

## ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТЕ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы

© 2022 г. О.В. Слатинская\*, П.И. Зарипов\*\*, Н.А. Браже\*, И.Ю. Петрушанко\*\*, Г.В. Максимов\*, \*\*\*, #

\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/24, Москва, 119991, Россия

\*\*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

\*\*\*Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Ленинский просп., 4/1, Москва, 119049, Россия

#E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.07.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 02.08.2022 г.

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния, инфракрасной спектроскопии и лазерной интерференционной микроскопии выявлены как изменения морфологии, так и изменения конформации гемоглобина в эритроците в результате увеличения соотношения  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  и  $[\text{K}^+]_{\text{in}}$  при блокировании  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы клетки. Установлено, что блокирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы приводит не только к увеличению  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  в клетке, но и к увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. В этих условиях выявлены изменения конформации как гема, так и белковой глобулы гемоглобина, а именно, снижение плотности упаковки молекулы гемоглобина, которые могут быть связаны как с сорбцией  $\text{Na}^+$  (или  $\text{Ca}^{2+}$ ) с гемоглобином, так и с увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением гемоглобина. Вероятно, перераспределение гемоглобина и изменение плотности упаковки участка глобина оказывают влияние на конформацию гема, увеличивая вероятность нахождения гема гемоглобина в «куполообразной форме» и, таким образом, повышает его способность связывать  $\text{O}_2$ .

*Ключевые слова:* спектроскопия комбинационного рассеяния, гемоглобин, эритроциты, объем эритроцита.

DOI: 10.31857/S0006302922050064, EDN: JIEVCW

В настоящее время большой интерес вызывают исследования, связанные с механизмом регуляции конформации и распределения гемоглобина при изменениях ионного гомеостаза эритроцита. Вероятно, изменения морфологии или объема эритроцита приводят к изменению способности гемоглобина (Гб) связывать или сбрасывать лиганды (в том числе  $\text{O}_2$  и  $\text{NO}_x$ ). Очевидно, эти процессы могут как вызвать нарушения газообмена в организме, так и быть последствием ряда патологий [1–3]. Так, увеличение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Na}^+$  выявлено у

больных с хронической почечной недостаточностью [4] и при уремии [4, 5]. Важно, что перераспределение ионов в эритроците сопровождается изменениями мембранного потенциала, которые модифицируют состояние мембранных белков и липидов [2]. Существенную роль в поддержании ионного гомеостаза, а также в регуляции объема и формы эритроцита выполняет фермент  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -аденозинтрифосфатаза, ЕС 3.6.3.9) [6, 7]. Перенос ферментом ионов против градиента их концентрации осуществляется за счет гидролиза АТФ и поддерживает низкий уровень  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  в клетке [8]. Важную роль в изменении функций эритроцитов выполняет процесс регуляции соотношения ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в цитоплазме клетки [9].

*Сокращения:* Гб – гемоглобин, СЭ – суспензия эритроцитов, ЛИМ – лазерная интерференционная микроскопия, КР – комбинационное рассеяние, ИК – инфракрасный, PLB – среда, имитирующая плазму крови (Plasma-Like Buffer).

Однако в настоящее время мало известно, каким образом изменения ионного гомеостаза и/или мембранного потенциала при работе  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроците регулируют распределение гемоглобина в клетке и его конформацию. Целью работы было исследование конформации и перераспределения гемоглобина в эритроците при блокировании активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы убаином.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение эритроцитов.** Объектом исследования служила суспензия эритроцитов (СЭ) из кубитальной крови доноров (объект предоставлен НМИЦ кардиологии им. академика А.Е. Чазова).

В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 Ед/мл крови). После забора кровь хранили при 4°C. Для выделения СЭ использовали физиологический фосфатный буфер Аллена (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 4 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 5 мМ глюкозы, рН 7.4). Очистку СЭ от компонентов плазмы и белых форменных элементов крови проводили следующим образом: к цельной крови добавляли буфер Аллена в соотношении 1 : 3, тщательно перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R, ThermoScientific, США) при 1500 г в течение 5 мин при 4°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 ч.

**Инкубация СЭ с убаином.** Для инкубации СЭ с убаином (G-Strophanthin, Sigma, США), готовили раствор с 10 мМ убаином (#75640, Fluka, Швейцария) в буфере Аллена и добавляли его к образцам СЭ (конечная концентрация убаина 1 мМ). Время инкубации СЭ в приготовленной среде составляло 60 мин.

**Регистрация ζ-потенциала плазматической мембраны эритроцита.** Для контроля за изменениями ζ-потенциала плазматической мембраны эритроцита 1 мл СЭ (*Ht* = 40%) пробу СЭ разводили в 1000 раз буфером Аллена. Далее 1 мл полученного раствора помещали в одноразовую капиллярную поликарбонатную U-образную кювету DTS1070 (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 прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при 25°C. Время адаптации образца к температуре – 60 с, количество проведенных измерений – 100. Каждое измерение включало не менее пяти повторов. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в

комплекте с прибором Zetasizer Nano ZS, и пакет программ MS Excel.

