

УДК 577.336

РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} В РЕГУЛЯЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И КОНФОРМАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ

© 2021 г. О. В. Слатинская^а, Н. А. Браже^а, С. Н. Орлов^а, Г. В. Максимов^{а, б, *}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119892 Россия

^бНациональный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, 119049 Россия

*e-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2020 г.

После доработки 11.01.2021 г.

Принята к публикации 13.01.2021 г.

Установлено, что снижение концентрации экстраклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$) увеличивает поверхностный заряд мембраны эритроцита, что сопровождается изменением конформации гема и глобина, а также перераспределением гемоглобина в клетке (снижение величины оптической разности хода луча (ОРХ) цитоплазмы и содержания примембранного гемоглобина). Установлено, что при варьировании $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М морфология эритроцита практически не меняется, ζ -потенциал возрастает с -15.4 ± 0.2 до -14.5 ± 0.3 мВ (при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ от 10^{-3} до 5×10^{-4} М), а величина ОРХ цитоплазмы клетки снижается. Уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ до 10^{-6} М меняет конформацию гема, а также распределение гемоглобина в эритроците: происходит снижение симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец и увеличение валентных колебаний винильных групп гемопорфина и сродство гема к лигандам. При этом не меняется вероятность нахождения гема в плоской конформации, но снижается жесткость его белкового окружения. При варьировании $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-4} М наблюдается изменение конформации глобина: снижение упорядоченности СН-групп аминокислот глобина, увеличение плотности упаковки глобина, а также полярности окружения глобина. При инкубации эритроцитов в среде, содержащей $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-6}$ М, максимальная величина интенсивности комбинационного рассеяния (КР) гемоглобина эритроцитов (полосы КР-спектра 1375 см^{-1} и 1580 см^{-1}) выявлена в центре клетки и в 2.6 раза меньше, чем у эритроцитов, инкубированных в среде, содержащей $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-3}$ М.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние, гемоглобин, эритроцит, экстраклеточный Ca^{2+}

DOI: 10.31857/S0233475521030099

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что для плазматической мембраны эритроцита характерно наличие фиксированных поверхностных зарядов молекул липидов и белков, формирующих поверхностный потенциал и характер распределения ионов и молекул воды [1]. В основном поверхностный потенциал эритроцита обусловлен зарядом карбоксильных групп N-ацетилнейраминаовой кислоты сфинголипида и ионизируемых групп гликофорина и снижается при воздействии на клетку нейраминидазы. С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) установлено, что при варьировании экстраклеточного рН от 4.82 до 9.70 меняется константа диссоциации комплекса мономер/димер гемоглобина (Гб) в клетке. Предполагается, что при нейтральном экстраклеточном рН, молекулы Гб локализованы в примембранном пространстве клетки или связаны с мембра-

ной, в то время как при низком рН значительная часть Гб локализована в центральной области клетки [2].

Известно, что изменение поверхностного заряда цитоплазматической мембраны эритроцита связано с ОН-группами тирозина ряда белков мембраны, например, белка полосы 3 (БПЗ) [3]. Изменение поверхностного потенциала на цитоплазматической стороне мембраны сопровождается активацией внутриклеточных фосфолипаз, что меняет упорядоченность жирнокислотных хвостов мембранных липидов, снижая долю примембранного Гб [4–6]. Важную роль в регуляции изменений заряда на цитоплазматической поверхности мембраны эритроцита выполняет внутриклеточный Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$). Например, повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ активирует Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы и приводит к гиперполяризации мембра-

ны [7]. Отметим, что из всех ионов цитоплазмы клетки (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ и Cl^-) только Ca^{2+} специфически связывается с клеточными белками, поскольку K^+ , Na^+ и моновалентные анионы формируют слабые комплексы с протеинами вследствие большого радиуса и небольшого заряда.

В настоящее время активно обсуждается вопрос о роли структурных изменений цитоплазмы эритроцита (“краудинг”) в регуляции объема и гемодинамики эритроцитов в сосудах [8–13]. Известно, что морфология эритроцита зависит от Ca^{2+} -зависимых изменений молекул спектрина и актина цитоскелета, формирующих комплекс с мембраной эритроцита. Так, α - и β -цепи тримеров спектрина способны к самопроизвольной агрегации в тетрамеры и формированию комплексов с актином, которые связываются с белком полосы 4.1 и гликофоорином с БПЗ плазматической мембраны. Спектрин связывается с помощью анкирина, контролируя таким образом как долю примембранного Гб (Гбпм), так и механические свойства мембраны эритроцита [14, 15]. Отметим, что N-конец молекулы БПЗ содержит анионные центры для формирования комплексов с глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназой, альдолазой, каталазой Гбпм [15–18].

Возможно, что $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ -зависимые изменения поверхностного заряда на внутренней поверхности мембраны эритроцита регулируют формирование комплекса БПЗ и Гб и эффективность переноса кислорода, которое обусловлено деполяризацией мембраны [19]. Предполагается, что при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ происходит формирование кластеров отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот на поверхности мембраны эритроцита, что увеличивает количество свободных ОН-групп тирозина БПЗ [3, 20].

В связи с этим цель работы заключалась в исследовании изменения морфологии, поверхностного потенциала, а также распределения и конформации гема и глобина Гб в эритроцитах при варьировании экстраклеточного Ca^{2+} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили отмытые от форменных элементов крови эритроциты, выделенные из крови здоровых доноров ($n = 10$, возраст 20–40 лет). Кровь отбирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки (Vacuette, РФ) и хранили при 4°C в течение 3 ч после забора крови. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20–50 ед/мл крови). Выделение эритроцитов проводили центрифугированием крови при 1500 g в течение 5 мин при 4°C (Laborfuge 400R, Thermo Scientific, США). Полученный супернатант отделяли, а осадок отмывали в физиологическом растворе Аллена, содержащем 145 mM NaCl, 5 mM

KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 5 mM глюкозы с добавлением CaCl_2 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} или 10^{-3} M (Sigma, США), pH 7.4. Выделенную суспензию эритроцитов (Ht = 40%) хранили при 4°C и использовали в эксперименте в течение 3 ч после выделения.

