

ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТА

Слатинская О.В., Максимов Г.В.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, стр. 24, г. Москва, 119892, РФ; e-mail: slatolya@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0518

Аннотация. Эритроцит представляет собой клетку, внутриклеточное пространство которой на 40% состоит из молекул гемоглобина (Гб), остальные 60% приходятся на молекулы воды. При изменении внутриклеточного объема, которое возможно при прохождении клеток эритроцита по кровеносному руслу, предполагается возможность перераспределения внутриклеточных компонентов клетки вследствие изменения её объема. Методами оптической спектроскопии (неинвазивные методы инфракрасной спектроскопии, Раман-спектроскопии, лазерной интерференционной микроскопии) выявлены изменения морфологии, конформации и перераспределения молекул Гб в эритроците человека в следствие увеличения соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы клетке. Установлено, что снижение активности работы Na^+/K^+ -АТФазы при помощи блокатора уабаина (3 мМ), приводит не только к увеличению $[Na^+]_{in}$ в клетке, но и увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны эритроцита. В этих условиях выявлены изменения конформации как гемовой, так и глобиновой части цитоплазматического Гб. Показано, что деполяризация клетки, вместе с изменением объема клетки, приводит к снижению плотности упаковки молекулы Гб, которые могут быть связаны как с сорбцией внутриклеточного Na^+ (или Ca^{2+}) с Гб, так и увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением Гб в клетке. Данные процессы могут приводить к изменению конформации примембранного Гб, так и к перераспределению и изменению конформации цитоплазматического Гб.

Ключевые слова: гемоглобин, конформация, уабаин, Раман-спектроскопия, инфракрасная спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой интерес вызывают исследования, связанные с механизмом регуляции конформации и распределения гемоглобина (Гб) при изменениях ионного гомеостаза эритроцита. Мы предполагаем, что изменения морфологии и объема эритроцита приводят к изменению способности Гб связывать или сбрасывать лиганды (в том числе O_2 и NO_x). Очевидно, эти процессы могут как вызвать нарушения газообмена в организме, так и быть последствием ряда патологий [1-3]. Известно, что при уремии и у больных с хронической почечной недостаточностью и при уремии, выявлено увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ [4,5]. При этом, важно отметить, что перераспределение ионов в клетке эритроцита сопровождается изменением мембранного потенциала, который, в свою очередь, модифицируют состояние мембранных белков и липидов. В качестве агента, способного изменять объем клетки, выбран уабаин – блокатор ферментативной активности Na^+/K^+ -АТФазы (Na-K-аденозин трифосфатаза EC 3.6.3.9) [6,7]. Na-K-АТФаза осуществляет перенос ионов против градиента их концентрации за счет гидролиза АТФ и поддерживает низкий уровень $[Na^+]_{in}$ в клетке [8]. Однако мало известно, каким образом изменения ионного гомеостаза и/или мембранного потенциала при работе Na-K-АТФазы в эритроците регулируют распределение и конформацию гемоглобина. Целью работы было исследование конформации и перераспределения гемоглобина в эритроците при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы уабаином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение эритроцитов. Объектом исследования служили выделенные из цельной крови доноров эритроциты (объект предоставлен ФГБУ НМИЦ кардиологии имени академика А.Е. Чазова). 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 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 $t = +4$ °С. Для выделения эритроцитов методом последовательного центрифугирования при 1500g использовали физиологический фосфатный буфер следующего состава: 145мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМ CaCl₂, 4мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, pH 7.4. Полученную суспензию эритроцитов хранили на льду не более 3 часов.

Блокирование активности Na^+/K^+ -АТФазы. Для инкубации эритроцитов с убаином (G-Strophanthin, Sigma), готовили раствор с 10 мМ убаином (Fluka, #75640) в буфере Аллена и добавляли его к образцам эритроцитов (конечная концентрация убаина 3 мМ) и инкубировали в течении 60 минут.

Регистрация ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита. Для контроля за изменениями ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита, пробу выделенной суспензии эритроцитов разводили в 1000 раз ($H_t = 40\%$) физиологическим фосфатным буфером. 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 эритроцитов в одной из частей кюветы. Измерения проводили в термостатирующей ячейке прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при +25 °С. Время адаптации образца к температуре – 60 секунд, количество снятых 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 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 30x ($NA=0,65$), с λ полупроводникового лазера - 650 нм с мощностью лазера на объекте менее 2 мВт. Для анализа полученных изображений использовали ПЗС видеокамеру VS-415U (NPK Videoscan, Россия). Общее время регистрации изображения составляло 10 сек [9,10]. Образец наносили на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. Препарат с клетками эритроцитов находился в буфере и в буфере с 3 мМ убаином [11]. Все измерения проводили после часовой инкубации эритроцитов в растворах с соответствующей концентрацией убаина. Для восстановления фазового изображения по 9 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 объема эритроцитов [12–14] по формуле:

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

где S – площадь клетки, рассчитанная методом наименьших квадратов по фоновому значению. Измерения объема эритроцита с помощью ЛИМ проведено на 60 клетках.