**Измерение объема эритроцита.** Контроль за изменениями объема и формы эритроцита проводили при помощи лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ), разработанного во ВНИИОФИ на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия) с объективом 30× (*NA* = 0.65) и полупроводниковым лазером ( $\lambda$  = 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 [10, 11]. Образец наносили на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. Препарат с СЭ находился в буфере Аллена и в буфере Аллена с 1 мМ убаином [12]. Все измерения проводили после часовой инкубации СЭ в растворах. Для восстановления фазового изображения по десяти регистрируемым интерферограммам методом фазовых шагов, использовали программу WinPhast, для последующей работы с изображениями – программы FIJI (США) и Origin 2017 (Microcal Inc., США).

Метод ЛИМ позволяет рассчитать фазовый объем эритроцитов [13–15] по формуле:

$$V = \frac{OPX_{\text{mean}}}{n_1 - n_0} \times S, \quad (1)$$

где *S* – площадь клетки, рассчитанная методом наименьших квадратов по фоновому значению, *OPX* – оптическая разность хода светового луча. Измерения объема эритроцита с помощью ЛИМ проведено на 60 клетках.

**Спектроскопия комбинационного рассеяния.** Регистрацию спектров комбинационного рассеяния (КР, Рамановская спектроскопия) гемоглобина проводили с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига 1000–3200 см<sup>-1</sup> с шагом измерения 1 см<sup>-1</sup>, охлаждение ССД камеры –50°C, объектив 5× с апертурой 0.15, решетка 600, мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15–30 с, количество накоплений сигнала – 3. Для регистрации сигнала образец помещали в гематокритный капилляр с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия), который запаивали для герметичности. Каждое измерение проводили не менее пяти раз. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Origin 2017. Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии.

**Таблица 1.** Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [16–21]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
$I_{1375}/I_{1172}$	Выраженность симметричных и асимметричных колебания пиррольных колец. Снижение величины соотношения характеризует возрастание подвижности гема
$I_{1580}/I_{1375}$	Вклад валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец. Относительная способность Гб выделять лиганды
$I_{2880}/I_{2930}$	Вклад несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот глобина по отношению к колебанию концевых метильных радикалов (возрастает при увеличении упорядоченности $\text{CH}_n$ -групп)

Для анализа полученных результатов использовали соотношение интенсивностей абсолютных величин полос спектра КР гемоглобина (табл. 1).

**Инфракрасная спектроскопия.** Регистрацию инфракрасных (ИК) спектров молекул в эритроците проводили в буфере Аллена с использованием приставки НПВО (неполного внутреннего отражения) на инфракрасном Фурье-спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США). Для регистрации ИК-спектра 2 мкл образца наносили на окно регистратора и подсушивали, контролируя вклад ИК-полос от ОН-групп воды в течение 5 мин при температуре 25°C. Регистрацию ИК-спектра от молекул эритроцита проводили в диапазоне 550–4000  $\text{см}^{-1}$  с шагом измерения 4  $\text{см}^{-1}$ . Время регистрации составляло 20 с. Измерения проводили в количестве повторов не менее 12. Для анализа положения максимумов пиков полос и построения соотношений интенсивностей полос, осуществляли коррекцию базовой линии спектра в программе Origin 2017. Для анализа изменений структуры белковой части гемоглобина в эритроците использовали соотношения интенсивностей полос ИК-спектра (табл. 2) [22, 23].

#### **Флуоресценция триптофана белков эритроцита.**

Для контроля за изменениями конформации белков эритроцита (в первую очередь, гемоглобина) регистрировали изменения времени жизни флуоресценции триптофана с помощью метода счета одиночных фотонов с корреляцией по времени. Для этого, флуоресценцию белков эритроцита 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, Chgma, США), выдающий импульсы длительностью 700 пс со средней мощностью 0.6 мкВт при частоте повторения 20 МГц. Регистрацию сигнала флуоресценции (в диапазоне 300–400 нм, с максимумом при 340 нм) осуществляли через коллимационную линзу спектрографа (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия), оснащенного детектором PML-16-C и решеткой 1200 штрих/мм с разрешением 6.25 нм. Аппаратуру TCSPC использовали в режиме FIFO, регистрируя поток фотонов в программном обеспечении для измерений SPCM 9.82 (Becker & Hickl GmbH, Германия).

Измерения проводили в кварцевой кювете (толщина поглощающего слоя 10 мм). Регистра-

**Таблица 2.** Соотношение интенсивностей полос спектра ИК гемоглобина [22, 23]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
$I_{1650}/I_{1540}$	Характеризует изменение вклада Amide I/Amide II. Смещение положения пика Amide I (1650 $\text{см}^{-1}$ ) указывает на изменение общего конформационного состояния белка в клетке
$I_{1650}/I_{1243}$	Различия по белкам*
$I_{1450}/I_{1243}$	Различия по аминокислотам*
$I_{2930}/I_{1243}$	Различия по жирным кислотам*

Примечание. \* – Если после вычета базовой линии полоса с максимумом при 1243  $\text{см}^{-1}$  одинакова, то ее можно использовать в качестве внутреннего стандарта оценки количественных изменений [10].

