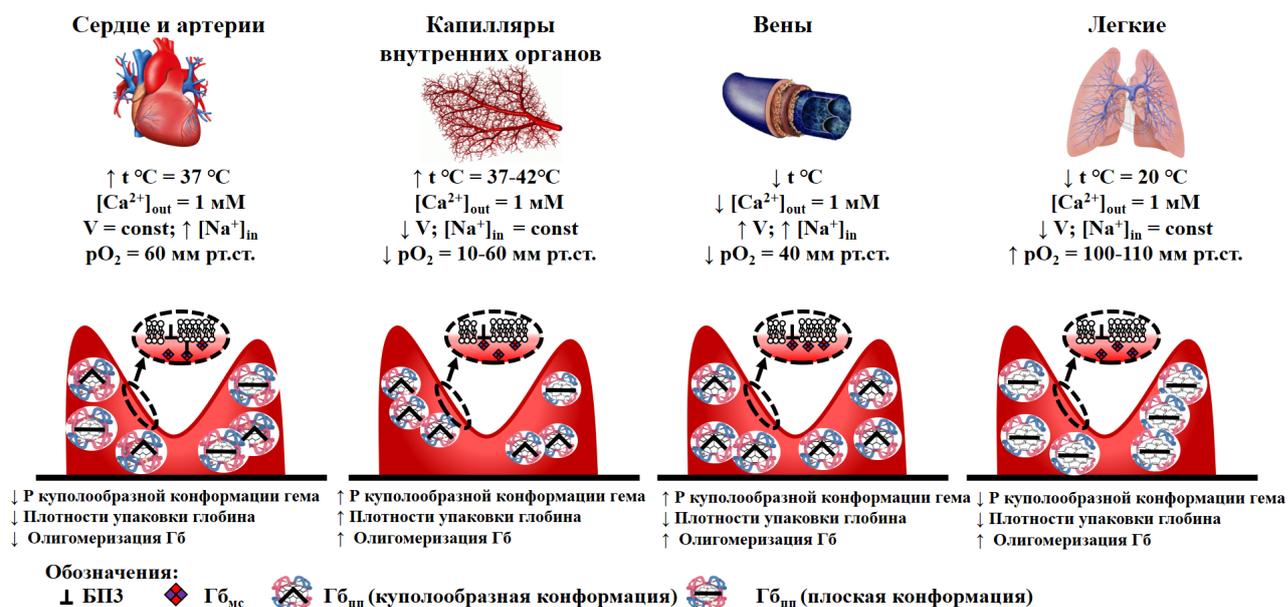


Рисунок 86 — Схематичное изображение изменения конформации гема и плотности упаковки глобина в эритроците при движении по кровеносному руслу в зависимости от изменений окружающих условий

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.

При изменении соотношения концентраций ионов натрия в клетке (блокирование Na^+/K^+ -АТФазы), меняется $[Na^+]_{in}$ и ζ -потенциал плазматической мембраны клетки [177], что сопровождается изменением вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации (снижение способности Гб связывать O_2) и плотность упаковки глобина. Согласно динамике медленной и быстрой компоненты τ_d , 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 снижение плотности упаковки 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}» за счет формирования комплекса с анионным сегментом БПЗ 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 O_2 (I_{1580}/I_{1375}). Разработан методический подход диагностики ИЛГ с помощью КР. Введен спектральный маркер (I_{1580}/I_{1550}), который предложен в качестве показателя степени тяжести (функциональный класс) заболевания.

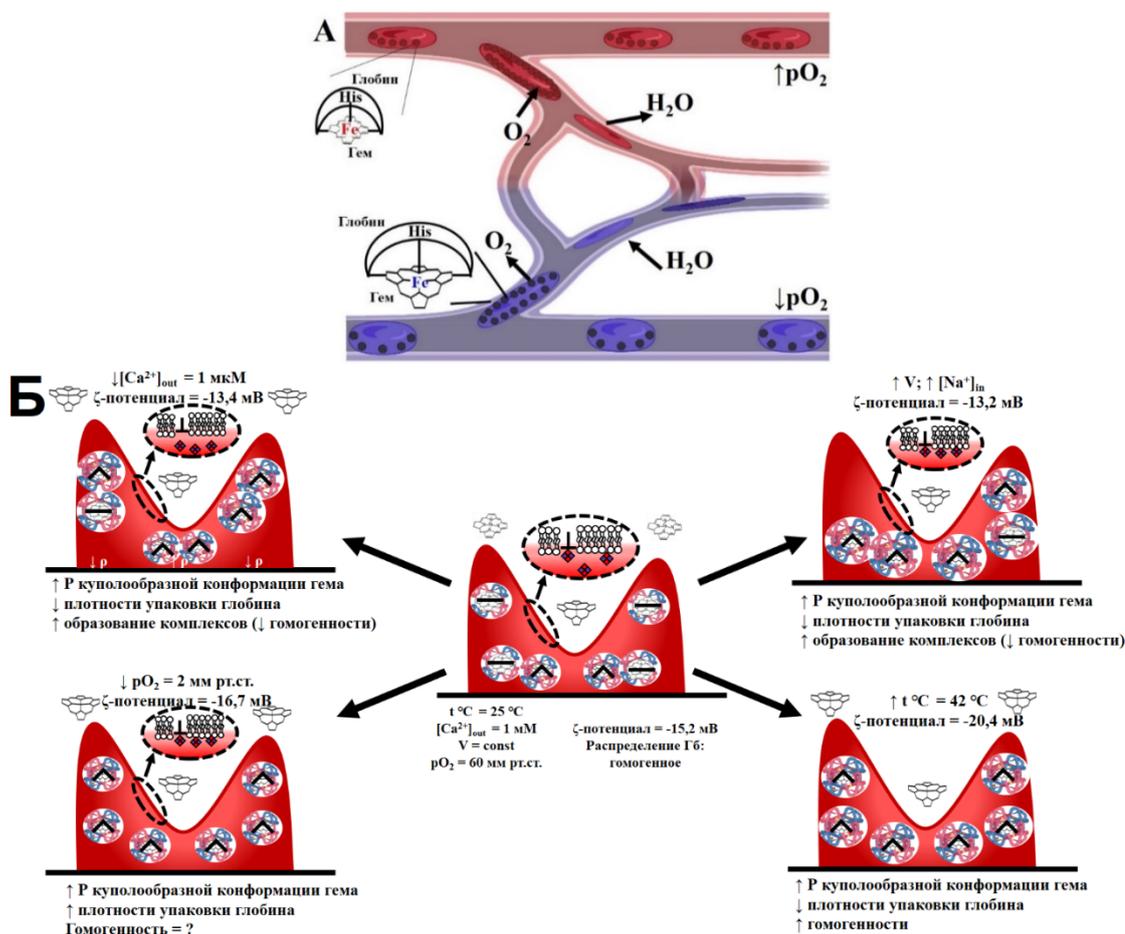


Рисунок 87 — А — Схематичное изменение конформации гема и расположения молекул Гб при прохождении эритроцита по кровеносному руслу, Б — Изменение конформации гема и плотности упаковки Гб при снижении pO_2 , $[Ca^{2+}]_{out}$, увеличении температуры (с 20 до 42 °C) и блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы (увеличение объема клетки и увеличение $[Na^+]_{in}$). В центре представлено схематичное изображение эритроцита в нормальных условиях, для которого характерно гомогенное распределение Гб_{цп} с возможным наличием олигомерных комплексов молекул Гб, необходимых для кооперативного связывания O_2 с Гб. При изменении компонентов окружающей среды (pO_2 , температура, $[Ca^{2+}]_{out}$, инкубация с убаином) происходит перераспределение молекул Гб с разной конформацией в различные части клетки, меняется плотность упаковки глобина и вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации (которая при изменении температуры, $[Ca^{2+}]_{out}$, блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы, свидетельствует о изменении конформации гема и средства к O_2 , а не насыщенность гема O_2 , т.к. $pO_2 = const$ [121, 255, 311]). Изменения локализации Гбмс (фиолетовые квадраты в пунктирном овале) представлено как вероятность нахождения Гб в примембранном слое в зависимости от изменения ζ -потенциала мембраны и, соответственно, изменения константы связывания с между дГб–СДВЗ [61, 310]

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 плотность 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2,3-БФГ — 2,3-бисфосфоглицерат
- АФК — активные формы кислорода
- Гб — гемоглобин
- Гб_{мс} — мембраносвязанный гемоглобин
- Гб_{пр} — примембранный гемоглобин
- Гб_{цит} — цитоплазматический гемоглобин
- дГб — дезоксигемоглобин
- ДСР — динамическое светорассеяние
- ИК — инфракрасная спектроскопия
- КР — комбинационное рассеяние
- ЛИМ — лазерная интерференционная микроскопия
- оГб — оксигемоглобин
- рО₂ — парциальное давление кислорода
- СЭ — суспензия эритроцитов
- ФКМ — фазово-контрастная микротомография
- ФС — фотосенсибилизатор
- Asn — аминокислотные остатки спарагина
- ВАСЕ — борированное производное хлорина е6 (хлорин е6 13(1)-N-{2-[N-(1-карба-клозо-додекаборан-1-ил)метил]аминоэтил}амид-15 (2), 17(3)-диметиловый эфир)
- Leu — аминокислотные остатки лейцина
- His — аминокислотные остатки гистидина
- Trp — аминокислотные остатки триптофана

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pasini E.M.* In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells / Pasini E.M., Kirkegaard M., Mortensen P., Lutz H.U., Thomas A.W., Mann M. // *Blood* – 2006. – V. 108 – № 3 – P. 791–801.
2. *Лунева О.Г.* Эритроциты как регуляторы сосудистого тонуса / Лунева О.Г., Сидоренко С.В., Максимов Г.В., Орлов С.Н., Григорчук С.Н. // *Биологические мембраны* – 2015. – Т. 32 – № 4 – С. 223.
3. *Чумакова С.П.* Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз / Чумакова С.П., Уразова О.И., Зима А.П., Новицкий В.В. // *Гематология и трансфузиология* – 2018. – Т. 63 – № 4 – С. 343–351.
4. *Abramson N.* The interaction between human monocytes and red cells: specificity for IgG subclasses and IgG fragments / Abramson N., Gelfand E.W., Jandl J.H., Rosen F.S. // *The journal of experimental medicine* – 1970. – V. 132 – № 6 – P. 1207–1215.
5. *Муравьев А.В.* Исследование роли отдельных реологических характеристик крови в изменении ее текучести и транспортного потенциала / Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Булаева С.В., Вдовин В.А., Муравьев А.А. // *Российский журнал биомеханики* – 2012. – № 3 – С. 32–41.
6. *Бурякина С.А.* Клиническое значение контрастных исследований Часть 1. Периферическое кровообращение. Основные понятия физиологии и биомеханики / Бурякина С.А., Кармазановский Г.Г. // *Медицинская визуализация* – 2011. – № 2 – С. 125–134.
7. *Богаченко С.Е.* Модель винтового движения крови в артериальных кровеносных сосудах / Богаченко С.Е., Устинов Ю.А. // *Современные проблемы механики сплошной среды* – 2007. – С. 73.
8. *Lang F.* Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte / Lang F., Lang K.S., Wieder T., Myssina S., Birka C., Lang P. A., Kaiser S., Kempe D., Duranton C., Huber S.M. // *Pflügers Archiv* – 2003. – V. 447 – № 2 – P. 121–125.

9. *Погорелое А.Г.* Цитоплазматический К/Na-баланс в мышечной клетке сердца при кислород-субстратном дефиците у молодых и старых крыс / Погорелое А.Г., Русаков А.В., Погорелова В.Н. // *Биофизика* – 2006. – Т. 51 – № 5 – С. 852–859.

10. *Осочук С.С.* Физико-химические свойства мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта / Осочук С.С., Марцинкевич А.Ф. // *Биохимия* – 2013. – С. 25–31.

11. *Орлов С.Н.* Котранспортеры катионов и хлора: регуляция, физиологическое значение и роль в патогенезе артериальной гипертензии / Орлов С.Н., Кольцова С.В., Капилевич Л.В. // *Успехи биологической химии* – 2014. – Т. 54 – С. 267–298.

12. *Tokumasu F.* Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by Plasmodium falciparum infection / Tokumasu F., Ostera G.R., Amaratunga C., Fairhurst R.M. // *Experimental parasitology* – 2012. – V. 131 – № 2 – P. 245–251.

13. *Громова О.А.* Возможна ли профилактика кальцификации сосудов препаратами кальция и витамина D3? / Громова О.А., Торшин И.Ю., Томилова И.К., Ощепкова Е.В. // *Земский врач* – 2011. – № 3 – С. 17–24.

14. *Лукьянчиков В.С.* Кальций: физиология. Онтогенетический и клинический аспект / Лукьянчиков В.С. // *Новые исследования* – 2012. – № 2 (31) – С. 5–13.

15. *Kang L.L.* Confocal Raman microscopy on single living young and old erythrocytes / Kang L.L., Huang Y.X., Liu W.J., Zheng X.J., Wu Z.J., Luo M. // *Biopolymers* – 2008. – V. 89 – № 11 – P. 951–959.

16. *Zhang Y.* The regulation roles of Ca²⁺ in erythropoiesis: What have we learned? / Zhang Y., Xu Y., Zhang S., Lu Z., Li Y., Zhao B. // *Experimental Hematology* – 2022. – V. 106 – P. 19–30.

17. *Knauf P. A.* Erythrocyte Anion Exchange and the Band 3 Protein: Transport Kinetics and Molecular Structure / Knauf P. A. // *Current Topics in Membranes and Transport* – 1979. – V. 12 – № 5 – P. 249–363.

18. *Batenjany M.M.* Near-UV Circular Dichroism of Band 3. Evidence for Intradomain Conformational Changes and Interdomain Interactions / Batenjany M.M., Mizukami H., Salhany J.M. // *Biochemistry* – 1993. – V. 32 – № 2 – P. 663–668.

19. *Jorgensen P.L.* Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions / Jorgensen P.L., Håkansson K.O., Karlsh S.J.D. // *Annual review of physiology* – 2003. – V. 65 – № 1 – P. 817–849.