Выделение Гб из суспензии эритроцитов проводили следующим образом: к суспензии эритроцитов добавляли фосфатный буфер (4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 1 мкМ CaCl_2 , pH 7.4) в десятикратном объеме, после чего суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин при температуре 4°C . Супернатант отделяли и хранили при 4°C . Образец использовали в течение 3 ч после выделения.

Исследование конформации гема и глобина гемоглобина проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Сигнал КР цитоплазматического Гб регистрировали с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, РФ) в диапазоне $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, с шагом измерения 0.8 см^{-1} , регистратор – CCD-детектор с Пельтье-охлаждением до -50°C (объектив $5\times$ с апертурой 0.15, решетка 600 штр/мм), мощность лазера на образце составила 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15 с. Измерения проводили при комнатной температуре. Для регистрации спектров КР Гб и суспензии эритроцитов образец помещали в гематокритный капилляр (Агат-Мед, РФ) и регистрировали по три спектра в разных точках капилляра. Количество повторов измерений каждой тестируемой концентрации Ca^{2+} – не менее 12.

Распределение амплитуды КР в клетке проводили с одиночных клеток, размещенных на покровном стекле, при помощи конфокального микроскопа-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, РФ) в диапазоне $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, с шагом измерения 0.8 см^{-1} (объектив $20\times$ с апертурой 0.45, решетка 600 штр/мм), длина волны возбуждения 532 нм, время получения одного изображения – 10 мин. Количество измеренных клеток – 12. Спектры КР обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров.

Для анализа изменений конформации гема и глобина молекулы гемоглобина использовали величины соотношений интенсивностей полос спектра КР [21–24]:

I_{1172}/I_{1375} – групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине, зависит от белкового окружения глобина возле гемопорфирина (характеризует выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных полуколец);

I_{1580}/I_{1375} — вклад симметричных колебаний пиррольных колец к валентным колебаниям связей винильных групп, характеризует способность гемоглобина выделять лиганды (в том числе O_2);

I_{1640}/I_{1375} — вклад колебаний метиновых мостиков к симметричным колебаниям пиррольных колец, характеризует конформационные изменения гема;

I_{2850}/I_{2880} — вклад симметричных колебаний по отношению к несимметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот, характеризующий плотность упаковки белка;

I_{2930}/I_{2850} — вклад колебаний симметричных концевых метиновых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот, характеризующий изменение полярности окружающей аминокислот глобина;

I_{2880}/I_{2930} — вклад колебаний водородных связей метиленовых групп аминокислот глобина, характеризующий конформационную подвижность белка. При увеличении параметра увеличивается упорядоченность аминокислот и плотность упаковки аминокислот.

КР-спектроскопия в поляризованном свете. Для выявления изменений упорядоченности молекулярных колебаний связей гема и глобина КР регистрировали в условиях с различными положениями плоскости поляризации лазера относительно образца [25, 26]. Для этого образцы размещали на прозрачном стекле и регистрировали сигнал от одиночных эритроцитов (для СЭ) или от раствора Гб. Регистрацию спектров КР в поляризованном свете проводили на КР-спектрометре WITec alpha 300 (Zeiss, Германия) в диапазоне $200\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 0.3 см^{-1} (объектив $20\times$ с апертурой 0.45 , решетка 1800 штр/мм), мощность лазера на образце — 7 мВт , длина волны возбуждения 532 нм , время регистрации сигнала — 5 с . Поляризацию осуществляли с помощью установки поляризатора (ThorLabs, США) под углом поляризации 0 и 90 градусов в специальное отверстие. Измерения проводили при комнатной температуре. Количество повторов измерений каждой тестируемой концентрации Ca^{2+} — не менее 12.

Регистрация изменений ζ -потенциала. Для регистрации изменений ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита суспензию эритроцитов ($\text{Ht} = 40\%$) разводили в 1000 раз в буфере Аллена с соответствующей концентрацией Ca^{2+} . Эксперимент проводили в термостатируемой кювете с золотыми электродами (Malvern, РФ) при 25°C , время адаптации образца к температуре — 100 с , количество измерений (100). Количество повторов измерений каждой тестируемой концентрации Ca^{2+} — не менее 12. Обработку результатов ζ -потенциала проводили с помощью программного обеспечения Malvern и MS Excel.

Изменения морфологии эритроцита и оптической разности хода (ОРХ) луча света цитоплазмы эритроцита регистрировали методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). После 10-минутной инкубации суспензии эритроцитов (5 мкл) в 1 мл буфера с тестируемой концентрацией Ca^{2+} добавляли 20 мкл 25% глутарового альдегида и инкубировали в течение 60 мин при 25°C [27]. Далее пробы центрифугировали (при 5000 g в течение 3 мин), к осадку добавляли 2 мл дистиллированной воды, ресуспендировали (Vortex, BioSan, Латвия) и повторяли процедуру. Суспензию фиксированных эритроцитов наносили на предметное стекло с зеркальным покрытием и регистрировали топографию распределения величины ОРХ цитоплазмы клетки с помощью лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ, ВНИИОФИ, РФ) на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, РФ) с объективом $30\times$ ($\text{NA} = 0.65$), с мощностью лазера на объекте менее 2 мВт ($\lambda = 650\text{ нм}$). Размер регистрируемого кадра составлял $195 \times 145\text{ мкм}$. Для анализа полученных изображений использовали ПЗС видеокамеру VS-415U (NPK Videoscan, РФ) с размером матрицы $6.5 \times 4.83\text{ мм}$ и разрешением 782×582 точек. Общее время регистрации составляло 10 с . Количество измеренных клеток — не менее 180. Для восстановления фазового изображения использовали программу WinPhast (ВНИИОФИ, РФ), а для реконструкции изображений — программы FIJI (ImageJ, США) и Origin2017 (Microcal Inc., OriginLab Corporation, США) [28, 29]. Реконструкция позволяла анализировать изменения величины ОРХ цитоплазмы эритроцита (средняя фазовая высота эритроцита) и площади клетки [30–33].