цию потока около  $10^6$  фотонов проводили в течение 10 с. Для получения максимальной величины отношения сигнал/шум измерения проводили в трикратно. В эксперименте СЭ разводили в 1000 раз в буфере Аллена в термостатирующей ячейке при  $25^\circ\text{C}$ . Время адаптации образца к температуре – 60 с. Все эксперименты проводили не менее трех раз. Изменения интенсивности, времени жизни и спектра флуоресценции обрабатывали с помощью пакета программ SPCImage 8.0 (Becker & Nickl, Германия).

**Определение содержания ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в эритроците.** Для выделения СЭ использовали среду, имитирующую плазму крови (PLB – Plasma-Like Buffer) следующего состава: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 25 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 0.75 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 мМ глюкозы, 0.015 мМ  $\text{ZnCl}_2$ , 0.2 мМ глицина, 0.2 мМ глутамата натрия, 0.1 мМ аргинина, 0.6 мМ глутамина, 0.2 мМ аланина, 20 мМ HEPES (pH 7.4 при 5%  $\text{CO}_2$ ) [24]. PLB добавляли к крови в соотношении 8 : 1. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g, после чего супернатант отбирали и проводили отмывку СЭ от компонентов плазмы дважды. К отмывке СЭ добавляли 1.8 мл PLB, ресуспендировали и аликвотировали по 90 мкл. В экспериментальные образцы вносили 10 мкл 10 мМ уабаина, а в контрольные образцы – 10 мкл PLB. После трехчасовой инкубации эритроцитов с уабаином в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе пробы помещали на лед и вносили 1.5 мл ледяного 0.1 М  $\text{MgCl}_2$ . Далее центрифугировали 10 мин при 2000 g и отбирали супернатант. Отмывку повторяли дважды. Затем к осадку добавляли по 1.5 мл 5% трихлоруксусной кислоты (#152592, MP Biomedicals, США) и оставляли образцы на ночь при  $4^\circ\text{C}$ . После осаждения клеточных белков трихлоруксусной кислотой [25] образцы центрифугировали 10 мин при 13700 g. Супернатант переносили в пробирки и определяли  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  и  $[\text{K}^+]_{\text{in}}$  на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант-2М» («КОРТЭК», Россия) [26]. Осадок растворяли в 1.5 мл 0.1 М NaOH и определяли содержание белка методом Бредфорда [27] с использованием Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent (#5000205, BioRad, США) на спектрофотометре V560 (JASCO, Япония).

Полученные данные обрабатывали стандартными статистическими методами в программе Statistica 8.0: вычисляли среднее арифметическое значение (M) и стандартную ошибку среднего (SE) для экспериментальных и контрольных результатов. Используя t-критерий Стьюдента ( $p < 0.05$ ), оценивали достоверность полученных результатов, а непараметрический критерий Вилкоксона применяли для оценки значимости различий двух связанных выборок ( $p < 0.05$ ).