20. *Marzec K.M.* Red blood cells polarize green laser light revealing hemoglobin's enhanced non-fundamental Raman modes / Marzec K.M., Perez-Guaita D., Veij M. De, McNaughton D., Baranska M., Dixon M.W.A., Tilley L., Wood B.R. // *ChemPhysChem* – 2014. – V. 15 – № 18 – P. 3963–3968.

21. *Kozicki M.* An attenuated total reflection (ATR) and Raman spectroscopic investigation into the effects of chloroquine on Plasmodium falciparum-infected red blood cells / Kozicki M., Creek D.J., Sexton A., Morahan B.J., Wesełucha-Birczyńska A., Wood B.R. // *Analyst* – 2015. – V. 140 – № 7 – P. 2236–2246.

22. *Perutz M.F.* Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron / Perutz M.F. // *Annual review of biochemistry* – 1979. – V. 48 – № 1 – P. 327–386.

23. *Hoard J.L.* Stereochemistry of Hemes and Other Metalloporphyrins: The remarkably varied stereochemistry of the iron porphyrins is utilized in the hemoprotein function. / Hoard J.L. // *Science* – 1971. – V. 174 – № 4016 – P. 1295–1302.

24. *Perutz M.* Molecular Anatomy, Physiology, and Pathology of Hemoglobin / Perutz M. // *Molecular Basis of Blood Diseases* – 1987. – V. 421 – P. 127.

25. *Monod J.* On the nature of allosteric transitions: A plausible model / Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. // *Journal of Molecular Biology* – 1965. – V. 12 – № 1 – P. 88–118.

26. *Schneider A.S.* Chlortetracycline as a Probe of Membrane-Associated Calcium and Magnesium: Interaction with Red Cell Membranes, Phospholipids, and Proteins Monitored by Fluorescence and Circular Dichroism / Schneider A.S., Herz R., Sonenberg M. // *Biochemistry* – 1983. – V. 22 – № 7 – P. 1680–1686.

27. *Goheen S.C.* Study of intact and modified erythrocyte membranes with laser Raman spectroscopy / Goheen S.C., Lis L.J., Kucuk O., Westerman M.P., Kauffman J.W. // *Journal of Raman Spectroscopy* – 1993. – V. 24 – № 9 – P. 599–602.

28. *Wood B.R.* Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte / Wood B.R., Tait B., McNaughton D. // *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research* – 2001. – V. 1539 – № 1–2 – P. 58–70.

29. *Wood B.R.* Micro-Raman characterization of high- and low-spin heme moieties within single living erythrocytes / Wood B.R., McNaughton D. // *Biopolymers - Biospectroscopy Section* – 2002. – V. 67 – № 4–5 – P. 259–262.

30. *Нельсон Д.Л.* Основы биохимии Ленинджера / Д. Л. Нельсон, М. М. Кокс, А. Ленинджер / под ред. Н. Иванова. – Бином. Лаб. знаний, 2011. Вып. 5– 703с.

31. *Кривенцев Ю.А.* Гемоглобины человека / Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Носков А.И. // *Вестник Астраханского государственного технического университета* – 2007. – № 6 – С. 34–41.

32. *Bryzgalova N.Y.* Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen / Bryzgalova N.Y., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., Maksimov G. V, Rubin A.B. // *Biophysics* – 2009. – V. 54 – № 3 – P. 308–311.

33. *Сейкина А.И.* Влияние гипоксии на конформацию и перераспределение гемоглобина в эритроцитах человека / Сейкина А.И., Громова Н.В., Ревина Э.С., Ревин В.В., Просникова К.В., Мартынова М.И.С.Т.А. // *Огарёв-Online* – 2016. – V. 24 – № 89 – С. 1–5.

34. *Муравлёва Л.Е.* Мембраносвязанный гемоглобин в норме и при патологических состояниях / Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Жумакаева С.С., Омертаева Д.Е., Вазенмиллер Д.В., Епифанцева Н.В., Ли В.В., Беков Е.К. // *Медицина и экология* – 2020. – № 1 (94) – С. 58–63.

35. *Brazhe N.A.* New Insight into Erythrocyte through In Vivo Surface-Enhanced Raman Spectroscopy / Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O. V., Maksimov G. V. // *Biophysical Journal* – 2009. – V. 97 – № 12 – P. 3206–3214.

36. *Sterpone F.* Magnitude and molecular origin of water slowdown next to a protein / Sterpone F., Stirnemann G., Laage D. // *Journal of the American Chemical Society* – 2012. – V. 134 – № 9 – P. 4116–4119.

37. *Zimmerman S.B.* Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences / Zimmerman S.B., Minton A.P. // *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* – 1993. – V. 22 – P. 27–65.

38. *Minton A.P.* The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media / Minton A.P. // *Journal of biological chemistry* – 2001. – V. 276 – № 14 – P. 10577–10580.

39. *Norris M.G.S.* What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase / Norris M.G.S., Malys N. // *Biochemical and biophysical research communications* – 2011. – V. 405 – № 3 – P. 388–392.

40. *Slatinskaya O. V.* The Role of Extracellular Ca²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes / Slatinskaya O. V, Brazhe N.A., Orlov S.N., Maksimov G. V // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* – 2021. – V. 15 – № 3 – P. 230–238.

41. *Maksimov G. V.* The role of erythrocyte receptors in regulation of the conformation and distribution of hemoglobin / Maksimov G. V, Slatinskaya O. V, Tkhor E.S., Anisimov N.A., Mamaeva S.N., Shutova V. V // *Biophysics* – 2019. – V. 64 – № 1 – P. 57–61.

42. *Slatinskaya O. V.* Conformational changes that occur in heme and globin upon temperature variations and normobaric hypoxia / Slatinskaya O. V, Luneva O.G., Deev L.I., Orlov S.N., Maksimov G. V. // *Biophysics* – 2020. – V. 65 – № 2 – P. 213–221.

43. *Slatinskaya O. V.* The Hemoglobin Conformation in Erythrocytes at Different Levels of Oxygen Partial Pressure / Slatinskaya O. V, Luneva O.G., Deev L.I., Zaripov P.I., Maksimov G. V // *Biophysics* – 2021. – V. 66 – № 5 – P. 797–803.

44. *Maksimov E.G.* The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components / Maksimov E.G., Sluchanko N.N., Slonimskiy Y.B., Stepanov A. V, Shirshin E.A.,

Tsoraev G. V., Klementiev K.E., Slatinskaya O. V., Lukashev E.P., Friedrich T., Paschenko V.Z., Rubin A.B., Shemyakin M.M., Ovchinnikov Y.A. // *Scientific Reports* – 2017. – V. 7 – № Nature Publishing Group – P. 15548–15566.

45. *Brezgin S.* Hydroxychloroquine Enhances Cytotoxic Properties of Extracellular Vesicles and Extracellular Vesicle–Mimetic Nanovesicles Loaded with Chemotherapeutics / Brezgin S., Kostyusheva A., Ponomareva N., Bayurova E., Kondrashova A., Frolova A., Slatinskaya O., Fatkhutdinova L., Maksimov G., Zyuzin M. // *Pharmaceutics* – 2023. – V. 15 – № 2 – P.534.

46. *Slatinskaya O. V.* Changes in the Conformation and Distribution of Hemoglobin in the Erythrocyte upon Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase Activity / Slatinskaya O. V., Zaripov P.I., Brazhe N.A., Petrushanko I.Y., Maksimov G. V // *Biophysics* – 2022. – V. 67 – № 5 – P.726–733

47. Кровь // Большая медицинская энциклопедия. – 1980. – 132с.

48. *Jensen K.* O-binding to heme: electronic structure and spectrum of oxyheme, studied by multiconfigurational methods / Jensen K., Roos B., Ryde U. // *Journal of Inorganic Biochemistry* – 2005. – V. 99 – № 1 – P. 45–54.

49. *Cortese-Krott M.M.* Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? / Cortese-Krott M.M., Kelm M. // *Redox Biology* – 2014. – V. 2 – P. 251–258.

50. *Боровская М.К.* Структурно-Функциональная Характеристика Мембраны Эритроцита И Ее Изменения При Патологиях Разного Генеза Structural and Functional Characteristics of Membrane'S Erythrocyte and Its Change At Pathologies of Various Genesis / Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. – 2010. – V. 3 – № 3 – С. 334–354.

51. *Chu H.* Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps / Chu H., Puchulu-Campanella E., Galan J.A., Tao W.A., Low P.S., Hoffman J.F. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2012. – V. 109 – № 31 – P. 12794–12799.

52. *Proverbio F.* Membrane Compartmentalized ATP and Its Preferential Use by the Na,K-ATPase of Human Red Cell Ghosts / Proverbio F., Hoffman J.F. – 1977. – V. 69 – P. 605–632.

53. *Трошкина Н.А.* Эритроцит: строение и функции его мембраны / Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. // Вятский медицинский вестник – 2007. – Т. 2–3 – С. 32–40.

54. *Kanwal K.G.* Characteristics of human erythrocyte insulin receptors / Kanwal K.G., Juanita A.A., Carole J.B. // Diabetes – 1978. – V. 27 – № 7 – P. 701–708.

55. *Adinolfi E.* P2X7 receptor: Death or life? / Adinolfi E., Pizzirani C., Idzko M., Panther E., Norgauer J., Virgilio F. Di, Ferrari D. // Purinergic Signalling – 2005. – V. 1 – № 3 – P. 219–227.

56. *Wang L.* ADP Acting on P2Y13 Receptors Is a Negative Feedback Pathway for ATP Release From Human Red Blood Cells / Wang L. // Circulation Research – 2005. – V. 96 – № 2 – P. 189–196.

57. *Муравлёва Л.Е.* Белки эритроцитов. Миниобзор / Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Понамарева О.А. // Medikal sciences – 2013. – № 4 – С. 28–31.

58. *Чеснокова Н.П.* Особенности структуры и функций эритроцитарной мембраны / Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. // Advances in current natural sciences – 2015. – № 1 – С. 328–331

59. *Olver C.S.* Erythrocyte structure and function / Olver C.S. // Schalm's veterinary hematology – 2022. – P. 158–165.

60. *Silva Xavier G.* DaProtein kinases / G. Da Silva Xavier / под ред. Т. Smiljanic. – Rijeka: InTech Design Team, 2012. Вып. 1– 374 с.

61. *Rosa M.C.* De Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: New insights in gas transport and metabolic modulation / Rosa M.C. De, Alinovi C.C., Galtieri A., Russo A., Giardina B. // IUBMB Life – 2008. – V. 60 – № 2 – P. 87–93.

62. *Маймистова А.А.* Изменение агрегации и деформируемости эритроцитов при активации внутриклеточных сигнальных путей / Маймистова

А.А., Кошелев В.Б., Булаева С.В., Муравьев А.В. // Ярославский педагогический вестник – 2009. – № 3 – С. 71–74.

63. Михайлова С.Г. Роль ионизированного кальция и механического стресса в механизмах регуляции клеточных свойств эритроцитов / Михайлова С.Г., Тихомирова И.А. // Ярославский педагогический вестник – 2012. – Т. 3 – № 3 – С. 129–133.

64. Hernández-Muñoz R. Oxidant Status and Lipid Composition of Erythrocyte Membranes in Patients with Type 2 Diabetes, Chronic Liver Damage, and a Combination of Both Pathologies / Hernández-Muñoz R., Olgúin-Martínez M., Aguilar-Delfín I., Sánchez-Sevilla L., García-García N., Díaz-Muñoz M. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity – 2013. – V. 2013 – P. 1–9.

65. Stokke B.T. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel: I. Membrane mechanochemical properties / Stokke B.T., Mikkelsen A., Elgsaeter A. // European Biophysics Journal – 1986. – V. 13 – P. 203–218.

66. Machnicka B. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling / Machnicka B., Grochowalska R., Bogusławska D.M., Sikorski A.F., Lecomte M.C. // Cellular and Molecular Life Sciences – 2012. – V. 69 – № 2 – P. 191–201.

67. Gedde M.M. Shape response of human erythrocytes to altered cell pH / Gedde M.M., Yang E., Huestis W.H. // Blood – 1995. – V. 86 – № 4 – P. 1595–1599.

68. Peng Z. Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell / Peng Z., Li X., Pivkin I. V., Dao M., Karniadakis G.E., Suresh S. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2013. – V. 110 – № 33 – P. 13356–13361.

69. Sluyter R. Significance of P2X7 Receptor Variants to Human Health and Disease / Sluyter R., Stokes L. // Recent Pat DNA Gene Seq – 2011. – V. 5 – № 1 – P. 41–54.

70. Föller M. Erythrocyte programmed cell death / Föller M., Huber S.M., Lang F. // IUBMB Life – 2008. – V. 60 – № 10 – P. 661–668.

71. Agre P. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel / Agre P., Preston G.M., Smith B.L., Jung J.S., Raina S., Moon C., Guggino W.B., Nielsen S. // The American Journal of Physiology – 1993. – V. 265 – № 4 – P. 463–476.

72. *Minetti M.* Spectrin involvement in a 40°C structural transition of the red blood cell membrane / Minetti M., Ceccarini M., Stasi A.M.M. Di, Petrucci T.C., Marchesi V.T. // *Journal of Cellular Biochemistry* – 1986. – Т. 30 – № 4 – P. 361–370.
73. *Butterfield D.A.* Induced alterations in the physical state of sialic acid and membrane proteins in human erythrocyte ghosts: implications for the topology of the major sialoglycoprotein / Butterfield D.A., Farmer B.T., Feix J.B. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 1983. – V. 414 – № 1 – P. 169–179.
74. *Бочкарева С.С.* Дисс. на соискание ученой степени кандидата наук: Влияние АТФ и инсулиноподобного фактора роста 1 на кислородтранспортную функцию эритроцита / С. С. Бочкарева – Моск. гос. ун-т им. МВ Ломоносова, 2016. – 172 с.
75. *Sukharev S.* The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL / Sukharev S., Betanzos M., Chiang C.-S., Guy H.R. // *Nature* – 2001. – V. 409 – № 6821 – P. 720–724.
76. *Финогенова О.А.* Дисс. на соискание ученой степени кандидата наук: Электрические потенциалы на границах липидных мембран при адсорбции одновалентных катионов и синтетических поликатионов / Финогенова О.А. – 2009. – 328 с.
77. *Guo F.* An N1–Hydrogen bonding model for flavin coenzyme / Guo F., Chang B.H., Rizzo C.J. // *Bioorganic & medicinal chemistry letters* – 2002. – V. 12 – № 2 – P. 151–154.
78. *Chludzińska L.* Near-infrared radiation protects the red cell membrane against oxidation / Chludzińska L., Ananicz E., Jaroszawska A., Komorowska M. // *Blood Cells, Molecules, and Diseases* – 2005. – V. 35 – № 1 – P. 74–79.
79. *Ciaccio C.* Role of hemoglobin structural-functional relationships in oxygen transport / Ciaccio C., Coletta A., Coletta M. // *Molecular Aspects of Medicine* – 2021. – P. 101022.
80. *Bernhardt I.* Passive membrane permeability for ions and the membrane potential / Bernhardt I., Weiss E. // *Red cell membrane transport in health and disease* – 2003. – P. 83–109.