Для оценки статистической значимости результатов использовали t -критерий. Результаты считали достоверно различающимися при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали изменения морфологии, состояние цитоплазмы эритроцита (ОРХ) и конформации внутриклеточного гемоглобина при варьировании экстраклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$). Установлено, что при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М морфология эритроцита практически не меняется, но уменьшается величина ОРХ цитоплазмы эритроцита (рис. 1а, 1б, табл. 1). Исследуя характер распределения величины интенсивности КР гемоглобина в эритроците (рис. 1в, полосы КР-спектра 1375 и 1580 см^{-1}), установлено, что при инкубации эритроцитов в среде с 10^{-6} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ величина интенсивности КР гемоглобина эритроцитов в 2.6 раза ниже, чем у эритроцитов, инкубированных в среде с 10^{-3} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$, а максимальная величина интенсивности сигнала выявлена в области ближе к краю клетки при 10^{-3} М

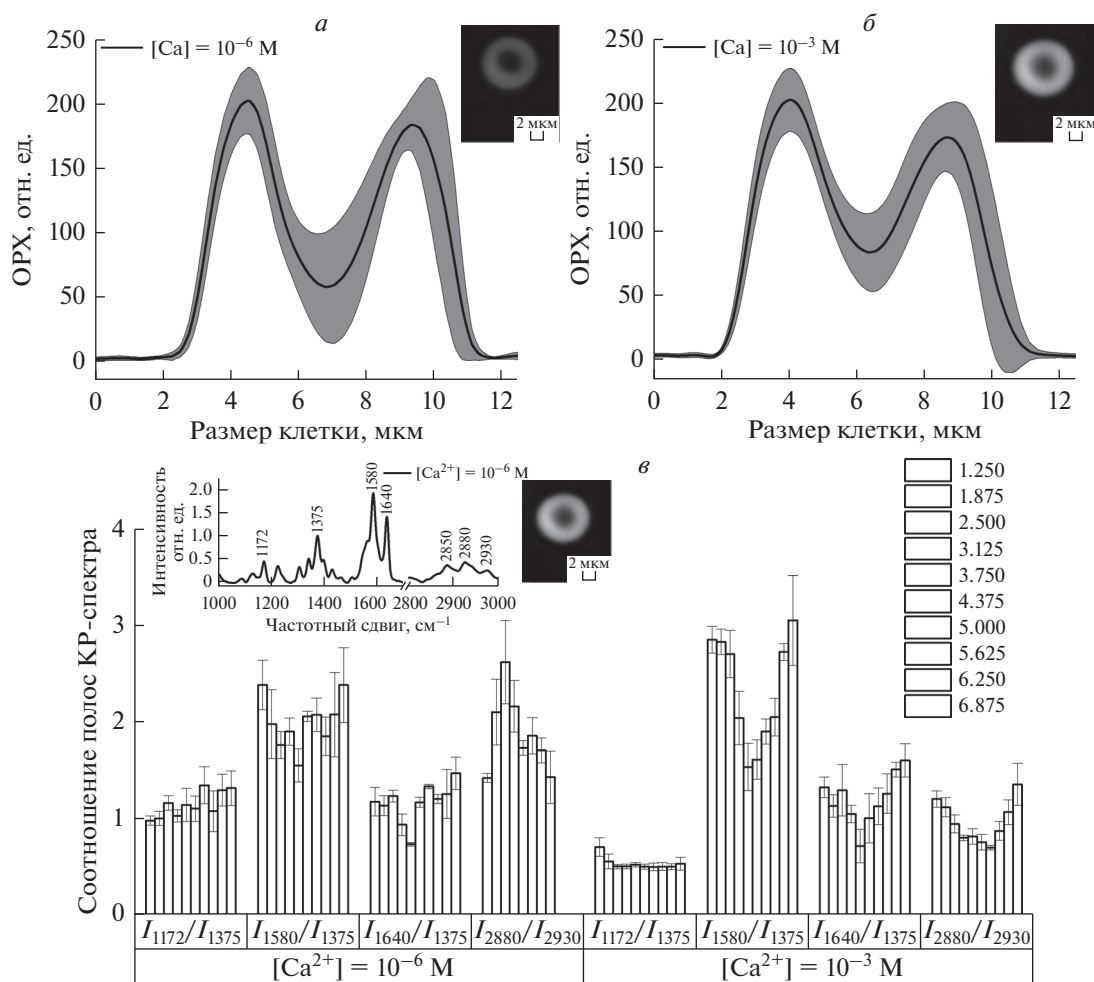


Рис. 1. 2D-распределение и фазовый профиль величины ОРХ эритроцитов при 10^{-6} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (а) и 10^{-3} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (б). На фотографии представлено изображение эритроцита, полученное методом ЛИМ. По оси абсцисс отложена длина скан-линии. Данные представлены как величина фазового профиля, усредненная по 180 клеткам (черная линия) \pm SE (SE – стандартная ошибка, серая линия). в – соотношение интенсивностей полос КР-спектра в эритроците при концентрациях при 10^{-6} и 10^{-3} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$. На фотографии указан срез, по которому проводили расчеты соотношений. Столбцы соответствуют величине скан-линии с шагом 0.625 нм.