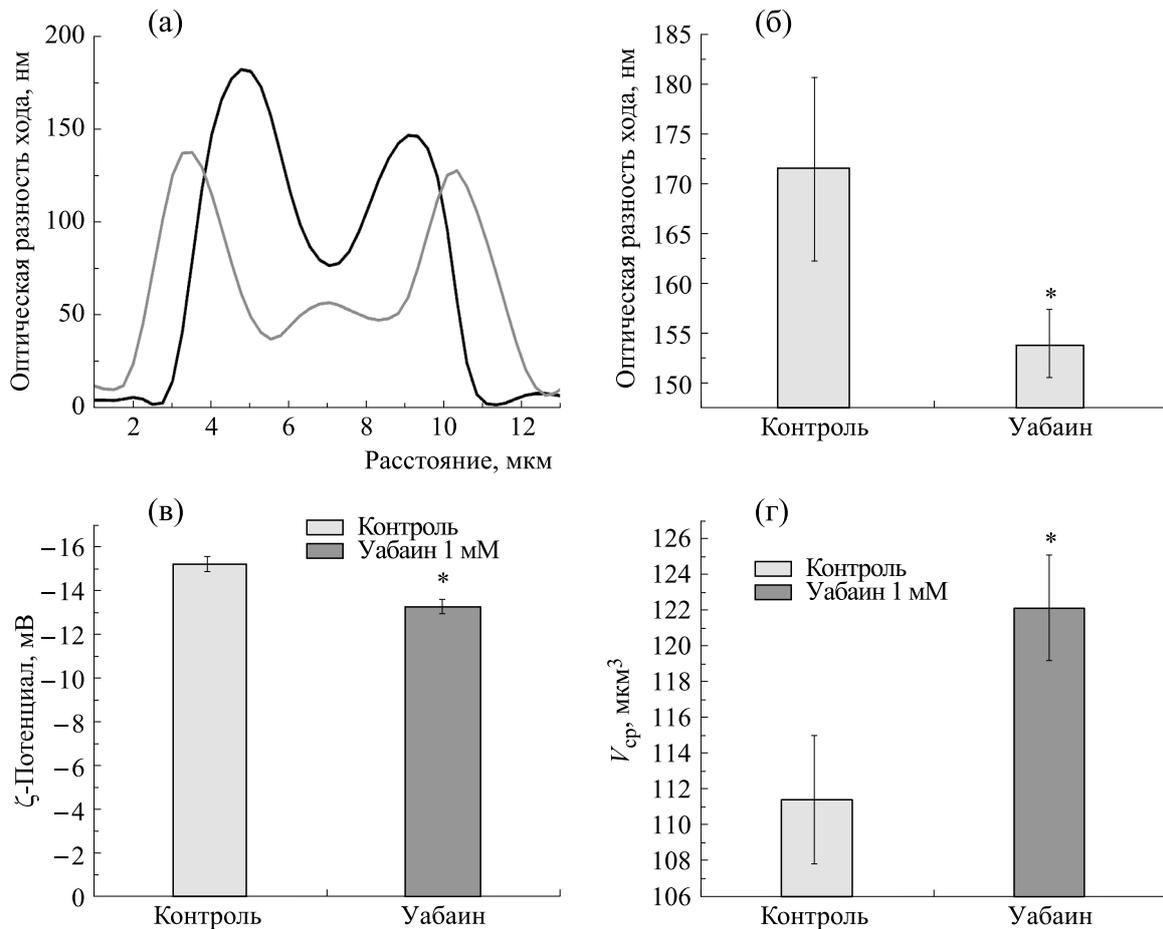
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование изменений морфологии эритроцита при блокировании  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.** Известно, что при селективном связывании уабаина с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой блокируется активный транспорт – выход из клетки  $\text{Na}^+$  и вход  $\text{K}^+$  [28]. При этом происходит накопление  $\text{Na}^+$  внутри клетки, на 88% снижается вход  $\text{K}^+$  [29] и, как следствие, наблюдается увеличение объема эритроцита.

С помощью ЛИМ нами установлено, что после инкубации эритроцитов с уабаином снижается величина фазового объема и амплитуда оптической разности хода луча света за счет перераспределения Гб вследствие входа воды при накоплении  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ . Вероятно, увеличение объема эритроцита при блокировании насоса [29–31] может сопровождаться как изменением трансмембранного потенциала, так и поверхностного заряда плазматической мембраны эритроцита. Действительно, при повышении  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  происходит деполаризация мембранного потенциала, которая запускает обратную моду  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, увеличивая  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ . Также основную роль в стабилизации объема эритроцитов выполняют кальций-активируемые калиевые каналы [32]. Вероятно, этими процессами обусловлено увеличение заряда мембраны с  $-15.2 \pm 0.2$  до  $-13.2 \pm 0.2$  мВ, а также перераспределение Гб в клетке (рис. 1а,в).

В следующей серии экспериментов исследовали изменения  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  и  $[\text{K}^+]_{\text{in}}$  эритроцита при действии уабаина (рис. 2). Доказано, что при блокировании  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы содержание  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  в эритроците возрастает, при этом наблюдается тенденция к снижению содержания  $[\text{K}^+]_{\text{in}}$  (рис. 2). Полученные данные подтверждают увеличение соотношения содержания ионов натрия и калия в эритроците при блокировании насоса [33].

**Исследование изменений конформации гемоглобина эритроцитов при блокировании  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.** Установлено, что блокирование активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы приводит к увеличению  $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$  и поверхностного заряда мембраны, а также перераспределению Гб в цитоплазме клетки (рис. 1). Мы предположили, что эти процессы могут быть фактором активации ряда внутриклеточных процессов (активация фосфолипаз), которые меняют упорядоченность жирнокислотных хвостов мембранных липидов, снижая долю примембранного Гб, связанного с белком полосы 3, а также формирования комплекса Гб и белка полосы 3 за счет отрицательно заряженного компонента белка полосы 3 [34–36]. Как отмечалось

