

БРИЛЛИАНТ СВЕТЛАНА АЛЕКСАНДРОВНА

**РОЛЬ НЕОДНОРОДНОСТИ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В АДАПТАЦИИ
ОРГАНИЗМА К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

Юшков Борис Германович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», г. Саранск

Власова Татьяна Ивановна

доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РБ, заведующая кафедрой нормальной физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г.Уфа

Каюмова Алия Фаритовна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 года в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620041, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Гемоглобин – самый распространенный среди современных животных дыхательный пигмент, который обладает уникальными свойствами, связанными с транспортом кислорода и углекислоты. Он является наиболее хорошо изученным белком с точки зрения структуры, функций и эволюционного происхождения (Блюменфельд Л.А., 1998; Wolk M., 2004; Кривенцев Ю.А. и др., 2018; Gell D.A., 2018; Bogdanova A.Yu. et al., 2020; Абрашева М.В. и др., 2021; Космачевская О.В. и др., 2021). До недавнего времени считалось, что у позвоночных гемоглобин содержится только в эритроидных клетках. Однако, накапливаются данные об экспрессии α - и β - глобинов в большом спектре неэритроидных клеток, включая мозг грызунов (нейроны коры головного мозга, гиппокампа и мозжечка, но не астроциты и олигодендроциты), нейроны эмбрионов и взрослых мышей и крыс (Ohyagi Y. et al., 1994; Biagioli M. et al., 2009; Schelshorn D.W. et al., 2009). Есть сведения о продукции гемоглобина помимо мозга в эндометрии эмбриона и взрослой мышце, макрофагах мышцы, хрусталике глаза, мезангиальных клетках крысы, альвеолярных эпителиальных клетках II типа, как крысы, так и человека, а также в клетках рака молочной железы и глиобластомы человека (Bhaskaran M. et al., 2005; Newton D. A. et al., 2006; Dassen H. et al., 2008; Gorr T.A. et al., 2011; Emara M. et al., 2014).

Многолетние исследования гемоглобина в различных лабораториях мира привели к значительному прогрессу в описании физических, химических и биологических его характеристик. На данный момент описаны первичные структуры более 700 вариантов гемоглобинов различных организмов. Показано, что в крови одного организма определяется несколько гемоглобинов, которые принято называть изоформами, иногда близких по свойствам, а иногда значительно отличающиеся друг от друга (Кривенцев Ю.А. и др., 2018; Топунов А.Ф. и др., 2018). Установлено, что у взрослого человека в крови циркулирует пять изоформ гемоглобина, у рыб – от трех до пяти, у птиц - от двух до трех, у лягушек, собак, лошадей, кошек – две, у крыс – шесть, а, по некоторым данным, девять изоформ (Сумин М. Н., 2002; Lisitsa et al., 2014; Storz J. F., 2016). Обнаружено, что все разнообразие гемоглобинов можно разделить на две большие группы: первая группа – гемоглобины, присутствующие в крови постоянно, и вторая – возникающие в крови лишь на определенных этапах развития организма или при патологии.

Многообразие видов гемоглобина ставит ряд вопросов:

1. Каково содержание и спектр гемоглобинов в одном эритроците?

Установлено, что один эритроцит может содержать несколько типов гемоглобина. Так, в клетках с фетальным гемоглобином имеется определенное количество гемоглобина А (Сумин М.Н., 2003; Кривенцев Ю.А., 2018).

2. Каково происхождение различных форм гемоглобина, возникают ли они в процессе эритропоэза и отражают разные популяции эритроцитов или образуются в процессе старения клеток, а также при действии экстремальных факторов в результате полимеризации и деградации белка?

Есть сведения, что полимеризованные гемоглобины улучшают показатели гемодинамики по сравнению с исходной молекулой 64 кДа. Внеклеточный полимерный дигемоглобин человека равный 130 кДа наименее токсичен для почек и обладает меньшей вазоактивностью по сравнению с гемоглобином 64 кДа (Budhiraja V. et al., 2002). На кинетику полимеризации HbS влияют HbA₂ и HbF (Alkindi S. et al., 2023). Известно, что у людей сохранение экспрессии HbF плода во взрослом возрасте улучшает патологические эффекты серповидноклеточной анемии.

3. Меняется ли соотношение между гемоглобинами при кратковременном действии экстремального фактора и на начальных стадиях адаптации организма к нему?

4. Не исследован вопрос и о структурных характеристиках гемоглобина разных популяций эритроцитов.