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ и в центре клетки при с 10^{-6} М $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$. Итак, при уменьшении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$, форма эритроцита практически не меняется, но наблюдается изменение локализации сигнала КР гемоглобина в клетке, что, вероятно, свидетельствует о перераспределении Гб в цитоплазме и десорбции мембраносвязанного Гб. Отметим, что при старении эритроцита также выявлено перераспределение Гб в цитоплазме: увеличение доли примембранного Гб и снижение поверхностного заряда мембраны [34]. В связи с этим исследовали изменения величины ζ -потенциала мембраны и конформации гема и глобина эритроцита при варьировании $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$. Установлено, что при уменьшении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М ζ -потенциал возрастает с -15.4 ± 0.2 до -14.5 ± 0.3 мВ и при более низких концентрациях не меняется (рис. 2а). Отметим, что изменения

величин ζ -потенциала эритроцитов согласуются с данными литературы [35, 36].

В следующей серии экспериментов при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М обнаружено, что изменения в КР-спектре внутриклеточного Гб наблюдаются в области $1355\text{--}1700$ cm^{-1} (рис. 2б). Установлено, что уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ до 10^{-6} М приводит к изменению конформации гема и глобина: снижение симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и увеличение вклада валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}) и сродства к лигандам (I_{1375}/I_{1580}). Отметим, что при этом не меняется вероятность нахождения гема в плоской конформации (I_{1640}/I_{1127}), но снижается жесткость его белкового окружения (I_{1170}/I_{1127}). При снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-4} М происходит увеличение

Таблица 1. Изменения площади клетки (S_{cp}) и распределения Гб (ОРХ) в эритроците при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{out}$

| $[\text{Ca}^{2+}]$, М | S_{cp} , μm^2 | ОРХ, нм | ОРХ/S | ОРХ _{центр} /ОРХ _{край} |
|------------------------|----------------------------|-------------------|-----------------|---|
| 10^{-6} | 45.50 ± 0.46 | 131.56 ± 0.65 | 2.92 ± 0.05 | 0.038 ± 0.016 |
| 10^{-5} | 44.52 ± 0.96 | 134.44 ± 0.57 | 3.30 ± 0.05 | 0.072 ± 0.027 |
| 10^{-4} | 44.62 ± 0.47 | 133.86 ± 0.69 | 3.12 ± 0.07 | 0.025 ± 0.026 |
| 10^{-3} | 44.86 ± 0.60 | 138.06 ± 0.80 | 3.13 ± 0.06 | 0.012 ± 0.007 |

плотности упаковки глобина (I_{2850}/I_{2880}) и полярности окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}), а также снижение упорядоченности СН-групп аминокислот глобина, что может быть связано с изменением поверхностного заряда мембраны и присоединением молекул Гб к мембране (I_{2880}/I_{2930}) (рис. 3). Отметим, что изменения в спектре КР в области ва-

лентных колебаний аминокислот $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ КР-спектра характерны только для глобина Гб, так как при данном режиме регистрации КР (возбуждение с длиной волны 532 нм) в области $2800\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ КР от белков и липидов мембраны эритроцита не регистрируется [10, 22]. Отметим, что при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{out}$ изменения конформации

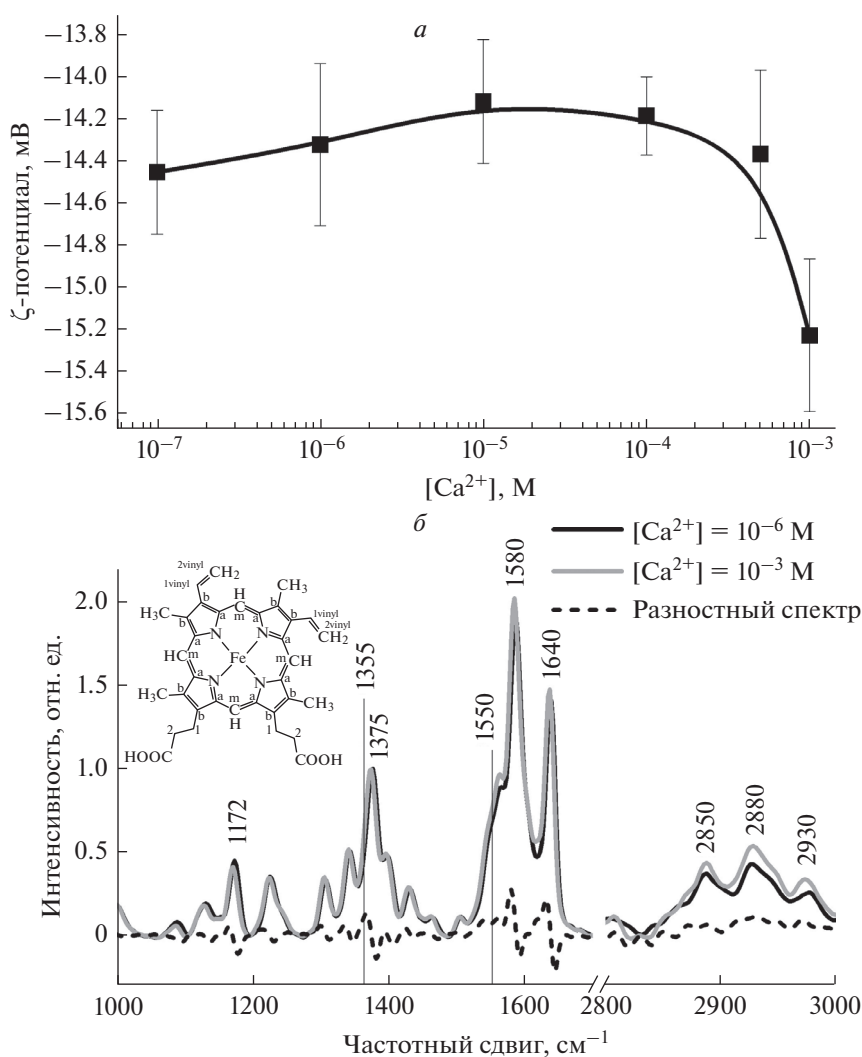


Рис. 2. *a* – Изменение величины ζ -потенциала мембраны эритроцита при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{out}$; *б* – спектры КР эритроцитов (нормированные на полосу 1280 см^{-1}) в области, характеризующей колебания в геме ($1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) и глобине ($2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$).