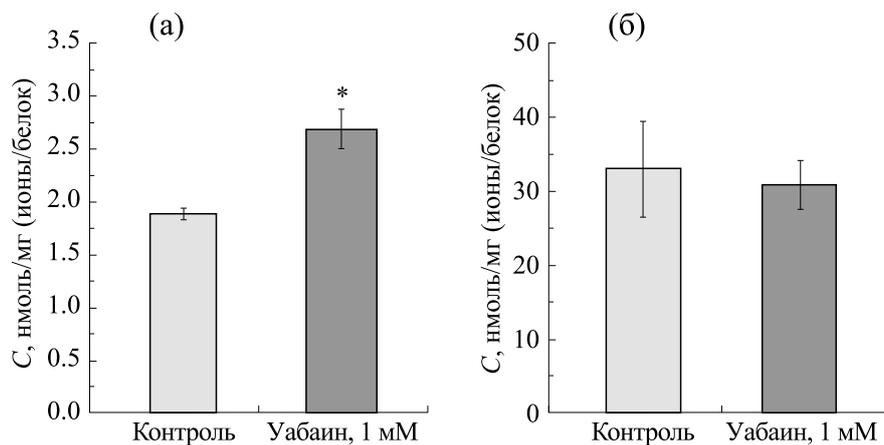


**Рис. 1.** Изменение величины оптической разности хода светового луча и поверхностного заряда эритроцитов после 60-минутной инкубации в растворе с 1 мМ уробилина: (а) – фазовый профиль эритроцита, полученный методом ЛИМ (черная кривая – контроль, серая кривая – после инкубации с уробилином); (б) – среднее значение оптической разности хода, полученное методом ЛИМ; (в) – ζ-потенциал мембран эритроцитов, (г) – фазовый объем (формула (1)). Данные представлены как среднее ± SE (\* –  $p \leq 0.05$ ).

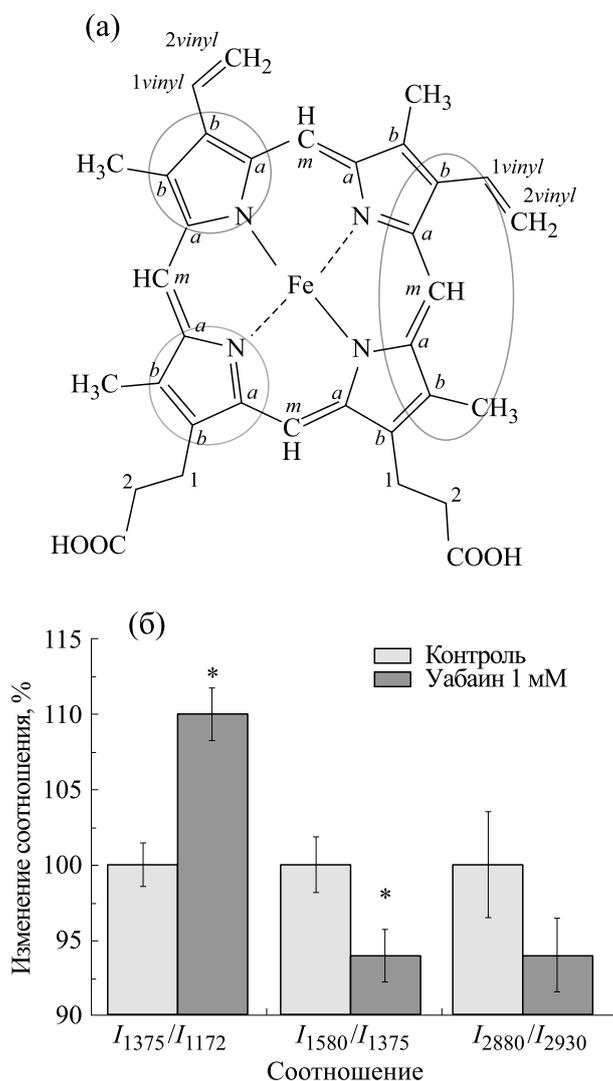
выше, при увеличении  $[Na^+]_{in}$  концентрация  $Ca^{2+}$  внутри эритроцита может увеличиться за счет активации Ca-каналов или обратной моды Na-Ca-обменника. Все это может влиять на конформацию Гб, а также на количество свободных ОН-групп тирозина белка полосы 3 [37, 38]. В связи с этим мы исследовали связь данных процессов с изменением конформации Гб в клетке.

С помощью метода КР установлено, что в условиях блокирования  $Na^+/K^+$ -АТФазы (деполяризация мембраны и вход ионов  $Na^+$  в клетку) наблюдаются изменения в спектре гема гемоглобина (область валентных колебаний пирролов, соотношение  $I_{1375}/I_{1172}$ ), свидетельствующие об изменении конформации гема (доля гема в «куполообразной форме»), доли комплексов окси- и дезоксигемоглобина, сродства Гб к лигандам (увеличение величины соотношения  $I_{1375}/I_{1172}$  и