5. Каково взаимное влияние различных изоформ гемоглобина, находящихся в одном эритроците, друг на друга?

Обнаружено, что при серповидноклеточной анемии, когда идет замена в 6-положении β- полипептидной цепи глутаминовой кислоты на валин, происходит изменение всей структуры белка и, соответственно, меняются его функции. Следовательно, в условиях гипоксии аномальный гемоглобин HbS, с изменёнными физико-химическими свойствами $\text{S}\alpha_2\beta_2$ ^{6 глут←вал}, выпадая в осадок, приводит к изменению формы красных клеток крови (Шапченко А.В. и др., 2013; Легкоева М.В. и др., 2022).

6. Каково физиологическое значение в изменении соотношения между разными изоформами гемоглобина при адаптации к действию экстремальных факторов?

Физиологический смысл изменения соотношения между изоформами гемоглобина птиц заключается в их возможности адаптироваться к резким перепадам кислородного режима во время полета. Так, у птиц высокогорья (беркутов) гипоксия преодолевается благодаря уникальным взаимодействиям в межсубъединичных контактах гемоглобина. Отмечено, что HbA беркута был адаптирован к гипоксии (Abid R. et al., 2014).

7. Есть ли связь между изменениями соотношения между различными изоформ гемоглобина и природой экстремального фактора?

8. Имеется ли связь между изменениями содержания и спектра гемоглобинов с физическими характеристиками клеток?

В целом, не смотря на колоссальный объем информации о разнообразии гемоглобинов и их физико-химических свойствах, до сих пор остаются нерешенными вопросы, которые требуют дополнительных исследований.

Цель исследования - оценить роль неоднородности изоформ гемоглобина крыс в адаптации организма к экстремальным воздействиям.

Задачи исследования:

1. Выявить различия изоформ гемоглобина периферической крови и костного мозга по их соотношению и молекулярной массе в физиологических условиях и при экстремальных воздействиях на организм.
2. Охарактеризовать распределение (количественное и процентное) изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов в физиологических условиях и при действии экстремальных факторов.
3. Выявить отличия фракций эритроцитов в зависимости от содержания изоформ гемоглобина, ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные изоформы гемоглобина при действии на организм экстремальных факторов.
4. Оценить изменения структурных характеристик смесей изоформ гемоглобина в эритроцитах при действии экстремальных факторов (метод Рамановской спектроскопии).
5. Проанализировать изменения изоформ гемоглобина и фракций эритроцитов при экстремальных воздействиях, сопоставив данные с состоянием гемопоэза.

Научная новизна исследования. В рамках данного исследования впервые показано, что неоднородность изоформ гемоглобина костного мозга и периферической крови является важным компонентом адаптивных реакций организма. Выделены наиболее значимые для адаптации изоформы гемоглобина костного мозга и цельной крови, а также изучены их свойства.

Впервые выявлено наличие 6 фракций эритроцитов у крыс, различающихся по соотношению между изоформами гемоглобина и по молекулярному весу (в физиологических условиях и при действии на организм экстремальных факторов).

Впервые обнаружено, что в пяти из шести фракций эритроцитов содержатся нормальные типы гемоглобинов с молекулярной массой 64-68 кДа, которые составляют 65% от всех гемоглобинов, 24% приходится на лёгкие (менее 64 кДа) и 11% - на тяжёлые (более 68 кДа) изоформы гемоглобина (в физиологических условиях и при действии экстремальных факторов).

Проведен сравнительный анализ структурных характеристик изоформ гемоглобина периферической крови. Показано, что изоформы гемоглобина отличаются по характеристикам как гема, так и глобина, что в итоге отражается на их лиганд связывающей способности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования носят фундаментальный характер и расширяют представления о различиях изоформ гемоглобина и фракций эритроцитов. Практическая значимость работы обусловлена