КР-спектроскопия. Регистрацию спектров комбинационного рассеяния (КР, Раман-спектроскопия) внутриклеточного Гб проводили с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига $1000-3200 \text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 1 см^{-1} , объектив 5x, мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15-30 секунд, количество накоплений сигнала - 3. Для регистрации сигнала, образец помещали в гематокритный капилляр с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия). Каждое измерение проводили не менее пяти раз. Для обработки результатов использовали программное Origin 2017. Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии.

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

ИК-спектроскопия. Регистрацию спектров ИК внутриклеточного Гб проводили с использованием приставки НПВО (неполное внутренне отражение) на ИК-Фурье спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США). Измерения проводили при температуре 25 °С в диапазоне $550-4000 \text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 4 см^{-1} . Время регистрации – 20 секунд. 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 Origin2017. Для анализа изменений структуры белковой части гемоглобина в эритроците использовали соотношения интенсивностей полос ИК-спектра (табл. 2) [15,16].

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 CH_n -групп)

Таблица 2. Соотношение интенсивностей полос спектра ИК гемоглобина [15,16]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1650}/I_{1540}	Характеризует изменение вклада AmideI/AmideII. Смещение положения пика AmideI (1650 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*

* - если после вычета базовой линии, полоса с максимумом при 1243 см^{-1} одинакова, то её можно использовать в качестве внутреннего стандарта оценки количественных изменений [10].

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 вызывали импульсным субнаносекундным УФ-светодиодом (EPLED 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм, Chroma, США). Регистрацию сигнала флуоресценции осуществляли в диапазоне 300–400 нм, с максимумом при 340 нм. Аппаратуру TCSPC использовали в режиме FIFO, регистрируя поток спектрально меченных фотонов в программном обеспечении для измерений SPCM 9.82 (Becker & Hickl GmbH, ФРГ).

Измерения проводили в кварцевой кювете (толщина поглощающего слоя 10 мм). Регистрация потока около 10^6 фотонов проводилась в течение 10 с в термостатирующей ячейке при $+25 \text{ }^\circ\text{C}$. Время адаптации образца к температуре – 60 секунд. Все эксперименты проводились не менее трех раз. Изменения интенсивности, времени жизни и спектра флуоресценции обрабатывали с помощью пакета программ SPCImage 8.0 (Becker & Hickl, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений морфологии эритроцита при блокировании Na-K-АТФазы. При селективном связывании убаина с Na-K-АТФазой блокируется выход из клетки Na^+ и вход K^+ [17], что приводит к накоплению Na^+ внутри клетки снижению входа K^+ на 88% с [18] и, как следствие наблюдается увеличение объема эритроцита (рис. 1).

Так, инкубация с убаином приводит к увеличению фазового объема клетки, а так же, снижению величины оптической разности хода за счет перераспределения молекул Гб в клетке при входе воды и накоплении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ [19]. Вероятно, увеличение объема эритроцита при блокировании насоса [18,20] может сопровождаться изменением трансмембранного потенциала и поверхностного заряда плазматической мембраны эритроцита. Действительно, при повышении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$, происходит деполяризация мембранного потенциала, которая запускает обратную моду $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, увеличивая $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Так же, основную роль в стабилизации объема эритроцитов выполняет кальций активируемые калиевые каналы [21]. Вероятно, этими процессами обусловлено увеличение заряда мембраны с $-15,2 \pm 0,2$ до $-13,1 \pm 0,1$ мВ, а также, перераспределение Гб в клетке.

Исследование изменений конформации Гб эритроцита при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы. Установлено, что блокирование активности Na-K-АТФазы приводит к увеличению $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и поверхностного заряда мембраны, а также перераспределению Гб в цитоплазме клетки. Вероятно, данные 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 (БПЗ), а также формирования комплекса Гб и БПЗ, за счет отрицательно заряженного компонента БПЗ [22–24], что может оказывать влияние на конформацию Гб в клетке.