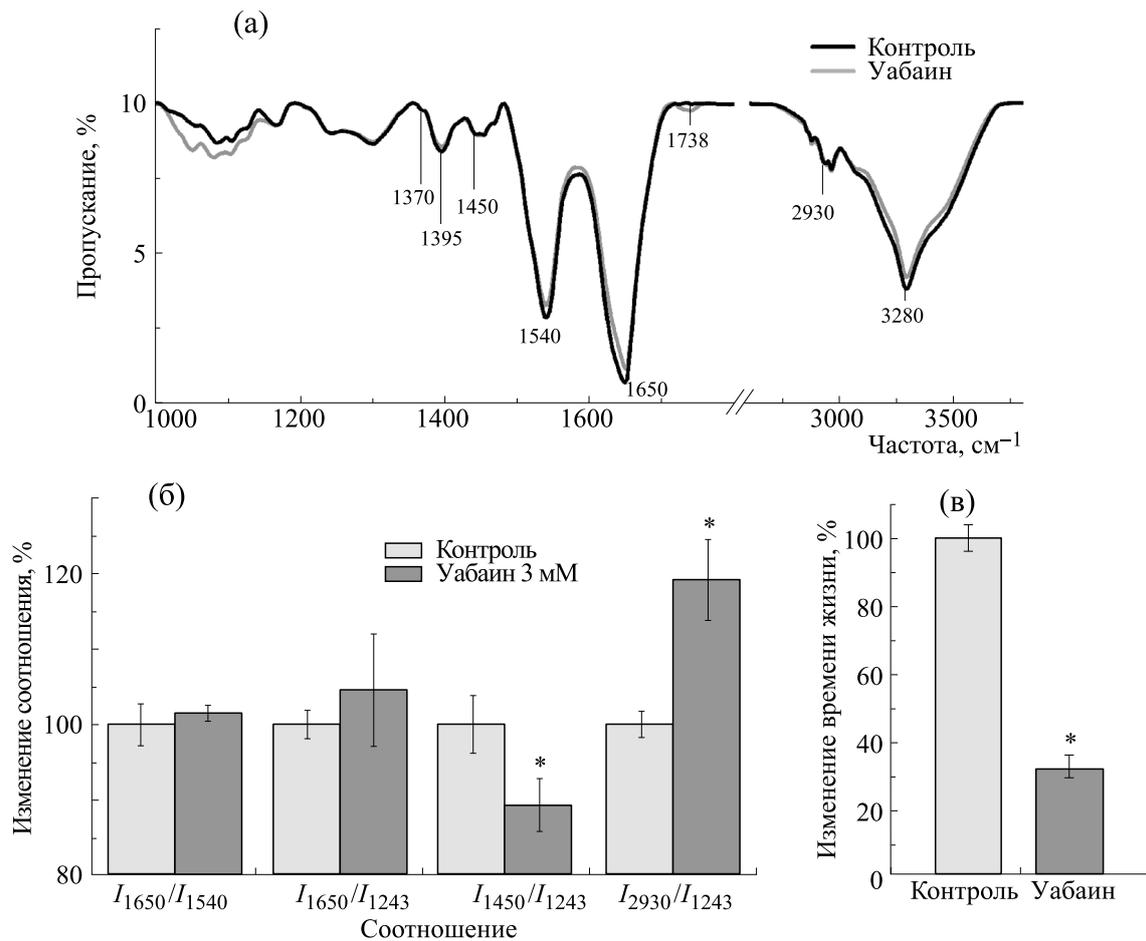
снижение величины соотношения  $I_{1580}/I_{1375}$ ) (рис. 3). В частности, выявлены изменения в конформации гема, характеризующие снижение подвижности гема (увеличение интенсивности соотношения  $I_{1375}/I_{1172}$ ) и снижение способности Гб выделять лиганды (снижение величины соотношения  $I_{1580}/I_{1375}$ ), что может быть вызвано как деполяризацией мембраны, так и снижением плотности Гб за счет входа воды, экранирования Гб молекулами воды, а также селективного связывания катионов  $Na^+$  белками [30]. Отметим, что накопление внутриклеточного натрия приводит и к изменению конформации глобиновой части молекулы Гб (выявлена тенденция к снижению упорядоченности  $CH_n$ -групп (снижение величины соотношения  $I_{2880}/I_{2930}$ ), что указывает на снижение плотности упаковки глобулы глобина и коррелирует с данными, свидетельствующими о снижении плотности распределения гемо-



**Рис. 2.** Изменение содержания  $[Na^+]_{in}$  (а) и  $[K^+]_{in}$  (б) при инкубации эритроцитов в течении 1 ч с 1 мМ убаина. Данные представлены как среднее  $\pm SE$  (\* –  $p \leq 0.05$ ).



**Рис. 3.** (а) – Молекулярная структура гема гемоглобина; (б) – величины соотношений интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния представлены как изменение относительно контроля (суспензия эритроцитов без добавления убаина в буфере Аллена). Данные представлены как среднее  $\pm SE$  (\* –  $p \leq 0.05$ ).



**Рис. 4.** (а) – ИК-спектр суспензии эритроцитов; (б) – величины соотношений интенсивностей полос ИК-спектра, представленные как изменение относительно контроля (суспензия эритроцитов без добавления убаина в буфере Аллена); (в) – время жизни триптофановой флуоресценции, представленное как изменение относительно контроля (суспензия эритроцитов без добавления убаина в буфере Аллена). Данные представлены как среднее ± SE (\* –  $p \leq 0.05$ ).

глубина (по величине оптической разности хода светового луча) в клетке.