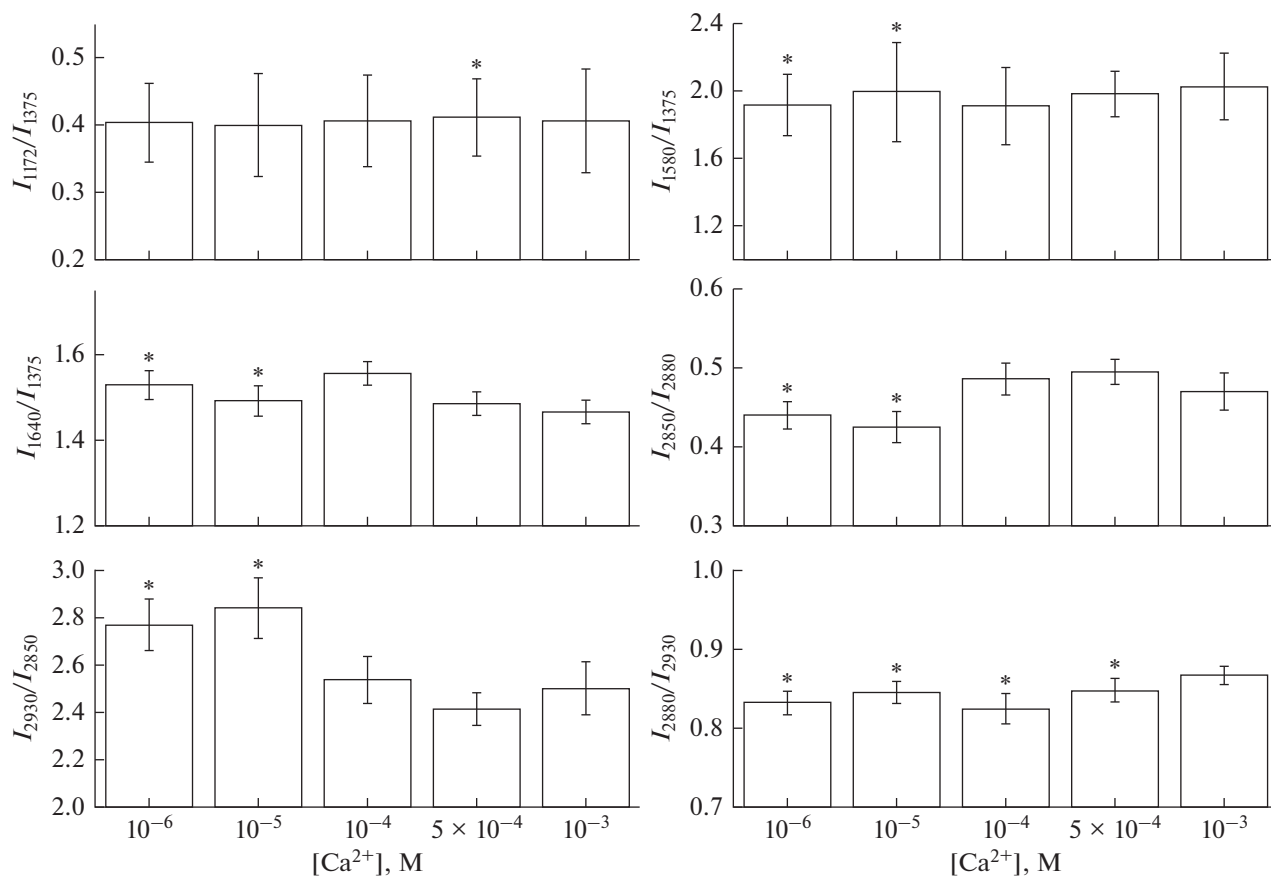


Рис. 3. Соотношения интенсивностей полос КР-спектра гема и глобина гемоглобина, измеренные от суспензии эритроцитов. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0.05$ относительно $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-3}$ М).

глобиновой части Гб в эритроците начинаются при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} 10^{-5}$ М, а изменения конформации гема – при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} 10^{-6}$ М (рис. 3). Вероятно, изменения конформации как гемовой, так и глобиновой части внутриклеточного Гб при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ до 10^{-4} М связаны частично с изменением поверхностного заряда (ζ -потенциал) мембраны (на 6%), но в большей степени с увеличением мембранного потенциала (на 25%).

В связи с выявленным различием в распределении Гб в клетке при снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (рис. 1) в следующей серии экспериментов с помощью КР-спектроскопии в поляризованном свете исследовали наличие упорядоченности в распределении Гб (гомогенное или негетогенное распределение Гб различных областях клетки) [37]. Установлено, что амплитуда характерных полос КР-спектра при перпендикулярной (I_{\perp}) и параллельной поляризации (I_{\parallel}) различна. При снижении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М изменения в спектре КР Гб в эритроците в поляризованном свете выявлены в области $1355\text{--}3000$ см⁻¹ (рис. 4). Установлено, что при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-3}$ М при регистра-

ции КР в плоско поляризованном свете вклад симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и способность Гб выделять лиганды (отношение симметричных валентных колебаний пирролов к валентным колебаниям винильных групп) (I_{1375}/I_{1580}) увеличивается, а вклад валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}) и полярность окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}) по сравнению с контролем уменьшается. При регистрации КР в перпендикулярно поляризованном свете уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ с 10^{-3} до 10^{-6} М не влияло на вклад симметричных колебаний боковых СН-групп пиррольных полуколец (I_{1375}/I_{1127}) и полярность окружения глобина (I_{2930}/I_{2850}), хотя менялся вклад валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1580}/I_{1550}). Таким образом, с помощью поляризации КР, были выявлены изменения структуры молекулы (что отражается в ориентации/вкладе определенных групп) или ее олигомеризации при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ (рис. 4).