новыми данными об изменении и отличии структурных характеристик, электрофоретической подвижности и молекулярного веса изоформ гемоглобина. Неоднородность изоформ гемоглобина обуславливает и гетерогенность фракций эритроцитов. Полученные данные могут быть использованы в образовательном процессе для подготовки специалистов медико-биологического профиля.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эритроциты периферической крови постоянно изменяют свои размеры в процессе циркуляции в зависимости от условий, в которых находятся.
2. Эритроциты периферической крови и эритроидные клетки костного мозга крыс в физиологических условиях и при действии на организм экстремальных факторов содержат 6 изоформ гемоглобина, отличающихся по молекулярной массе: основные изоформы - 64 кДа и 68 кДа, тяжёлые - свыше 70 кДа и лёгкие - менее 60 кДа.
3. 6 изоформ гемоглобина неравномерно распределены в эритроцитах; в одном эритроците содержится только 2 изоформы гемоглобина; смеси гемоглобинов разных фракций эритроцитов отличаются по характеристикам гема, глобина и лиганд связывающей способности.
4. По соотношению изоформ гемоглобина можно выделить 6 фракций эритроцитов; при адаптации организма к действию экстремальных факторов соотношение между изоформами в цельной крови меняется в зависимости от природы экстремального воздействия и отражает изменение фракций эритроцитов.
5. Адаптация к экстремальным воздействиям на ранних этапах определяется гетерогенностью изоформ гемоглобинов, а на поздних – перестройкой гемопоэза.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы используются в научных разработках лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), а также в составе курсов «Патологическая физиология», «Физиология» в Департаменте биологии и фундаментальной медицины Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина».

Достоверность полученных результатов. Автором проведен анализ большого количества данных современной литературы по исследуемой теме и сделаны на основании этого главные теоретические заключения. Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объёмом выборки, использованием современных высокоинформативных методов исследования (метод электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (RAMAN-

спектроскопии), метод фракционного центрифугирования эритроцитов, метод малоуглового светорассеяния частиц, метод кислотной элюции (Kleihauer-Betke test) и др.) и современного оборудования, а также использованием адекватных методов статистической обработки полученных результатов. Полученные в результате экспериментов данные не противоречат сведениям других авторов. Научные положения и выводы, сформулированные в работе, соответствуют заявленной в работе цели и задачам.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования. Автором самостоятельно проведены эксперименты, осуществлен поиск и анализ литературы по теме исследования, выполнена обработка результатов исследования с помощью статистических методов, написание и оформление рукописи диссертации и автореферата. Формулировка цели, задач, положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций осуществлялась совместно с научным руководителем. Полученные результаты представлены в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях совместно с соавторами.

Апробация работы. Работа апробирована на конференциях различного уровня: на конференции с международным участием «Современные аспекты физиологии и медицины», посвящённой 90-летию ИГМА (г. Ижевск, 2023), на конференции с международным участием «Медицинская физика, физиология и смежные дисциплины в академической науке», посвящённой 100-летию МГМСУ им. А.И. Евдокимова (г. Москва, 2022), на XV Всероссийской конференции патофизиологов Урала (г. Екатеринбург, 2022), на VI Междисциплинарной конференции с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций, посвященная 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова (г. Москва, 2022), на XIX Симпозиуме с международным участием «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (г. Казань, 2022 г.), на X Региональной научно-практической конференции «Клеточные технологии — практическому здравоохранению» (г. Екатеринбург, 2021), на XXIII Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (г. Москва, 2021), на XXVIII Международной конференции и дискуссионном научном клубе «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Крым, Ялта-Гурзуф, 2021), на IX Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению» (г. Екатеринбург, 2020), на XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз–Россия 2019» (г. Пермь, 2019), на VII Международной научно-практической конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (г. Челябинск, 2018), на X Всероссийском Конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-2017» (г. Казань, 2017), на VI Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии –

практическому здравоохранению 2017» (г. Екатеринбург, 2017), на Всероссийской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина», посвящённой памяти В.С. Мархасина (г. Екатеринбург, 2016), на XXI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2015) и других.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 37 печатных работ, из них 12 в изданиях, рекомендованных ВАК, и/или индексируемых в международных электронных базах данных WoS (Q1-Q4) и Scopus, а также 25 докладов, представленных на российских и международных конференциях.

Конкурсная поддержка. Научно-исследовательская работа выполнена в рамках бюджетной темы №1 «Иммунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма», № государственной регистрации 122020900136-4.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей методические вопросы исследования, 4 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, списков сокращений и литературы, включающего 203 источника, из них 75 - отечественных и 128 - иностранных. Работа содержит 49 таблиц и 8 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методические вопросы исследования. В качестве экспериментальных животных использовались 103 белые половозрелые крысы-самцы (3-3,5 месяца) линии Wistar массой 180-225 грамм. Все эксперименты с животными проводили согласно этическим принципам и нормативным документам Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС. На проведение данного научного исследования было получено разрешение Этического комитета ИИФ УрО РАН (протокол № 01/20 от 8.04.2020 г.).