Для более детального исследования изменений конформации глобина гемоглобина и состояния липидов плазматической мембраны эритроцита при блокировании насоса использовали ИК-спектроскопию (рис. 4). Установлено, что в данных условиях наблюдаются изменения в валентных колебаниях связей  $\text{CH}_3$ -групп аминокислотных остатков ( $I_{1450}/I_{1243}$ ) и увеличение величины соотношения  $I_{2930}/I_{1243}$ , характеризующего упорядоченность жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов плазматической мембраны эритроцита. Например, при инкубации клеток с убаином возрастает интенсивность полосы  $1738 \text{ см}^{-1}$  (рис. 4а), которая характеризует растяжение  $\text{C}=\text{O}$ -связей фосфолипидов мембраны [39, 40]. При инкубации эритроцитов с убаином не выявлены изменения соотношения  $I_{1650}/I_{1540}$  (отношение Amide I к Amide II) и

$I_{1650}/I_{1243}$ ), но смещение полосы 1650 до  $1647 \text{ см}^{-1}$  может свидетельствовать об изменении длины сопряжения между амидными связями  $\text{C}=\text{O}$  во вторичной структуре белка.

В дополнительной серии экспериментов нами были выявлены изменения конформации белков СЭ (Гб, белки плазматической мембраны, цитоскелета и т. д.) (снижение времени жизни флуоресценции триптофанов, рис. 4в). Поскольку гемоглобин является основным белком эритроцитов, составляя около 98% всех белков цитоплазмы клетки, то изменения его конформации будут вносить основной вклад в изменение флуоресценции триптофанов. Таким образом, наблюдаемые изменения в первую очередь свидетельствуют об изменении конформации глобина за счет изменения положения триптофанов глобина близ гема, либо в окружения молекул Гб (например, в белке полосы 3). Все это, вероятно, отражает перераспределение молекул Гб в цитоплазме и

снижение плотности упаковки глобулы Гб (рис. 1 и 3).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью методов оптической спектроскопии (КР, ИК и ЛИМ) исследованы как изменения морфологии эритроцитов, так и изменения конформации Гб в эритроците в результате увеличения соотношения  $[Na^+]_{in}$  и  $[K^+]_{in}$  в клетке. Установлено, что блокирование  $Na^+/K^+$ -АТФазы приводит не только к увеличению  $[Na^+]_{in}$  в клетке, но и увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны (рис. 1 и 2). В этих условиях выявлены изменения конформации как гема, так и белковой глобулы Гб, а именно, снижение плотности упаковки молекулы Гб, которые могут быть связаны как с сорбцией  $Na^+$  с Гб, так и увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением Гб в клетке. Вероятно, перераспределение Гб и изменение плотности упаковки участка глобина оказывают влияние на конформацию гема, увеличивая вероятность нахождения гема гемоглобина в «куполообразной форме» и, таким образом, повышает способность выделять  $O_2$ . Можно предположить, что выявленные изменения обусловлены главным образом изменениями во вторичной структуре белка-глобина близ центров локализации гема в Гб.

Итак, увеличение соотношения  $[Na^+]_{in}$  и  $[K^+]_{in}$  в клетке может привести как к деполяризации плазматической мембраны и изменению конформации примембранного Гб, так и к перераспределению и изменению конформации цитоплазматического Гб. Все вышеперечисленное нарушает способность эритроцитов переносить кислород и является причиной гипоксии в норме и при патологии.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-34-90073, для О.В.С.) (рис. 1, 3, 4); данные, представленные на рис. 2, получены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374-П, для И.Ю.П).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с кровью человека проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. J. Brearley, J. K. Aronson, N. A. Boon, et al., *Clin. Sci.*, **85** (6), 725 (1993).
2. С. С. Коваленко, Е. Ю. Паршина, А. И. Юсипович и др., *Биофизика*, **59** (6), 1093 (2014).
3. С. М. Иванова, О. И. Лабеецкая, Н. А. Анисимов и др., *Авиакосмич. и экологич. медицина*, **53** (2), 62 (2019).
4. E. W. Weiler L. F. Saldanha, F. Khalil-Manesh, et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **7** (3), 454 (1996).
5. L. de Franceschi, O. Oliveri, D. Girelli, et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, **25** (10), 762 (1995).
6. L. N. Katyukhin, A. M. Kazennov, M. N. Maslova, et al., *Comp. Biochem. Phys. B*, **120** (3), 493 (1998).
7. J.-M. Krzesinski, et al., *J. Artif. Organs*, **16** (1), 23 (1993).
8. P. L. Jorgensen, K. O. Håkansson, S. J. D. Karlish, and P. L. Jorgensen, *Annu. Rev. Physiol.*, **65** (1), 817 (2003).
9. А. Г. Погорелов, А. В. Русаков и В. Н. Погорелова, *Биофизика*, **51** (5), 852 (2006).
10. А. И. Yusipovich, M. V. Zagubizhenko, G. G. Levin, et al., *J. Microsc.*, **244** (3), 223 (2011).
11. N. Y. Bryzgalova, N. A. Brazhe, A. I. Yusipovich, et al., *Biophysics*, **54** (3), 308 (2009).
12. Г. И. Козинец и Ю. А. Симоварт, *Поверхностная цитоархитектоника клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы клеток* (Валгус, Таллин, 1984).
13. P. Mazon, S. Muller, H. Azouzi, et al., *Eur. Biophys. J.*, (1997).
14. А. И. Yusipovich, N. Y. Bryzgalova, E. Y. Parshina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **145** (3), 382 (2008).
15. А. И. Yusipovich, S. M. Novikov, T. A. Kazakova, et al., *Quant. Electron.*, **36** (9), 874 (2006).
16. S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, et al., *J. Raman Spectroscopy*, **24** (9), 275 (1993).
17. N. K. Howell, G. Arteaga, S. Nakai et al. *J. Agricult. Food Chem.* **47** (3), 924 (1999).
18. C. H. Camp and M. T. Cicerone, *Nat Photonics*, **9**, 295 (2015).
19. T. Filho, I. P. Ternner, J. Pittman, et al. *J. App. Phys.*, **104** (6), 1809 (2008).
20. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., *Biophys. J.*, **97** (12), 3206 (2009).