Известно, что важнейшими компонентами внешнего монослоя мембраны эритроцитов являются незаряженный фосфотидилхолин (около

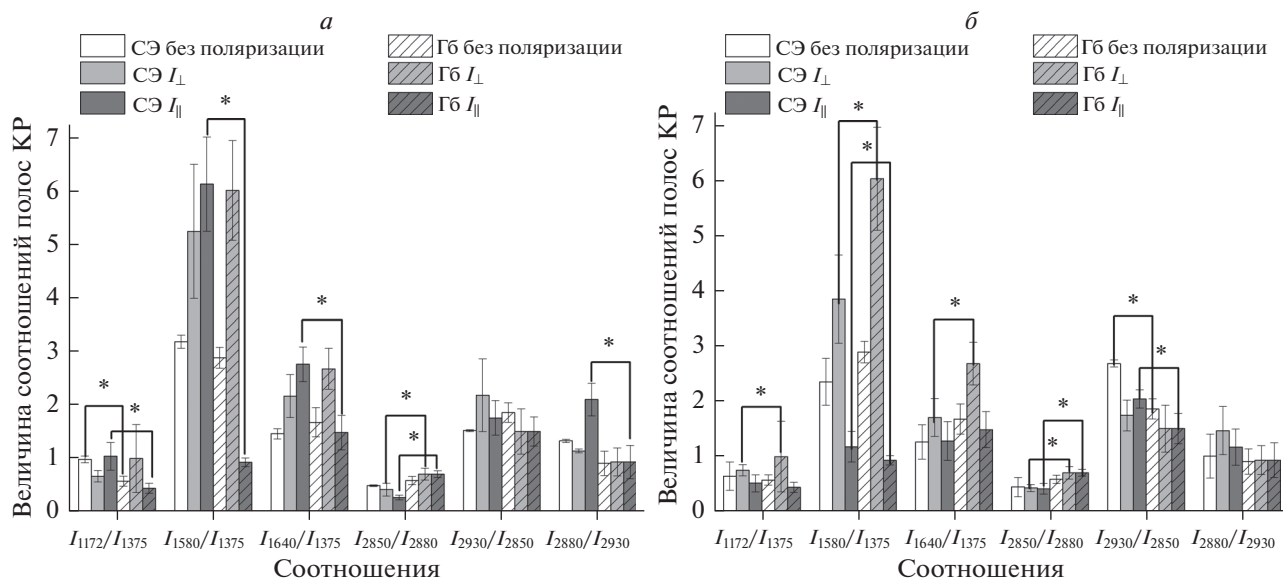


Рис. 4. Соотношение интенсивностей полос КР-спектра в поляризованном свете внутриклеточного Гб при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-6}$ М (а) и 10^{-3} М (б) и внеклеточного Гб при $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 10^{-6}$ М. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0.05$ для СЭ относительно внеклеточного Гб). Скобками указаны группы сравнения.

28%) и отрицательно заряженные сфинголипиды (сфингомиелин, составляющий около 26% от всех липидов) с N-ацетилнейраминовой кислотой, а также гликопротеин (гликофорин). В мембране гликофорин распределен неравномерно (локализован как на внешней, так и на внутренней поверхности плазматической мембраны) и содержит большое количество отрицательно заряженных групп сиаловой кислоты. Известно, что при старении эритроцита величина поверхностного потенциала мембраны эритроцита снижается на 7 мВ (с -30.2 до -23.2 мВ) что соответствует 2.5×10^6 электронным зарядам или 4×10^{13} кулонов на поверхности мембраны эритроцита [1, 36]. Нами установлено, что снижение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ увеличивает поверхностный заряд, и это сопровождается изменением конформации гема и глобина, а также его олигомеризацией (за счет снижения упорядоченности цитоплазмы и десорбции примембранного Гб). 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 [38, 39]. Известно, что NH_2 -терминальный участок БПЗ имеет гибкий анионный сегмент и может входить в катионную центральную полость дезоксигемоглобина (дГб), которая значительно сужается при связывании O_2 (это снижает сродство O_2 к Гб). Предполагается, что при связывании молекулы кислорода изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб (например, лизина)

увеличивают плотность отрицательного заряда в центральной полости дГб, способствуя смещению анионного сегмента в БПЗ [10].

Вероятно, снижение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ меняет конформацию гема и расположения близлежащих к гему аминокислот дГб (например, лизина) и локализацию анионного сегмента БПЗ за счет увеличения мембранного потенциала и поверхностного заряда. Этот процесс сопровождается десорбцией мембраносвязанного оксигемоглобина (оГб), дГб и последующей олигомеризацией цитоплазматического оГб, что меняет кислородтранспортные свойства эритроцита.