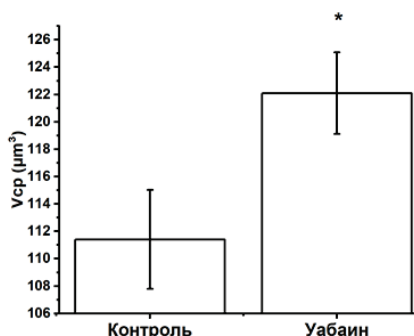


Рисунок 1. Фазовый объем эритроцита после 60-минутной инкубации в растворе с убаином. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p < 0,05$)

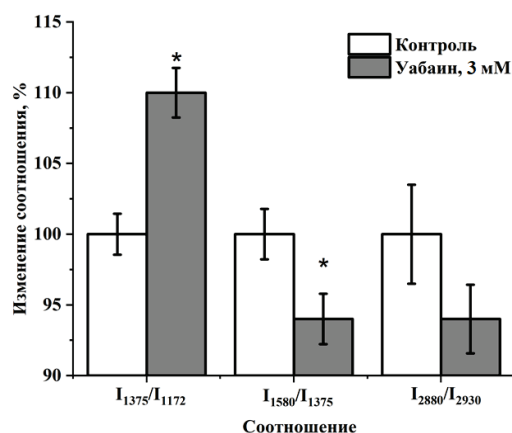


Рисунок 2. Величины соотношений интенсивностей полос КР-спектра представлены как изменение относительно контроля (эритроциты без добавления уробилина). Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0,05$)

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 доли гема в «куполообразной конформации» (рис. 2). Так, 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, экранирование Гб молекулами воды, а так же, селективного связывания катионов Na^+ белками [19]. Отметим, что накопление внутриклеточного натрия приводит и к изменению конформации глобиновой части молекулы Гб (выявлена тенденция к снижению упорядоченности CH_2 -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 гемоглобина (по величине ОРХ) в клетке.

Для более детального исследования изменений конформации глобина гемоглобина и состояния липидов плазматической мембраны эритроцита использовали ИК-спектроскопию. Установлено, что в данных условиях наблюдаются изменения в валентных колебаниях связей CH_3 -групп аминокислотных остатков (I_{1450}/I_{1243}) и увеличение величины соотношения I_{2930}/I_{1243} , характеризующие упорядоченность жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов плазматической мембраны эритроцита. Например, при инкубации клеток с уробилином возрастает интенсивность полосы 1738 см^{-1} (рис. 3), которая характеризует растяжение $\text{C}=\text{O}$ связей фосфолипидов мембраны [25,26]. При инкубации эритроцитов с уробилином не выявлены изменения соотношения I_{1650}/I_{1540} (отношение AmideI к AmideII) и I_{1650}/I_{1243} , но смещение полосы 1650 до 1647 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 флуоресценции триптофанов на 63 ± 5 %), что в первую очередь свидетельствует об изменении конформации глобина за счет изменения положения триптофанов глобина близ гема, либо в окружения молекул Гб (например, БПЗ) [27]. Все это,

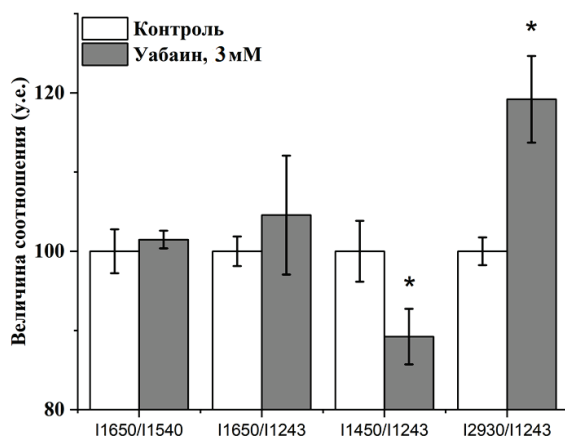


Рисунок 3. Величины соотношений интенсивностей полос ИК-спектра. Данные представлены как изменение относительно контроля (эритроциты без добавления уробилина). Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0,05$)

вероятно, отражает перераспределение Гб в цитоплазме и снижение плотности упаковки глобулы Гб (рис. 1, 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения морфологии и конформации Гб в эритроците в результате увеличения соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в клетке так же сопровождаются увеличением положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. При этом, происходит снижение плотности упаковки глобина, что может быть связано с сорбцией Na^+ с Гб, либо с увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением молекул Гб в клетке. Вероятно, выявленные изменения характеризуют главным образом изменения во вторичной структуре глобина близ центров локализации гема, что в свою очередь оказывает влияние на конформацию гема – возрастает вероятность нахождения гема в куполообразной форме, что повышает способность молекул Гб связываться с лигандами.