81. *Parshina E.Y.* Thermal inactivation of volume-sensitive K⁺, Cl⁻ cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes / Parshina E.Y., Yusipovich A.I., Platonova A.A., Grygorczyk R., Maksimov G. V., Orlov S.N. // *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* – 2013. – V. 465 – № 7 – P. 977–983.
82. *Ellis R.J.* Join the crowd / Ellis R.J., Minton A.P. // *Nature* – 2003. – V. 425 – № 6953 – P. 27–28.
83. *Сергунова В.А.* Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор) / Сергунова В.А., Манченко Е.А., Гудкова О.Е. // *Общая реаниматология* – 2016. – V. 12 – № 6 – С. 49–63.
84. *Nagel R.L.* The paradox of hemoglobin SC disease / Nagel R.L., Fabry M.E., Steinberg M.H. // *Blood reviews* – 2003. – V. 17 – № 3 – P. 167–178.
85. *Minton A.P.* The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences / Minton A.P. // *Molecular and cellular biochemistry* – 1983. – V. 55 – № 2 – P. 119–140.
86. *Sidorenko S.V.* Hemolysis and ATP Release from Human and Rat Erythrocytes under Conditions of Hypoxia: A Comparative Study / Sidorenko S. V., Luneva O.G., Novozhilova T.S., Alekseeva N. V., Rodnenkov O. V., Deev L.I., Maksimov G. V., Grygorczyk R., Orlov S.N. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* – 2018. – V. 12 – P. 114–120.
87. *Brazhe N.A.* Tuning SERS for living erythrocytes: Focus on nanoparticle size and plasmon resonance position / Brazhe N.A., Parshina E.Y., Khabatova V. V., Semenova A.A., Brazhe A.R., Yusipovich A.I., Sarycheva A.S., Churin A.A., Goodilin E.A., Maksimov G. V., Sosnovtseva O. V. // *Journal of Raman Spectroscopy* – 2013. – V. 44 – № 5 – P. 686–694.
88. *Minetti G.* Tyrosine phosphorylation of band 3 protein in Ca²⁺/A23187-treated human erythrocytes / Minetti G., Piccinini G., Balduini C., Seppi C., Brovelli A. // *Biochemical Journal* – 1996. – V. 320 – № 2 – P. 445–450.
89. *Sun K.* Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia / Sun K., Zhang Y., D'Alessandro A., Nemkov T., Song A., Wu H., Liu H., Adebiyi M., Huang A., Wen Y.E. // *Nature*

communications – 2016. – V. 7 – № 1 – P. 1–13.

90. *Cheng Y.* Lanthanide ions induce hydrolysis of hemoglobin-bound 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), conformational changes of globin and bidirectional changes of 2,3-DPG-hemoglobin's oxygen affinity / Yi Cheng, Huakuan Lin, Deping Xue, Rongchang Li // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2001. – V. 1535 – P. 200–216.

91. *Sidorenko S. V.* Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes / Sidorenko S. V., Ziganshin R.H., Luneva O.G., Deev L.I., Alekseeva N. V., Maksimov G. V., Grygorczyk R., Orlov S.N. // *Journal of Proteomics* – 2018. – V. 184 – № 6 – P. 25–33

92. *Burmester T.* Function and evolution of vertebrate globins / Burmester T., Hankeln T. // *Acta Physiologica* – 2014. – V. 211 – № 3 – P. 501–514.

93. *Uzan J.* Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding / Uzan J., Dewilde S., Burmester T., Hankeln T., Moens L., Hamdane D., Marden M.C., Kiger L. // *Biophysical journal* – 2004. – V. 87 – № 2 – P. 1196–1204.

94. *Meuwly M.* The functional role of the hemoglobin-water interface / Meuwly M., Karplus M. // *Molecular Aspects of Medicine* – 2022. – V. 84 – P. 101042.

95. *Legge D.G.* The Effect of pH on the Volume, Density and Shape of Erythrocytes and Thymic Lymphocytes / Legge D.G., Shortman K. // *British Journal of Haematology* – 1968. – V. 14 – № 3 – P. 323–335.

96. *Wang G.* Hydrogen Sulfide Is a Regulator of Hemoglobin Oxygen-Carrying Capacity via Controlling 2, 3-BPG Production in Erythrocytes / Wang G., Huang Y., Zhang N., Liu W., Wang C., Zhu X., Ni X. // *Oxidative medicine and cellular longevity* – 2021. – V. 2021. – P. 8877691.

97. *Harvey J.W.* Erythrocyte biochemistry / Harvey J.W. // *Schalm's veterinary hematology* – 2022. – P. 166–171.

98. *Giardina B.* Hemoglobin: Multiple molecular interactions and multiple functions. An example of energy optimization and global molecular organization / Giardina B. // *Molecular Aspects of Medicine* – 2021. – V. 84 – P. 101040.

99. *Marengo-Rowe A. J.* Structure-function relations of human hemoglobins //

Proc (Bayl Univ Med Cent) – 2006. – V. 19 – P. 239–245.

100. *Fan J.-S.* Solution Structure and Dynamics of Human Hemoglobin in the Carbonmonoxy Form / Fan J.-S., Zheng Y., Choy W.-Y., Simplaceanu V., Ho N.T., Ho C., Yang D. // *Biochemistry* – 2013. – V. 52 – № 34 – P. 5809–5820.

101. *Takayanagi M.* Non-site-specific allosteric effect of oxygen on human hemoglobin under high oxygen partial pressure / Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M. // *Scientific Reports* – 2014. – V. 4 – № 1 – P. 4601.

102. *Grundman J.E.M.* Control of distal lysine coordination in a monomeric hemoglobin: A role for heme peripheral interactions / Grundman J.E.M., Plana L.J., Schlessman J.L., Capece L., Estrin D.A., Lecomte J.T.J. // *Journal of Inorganic Biochemistry* – 2021. – V. 219 – P. 111437.

103. *Pauling L.* Magnetic properties and structure of oxyhemoglobin / Pauling L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1977. – V. 74 – P. 2612–2613.

104. *Weiss J.J.* Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin / Weiss J.J. // *Nature* – 1964. – V. 203 – P. 182–183.

105. *Olafson B.D.* Molecular description of dioxygen bonding in hemoglobin / Olafson B.D., Goddard W.A. – 1977. – V. 74 – № 4 – P. 1315–1319.

106. *Semenza G.L.* Oxygen homeostasis / Semenza G.L. // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* – 2010. – V. 2 – № 3 – P. 336–361.

107. *Riggs A.F.* The Bohr effect / Riggs A.F. // *Annual Review of Physiology* – 1988. – V. 50 – P. 181–204.

108. *Dayer M.R.* Band Assignment in Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four- Orbital Model of Gouterman / Dayer M.R., Moosavi-Movahedi A.A., Dayer M.S. – 2010. – V. 17 – P. 473–479.

109. *Абрашева М.В.* Эритроцитарный гемоглобин: виды, значения, альтернативные и дополнительные функции / Абрашева М.В., Андреева А.И., Виноградова О.Е., Викторovich Н.Н. // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* – 2021. – № 7 – С. 7–11.

110. *Brazhe N.A.* New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy / Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova

N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O. V., Maksimov G. V. // *Biophysical Journal* – 2009. – V. 97 – № 12 – P. 3206–3214.

111. *Bryk A.H.* Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome / Bryk A.H., Wiśniewski J.R. // *Journal of Proteome Research* – 2017. – V. 16 – № 8 – P. 2752–2761.

112. *Chen Q.* Human and mouse hemoglobin association with the transgenic mouse erythrocyte membrane / Chen Q., Balazs T.C., Nagel R.L., Hirsch R.E. // *FEBS letters* – 2006. – V. 580 – № 18 – P. 4485–4490.

113. *Reyes-Goddard J.M.* Photodiagnosis using Raman and surface enhanced Raman scattering of bodily fluids / Reyes-Goddard J.M., Barr H., Stone N. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2005. – V. 2 – № 3 – P. 223–233.

114. *Drescher D.* SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components / Drescher D., Büchner T., McNaughton D., Kneipp J. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2013. – V. 15 – № 15 – P. 5364–5373.

115. *Klug A.* The diffusion of oxygen in concentrated haemoglobin solutions / Klug A., Kreuzer F., Roughton F.J. // *Helvetica physiologica et pharmacologica acta* – 1956. – V. 14 – № 2 – P. 212–218.

116. *Zander R.* Intracellular mechanisms of oxygen transport in flowing blood / Zander R., Schmid-Schönbein H. // *Respiration Physiology* – 1973. – V. 19 – № 3 – P. 279–289.

117. *Vandegriff K.D.* The kinetics of O₂ release by human red blood cells in the presence of external sodium dithionite. / Vandegriff K.D., Olson J.S. // *Journal of Biological Chemistry* – 1984. – V. 259 – № 20 – P. 12609–12618.

118. *Космачевская О.В.* Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции (обзор) / Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. // *Прикладная биохимия и микробиология* – 2019. – Т. 55 – № 2 – С. 107–123.

119. *Bouwer S.T.* Diffusion coefficients of oxygen and hemoglobin measured by facilitated oxygen diffusion through hemoglobin solutions / Bouwer S.T., Hoofd L.,

Kreuzer F. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* – 1997. – V. 1338 – № 1 – P. 127–136.

120. *Wood B.R.* Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte / Wood B.R., Hammer L., McNaughton D. // *Vibrational Spectroscopy* – 2005. – V. 38 – № 1–2 – P. 71–78.

121. *Brazhe N.A.* Monitoring of blood oxygenation in brain by resonance Raman spectroscopy / Brazhe N.A., Thomsen K., Lønstrup M., Brazhe A.R., Nikelshparg E.I., Maksimov G. V., Lauritzen M., Sosnovtseva O. // *Journal of Biophotonics* – 2018. – V. 11 – № 6 – P. 1–10.

122. *Creteur J.* Near-infrared spectroscopy technique to evaluate the effects of red blood cell transfusion on tissue oxygenation. / Creteur J., Neves A.P., Vincent J.L. // *Critical care (London, England)* – 2009. – V. 13 Suppl 5 – P. 1–7.

123. *Polakovs M.* EPR and FTIR spectroscopies study of human blood after irradiation / Polakovs M., Mironova-Ulmane N., Pavlenko A., Reinholds E., Gavare M., Grube M. // *Spectroscopy (New York)* – 2012. – V. 27 – № 5–6 – P. 367–371.

124. *Bryzgalova N.Y.* Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen / Bryzgalova N.Y., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., Maksimov G. V., Rubin A.B. // *Biophysics* – 2009. – V. 54 – P. 308–311.

125. *Blann A.* Blood Science Principles and Pathology Blood Science Principles and Pathology / A. Blann, N. Ahmed – 2014. – P. 1105–1120.

126. *Мороз В.В.* Строение И Функция Эритроцита В Норме И При Критических Состояниях / Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. // *Общая Реаниматология* – 2012. – Т. 8 – № 1 – С. 52–60.

127. *Benga G.* Water Exchange through the Erythrocyte Membrane / под ред. G.H. Bourne, K.W. Jeon, M.B.T.-I.R. of C. Friedlander. Academic Press, 1989. – P. 273–316.

128. *Судницына Ю.С.* Эритроциты и гипоксия: деоксигемоглобин ингибирует аммонийный транспорт в эритроцитах человека / Судницына, Ю. С., Гамбарян, С. П., Андреева, А. Ю., Кривченко, А. И., Миндукшев, И. В // *Рецепторы*

и внутриклеточная сигнализация – 2016. – С. 538–543.

129. *Сашенков С.Л.* Влияние липоксигеназных метаболитов арахидоновой кислоты на поверхностный заряд мембраны эритроцитов / Сашенков С.Л., Хшиво А.Л., Егорова Н.В. // Физиологический журнал СССР им. ИМ Сеченова – 1990. – Т. 76 – № 3 – С. 83–86.

130. *Atkins C.G.* Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components / Atkins C.G., Buckley K., Blades M.W., Turner R.F.B. // Applied Spectroscopy – 2017. – V. 71 – № 5 – P. 767–793.

131. *Huang Y.X.* Pathway and mechanism of pH dependent human hemoglobin tetramer-dimer- monomer dissociations / Huang Y.X., Wu Z.J., Huang B.T., Luo M. // PLoS ONE – 2013. – V. 8 – № 11 – P. 1–9.

132. *Brunori M.* Redox equilibrium of sperm-whale myoglobin, Aplysia myoglobin, and Chironomus thummi hemoglobin / Brunori M., Saggese U., Rotilio G.C., Antonini E., Wyman J. // Biochemistry – 1971. – V. 10 – № 9 – P. 1604–1609.

133. *Binotti I.* Studies on the functional properties of fish hemoglobins: II. The oxygen equilibrium of the isolated hemoglobin components from trout blood / Binotti I., Giovenco S., Giardina B., Antonini E., Brunori M., Wyman J. // Archives of biochemistry and biophysics – 1971. – V. 142 – № 1 – P. 274–280.

134. *Майлян Д.Э.* Роль дисметаболизма кальция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / Майлян Д.Э., Коломиец В.В. // Российский кардиологический журнал – 2019. – № 9 – С. 78–85.