21. D. M. Scholler, M. Y. Wang, and B. M. Hoffman, *J. Biol. Chem.* **254** (10), 4072 (1979).
22. S. Din, E. L. Aisha, A. Bahay, et al., *Radiat. Phys. Chem.*, **44** (1–2), 195 (1994).
23. M. Polakovs, N. Mironova-Ulmane, and N. Kurjane, In *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Conf. on Advanced Optical Materials and Devices* (Springer, 2008), p. 714214.
24. A. Makhro, L. Kaestner, and A. Bogdanova, In *NMDA Receptors* (Springer, 2017), pp. 265–282.
25. A. J. Link and J. LaBaer, *Cold Spring Harbor Protocols*, **8**, pdb-prot5651 (2011).
26. D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, et al., *Heliyon*, **7** (9), e08088 (2021).
27. T. Zor and Z. Selinger, *Anal. Biochem.*, **236** (2), 302 (1996).
28. С. Н. Орлов, *Бюл. сибирской медицины*, **18** (2), 234 (2019).
29. Е. Д. Суглобова, В. Н. Спиридонов, Ю. А. Борисов и др., *Нефрология*, **2** (4), 68 (1998).
30. S. Sidorenko, V. Rebrov, V. G. Verkhov, et al., *Chem. Biol. Ecol.*, **16** (3), 279 (2016).
31. Н. В. Калягина, М. В. Мартынов и Ф. И. Атауллаханов, *Биол. мембраны*, **30** (2), 115 (2013).
32. Ф. И. Атауллаханов, А. Б. Кляткина, В. М. Витвицкий и др., *Биол. мембраны*, **10** (5), 519 (1993).
33. И. А. Медведева, М. Н. Маслова и А. А. Панов, *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **78** (11), 119 (1992).
34. J. S. Wiley and K. E. McCulloch, *Pharmacol. Therapeut.*, **18** (2) 271 (1982).
35. E. Friederichs, R. A. Farley, and H. J. Meiselman, *Am. J. Hematol.*, **41**, 170 (1992).
36. Z. Peng, X. Li, I. V. Pivkin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (33), 13356 (2013).
37. G. Minetti, G. Piccinini, C. Balduini, et al., *Biochem. J.*, **320** (2), 445 (1996).
38. О. В. Слатинская, Н. А. Бразхе, С. Н. Орлов, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **15** (3), 230 (2021).
39. R. Gasper, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1788** (6), 1263 (2009).
40. P. Lasch, et al., *Vibr. Spec.*, **28** (1), 147 (2002).

## Changes in Conformation and Distribution of Hemoglobin in the Erythrocyte during Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity

O.V. Slatinskaya\*, P.I. Zaripov\*\*, N.A. Brazhe\*, I. Yu. Petrushanko\*\*, and G.V. Maksimov\*, \*\*\*

\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/24, Moscow, 119991 Russia

\*\*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*National Research Technological University MISiS, Leninskiy prosp. 4/1, Moscow, 119049 Russia

Raman spectroscopy, infrared spectroscopy and laser interference microscopy revealed the changes in erythrocyte morphology and the hemoglobin conformational changes induced by an increase in the  $[Na^+]_{in}/[K^+]_{in}$  ratio when Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase was blocked in a cell. It has been established that the loss of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase leads to  $[Na^+]_{in}$  accumulation in the cell, and the cytoplasmic surface of the plasma membrane becomes less negative. Under these conditions, the following changes in the conformation of both the heme and the molten globule of hemoglobin were observed: the packing density of the hemoglobin molecule decreases; it can be due to the sorption of Na<sup>+</sup> (or Ca<sup>2+</sup>) from hemoglobin and to an increase in number of water molecules in the cell and the redistribution of hemoglobin in a cell. It is likely that the redistribution of hemoglobin and the change in the packing density of the globin site affect the conformation of the heme, increasing the probability of finding the heme of hemoglobin in a "dome-shaped form" and, thus, increasing the ability to bind O<sub>2</sub>.

*Keywords: Raman spectroscopy, hemoglobin, erythrocyte, red blood cells, erythrocyte volume*