Таким образом, 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.

Исследование выполнено при финансовой РФФИ (№ 20-34-90073, для С.О.В.)

Список литературы / References:

1. Brearley C.J., Aronson J.K., Boon N.A., Raine A.E.G. Effects of haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis on abnormalities of ion transport in vivo in patients with chronic renal failure. *Clinical Science*, 1993, vol. 85, no. 6, doi: 10.1042/cs0850725.
2. Kovalenko S.S., Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B. Changes in the hemoporphyrin conformation in hemoglobin and NO-binding in erythrocytes under the action of insulin-like growth factor 1. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 6, doi: 10.1134/S0006350914060062.
3. Ivanova S.M., Labetskaya O.I., Anisimov N.A., Maksimov G.V., Parshina E.Yu., Yusipovich A.I. Morfobioximicheskie pokazateli e`ritroцитов i sostoyaniya gemoporfirinov gemoglobina u obsleduem`x v dinamike kratkovremennoj izolyacii v germoob`eme, *Aviakosmicheskaya i e`kologicheskaya medicinaa*, 2019, vol. 53, no. 2, doi: 10.21687/0233-528X-2019-53-2-62-67.
4. Franceschi L. de, Oliveri O., Girelli D., Lupo A., Bernich P., Corrocher R. Red blood cell cation transports in uraemic anaemia: evidence for an increased K/Cl co-transport activity. Effects of dialysis and erythropoietin treatment. *European Journal of Clinical Investigation*, 1995, vol. 25, no. 10, doi: 10.1111/j.1365-2362.1995.tb01955.x.
5. Weiler E.W., Saldanha L.F., Khalil-Manesh F., Prins B.A., Purdy R.E., Gonick H.C. Relationship of Na-K-ATPase inhibitors to blood-pressure regulation in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1996, vol. 7, no. 3, doi: 10.1681/ASN.V73454.
6. Katyukhin L.N., Kazennov A.M., Maslova M.N., Matskevich Y.A. Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, vol. 120, no. 3, doi: 10.1016/S0305-0491(98)10035-4.
7. Krzesinski J.-M., Du F., Pequeux M.L., Rorive G.L. Krzesinski J.-M. Plasma Na-K ATPase inhibitor activity and intracellular ions during hemodialysis. *The International Journal of Artificial Organs*, 1993, vol. 16, no. 1, doi: 10.1177/039139889301600106.
8. Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J.D. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology*, 2003, vol. 65, no. 1.
9. Yusipovich A.I., Zagubizhenko M.V., Levin G.G., Platonova A., Parshina E.Y., Grygorzcyk R., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: Impact of cell volume and refractive index. *Journal of Microscopy*, 2011, vol. 244, no. 3, doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x.
10. Bryzgalova N.Y., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B. Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen. *Biophysics*, 2009, vol. 54, no. 308, doi: 10.1134/S0006350909030075.
11. Kozinecz G.I., Simovart Yu.A. Poverxnostnaya arxitektonika kletok perifericheskoy krovi v norme i pri zabolevaniyax sistemy` krovi. *E`stonskaya sel`skoxozyajstvennaya akademiya*, 1984.
12. Mazon P., Muller S., Azouzi H. El On intensity reinforcements in small-angle light scattering patterns of erythrocytes under shear. *European Biophysics Journal*, 1997.
13. Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, vol. 145, no. 382, doi: 10.1007/s10517-008-0097-3.
14. Yusipovich A.I., Novikov S.M., Kazakova T.A., Erokhova L.A., Brazhe N.A., Lazarev G.L., Maksimov G.V. Peculiarities of studying an isolated neuron by the method of laser interference microscopy. *Quantum Electronics*, 2006, vol. 36, no. 9, doi: 10.1070/QE2006v036n09ABEH013408.
15. Din S. El, Aisha A., Bahay A.Z. El Effect of gamma irradiation on infrared spectra of rat hemoglobin. *Radiation Physics and Chemistry*, 1994, vol. 44, no.1-2, doi: 10.1016/0969-806X(94)90130-9.