135. *Деева Н.С.* Роль нарушений обмена кальция в индукции иммунной гиперчувствительности при сердечно-сосудистых заболеваниях / Деева Н.С., Шабалдин А.В., Антонова Л.В. // Бюллетень сибирской медицины – 2021. – Т. 20 – № 3 – С. 141–151.

136. *Muravyov A.* Role Ca²⁺ in mechanisms of the red blood cells microrheological changes / Muravyov A., Tikhomirova I. // Calcium Signaling – 2012. – P. 1017–1038.

137. *Lew V.L.* Physiological [Ca²⁺] i level and pump-leak turnover in intact red cells measured using an incorporated Ca chelator / Lew V.L., Tsien R.Y., Miner C.,

Bookchin R.M. // Nature – 1982. – V. 298 – № 5873 – P. 478–481.

138. *Васильева Е.М.* Биохимические Особенности Эритроцита. Влияние Патологии (Обзор Литературы) / Васильева Е.М. // Биомедицинская Химия – 2005. – Т. 51 – № 2 – С. 118–126.

139. *Дмитриев Р.И.* SPCA, Ca²⁺-АТФ-аза секреторного пути, локализована преимущественно в плазматической мембране / Дмитриев Р.И., Пестов Н.Б., Корнеев Т.В., Сорокина Е.С., Казьмин А.А., Костина М.Б., Шапаронов М.И. // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии – 2003. – Т. 20 – № 6 – С. 480–485.

140. *Lang P. A.* Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis / Lang P. A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. // AJP: Cell Physiology – 2003. – V. 285 – № 6 – P. 1553–C1560.

141. *Parker J.C.* Role of calcium in volume regulation by dog red blood cells. / Parker J.C., Gitelman H.J., Glosson P.S., Leonard D.L. // The Journal of general physiology – 1975. – V. 65 – № 1 – P. 84–96.

142. *Сюсин И.В.* Дисс. на соискание ученой степени кандидата наук: Влияние ионов Ca²⁺ на фосфолипидный состав, состояние и морфологические характеристики эритроцитов // – 2015. – 122 с.

143. *Thomas S.L.Y.* Ion channels in human red blood cell membrane: actors or relics? / Thomas S.L.Y., Bouyer G., Cuffe A., Egée S., Glogowska E., Ollivaux C. // Blood Cells, Molecules, and Diseases – 2011. – V. 46 – № 4 – P. 261–265.

144. *Tirodkar T.S.* Sphingolipids in apoptosis / T. S. Tirodkar, C. Voelkel-Johnson – Experimental oncology, 2012. – 360с.

145. *Решетняк О.А.* Особенности адаптации сердечно-сосудистой системы спортсменов к физической нагрузке в зависимости от уровня содержания кадмия, калия и кальция в организме / Решетняк О.А., Евстафьева И.А., Евстафьева Е.В., Решетняк А.В. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия – 2011. – Т. 24 – № 4 (63) – С. 211–217.

146. *Levin R.L.* Effect of hydration on the water content of human erythrocytes / Levin R.L., Cravalho E.G., Huggins C.E. // Biophysical Journal – 1976. – V. 16 – № 12

– P. 1411–1426.

147. *Conlon T.* The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability / Conlon T., Outhred R. // *Biochimica et biophysica acta* – 1978. – V. 511 – № 3 – P. 408–418.

148. *Сундукова М.В.* Влияние лекарственных веществ на проницаемость мембран эритроцитов для воды биологические мембраны / Сундукова М.В., Мутина А.Р., Дружинина О.С., Скоринкин А.И. // *Биологические мембраны* – 2010. – Т. 27 – № 2 – С. 202–208.

149. *Черницкий Е.А.* Структура и функции эритроцитарных мембран / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей – Минск, 1981.– 216 с.

150. *Brugnara C.* Erythrocyte membrane transport physiology. / Brugnara C. // *Current opinion in hematology* – 1997. – V. 4 – № 2 – P. 122–127.

151. *Gallagher P.G.* Disorders of erythrocyte hydration / Gallagher P.G. // *Blood* – 2017. – V. 130 – № 25 – P. 2699–2708.

152. *Kregenow F.M.* Osmoregulatory salt transporting mechanisms: control of cell volume in anisotonic media. / Kregenow F.M. // *Annual Review of Physiology* – 1981. – Т. 43 – P. 493–505.

153. *Syeda R.* LRRC8 proteins form volume-regulated anion channels that sense ionic strength / Syeda R., Qiu Z., Dubin A.E., Murthy S.E., Florendo M.N., Mason D.E., Mathur J., Cahalan S.M., Peters E.C., Montal M. // *Cell* – 2016. – V. 164 – № 3 – P. 499–511.

154. *Carbrey J.M.* Discovery of the aquaporins and development of the field / Carbrey J.M., Agre P. // *Aquaporins* – 2009. – P. 3–28.

155. *Artmann G.M.* Temperature transitions of protein properties in human red blood cells / Artmann G.M., Kelemen C., Porst D., Büldt G., Chien S. // *Biophysical Journal* – 1998. – V. 75 – № 6 – P. 3179–3183.

156. *Evans E.* Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments / Evans E., Berk D., Leung A. // *Biophysical journal* – 1991. – V. 59 – № 4 – P. 838–848.

157. *Hochmuth R.M.* Micropipette aspiration of living cells / Hochmuth R.M. //

Journal of biomechanics – 2000. – V. 33 – № 1 – P. 15–22.

158. *Stadler A.M.* Hemoglobin dynamics in red blood cells: Correlation to body temperature / Stadler A.M., Digel I., Artmann G.M., Embs J.P., Zaccai G., Büldt G. // Biophysical Journal – 2008. – V. 95 – № 11 – P. 5449–5461.

159. *Bunkin A.F.* Four-photon spectroscopy of ortho/para spin-isomer H₂O molecule in liquid water in sub-millimeter range / Bunkin A.F., Pershin S.M., Nurmatov A.A. // Laser Physics Letters – 2006. – V. 3 – № 6 – P. 275.

160. *Ozeki S.* Transient oxygen clathrate-like hydrate and water networks induced by magnetic fields / Ozeki S., Otsuka I. // The Journal of Physical Chemistry B – 2006. – V. 110 – № 41 – P. 20067–20072.

161. *Tanford C.* The hydrophobic effect and the organization of living matter / Tanford C. // Science – 1978. – V. 200 – № 4345 – P. 1012–1018.

162. *Paciaroni A.* Effect of the environment on the protein dynamical transition: a neutron scattering study / Paciaroni A., Cinelli S., Onori G. // Biophysical journal – 2002. – V. 83 – № 2 – P. 1157–1164.

163. *Smith J.* Internal dynamics of globular proteins: comparison of neutron scattering measurements and theoretical models / Smith J., Kuczera K., Tidor B., Doster W., Cusack S., Karplus M. // Physica B: Condensed Matter – 1989. – V. 156 – P. 437–443.

164. *Yusuff O.K.* Role of the subunit interactions in the conformational transitions in adult human hemoglobin: an explicit solvent molecular dynamics study / Yusuff O.K., Babalola J.O., Bussi G., Raugei S. // The Journal of Physical Chemistry B – 2012. – V. 116 – № 36 – P. 11004–11009.

165. *Hage K.* El Valid molecular dynamics simulations of human hemoglobin require a surprisingly large box size / Hage K. El, Hedin F., Gupta P.K., Meuwly M., Karplus M. // Elife – 2018. – V. 7 – P. e35560.

166. *Stadler A.M.* Cytoplasmic water and hydration layer dynamics in human red blood cells / Stadler A.M., Embs J.P., Digel I., Artmann G.M., Unruh T., Büldt G., Zaccai G. // Journal of the American Chemical Society – 2008. – V. 130 – № 50 – P. 16852–16853.

167. *Brearley C.J.* Effects of haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis on abnormalities of ion transport in vivo in patients with chronic renal failure / Brearley C.J., Aronson J.K., Boon N.A., Raine A.E.G. // *Clinical Science* – 1993. – V. 85 – № 6 – P. 725–731.

168. *Коваленко С.С.* Изменение конформации гемопорфирина гемоглобина и связывания NO в эритроцитах при действии инсулиноподобного фактора роста 1 / Коваленко С.С., Паршина Е.Ю., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Рубин А.Б. // *Биофизика* – 2014. – V. 59 – № 6 – С. 1093–1096.

169. *Иванова С.М.* Морфобioхимические показатели эритроцитов и состояния гемопорфиринов гемоглобина у обследуемых в динамике кратковременной изоляции в гермообъеме / Иванова С.М., Лабецкая О.И., Анисимов Н.А., Максимов Г.В., Паршина Е.Ю., Юсипович А.И. // *Авиакосмическая и экологическая медицина* – 2019. – V. 53 – № 2 – С. 62–67.

170. *Fu D.* Quantitative chemical imaging with multiplex stimulated Raman scattering microscopy / Fu D., Lu F.K., Zhang X., Freudiger C., Pernik D.R., Holtom G., Xie X.S. // *Journal of the American Chemical Society* – 2012. – V. 134 – № 8 – P. 3623–3626.

171. *Fu Y.* Paranodal myelin retraction in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis visualized by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy / Fu Y., Cheng J.-X., Frederick T.J., Goings G.E., Miller S.D., Huff T.B. // *Journal of Biomedical Optics* – 2011. – V. 16 – № 10 – P. 106006.

172. *Tomaiuolo G.* Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics / Tomaiuolo G. // *Biomicrofluidics* – 2014. – V. 8 – № 5 – P. 51501.

173. *Бондарь Н.В.* Вклад внутренних и поверхностных состояний носителей заряда в спектры излучения квантовых точек CdS в боросиликатном стекле / Бондарь Н.В., Бродин М.С., Тельбиз Г.М. // *Физика и техника полупроводников* – 2006. – V. 40 – № 8 – С. 948–954.

174. *Katyukhin L.N.* Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases / Katyukhin L.N., Kazennov A.M., Maslova M.N.,

Matskevich Y.A. // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology – 1998. – V. 120 – № 3 – P. 493–498.

175. *Krzesinski J.-M.* Plasma Na-K ATPase inhibitor activity and intracellular ions during hemodialysis / Krzesinski J.-M., Du F., Pequeux M.L., Rorive G.L. // The International Journal of Artificial Organs – 1993. – V. 16 – № 1 – P. 23–30.

176. *Головкин А.С.* Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов / Головкин А.С., Асадуллина И.А., Кудрявцев И.В. // Медицинская иммунология – 2018. – Т. 20 – № 4 – С. 463–476.

177. *Hamlyn J.M.* Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis / Hamlyn J.M., Hamilton B.P., Manunta P. // Journal of hypertension – 1996. – V. 14 – № 2 – P. 151–167.

178. *Yang S.* Targeting Na⁺/K⁺-ATPase by berbamine and ouabain synergizes with sorafenib to inhibit hepatocellular carcinoma / Yang S., Yang S., Zhang H., Hua H., Kong Q., Wang J., Jiang Y. // British Journal of Pharmacology – 2021. – V. 178 – № 21 – P. 4389–4407.

179. *Dobler S.* Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na,K-ATPase / Dobler S., Dalla S., Wagschal V., Agrawal A.A. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2012. – V. 109 – № 32 – P. 13040–13045.

180. *Franceschi L. de* Red blood cell cation transports in uraemic anaemia: evidence for an increased K/Cl co-transport activity. Effects of dialysis and erythropoietin treatment / Franceschi L. de, Oliveri O., Girelli D., Lupo A., Bernich P., Corrocher R. // European Journal of Clinical Investigation – 1995. – V. 25 – № 10 – P. 762–768.

181. *Weiler E.W.* Relationship of Na-K-ATPase inhibitors to blood-pressure regulation in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis. / Weiler E.W., Saldanha L.F., Khalil-Manesh F., Prins B.A., Purdy R.E., Gonick H.C. // Journal of the American Society of Nephrology – 1996. – V. 7 – № 3 – P. 454–463.

182. *Cartwright R.A.* Epidemiology of Hodgkin's disease: a review / Cartwright R.A., Watkins G. // Hematological oncology – 2004. – V. 22 – № 1 – P. 11–26.

183. *Суслин С.А.* Организация гематологической помощи взрослому

населению Самарской области / Суслин С.А., Давыдкин И.Л., Шешунова Р.А. // Современные проблемы науки и образования – 2016. – V. 6 – С. 76–82.

184. *Мадеева Д.В.* Легочная гипертензия: трудный случай в клинической практике / Мадеева Д.В., Драпкина О.М., Схиртладзе М.Р., Сергеев И.Е., Ивашкин В.Т. // Клиницист – 2011. – № 4 – С. 53–54.

185. *Sharma S.* Role of oxidized lipids in pulmonary arterial hypertension / Sharma S., Ruffenach G., Umar S., Motayagheni N., Reddy S.T., Eghbali M. // Pulmonary circulation – 2016. – V. 6 – № 3 – P. 261–273.

186. *Morrell N.W.* Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension / Morrell N.W., Adnot S., Archer S.L., Dupuis J., Jones P.L., MacLean M.R., McMurtry I.F., Stenmark K.R., Thistlethwaite P. A., Weissmann N., Yuan J.X.-J., Weir E.K. // Journal of the American College of Cardiology – 2009. – V. 54 – № 1 – P. 20–31.

187. *Escribá P. V.* Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies / Escribá P. V, González-Ros J.M., Goñi F.M., Kinnunen P.K.J., Vigh L., Sánchez-Magraner L., Fernández A.M., Busquets X., Horváth I., Barceló-Coblijn G. // Journal of cellular and molecular medicine – 2008. – V. 12 – № 3 – P. 829–875.

188. *Batta G.* Alterations in the properties of the cell membrane due to glycosphingolipid accumulation in a model of Gaucher disease / Batta G., Soltész L., Kovács T., Bozó T., Mészár Z., Kellermayer M., Szöllősi J., Nagy P. // Scientific reports – 2018. – V. 8 – № 1 – P. 1–13.

189. *Лукина Е.А.* Болезнь Гоше: современная диагностика и лечение / Лукина Е.А. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика – 2009. – Т. 2 – № 2 – С. 196–199.

190. *Hein L.K.* Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease / Hein L.K., Meikle P.J., Hopwood J.J., Fuller M. // Molecular genetics and metabolism – 2007. – V. 92 – № 4 – P. 336–345.