Исследование выполнено при финансовой РФФИ (№ 20-34-90073, для С.О.В.) и РНФ (№ 19-79-30062, для М.Г.В. и Б.Н.А), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета "Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atkins C.G., Buckley K., Blades M.W., Turner R.F. 2017. Raman spectroscopy of blood and blood components. *Appl. Spectrosc.* **71** (5), 767–793. <https://doi.org/10.1177/0003702816686593>
2. Wu Y., Huang Y.X., Kang L.L., Wu Z.J., Luo M. 2010. Effect of pH on molecular constitution and distribution of hemoglobin in living erythrocyte. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules.* **93** (4), 348–354. <https://doi.org/10.1002/bip.21348>
3. Minetti G., Piccinini G., Balduini C., Seppi C., Brovelli A. 1996. Tyrosine phosphorylation of band 3 pro-

- tein in Ca^{2+} /A23187-treated human erythrocytes. *Biochem. J.* **320** (2), 445–450.
<https://doi.org/10.1042/bj3200445>
4. Friederichs E., Farley R.A., Meiselman H.J. 1992. Influence of calcium permeabilization and membrane-attached hemoglobin on erythrocyte deformability. *Amer. J. Hematol.* **41** (3), 170–177.
<https://doi.org/10.1002/ajh.2830410306>
 5. Peng, Z., Li X., Pivkin I.V., Dao M., Karniadakis G.E., Suresh S. 2013. Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (33), 13356–13361.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1311827110/-/DCSupplemental>
 6. Wiley J.S., McCulloch K.E. 1982. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmac. Therap.* **18** (2), 271–292.
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90070-5)
 7. Орлов С.Н. 2014. Котранспортеры катионов и хлора: регуляция, физиологическое значение и роль в патогенезе артериальной гипертензии. *Усп. биол. химии.* **54**, 267–298.
 8. Luneva O.G., Sidorenko S.V., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. 2015. Erythrocytes as regulators of blood vessel tone. *Biochem. (Moscow) Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* **9** (3), 161–171.
<https://doi.org/10.1134/S1990747815040078>
 9. Sidorenko S.V., Ziganshin R.H., Luneva O.G., Deev L.I., Alekseeva N.V., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. 2018. Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes. *J. Proteom.* **184**, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.008>
 10. Slatinskaya O.V., Luneva O.G., Deev L.I., Orlov S.N., Maksimov G.V. 2020. Conformational changes that occur in heme and globin upon temperature variations and normobaric hypoxia. *Biophys.* **65** (2), 213–221.
<https://doi.org/10.1134/S0006350920020220>
 11. Parshina E.Y., Yusipovich A.I., Brazhe A.R., Silicheva M.A., Maksimov G.V. 2019. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J. Biol. Phys.* **45** (4), 367–377.
<https://doi.org/10.1007/s10867-019-09533-5>
 12. Klimanova E.A., Sidorenko S.V., Tverskoi A.M., Shiyana A.A., Smolyaninova L.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Maksimov G.V., Lopina O.D., Orlov S.N. 2019. Search for intracellular sensors involved in the functioning of monovalent cations as secondary messengers. *Biochem. (Moscow).* **84** (11), 1280–1295.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110063>
 13. Maksimov G.V., Slatinskaya O.V., Tkhor E.S., Anisimov N.A., Mamaeva S.N., Shutova V.V. 2019. The role of erythrocyte receptors in regulation of the conformation and distribution of hemoglobin. *Biophys.* **64** (1), 57–61.
<https://doi.org/10.1134/S0006350919010123>
 14. De Rosa M.C., Alinovi C.C., Galtieri A., Russo A., Giardina B. 2008. Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: New insights in gas transport and metabolic modulation. *IUBMB life.* **60** (2), 87–93.
<https://doi.org/10.1002/iub.15>
 15. 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. 2018. Hemolysis and ATP release from human and rat erythrocytes under conditions of hypoxia: A comparative study. *Biochem. (Moscow), Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* **12** (2), 114–120.
<https://doi.org/10.1134/S1990747818020125>
 16. Mawatari S., Murakami K. 2004. Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **421** (1), 108–114.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.10.012>
 17. Kovalenko S.S., Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Maksimov G.V. 2015. Role of purinergic receptors of erythrocytes in the regulation of conformation and oxygen- and NO-transporting capacity of hemoglobin. *Bull. Exp. Biol. Med.* **159** (2), 213–216.
<https://doi.org/10.1007/s10517-015-2925-6>
 18. 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. 2013. Tuning SERS for living erythrocytes: Focus on nanoparticle size and plasmon resonance position. *J. Raman Spectrosc.* **44** (5), 686–694.
<https://doi.org/10.1002/jrs.4274>
 19. Cordero J.F., Romero P.J. 2002. Caffeine activates a mechanosensitive Ca^{2+} channel in human red cells. *Cell Calcium.* **31** (5), 189–200.
[https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(02\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(02)00032-5)
 20. Othmane A., Bitbol M., Snabre P., Mills P. 1990. Influence of altered phospholipid composition of the membrane outer layer on red blood cell aggregation: Relation to shape changes and glycocalyx structure. *Eur. Biophys. J.* **18** (2), 93–99.
<https://doi.org/10.1007/BF00183268>
 21. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. 2009. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biophys. J.* **97** (12), 3206–3214.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.029>
 22. Goheen S.C., Lis L.J., Kucuk O., Westerman M.P., Kauffman J.W. 1993. Compositional dependence of spectral features in the Raman spectra of erythrocyte membranes. *J. Raman Spectrosc.* **24** (5), 275–279.
<https://doi.org/10.1002/jrs.1250240503>
 23. Tiba M.H., Draucke, G.T., Barbee R.W., Terner J., Torres Filho I., Romfh P., Vakhshoori D., Ward K.R. 2014. Tissue oxygenation monitoring using resonance Raman spectroscopy during hemorrhage. *J. Trauma and Acute Care Surgery.* **76** (2), 402–408.
<https://doi.org/10.1097/TA.000000000000088>
 24. Wood B.R., Hammer L., McNaughton D. 2005. Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte. *Vibration. Spectrosc.* **38** (1–2), 71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.016>