16. Spigulis J., Krumins A., Millers D., Sternberg A., Muzikante I., Ozols A., Ozolinsh M. *Micro-Raman scattering and infrared spectra of hemoglobin*. 2008, doi: 10.1117/12.815796.
17. Orlov S.N. Membrannaya teoriya patogeneza arterialnoj gipertenzii: chto my znaem ob etom polveka spustya? *Bulleten sibirskoj mediciny*, 2019, vol. 18, no. 2, doi: 10.20538/1682-0363-2019-2-234-247.
18. Suglobova E.D., Spiridonov V.N., Borisov Yu.A., Lebedeva E.B., Gavrilencov P.V. Biofizicheskie karakteristiki membran e`ritroцитов u bol`ny`x, poluchayushhix lechenie reguljarny`m gemodializom. Rezistenstnost` k dejstviyu vneshnego kanaloformera. *Nefrologiya*, 1998.
19. Sidorenko S.V., Rebrov V.G., Verkhov D.G., Usanov A.D., Skripal A.V., Usanov D.A. Competitive Binding of K⁺ in the Presence of Na⁺ with Bovine Serum Albumin and Hemoglobin. *Chemistry. Biology. Ecology*, 2016, vol. 16, no. 3, doi: 10.18500/1816-9775-2016-16-3-279-284.
20. Kalyagina N.V., Marty`nov M.V., Ataulloxanov F.I. Matematicheskij analiz reguljacii ob`ema e`ritrocita cheloveka s uchetom uprugogo vozdejstviya obolochki e`ritrocita na obmenny`e processy`. *Biologicheskie membrany*, 2013, vol. 30, no. 2, doi: 10.7868/S0233475513010052.
21. Ataulloxanov F.I., Klyatkina A.B., Vitviczkij V.M., Pichugin A.V. Reguljaciya obyoma eritrocitov cheloveka. Rol kalievyx kanalov, aktiviruemy s kalciem. *Biologicheskie membrany*, 1993, vol. 10, no. 5.
22. Wiley J.S., McCulloch K.E. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmacology & Therapeutics*, 1982, vol. 18, no. 2, doi: 10.1016/0163-7258(82)90070-5.
23. Friederichs E., Farley R.A., Meiselman H.J. Influence of Calcium Permeabilization and Membrane-Attached Hemoglobin on Erythrocyte Deformability. *American Journal of Hematology*, 1992, vol. 41, doi: 10.1002/ajh.2830410306.
24. Peng Z., Li X., Pivkin I.V., Dao M., Karniadakis G.E., Suresh S. Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, vol. 110, no. 33, doi: 10.1073/pnas.131182711.
25. Gasper R., Dewelle J., Kiss R., Mijatovic T., Goormaghtigh E. IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2009, vol. 1788, no. 6.
26. Lasch P., Boese M., Pacifico A., Diem M. FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level. *Vibrational Spectroscopy*, 2002, vol. 28, no. 1, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.02.016.
27. Slatinskaya O.V., Brazhe N.A., Orlov S.N., Maksimov G.V. The Role of Extracellular Ca²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2021, vol. 15, no. 3, doi: 10.1134/S1990747821030090.

CHANGES IN THE ERYTHROCYTE HEMOGLOBIN CONFORMATION AND DISTRIBUTION DURING RBC VOLUME CHANGES

Slatinskaya O.V., Maksimov G.V.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory 1/24, Moscow, 119892, Russia; e-mail: slatolya@mail.ru

Received 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0518

Abstract. The intracellular space of red blood cells (RBC) includes 40% hemoglobin (Hb) molecules and 60% being water molecules. When the intracellular volume changes, which is possible when erythrocyte cells pass through the blood stream, the possibility of redistribution of intracellular components of the cell due to its volume changes is assumed. By methods of optical spectroscopy (non-invasive methods of infrared spectroscopy, Raman-spectroscopy, laser interference microscopy) changes of morphology, conformation and redistribution of Hb have been revealed in the human erythrocyte due to an increase in the ratio of [Na⁺]_{in} and [K⁺]_{in} when Na⁺/K⁺-ATPase is blocked in the cell. The decrease of activity of Na⁺/K⁺-ATPase by a ouabaine (3 mM) has been found to lead not only to an increase in [Na⁺]_{in} cell but also to an increase in positive charge on the cytoplasmic surface of the RBC membrane. In these conditions, changes in the conformation of both the heme and globine parts of the cytoplasmic Hb have been identified. It has been shown that cell depolarization, together with cell volume change, leads to a decrease in packing density of Hb molecule, which may be related to sorption of intracellular Na⁺ (or Ca²⁺) c Hb, as well as increasing the amount of water molecules in the cell and redistributin Hb in the cell. These processes can lead to a change in the conformation of Hb, as well as to a redistribution and alteration of the conformation of the cytoplasmic Hb.

Key words: hemoglobin, conformation, Raman-spectroscopy, ouabain.