191. *Заклякова Л.В.* Болезнь Гоше в Астраханской области: клиника, особенности современной диагностики и терапии / Заклякова Л.В., Левитан Б.Н., Овсянникова Е.Г., Шамгунова Б.А., Петелина И.Ю., Болгова М.Ю., Закляков К.К.,

Овсянникова Л.С. // Астраханский медицинский журнал – 2020. – Т. 15 – № 2 – С. 61–68.

192. *Piette J.* Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers / Piette J., Volanti C., Vantieghem A., Matroule J.-Y., Habraken Y., Agostinis P. // *Biochemical Pharmacology* – 2003. – V. 66 – № 8 – P. 1651–1659.

193. *Kitagawa T.* Nature of the Iron-Ligand Bond in Ferrous Low Spin Hemoproteins Studied by Resonance Raman Scattering / Kitagawa T., Kyogoku Y., Iizuka T., Saito M.I. // *Journal of the American Chemical Society* – 1976. – V. 98 – № 17 – P. 5169–5173.

194. *Moisenovich M.M.* Novel photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization / Moisenovich M.M., Ol'Shevskaya V.A., Rokitskaya T.I., Ramonova A.A., Nikitina R.G., Savchenko A.N., Tatarskiy V. V., Kaplan M.A., Kalinin V.N., Kotova E.A., Uvarov O. V., Agapov I.I., Antonenko Y.N., Shtil A.A. // *PLoS ONE* – 2010. – V. 5 – № 9 – P. e12717.

195. *Vereshchagina V.M.* Effect of penicillin on red blood cell membranes / Vereshchagina V.M. // *Antibiotiki* – 1984. – V. 29 – № 1 – P. 40–42.

196. *Spikes J.D.* New trends in photobiology: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine / Spikes J.D. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 1990. – V. 6 – № 3 – P. 259–274.

197. *Mojzisova H.* Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems / Mojzisova H., Bonneau S., Maillard P., Berg K., Brault D. // *Photochemical & Photobiological Sciences* – 2009. – V. 8 – № 6 – P. 778–787.

198. *Gurinovich G.P.* Photosensitization by chlorine and porphyrin causing structural damage of erythrocytes / Gurinovich G.P., Zorina T.E., Zorin V.P., Sarzhevskaya M. V, Cherenkevich S.N. // *Biofizika* – 1988. – V. 33 – № 2 – P. 314–318.

199. *Antonenko Y.N.* Photodynamic activity of the boronated chlorin e6 amide in artificial and cellular membranes / Antonenko Y.N., Kotova E.A., Omarova E.O., Rokitskaya T.I., Ol'Shevskaya V.A., Kalinin V.N., Nikitina R.G., Osipchuk J.S., Kaplan

M.A., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* – 2014. – V. 1838 – № 3 – P. 793–801.

200. *Rich S.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. / Rich S., Dantzker D.R., Ayres S.M., Bergofsky E.H., Brundage B.H., Detre K.M., Fishman A.P., Goldring R.M., Groves B.M., Koerner S.K. // *Annals of internal medicine* – 1987. – V. 107 – № 2 – P. 216–223.

201. *Humbert M.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. / Humbert M., Sitbon O., Chaouat A., Bertocchi M., Habib G., Gressin V., Yaici A., Weitzenblum E., Cordier J.-F., Chabot F., Dromer C., Pison C., Reynaud-Gaubert M., Haloun A., Laurent M., Hachulla E., Simonneau G. // *American journal of respiratory and critical care medicine* – 2006. – V. 173 – № 9 – P. 1023–1030.

202. *Frost A.E.* The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: how reveal differs from historic and non-US Contemporary Registries. / Frost A.E., Badesch D.B., Barst R.J., Benza R.L., Elliott C.G., Farber H.W., Krichman A., Liou T.G., Raskob G.E., Wason P., Feldkircher K., Turner M., McGoon M.D. // *Chest* – 2011. – V. 139 – № 1 – P. 128–137.

203. *Hoepfer M.M.* Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension / Hoepfer M.M., Bogaard H.J., Condliffe R., Frantz R., Khanna D., Kurzyna M., Langleben D., Manes A., Satoh T., Torres F., Wilkins M.R., Badesch D.B. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2013. – V. 62 – № 25 – P. 42–50.

204. *Чазова И.Е.* Диагностика и лечение легочной гипертензии / Чазова И.Е., Мартынюк Т.В. Валиева, З. С., Азизов, В. А. О., Барбараш, О. Л., Веселова, Т. Н., Шмальц, А. А. // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика* – 2007. – № 6 – С. 15.

205. *Рябыкина Г.В.* Электровекторкардиографическая диагностика гипертрофии правого желудочка у больных легочной гипертензией / Рябыкина Г.В., Блинова Е.В. Сахнова Т.А. // *Медицинский алфавит* – 2017. – Т. 8 – С. 3–17.

206. *Чазова И.Е.* Клинические рекомендации по диагностике и лечению легочной гипертензии / Чазова И.Е., Авдеев, С. Н., Царева, Н. А., Волков, А. В., Мартынюк, Т. В., Наконечников, С. Н. // *Клинические рекомендации по*

диагностике и лечению легочной гипертензии – 2014. – Т. 9 – № 13 – С. 4–23.

207. *Milne E.N.C.* Forgotten gold in diagnosing pulmonary hypertension: the plain chest radiograph // *Radiographics*. – 2012. – V. 32. – № 4. – P. 1085–1087.

208. *Mukerjee D.* Echocardiography and pulmonary function as screening tests for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. / Mukerjee D., St George D., Knight C., Davar J., Wells A.U., Bois R.M. Du, Black C.M., Coghlan J.G. // *Rheumatology (Oxford, England)* – 2004. – V. 43 – № 4 – P. 461–466.

209. *Fisher M.R.* Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. / Fisher M.R., Forfia P.R., Chamera E., Houston-Harris T., Champion H.C., Girgis R.E., Corretti M.C., Hassoun P.M. // *American journal of respiratory and critical care medicine* – 2009. – V. 179 – № 7 – P. 615–621.

210. *Torbicki A.* Cardiac magnetic resonance in pulmonary arterial hypertension: a step in the right direction // *Eur. Heart J.* – 2007. – V. 28. – № 10. – 1187–1189P.

211. *Savarese G.* Do changes of 6-minute walk distance predict clinical events in patients with pulmonary arterial hypertension? A meta-analysis of 22 randomized trials / Savarese G., Paolillo S., Costanzo P., D'Amore C., Cecere M., Losco T., Musella F., Gargiulo P., Marciano C., Perrone-Filardi P. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2012. – V. 60 – № 13 – P. 1192–1201.

212. *Trip P.* Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: patient characteristics and treatment responses. / Trip P., Nossent E.J., Man F.S. de, Berk I.A.H. van den, Boonstra A., Groepenhoff H., Leter E.M., Westerhof N., Grunberg K., Bogaard H.-J., Vonk-Noordegraaf A. // *The European respiratory journal* – 2013. – V. 42 – № 6 – P. 1575–1585.

213. *Holverda S.* Cardiopulmonary exercise test characteristics in patients with chronic obstructive pulmonary disease and associated pulmonary hypertension. / Holverda S., Bogaard H.J., Groepenhoff H., Postmus P. E., Boonstra A., Vonk-Noordegraaf A. // *Respiration; international review of thoracic diseases* – 2008. – V. 76 – № 2 – P. 160–167.

214. *Hoepfer M.M.* Complications of right heart catheterization procedures in patients with pulmonary hypertension in experienced centers. / Hoepfer M.M., Lee S.H.,

Voswinckel R., Palazzini M., Jais X., Marinelli A., Barst R.J., Ghofrani H.A., Jing Z.-C., Opitz C., Seyfarth H.-J., Halank M., McLaughlin V., Oudiz R.J., Ewert R., Wilkens H., Kluge S., Bremer H.-C., Baroke E., Rubin L.J. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2006. – V. 48 – № 12 – P. 2546–2552.

215. *Ahearn G.S.* Electrocardiography to define clinical status in primary pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension secondary to collagen vascular disease / Ahearn G.S., Tapson V.F., Rebeiz A., Greenfield J.C. // *Chest* – 2002. – V. 122 – № 2.

216. *Lowe B.S.* Diagnosis of pulmonary hypertension in the congenital heart disease adult population: Impact on outcomes / Lowe B.S., Therrien J., Ionescu-Ittu R., Pilote L., Martucci G., Marelli A.J. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2011. – V. 58 – № 5 – P. 538–546.

217. *D'Alonzo G.E.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a national prospective registry / D'Alonzo G.E., Barst R.J., Ayres S.M., Bergofsky E.H., Brundage B.H., Detre K.M., Fishman A.P., Goldring R.M., Groves B.M., Kernis J.T. // *Annals of internal medicine* – 1991. – V. 115 – № 5 – P. 343–349.

218. *Nagababu E.* Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells / Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., Ostera G.R., Rifkind J.M. // *Life Sciences* – 2010. – V. 86 – № 3–4 – P. 1330138.

219. *Hofmann U.G.* Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope / Hofmann U.G., Rotsch C., Parak W.J., RadMacHer M. // *Journal of Structural Biology* – 1997. – V. 119 – № 2 – P. 84–91.

220. *Козинец Г.И.* Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови / Г. И. Козинец, Ю. А. Симоварт – Таллин, 1984. Вып. Валгус– 116 с.

221. *Белоусова О.Д.* Особенности подготовки проб крови для исследования морфологических параметров и структуры мембран эритроцитов методами атомно-силовой микроскопии / Белоусова О.Д., Толмачев И.А., Гайдаш А.А., Левичев В.В., Жуков М.В., Белоусов И.С. // *Medline. ru. Российский биомедицинский журнал* – 2012. – Т. 13 – № 4 – С. 954–966.

222. *Makhro A.* NMDA receptor activity in circulating red blood cells: methods of detection / Makhro A., Kaestner L., Bogdanova A. // *NMDA Receptors: Methods and Protocols* – 2017. – P. 265–282.

223. *Link A.J.* Trichloroacetic acid (TCA) precipitation of proteins / Link A.J., LaBaer J. // *Cold Spring Harbor Protocols* – 2011. – V. 2011 – № 8 – P.pdb-prot5651.

224. *Fedorov D.A.* Na⁺ i/K⁺ i imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl / Fedorov D.A., Sidorenko S. V, Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Tverskoi A.M., Abramicheva P. A., Maksimov G. V, Orlov S.N., Lopina O.D., Klimanova E.A. // *Heliyon* – 2021. – V. 7 – № 9 – P. e08088.

225. *Zor T.* Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies / Zor T., Selinger Z. // *Analytical biochemistry* – 1996. – V. 236 – № 2 – P. 302–308.

226. Слатинская О.В. Исследование изменений конформации гема и глобина при изменении температуры и нормобарической гипоксии / Слатинская О.В., Лунева О.Г., Деев Л.И., Орлов С.Н., Максимов Г.В. // *Биофизика* – 2020. – V. 65 – № 2 – С. 250–258.

227. *Sidorenko S. V.* Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes / Sidorenko S. V., Ziganshin R.H., Luneva O.G., Deev L.I., Alekseeva N. V., Maksimov G. V., Grygorczyk R., Orlov S.N. // *Journal of Proteomics* – 2018. – V. 184 – P. 25–33.

228. *Stetefeld J.* Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // *Biophys. Rev.* – 2016. – Т. 8. – № 4. – 409–427P.

229. Санкт-Петербургский государственный университет © 2020. Ресурсный центр «Оптические и лазерные методы исследования вещества» // <https://laser.spbu.ru/projects-rus/drl-rus.html> [Электронный ресурс]. URL: <https://laser.spbu.ru/projects-rus/drl-rus.html>.

230. *Шмидт В.* Оптическая спектроскопия для химиков и биологов / В. Шмидт – Москва: Техносфера, 2007. Вып. Техносфера– 368 с.

231. *Goldburg W.I.* Dynamic light scattering / Goldburg W.I. // *American Journal of Physics* – 1999. – V. 67 – № 12 – P. 1152–1160.

232. *Ермаков Ю.А.* Биоэлектрохимия Бислойных Липидных Мембран / Ермаков Ю.А. // Российский Химический Журнал – 2005. – V. 49 – № 5 – С. 114–120.
233. *Helmholtz H.* Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche / Helmholtz H. // Annalen der Physik – 1853. – V. 165 – № 6 – P. 353–377.
234. Анализаторы размеров частиц серии Zetasizer ZS. Руководство пользователя. ООО “Malvern Panalytical” / – Worcestershire, UK: Malvern Instruments Limited, 2018.– 20 с.
235. *Huang Y.X.* Human red blood cell aging: Correlative changes in surface charge and cell properties / Huang Y.X., Wu Z.J., Mehrishi J., Huang B.T., Chen X.Y., Zheng X.J., Liu W.J., Luo M. // Journal of Cellular and Molecular Medicine – 2011. – V. 15 – № 12 – P. 2634–2642.
236. *Харамоненко С.С.* Электрофорез клеток крови в норме и патологии / С. С. Харамоненко, А. А. Ракитянская – 1974.– 135с.
237. *Adak S.* Dynamic and electrokinetic behavior of erythrocyte membrane in diabetes mellitus and diabetic cardiovascular disease / Adak S., Chowdhury S., Bhattacharyya M. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects – 2008. – V. 1780 – № 2 – P. 108–115.
238. *Leverenz R.L.* A 12 A carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection / Leverenz R.L., Sutter M., Wilson A., Gupta S., Thurotte A., Bourcier de Carbon C., Petzold C.J., Ralston C., Perreau F., Kirilovsky D., Kerfeld C.A. // Science – 2015. – V. 348 – № 6242 – P. 1463–1466.
239. *Levine S.* Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes / Levine S., Levine M., Sharp K.A., Brooks D.E. // Biophysical journal – 1983. – V. 42 – № 2 – P. 127–135.
240. *Tikhomirova I.A.* Correlation between electrophoretic mobility and extent of aggregation of human red blood cells / Tikhomirova I.A., Murav'ev A. V., Mikhailichenko L.A., Golubkova E. V. // Human Physiology – 2006. – V. 32 – № 6 – P. 748–749.