25. Kutuzov N.P., Brazhe A.R., Maksimov G.V., Dracheva O.E., Lyaskovskiy V.L., Bulygin F.V., Rubin A.B. 2014. Orientational ordering of carotenoids in myelin membranes resolved by polarized Raman microscopy. *Biophys. J.* **107** (4), 891–900. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.002>
26. Maksimov G.V., Kutuzov N.P., Shutova V.V., Orlov S.N. 2019. Microdomain organization of internodal myelin. *Biochem. (Moscow), Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* **13** (3), 260–267. <https://doi.org/10.1134/S1990747819030164>
27. Hofmann U.G., Rotsch C., Parak W.J., Radmacher M. 1997. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J. Struct. Biol.* **119** (2), 84–91. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3868>
28. Bryzgalova N.Y., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B. 2009. Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen. *Biophys.* **54** (3), 308. <https://doi.org/10.1134/S0006350909030075>
29. 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. 2011. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: Impact of cell volume and refractive index. *J. Microscopy.* **244** (3), 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x>
30. Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. 2005. Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках. *Цитология*, **47** (4), 348–356.
31. Mazon P., Muller S., El Azouzi H. 1997. Deformation of erythrocytes under shear: A small-angle light scattering study. *Biorheol.* **34** (2), 99–110. <https://doi.org/10.3233/BIR-1997-34202>
32. Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. 2008. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bull. Experm. Biol. Med.* **145** (3), 382. <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0097-3>
33. Yusipovich A.I., Novikov S.M., Kazakova T.A., Erokhova L.A., Brazhe N.A., Lazarev G.L., Maksimov G.V. 2006. Peculiarities of studying an isolated neuron by the method of laser interference microscopy. *Quant. Electron.* **36** (9), 874. <https://doi.org/10.1134/S000368381203012X>
34. Kang L.L., Huang Y.X., Liu W.J., Zheng X.J., Wu Z.J., Luo M. 2008. Confocal Raman microscopy on single living young and old erythrocytes. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules.* **89** (11), 951–959. <https://doi.org/10.1002/bip.21042>
35. Tikhomirova I.A., Murav'ev A.V., Mikhailichenko L.A., Golubkova E.V. 2006. Correlation between electrophoretic mobility and extent of aggregation of human red blood cells. *Hum. Physiol.* **32** (6), 748–749. <https://doi.org/10.1134/S0362119706060223>
36. Huang Y.X., Wu Z.J., Mehrishi J., Huang B.T., Chen X.Y., Zheng X.J., Lui W.J., Luo M. 2011. Human red blood cell aging: Correlative changes in surface charge and cell properties. *J. Cell. Mol. Medicine.* **15** (12), 2634–2642. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01310.x>
37. Spiro T.G., Strekas T.C. 1972. Resonance Raman spectra of hemoglobin and cytochrome c: Inverse polarization and vibronic scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69** (9), 2622–2626. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2622>
38. Shaklai N., Sharma V.S., Ranney H.M. 1981. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78** (1), 65–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.65>
39. Demehin A.A., Abugo, O.O., Jayakumar R., Lakowicz J.R., Rifkind J.M. 2002. Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-labeled band 3: Analysis of centrifugation and fluorescence lifetime data. *Biochem.* **41** (27), 8630–8637. <https://doi.org/10.1021/bi012007e>

The Role of Extracellular Ca²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes

O. V. Slatinskaya¹, N. A. Brazhe¹, S. N. Orlov¹, and G. V. Maksimov^{1,2,*}

¹Lomonosov Moscow State University, Biological Department, Moscow, 119892 Russia

²National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, 119049 Russia

*e-mail: gmaksimov@mail.ru

It was found that a decrease in the concentration of extracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_{out}) leads to an increase in the surface charge of the membranes of human red blood cells (RBC), which is accompanied by a change in the conformation of heme and globin, as well as a decrease in the ordering of the cytoplasm and the content of membrane hemoglobin. It was found that in the range of [Ca²⁺]_{out} from 10⁻³ to 10⁻⁶ M, the morphology of RBC remains almost unchanged. With a decrease in [Ca²⁺]_{out} from 10⁻³ to 5 × 10⁻⁴ M ζ-potential increases from -15.4 ± 0.2 to -14.5 ± 0.3 mV and the value of the mean phase height (OPD) of the cell cytoplasm decreases. At [Ca²⁺]_{out} = 10⁻⁶ M, the maximum value of the Raman intensity of intracellular hemoglobin (Raman spectra bands of 1375 and 1580 cm⁻¹) is 2.6 times lower than that recorded at [Ca²⁺]_{out} = 10⁻³ M and is observed in the center of the cell. A decrease of [Ca²⁺]_{out} to 10⁻⁶ M leads to a change in the conformation of hemoglobin heme in RBC: a decrease in the symmetric vibrations of the side CH-groups of pyrrole rings and

an increase in the stretching vibrations of the vinyl groups of hemoporphyrin and the affinity of heme for ligands. At the same time, the probability of a flat conformation of heme does not change, but the rigidity of protein environment decreases. A decrease of $[Ca^{2+}]_{out}$ from 10^{-3} M to 10^{-6} M causes changes in the globin conformation: a decrease in the ordering of the CH-groups of globin amino acids, increase in the globin packing density, as well as the polarity of the globin environment is observed. On the basis of these observations we suggest that a decrease in $[Ca^{2+}]_{out}$ changes the conformation of the heme and the location of the amino acids dHb close to the heme (for example, lysine) and the localization of the protein band 3 anionic segment due to an increase in the membrane potential and surface charge that leaves the cationic central cavity of dHb. This process is accompanied by desorption of membrane-bound oxyHb and subsequent oligomerization of cytoplasmic oxyHb, which changes the oxygen transport properties of the erythrocyte.

Keyword: Raman spectroscopy, hemoglobin, conformation, erythrocyte, red blood cells, extracellular calcium