241. *Vandenabeele P.* A decade of Raman spectroscopy in art and archaeology / *Vandenabeele P., Edwards H.G.M., Moens L.* // *Chemical reviews* – 2007. – V. 107 – № 3 – P. 675–686.

242. *Кэри П.* Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии / *П. Кэри* / под ред. перевод с англ. А.А.С.; под ред. Б.В. Локшина. – Москва, 1985. Вып. Мир–272 с.

243. *Pézolet M.* Raman spectroscopy of nerve fibers. A study of membrane lipids under steady state conditions. / *Pézolet M., Georgescauld D.* // *Biophysical journal* – 1985. – V. 47 – P. 367–372.

244. *Кузнецов С.А.* Плазмон-усиленная колебательная спектроскопия полупроводниковых нанокристаллов / *Кузнецов С.А., Латышев А.В.* // *Автометрия* – 2020. – Т. 56 – № 5 – С. 64–71.

245. *Wood B.R.* Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo / *Wood B.R., McNaughton D.* // *Journal of Raman Spectroscopy* – 2002. – V. 33 – № 7 – P. 517–523.

246. *Friedman J.M.* The iron-proximal histidine linkage and protein control of oxygen binding in hemoglobin. A transient Raman study / *Friedman J.M., Scott T.W., Stepnoski R.A., Ikeda-Saito M., Yonetani T.* // *Journal of Biological Chemistry* – 1983. – V. 258 – № 17 – P. 10564–10572.

247. *Strekas T.C.* Hemoglobin: resonance Raman spectra / *Strekas T.C., Spiro T.G.* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* – 1972. – V. 263 – № 3 – P. 830–833.

248. *Woody R.W.* The role of heme chirality in the circular dichroism of heme proteins / *Woody R.W., Pescitelli G.* // *Zeitschrift fur Naturforschung - Section A Journal of Physical Sciences* – 2014. – V. 69 – № 7 – P. 313–325.

249. *Nagai M.* A role of heme side-chains of human hemoglobin in its function revealed by circular dichroism and resonance Raman spectroscopy / *Nagai M., Mizusawa N., Kitagawa T., Nagatomo S.* // *Biophysical Reviews* – 2018. – V. 10 – P. 271–284.

250. *Wood B.R.* Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation / *Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancherri S.,*

McNaughton D. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – 2007. – V. 387 – P. 1691–1703.

251. *Nagatomo S.* Quaternary Structures of Intermediately Ligated Human Hemoglobin A and Influences from Strong Allosteric Effectors: Resonance Raman Investigation / Nagatomo S., Nagai M., Mizutani Y., Yonetani T., Kitagawa T. // *Biophysical Journal* – 2005. – V. 89 – № 2 – P. 1203–1213.

252. *Choi S.* Structural Correlations and Vinyl Influences in Resonance Raman Spectra of Protoheme Complexes and Proteins / Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M., Budd D.L., Mar G.N.L. // *Journal of the American Chemical Society* – 1982. – V. 104 – № 16 – P. 4345–4351.

253. *Howell N.K.* Raman spectral analysis in the C - H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions / Howell N.K., Arteaga G., Nakai S., Li-Chan E.C.Y. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry* – 1999. – V. 47 – № 3 – P. 924–933.

254. *Kang J.W.* Combined confocal Raman and quantitative phase microscopy system for biomedical diagnosis / Kang J.W., Lue N., Kong C.-R., Barman I., Dingari N.C., Goldfless S.J., Niles J.C., Dasari R.R., Feld M.S. // *Biomedical Optics Express* – 2011. – V. 2 – № 9 – P. 2484.

255. *Wood B.R.* Micro-Raman characterization of high- and low-spin heme moieties within single living erythrocytes / Wood B.R., McNaughton D. // *Biopolymers* – 2002. – V. 67 – № 4–5 – P. 259–262.

256. *Wood B.R.* Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium / Wood B.R., Chiriboga L., Yee H., Quinn M.A., McNaughton D., Diem M. // *Gynecologic Oncology* – 2004. – V. 93 – № 1 – P. 59–68.

257. *Parthasarathi N.* Metalloporphyrin Core Size Resonance Raman Marker Bands Revisited: Implications for the Interpretation of Hemoglobin Photoproduct Raman Frequencies / Parthasarathi N., Hansen C., Yamaguchi S., Spiro T.G. // *J. Am. Chem. SOC* – 1987. – V. 109 – № 13 – P. 3865–3871.

258. *Yu N.-T.* Resonance Raman studies of nitric oxide binding to ferric and

ferrous hemoproteins: Detection of Fe(III)-NO stretching, Fe(III)-N-O bending, and Fe(II)-N-O bending vibrations / Yu N.-T., BENKO B. // Proc. Natl. Acad. Sci USA – 1983. – V. 80 – P. 7042–7046.

259. *Camp C.H.* Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering / Camp C.H., Cicerone M.T. // Nature Photonics – 2015. – V. 9 – № 5 – P. 295–305.

260. *Torres Filho I.P.* Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation / Torres Filho I.P., Terner J., Pittman R.N., Proffitt E., Ward K.R. // Journal of Applied Physiology – 2008. – V. 104 – № 6 – P. 1809–1817.

261. *Scholler D.M.* Resonance Raman and EPR of nitrosyl human hemoglobin and chains, carp hemoglobin, and model compounds. Implications for the nitrosyl heme coordination state. / Scholler D.M., Wang M.Y., Hoffman B.M. // Journal of Biological Chemistry – 1979. – V. 254 – № 10 – P. 4072–4078.

262. *Набиев И.П.* Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к изучению биологических молекул / Набиев И.П., Ефремов Р.Г., Чумаков Г.Д. // Успехи физических наук – 1988. – Т. 154 – № 3 – С. 4590496.

263. *Fleischmann M.* Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode / Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. // Chemical physics letters – 1974. – V. 26 – № 2 – P. 163–166.

264. *Jeanmaire D.L.* Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode / Jeanmaire D.L., Duyne R.P. Van // Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry – 1977. – V. 84 – № 1 – P. 1–20.

265. *Albrecht M.G.* Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode / Albrecht M.G., Creighton J.A. // Journal of the American Chemical Society – 1977. – V. 99 – № 15 – P. 5215–5217.

266. *Zhang N.* Ultrabroadband metasurface for efficient light trapping and localization: A universal surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for “all” excitation wavelengths / Zhang N., Liu K., Liu Z., Song H., Zeng X., Ji D., Cheney A.,

Jiang S., Gan Q. // *Advanced Materials Interfaces* – 2015. – V. 2 – № 10 – P. 1500142.

267. *Wang Y.* Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology / Wang Y., Irudayaraj J. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* – 2013. – V. 368 – № 1611 – P. 20120026.

268. *Володина М.О.* Композиция, обладающая гкр-активностью для определения полиароматических гетероциклических серосодержащих соединений в углеводородных продуктах, способ получения композиции, планарный твердофазный оптический сенсор на ее основе и способ его получения, применение сенсора для анализа полиароматических гетероциклических серосодержащих соединений / Володина М.О., Сидоров А.В., Еремина О.Е., Веселова И.А., Гудилин Е.А. – 2017.

269. *Bankapur A.* A micro-Raman study of live, single red blood cells (RBCs) treated with AgNO₃ nanoparticles / Bankapur A., Barkur S., Chidangil S., Mathur D. // *PLoS One* – 2014. – V. 9 – № 7 – P. e103493.

270. *Максимов Г.В.* Спектроскопия комбинационного рассеяния и наночастицы серебра в биомедицинских исследованиях гемоглобина / Максимов Г.В., Сазонтова Т.Г., Коваленко С.С., Браже Н.А., Семенова А.А., Паршина Е.Ю., Кузьмичева Л.В., Шутова В.В., Юсипович А.И., Сосновцева О.В., Гудилин Е.А., Архипенко Ю.В. // *Вестник Московского Университета. Химия* – 2015. – Т. 56 – № 3 – С. 158–163.

271. *Стецюра И.Ю.* Различные типы платформ для гигантского комбинационного рассеяния и их применение / Стецюра И.Ю., Горин Д.А. // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика* – 2013. – Т. 13 – № 2 – С. 84–87.

272. *Semenova A.A.* Planar SERS Nanostructures with Stochastic Silver Ring Morphology for Biosensor Chips / Semenova A.A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov, V.K., Baranchikov A.E., Lebedev V.A., Goldt A.E., Sosnovtseva O.V., Savilov S.V., Egorov A.V., Brazhe A.R., Parshina E.Y., Luneva O.G., Maksimov G.V., Tretyakov Y.D. – 2012. – Т. 22 – № 47 – P. 24530–24544.

273. *Ali-Seyed M.* Photolon™-photosensitization induces apoptosis via ROS-

mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes / Ali-Seyed M., Bhuvanewari R., Soo K.C., Olivo M. // *International journal of oncology* – 2011. – V. 39 – № 4 – P. 821–831.

274. *Senge M.O.* Temoporfin (Foscan®, 5, 10, 15, 20-tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin)—a second-generation photosensitizer / Senge M.O., Brandt J.C. // *Photochemistry and photobiology* – 2011. – V. 87 – № 6 – P. 1240–1296.

275. *Nichiporovich I.N.* Spectral and photosensitizing properties of bacteriochlorin a and its monomethyl and dimethyl esters / Nichiporovich I.N., Vadetskaya T.N., Vorobei A. V, Kochubeeva N.D., Kuz'mitskii V.A. // *Journal of Applied Spectroscopy* – 2006. – V. 73 – № 1 – P. 107–114.

276. *Rokitskaya T.I.* Boronated derivatives of chlorin e6 and fluoride-containing porphyrins as penetrating anions: A study using bilayer lipid membranes / Rokitskaya T.I., Zaitsev A. V., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Moisenovich M.M., Agapov I.I., Antonenko Y.N. // *Biochemistry (Moscow)* – 2012. – V. 77 – № 9 – P. 975–982.

277. *Yusipovich A.I.* Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy / Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O. V., Levin G.G., Maksimov G. V., Rubin A.B. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2008. – V. 145 – P. 382–385.

278. *Атаходжаев А.* Лазерная интерференционная микроскопия для нанотехнологий / Атаходжаев А., Игнатъев П., Индукаев К., Осипов П. // *Фотоника* – 2012. – № 2 – P. 52–55.

279. *Vishnyakov G.N.* Optical tomography of living cells using phase-shifting Linnik microscope / Vishnyakov G.N., Levin G.G. // *Optical Biopsies and Microscopic Techniques* – 1999. – V. 3568 – № 9 – P. 29–32.

280. *Brazhe A.R.* Non-invasive study of nerve fibres using laser interference microscopy / Brazhe A.R., Brazhe N.A., Rodionova N.N., Yusipovich A.I., Ignatyev P.S., Maksimov G. V., Mosekilde E., Sosnovtseva O. V. // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* – 2008. – V. 366 – № 1880 – P. 3463–3481.

281. *Rappaz B.* Measurement of the integral refractive index and dynamic cell

morphometry of living cells with digital holographic microscopy / Rappaz B., Marquet P., Cuche E., Emery Y., Depeursinge C., Magistretti P.J. // *Optics Express* – 2005. – V. 13 – № 23 – P. 9361–9373.

282. *Levin G.G.* Coherent oscillations of the state of protein molecules in living cells / Levin G.G., Bulygin F. V, Vishnyakov G.N. // *Tsitologiya* – 2005. – V. 47 – № 4 – P. 348–356.

283. *Mazeron P.* On intensity reinforcements in small-angle light scattering patterns of erythrocytes under shear / Mazeron P., Muller S., Azouzi H. El // *European Biophysics Journal* – 1997. – V. 26 – № 3 – P. 247–252.

284. *Yusipovich A.I.* Peculiarities of studying an isolated neuron by the method of laser interference microscopy / Yusipovich A.I., Novikov S.M., Kazakova T.A., Erokhova L.A., Brazhe N.A., Lazarev G.L., Maksimov G. V // *Quantum Electronics* – 2006. – V. 36 – № 9 – P. 874.

285. *Yusipovich A.I.* Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: Impact of cell volume and refractive index / Yusipovich A.I., Zagubizhenko M. V., Levin G.G., Platonova A., Parshina E.Y., Grygorczyk R., Maksimov G. V., Rubin A.B., Orlov S.N. // *Journal of Microscopy* – 2011. – V. 244 – № 3 – P. 223–229.

286. *Yusipovich A.I.* Use of a Laser Interference Microscope for Estimating Fluctuations and the Equivalent Elastic Constant of Cell Membranes / Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Baizhumanov A.A., Pirutin S.K., Ivanov A.D., Minaev V.L., Levin G.G., Maksimov G. V // *Instruments and Experimental Techniques* – 2021. – V. 64 – № 6 – P. 877–885.

287. *Zernike F.* Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects / Zernike F. // *Physica* – 1942. – V. 9 – № 7 – P. 686–698.

288. *Vishnyakov G.N.* Tomographic interference microscopy of living cells / Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L., Pickalov V. V, Likhachev A. V // *Microscopy and Analysis* – 2004. – P. 15–18.

289. *Vishnyakov G.N.* Investigation of the Method of Local Optical Tomography by Differential Projections / Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L., Ermakov M.M. // *Optics and Spectroscopy* – 2018. – V. 125 – № 6 – P. 1065–1073.

290. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli U.K. // *Nature* – 1970. – V. 227 – № 5259 – P. 680–685.
291. *Towbin H.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proceedings of the national academy of sciences* – 1979. – V. 76 – № 9 – P. 4350–4354.
292. *Smith B.J.* SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins Springer, 1984. – 41–55P.
293. *Lakowicz J.R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz – , 2014.– 500с.
294. *Глебович Г.В.* Исследование объектов с помощью пикосекундных импульсов / Г. В. Глебович, А. В. Андриянов, Ю. В. Введенский, И. П. Ковалев, В. В. Крылов, Ю. А. Рябинин – Государственное унитарное предприятие научно-техническое издательство" Радио ..., 1984.– 256с.
295. *Oort B. Van* Picosecond fluorescence of intact and dissolved PSI-LHCI crystals / Oort B. Van, Amunts A., Borst J.W., Hoek A. Van, Nelson N., Amerongen H. Van, Croce R. // *Biophysical journal* – 2008. – V. 95 – № 12 – P. 5851–5861.
296. *Zhang G.* Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy / Zhang G., Que Q., Pan J., Guo J. // *Journal of molecular structure* – 2008. – V. 881 – № 1–3 – P. 132–138.
297. *Wang Y.* Comparative studies of interactions of hemoglobin with single-chain and with gemini surfactants / Wang Y., Guo R., Xi J. // *Journal of colloid and interface science* – 2009. – V. 331 – № 2 – P. 470–475.
298. *Li R.* Changes of tyrosine and tryptophan residues in human hemoglobin by oxygen binding: Near- and far-UV circular dichroism of isolated chains and recombined hemoglobin / Li R., Nagai Y., Nagai M. // *Journal of Inorganic Biochemistry* – 2000. – V. 82 – № 1–4 – P. 93–101.
299. *Mahato M.* Hemoglobin– silver interaction and bioconjugate formation: A spectroscopic study / Mahato M., Pal P., Kamilya T., Sarkar R., Chaudhuri A., Talapatra

G.B. // The Journal of Physical Chemistry B – 2010. – V. 114 – № 20 – P. 7062–7070.

300. *Gryzunov Y.A.* Serum albumin binding sites properties in donors and in schizophrenia patients: the study of fluorescence decay of the probe K-35 using S-60 synchrotron pulse excitation / Gryzunov Y.A., Syreishchikova T.I., Komarova M.N., Misionzhnik E.Y., Uzbekov M.G., Molodetskich A. V, Dobretsov G.E., Yakimenko M.N. // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment – 2000. – V. 448 – № 1–2 – P. 478–482.

301. *Бек М.* Исследование комплексообразования спектрофотометрическими методами / М. Бек, И. Надьпал – 1989.– 256с.

302. *Смит А.* Прикладная ИК-спектроскопия. Пер. с англ. БН Тарасевича/Под ред. АА Мальцева / А. Смит – М.:Мир, 1982.– 450с.

303. *Колесник И.В.* Инфракрасная спектроскопия: методическая разработка факультета наук о материалах / И. В. Колесник, Н. А. Саполетова – 2011. – 62 с.

304. *Тарасевич Б.Н.* ИК спектры основных классов органических соединений / Б. Н. Тарасевич – 2012.– 55 с.

305. *Socrates G.* Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts / G. Socrates – John Wiley & Sons, 2004.– 92 с.

306. *Din S.* El Effect of gamma irradiation on infrared spectra of rat hemoglobin / Din S. El, Aisha A., Bahay A.Z. El // Radiation Physics and Chemistry – 1994. – V. 44 – № 1–2 – P. 195–197.

307. *Polakovs M.* Micro-Raman scattering and infrared spectra of hemoglobin / Polakovs M., Mironova-Ulmane N., Kurjane N., Reinholds E., Grube M. // Sixth International Conference on Advanced Optical Materials and Devices (AOMD-6) – 2008. – V. 7142 – № 12 – P. 306–313.

308. *Wood B.R.* Micro-Raman characterization of high- and low-spin heme moieties within single living erythrocytes , 2002.

309. *Torres Filho I.P.* Oxygen saturation monitoring using resonance Raman spectroscopy / Torres Filho I.P., Nguyen N.M., Jivani R., Turner J., Romfh P., Vakhshoori D., Ward K.R. // Journal of Surgical Research – 2016. – V. 201 – № 2 – P.

425–431.

310. *Rosa M.C. De* The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron / Rosa M.C. De, Alinovi C.C., Galtieri A., Scatena R., Giardina B. // *Gene* – 2007. – V. 398 – № 1–2 – P. 162–171.

311. *Wood B.R.* Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo / Wood B.R., McNaughton D. // *Journal of Raman Spectroscopy* – 2002. – V. 33 – № 7 – P. 517–523.

312. *Marzec K.M.* Red blood cells polarize green laser light revealing hemoglobin's enhanced non-fundamental Raman modes / Marzec K.M., Perez-Guaita D., Veij M. De, McNaughton D., Baranska M., Dixon M.W.A., Tilley L., Wood B.R. // *ChemPhysChem* – 2014. – V. 15 – № 18 – P. 3963–3968.

313. *Weselucha-Birczyńska A.* Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy / Weselucha-Birczyńska A., Kozicki M., Czepiel J., Łabanowska M., Nowak P., Kowalczyk G., Kurdziel M., Birczyńska M., Biesiada G., Mach T., Garlicki A. // *Journal of Molecular Structure* – 2014. – V. 1069 – № 1 – P. 305–312.

314. *Subramaniam S.* Hemoglobin R-T Structural Dynamics from Simultaneous Monitoring / Subramaniam S., Spire T.G. // *Biochemistry* – 1992. – № 1 – P. 3697–3709.

315. *Strekas T.C.* Hemoglobin: Resonance Raman spectra / Streckas T.C., Spiro T.G. // *BBA - Protein Structure* – 1972. – V. 263 – № 3 – P. 830–833.

316. *Torres Filho I.P.* Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation / Torres Filho I.P., Terner J., Pittman R.N., Proffitt E., Ward K.R. // *Journal of Applied Physiology* – 2008. – V. 104 – № 6 – P. 1809–1817.

317. *Guidotti G.* The Structure of Human Hemoglobin / Guidotti G., Hill R.J.H., Konigsberg W. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1962. – V. 237 – № 5 – P. 1549–1544.

318. *Parker F.S.* Applications of infrared, Raman, and resonance Raman spectroscopy in biochemistry / F. S. Parker – Springer Science & Business Media, 1983.

Вып. New York :– 568 с.

319. *Brozek-Pluska B.* Label-free determination of lipid composition and secondary protein structure of human salivary noncancerous and cancerous tissues by Raman microspectroscopy / Brozek-Pluska B., Kopec M., Niedzwiecka I., Morawiec-Sztandera A. // *Analyst* – 2015. – V. 140 – № 7 – P. 2107–2113.

320. *Reithmeier R.A.F.* Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context / Reithmeier R.A.F., Casey J.R., Kalli A.C., Sansom M.S.P., Alguel Y., Iwata S. // *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Biomembranes* – 2016. – V. 1858 – № 7 – P. 1507–1532.

321. *Surmacki J.* Raman imaging at biological interfaces: Applications in breast cancer diagnosis / Surmacki J., Musial J., Kordek R., Abramczyk H. // *Molecular Cancer* – 2013. – V. 12 – № 1 – P. 1–12.

322. *Friedman J.M.* The iron-proximal histidine linkage and protein control of oxygen binding in hemoglobin. A transient Raman study / Friedman J.M., Scott T.W., Stepnoski R.A., Ikeda-Saito M., Yonetani T. // *Journal of Biological Chemistry* – 1983. – V. 258 – № 17 – P. 10564–10572.

323. *Ишутина Н.А.* Изменение показателей свободно-радикального статуса, антиоксидантной защиты и морфологические изменения эритроцитов периферической крови беременных первого триместра с цитомегаловирусной инфекцией / Ишутина Н.А., Андриевская И.А. // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания* – 2018. – № 68 – С. 57–62.

324. *Rossi-Bernardi L.* The specific influence of carbon dioxide and carbamate compounds on the buffer power and Bohr effects in human haemoglobin solutions / Rossi-Bernardi L., Roughton F.J.W. // *The Journal of physiology* – 1967. – V. 189 – № 1 – P. 1–29.

325. *Dash R.K.* Erratum to: Blood HbO₂ and HbCO₂ dissociation curves at varied O₂, CO₂, pH, 2, 3-DPG and temperature levels / Dash R.K., Bassingthwaite J.B. // *Annals of biomedical engineering* – 2010. – V. 38 – № 4 – P. 1683–1701.

326. *Bellingham A.J.* Regulatory mechanisms of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis / Bellingham A.J., Detter J.C., Lenfant C. // *The Journal of Clinical*

Investigation – 1971. – V. 50 – № 3 – P. 700–706.

327. *Weber R.E.* Temperature dependence of haemoglobin–oxygen affinity in heterothermic vertebrates: mechanisms and biological significance / Weber R.E., Campbell K.L. // *Acta Physiologica* – 2011. – V. 202 – № 3 – P. 549–562.

328. *Титовец Э.П.* Исследование механизма кислородного обмена эритроцитов человека / Титовец Э.П., Пархач Л.П., Степанова Т.С., Матусевич Л.И. // *Российский биомедицинский журнал* – 2009. – Т. 10 – С. 425–441.

329. *Schmidt-Nielsen B.* August and Marie Krogh and respiratory physiology / Schmidt-Nielsen B. // *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology* – 1984. – V. 57 – № 2 – P. 293–303.

330. *Атауллаханов Ф.И.* Эритроцит: Мешок С Гемоглобином Или Живая, Активная Клетка? / Атауллаханов Ф.И., Борсакова Д.В., Протасов Е.С., Синауридзе Е.И., Зейналов А.М. // *Вопросы Гематологии/Онкологии И Иммунопатологии В Педиатрии* – 2018. – V. 1 – № 17 – С. 1–25.

331. *Huang Z.* Nitric oxide binding to oxygenated hemoglobin under physiological conditions / Huang Z., Louderback J.G., Goyal M., Azizi F., King S.B., Kim-Shapiro D.B. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* – 2001. – V. 1568 – № 3 – P. 252–260.

332. *Sega M.F.* Fluorescence assay of the interaction between hemoglobin and the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 / Sega M.F., Chu H., Christian J.A., Low P.S. // *Blood Cells, Molecules, and Diseases* – 2015. – V. 55 – № 3 – P. 266–271.

333. *Chu H.* Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties / Chu H., Breite A., Ciruolo P., Franco R.S., Low P.S. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* – 2008. – V. 111 – № 2 – P. 932–938.

334. *Luneva O.G.* Deoxygenation Affects Composition of Membrane-Bound Proteins in Human Erythrocytes / Luneva O.G., Sidorenko S. V., Ponomarchuk O.O., Tverskoy A.M., Cherkashin A.A., Rodnenkov O. V., Alekseeva N. V., Deev L.I., Maksimov G. V., Grygorczyk R., Orlov S.N. // *Cellular Physiology and Biochemistry* –

2016. – V. 39 – № 1 – P. 81–88.

335. *Sharma R.* Membrane-bound hemoglobin as a marker of oxidative injury in adult and neonatal red blood cells / Sharma R., Premachandra B.R. // *Biochemical medicine and metabolic biology* – 1991. – V. 46 – № 1 – P. 33–44.

336. *Громов П.С.* Двухмерная карта мембранных белков эритроцитов человека / Громов П.С., Захаров С.Ф., Шишин С.С., Ильинский Р.В. // *Биохимия* – 1988. – V. 53 – № 8 – С. 1316–1326.

337. *Jensen F.B.* Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport / Jensen F.B. // *Acta Physiologica Scandinavica* – 2004. – V. 182 – № 3 – P. 215–227.

338. *Mairbäurl H.* Oxygen transport by hemoglobin / Mairbäurl H., Weber R.E. // *Comprehensive Physiology* – 2012. – V. 2 – № 2 – P. 1463–1489.

339. *Завадский В.А.* Особенности молекулярной структуры мембран эритроцитов / Завадский В.А., Монастырева Н.В., Ерошин В.К., Бойко С.Г., Старченко В.Н. – 2016. – V. 6 – № 27 – С. 77–79.

340. *Зарифьян А.Г.* Физиология гемоглобина: учеб. пособие / А. Г. Зарифьян, И. Е. Кононец, Э. А. Джайлобаева, Т. Н. Наумова / под ред. Б.Т. Турусбеков. – Бишкек, 2010. – 125 с.

341. *Fujinaga J.* Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1 / Fujinaga J., Tang X.B., Casey J.R. // *Journal of Biological Chemistry* – 1999. – V. 274 – № 10 – С. 6626–6633.

342. *Новикова Н.Н.* Рентгенофлуоресцентные измерения в условиях полного внешнего отражения для исследования взаимодействия белков с ионами металлов в биологических системах / Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Юрьева Э.А., Коновалов О.В., Рогачев А.В., Степина Н.Д., Сухоруков В.С., Царегородцев А.Д., Чухрай Е.С., Якунин С.Н. // *Кристаллография* – 2012. – V. 57 – № 5 – С. 727.

343. *Зинченко А.В.* Калориметрическое исследование денатурации гемоглобина человека с диметилсульфоксидом / Зинченко А.В., Говорова Ю.С. // *Региональные геосистемы* – 2014. – V. 26 – № 3 (174) – С. 89–93.

344. *Пащенко В.З.* Исследование температурной зависимости времени

жизни флуоресценции триптофана в диапазоне -170°C – $+20^{\circ}\text{C}$ в различных растворителях / Пащенко В.З., Горохов В.В., Корватовский Б.Н., Нокс П.П., Гришанова Н.П., Горячев С.Н. // Биофизика – 2021. – Т. 66 – № 3 – С. 454–465.

345. *Callis P.R.* Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation / Callis P.R. // Journal of Molecular Structure – 2014. – V. 1077 – P. 22–29.

346. *Булл Г.В.* Физическая биохимия (Перевод с английского Г.А. Деборина) / Г. В. Булл – Москва, 1949. Вып. Издательство – 341 с.

347. *Devineau S.* Change of the isoelectric point of hemoglobin at the air/water interface probed by the orientational flip-flop of water molecules / Devineau S., Inoue K.I., Kusaka R., Urashima S.H., Nihonyanagi S., Baigl D., Tsuneshige A., Tahara T. // Physical Chemistry Chemical Physics – 2017. – V. 19 – № 16 – P. 10292–10300.

348. *Lanotte L.* Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions / Lanotte L., Mauer J., Mendez S., Fedosov D.A., Fromental J.-M., Claveria V., Nicoud F., Gompper G., Abkarian M. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2016. – V. 113 – № 47 – P. 13289–13294.

349. *Maksimov G.V.* Study on conformational changes in hemoglobin protoporphyrin in essential hypertension / Maksimov G. V., Maksimova N. V., Churin A.A., Orlov S.N., Rubin A.B. // Биохимия – 2001. – V. 66 – № 3 – P. 365–370.

350. *Bookchin R.M.* Effect of a 'sickling pulse' on calcium and potassium transport in sickle cell trait red cells / Bookchin R.M., Lew V.L. // The Journal of physiology – 1981. – V. 312 – № 1 – P. 265–280.

351. *Нагорнов Ю.С.* Моделирование Морфологии И Жесткости Мембраны Эритроцитов После Фемтосекундного Лазерного Облучения / Нагорнов Ю.С. // Российский Журнал Биомеханики – 2013. – Т. 17 – № 3 (61) – С. 112–121.

352. *Лысов Н.А.* Связь способности эритроцитов к деформации со структурными перестройками мембран красных клеток крови у лиц различных возрастных групп / Лысов Н.А., Горис А., Зарубина Е.Г., Москвин С.В. // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье – 2011. – № 4

– С. 6–11.

353. *Zhdanova N.G.* Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins / Zhdanova N.G., Maksimov E.G., Arutyunyan A.M., Fadeev V. V, Shirshin E.A. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* – 2016. – V. 174 – № 11 – P. 223–229.

354. *Суглобова Е.Д.* Биофизические характеристики мембран эритроцитов у больных, получающих лечение регулярным гемодиализом. Резистентность к действию внешнего каналоформера / Суглобова Е.Д., Спиридонов В.Н., Борисов Ю.А., Лебедева Э.Б., Гавриленков П.В. // *Нефрология* – 1998. – Т. 2 – № 4 – С. 68–75.

355. *Атауллаханов Ф.И.* Регуляция объема эритроцитов человека. Роль калиевых каналов, активируемых кальцием / Атауллаханов Ф.И., Кляткина А.Б., Витвицкий В.М., Пичугин А.В. // *Биологические мембраны* – 1993. – Т. 10 – № 5 – С. 519–526.

356. *Spiro T.G.* Resonance Raman spectra of hemoglobin and cytochrome c: inverse polarization and vibronic scattering / Spiro T.G., Strekas T.C. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1972. – V. 69 – № 9 – P. 2622–2626.

357. *Lasch P.* FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level / Lasch P., Boese M., Pacifico A., Diem M. // *Vibrational Spectroscopy* – 2002. – V. 28 – № 1 – P. 147–157.

358. *Gasper R.* IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures / Gasper R., Dewelle J., Kiss R., Mijatovic T., Goormaghtigh E. // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* – 2009. – V. 1788 – № 6 – P. 1263–1270.

359. *Parthasarathi K.* Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability / Parthasarathi K., Lipowsky H.H. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* – 1999. – V. 277 – № 6 – P. 2145–2157.

360. *Clark Jr A.* Oxygen delivery from red cells / Clark Jr A. Federspiel, W. J., Clark, P. A., & Cokelet, G. R. // *Biophys. J* – 1985. — V. 47 – P. 171–181.

361. *Gayeski T.E.J.* A graphical analysis of the influence of red cell transit time,

carrier-free layer thickness, and intracellular PO₂ on blood-tissue O₂ transport / Gayeski, T. E. J., Federspiel, W. J., Honig, C. R // Oxygen Transport to Tissue – 1988. – 25–35P.

362. *Goldman D.* Theoretical models of microvascular oxygen transport to tissue / Goldman D. // Microcirculation – 2008. – V. 15 – № 8 – P. 795–811.

363. *Vadapalli A.* Calculations of oxygen transport by red blood cells and hemoglobin solutions in capillaries / Vadapalli A., Goldman D., Popel A.S. // Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology – 2002. – V. 30 – № 3 – P. 157–188.

364. *Кисляков Ю.Я.* Математическое моделирование динамики транспорта O₂ в эритроцитах и плазме крови в капилляре / Кисляков Ю.Я., Кислякова Л.П. // Научное приборостроение – 2000. – Т. 10 – № 1 – С. 44–51.

365. *Акулич Н.В.* Морфологические маркеры старения эритроцитов донорской крови / Акулич Н.В., Тарасова Е.А., Сорока А.В., Сяхович В.Э., Беляев Р.А. // Математика, физика, биология – 2017. – V. 1 – № 49 – С. 75–83.

366. *Кучкаров Б.Х.* Влияние ультразвукового воздействия на скорость формирования заряда инверсионного слоя в структурах метал-стекло-полупроводник / Кучкаров Б.Х. // Вестник КРАУНЦ. Физико-математические науки – 2019. – Т. 29 – № 4 – С. 125–134.

367. *Баринов И.Н.* Конструктивно-технологические решения чувствительных элементов датчиков абсолютного давления / Баринов И.Н., Волков В.С., Кривулин Н.П. // Труды Международного симпозиума «Надежность и качество» – 2008. – Т. 1 – С. 498–500.

368. *Smolyaninova L.V.* Ouabain at low concentrations affects transcription without any impact on intracellular content of sodium and potassium in rat brain neurons / Smolyaninova L. V., Shiyan A.A., Klementieva T.S., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Orlov S.N. // Biologicheskie Membrany – 2019. – V. 36 – № 5 – P. 373–380.

369. *Hamlyn J.M.* Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. / Hamlyn J.M., Hamilton B.P., Manunta P. // Journal of hypertension – 1996. – V. 14 – № 2 – P. 151–167.

370. *Sidorenko S.V.* Competitive Binding of K⁺ in the Presence of Na⁺ with Bovine Serum Albumin and Hemoglobin / Sidorenko S. V., Rebrov V.G., Verkhov D.G.,

Usanov A.D., Skripal A. V., Usanov D.A. // Chemistry. Biology. Ecology – 2016. – V. 16 – № 3 – P. 279–284.

371. *Lingrel J.B.* Na, K-ATPase and the role of [alpha] isoforms in behavior / Lingrel J.B., Williams M.T., Vorhees C. V, Moseley A.E. // Journal of bioenergetics and biomembranes – 2007. – V. 39 – № 5–6 – P. 385.

372. *Медведева И.А.* Влияние гипотермического стресса на активность Na⁺-K⁺-АТФазы в эритроцитах крыс / Медведева И.А., Маслова М.Н., Панов А.А. // Физиол. журн. им. ИМ Сеченова – 1992. – V. 78 – № 11 – С. 119–123.

373. *Friederichs E.* Influence of Calcium Permeabilization and Membrane-Attached Hemoglobin on Erythrocyte Deformability / Friederichs E., Farley R.A., Meiselman H.J. // American Journal of Hematology – 1992. – V. 41 – P. 170–177.

374. *Muravyov A.* Erythrocyte Deformation: the Role in Microcirculation / Muravyov A., Komlev V., Mikhaylov P., Akhapkina A. // Yaroslav. Ped. Vestn. – 2013. – V. 3 – № 2 – P. 93–102.

375. *Kuhn V.* Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia / Kuhn V., Diederich L., Keller IV T.C.S., Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorava T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M. // Antioxidants & redox signaling – 2017. – V. 26 – № 13

376. *Калягина Н.В.* Математический анализ регуляции объема эритроцита человека с учетом упругого воздействия оболочки эритроцита на обменные процессы / Калягина Н.В., Мартынов М.В., Атауллаханов Ф.И. // Биологические мембраны – 2013. – V. 30 – № 2 – С. 115.

377. *Kutuzov N.P.* Orientational ordering of carotenoids in myelin membranes resolved by polarized Raman microspectroscopy / Kutuzov N.P., Brazhe A.R., Maksimov G. V., Dracheva O.E., Lyaskovskiy V.L., Bulygin F. V., Rubin A.B. // Biophysical Journal – 2014. – V. 107 – № 4 – P. 891–900.

378. *Abramczyk H.* Polarized Raman microscopy imaging: Capabilities and challenges for cancer research / Abramczyk H., Brozek-Pluska B., Kopec M. // Journal of Molecular Liquids – 2018. – V. 259 – P. 102–111.

379. *Spiro T.* Resonance Raman Spectra of Hemoglobin and Cytochrome c: Inverse

Polarization and Vibronic Scattering / G. Spiro T., C. Strekas T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1972. – V. 69 – № 9 – P. 2622–2626.

380. *Faridani A.* Local tomography / Faridani A., Ritman E.L., Smith K.T. // SIAM Journal on Applied Mathematics – 1992. – V. 52 – № 2 – P. 459–484.

381. *Лобов И.А.* Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии / Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. // Вестник Омского университета – 2013. – V. 68 – № 2 – С. 129–132.

382. *Collins K.D.* C harge Density — Dependent Strength of Hydration and Biological Structure / Collins K.D. // Biophysical journal – 1997. – V. 72 – P. 65 — 76.

383. *Moelbert S.* Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability / Moelbert S., Normand B., Los Rios P. De // Biophysical chemistry – 2004. – V. 112 – № 1 – P. 45–57.

384. *Omta A.W.* Influence of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water / Omta A.W., Kropman M.F., Woutersen S., Bakker H.J. // Journal of Chemical Physics – 2003. – V. 119 – № 23 – P. 12457–12461.

385. *Jolivet J.-P.* Metal Oxide Chemistry and Synthesis. From Solution to Solid State / J.-P. Jolivet – 1988. John Wiley– 321с.

386. *Казакова В.В.* Характеристика интенсивности гликолиза и образования гликозилированной формы гемоглобина в эритроцитах при кардиомиопатии / Казакова В.В., Ёлкина Н.М., Луцик Е.Г., Коношенко С.В., Лайкова Е.В. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины – 2011. – № 2 – С. 23–25.

387. *Ditzel J.* The oxygen transport system of red blood cells during diabetic ketoacidosis and recovery / Ditzel J., Standl E. // Diabetologia – 1975. – V. 11 – № 4 – P. 255–260.

388. *Мартынюк Т.В.* Диагностика легочной артериальной гипертензии / Мартынюк Т.В. Авдеев, С. Н., Акчурин, Р. С., Амбатьелло, Л. Г., Аншелес, А. А., Блинова, Е. В., Волков, А. В., Шария, М. А. // Терапевтический архив – 2008. – Т. 80 – № 4 – С. 33–38.

389. *Galie N.* ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endor / Galie N., Humbert M., Vachiery J.-L., Gibbs S., Lang I., Torbicki A., Simonneau G., Peacock A., Vonk Noordegraaf A., Beghetti M., Ghofrani A., Gomez Sanchez M.A., Hansmann G., Klepetko W., Lancellotti P., Matucci M., McDonagh T., Pierard L.A., Trindade P.T., Zompatori M., Hoeper M. // *European heart journal* – 2016. – V. 37 – № 1 – P. 67–119.

390. *Galie N.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the Internat / Galie N., Hoeper M.M., Humbert M., Torbicki A., Vachiery J.-L., Barbera J.A., Beghetti M., Corris P., Gaine S., Gibbs J.S. // *European heart journal* – 2009. – V. 30 – № 20 – P. 2493–2537.

391. *Luneva O.G.* Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: role of augmented plasma cholesterol / Luneva O.G., Brazhe N.A., Maksimova N. V, Rodnenkov O. V, Parshina E.Y., Bryzgalova N.Y., Maksimov G. V, Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I. // *Pathophysiology* – 2007. – V. 14 – № 1 – P. 41–46.

392. *Ivanova S.M.* Role of viscosity and permeability of erythrocyte plasmatic membrane in controlling the oxygen transport effectiveness by human hemoglobin on completion of space flight / Ivanova S.M., Maksimov G. V, Morukov B. V, IuV I., Labetskaia O.I., Luneva O.G., Maksimova N. V, Brazhe N.A., NIu B., EIu P. // *Aviakosmicheskaja i Ekologicheskaja Meditsina= Aerospace and Environmental Medicine* – 2007. – V. 41 – № 2 – P. 41–44.

393. *Чазова И.Е.* Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической тромбоэмболической легочной гипертензии / Чазова И.Е., Мартынюк Т.В. Акчюрин Р.С., Чернявский А.М., Мершин К.В., Данилов Н.М., Матчин Ю.Г., Драненко Н.Ю., Захарова М.А., Иофин А.И., Косолапова В.И., Калимуллина Г.К., Лукьянчикова В.Ф., Филлипов Е.В. // *Тер. архив* – 2016. – Т. 88 – № 9 – С. 90–101.

394. *Chu J.W.* High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension. / Chu J.W., Kao P.N., Faul J.L., Doyle R.L. // *Chest* – 2002. – V. 122 – № 5 – P. 1668–1673.

395. *Bohr Chr.*, Hasselbalch K., and Krogh A. Ueber einen in biologischer Ueziehung wichtigen Ein- fluss, den die Kohlensaurespannung des Blutes / Bohr Chr., Hasselbalch K., Krogh A. // *Skand Arch Physiol* – 1904. – V. 16 – P. 402–412.

396. *Fang Y.-H.* Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle’s cycle. / Fang Y.-H., Piao L., Hong Z., Toth P.T., Marsboom G., Bache-Wiig P., Rehman J., Archer S.L. // *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* – 2012. – V. 90 – № 1 – P. 31–43.

397. *Ryan J.J.* Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. / Ryan J.J., Huston J., Kutty S., Hatton N.D., Bowman L., Tian L., Herr J.E., Johri A.M., Archer S.L. // *The Canadian journal of cardiology* – 2015. – V. 31 – № 4 – P. 391–406.

398. *Зарифьян А.Г.* Физиология гемогдинамики: учеб. пособие / Зарифьян А.Г., Кононец И.Е., Джайлобаева Э.А., Наумова Т.Н. – 2010. – 125 с.

399. *Завырылина И.Н.* Клинический случай: применение комбинированной патогенетической терапии ингаляционным илопростом в сочетании с ингибитором фосфодиэстеразы 5-го типа силденафилом при идиопатической легочной гипертензии / Завырылина И.Н., Архипова О.А., Саидова М.А., Данилов Н.М., Мартынюк Т.В., Чазова И.Е. // *Системные гипертензии* – 2015. – Т. 12 – № 2 – С. 66–70.

400. *Валиева З.С.* Клинический случай успешного применения нового селективного агониста IP-рецепторов простаглицина селексипаг у пациента с идиопатической легочной гипертензией / Валиева З.С., Мартынюк Т.В. // *Евразийский кардиологический журнал* – 2019. – № 4 – С. 144–155.