Роль неоднородности изоформ гемоглобина крыс исследовали на экспериментальных моделях: острой массивной кровопотери (из расчета 2,5% от массы тела животного (Юшков Б.Г. и др., 1999)), острого асептического воспаления (однократное введение 0,5 мл скипидара под кожу спины крысам (Sandakov D., 2003)), и иммобилизационного стресса (однократное привязывание животных к предметному столику за лапки в положении лежа на спине, с удержанием их на протяжении 6 часов (Selye H., 1936)).

Выведение животных из эксперимента осуществляли на ранние сроки (6 ч и 2 сут) путем подачи крысам ксилозолетилового наркоза.

Исследовали диаметры красных клеток крови при добавлении адреналина, инсулина и ацетилхолина (в условиях *in vitro*) с помощью лазерного анализатора микрочастиц «Ласка 1К» (Mindukshev I.V. et al., 2006).

Оценивали качественные и количественные характеристики клеток крови с помощью гематологического анализатора Celly 70 фирмы Biocode-Nucel (Франция), в мазках определяли эритроциты, содержащие фетальные формы гемоглобина (F-клетки) с помощью метода кислотной элюции (Kleihauer- Betke test) и ретикулоциты после окраски бриллиантовым крезильным синим. Подсчет ретикулоцитов и F-клеток (*рисунок 1*) проводили на 1000 эритроцитов, выражая в относительных и абсолютных величинах (% и г/л).

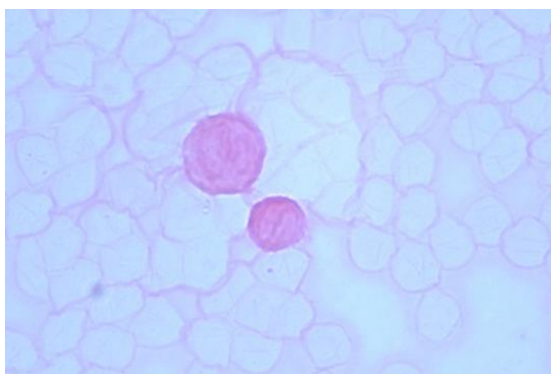


Рисунок 1 - Эритроциты, несущие кислотоустойчивые (фетальные) изоформы гемоглобина

Примечание: Окраска по- Betke-Kleihauer, увеличение x 1000.

В мазках костного мозга (окраска по Романовскому-Гимза) подсчитывали ядродержащие клетки бедренной кости и миелограмму, результат выражали в млн/100 г массы тела животного.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) 10%-ной концентрации (по Г. Мауреру), при помощи оборудования фирмы Bio-Rad (США), определяли электрофоретическую подвижность железосодержащих белков. Сначала образцы геля вносили в лунки ($V = 200$ мкл в каждую). В первую лунку вносили белковый стандарт Precision Plus Protein Standards Dual Color фирмы Bio-Rad (США). Диапазон молекулярных масс составлял от 10 до 250 кДа. С 2-й по 10-ю лунки геля вносили образцы гемолизата периферической крови и костного мозга, далее проводили разгонку белков. Для лучшей диагностики проводили окрашивание полос бензидиновым раствором. Сканировали электрофореграмму и обрабатывали с помощью программы Image Lab 6.0.1. фирмы Bio-Rad (США), определяя соотношение отдельных изоформ гемоглобина (в % и г/л) и их молекулярную массу (в кДа).

Проводили исследование структурных характеристик изоформ гемоглобина методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (или RAMAN- спектроскопии). Для записи КР- спектров использовали конфокальный рамановский микроскоп Renishaw inVia Qontor (Великобритания), оборудованный двумя полупроводниковыми твердотельными лазерами с длинами волн 532 нм, 785 нм и ICDD- детектором. Порошкообразные образцы

гемоглобина размещали горизонтально на препаративном стекле. Для каждого образца осуществляли 4 независимых измерения в разных точках. Далее анализировали частоты колебаний и отношения интенсивностей линий (I) в КР- спектрах, оценивали различия в геме и глобине, а также лиганд связывающую способность пигмента.

Оценивали качественные характеристики изоформ гемоглобина крыс в цельной крови до и после их разделения на 6 фракций эритроцитов (*рисунок 2*), применив метод фракционного центрифугирования (Юшков Б.Г., Бриллиант С.А., 2020).

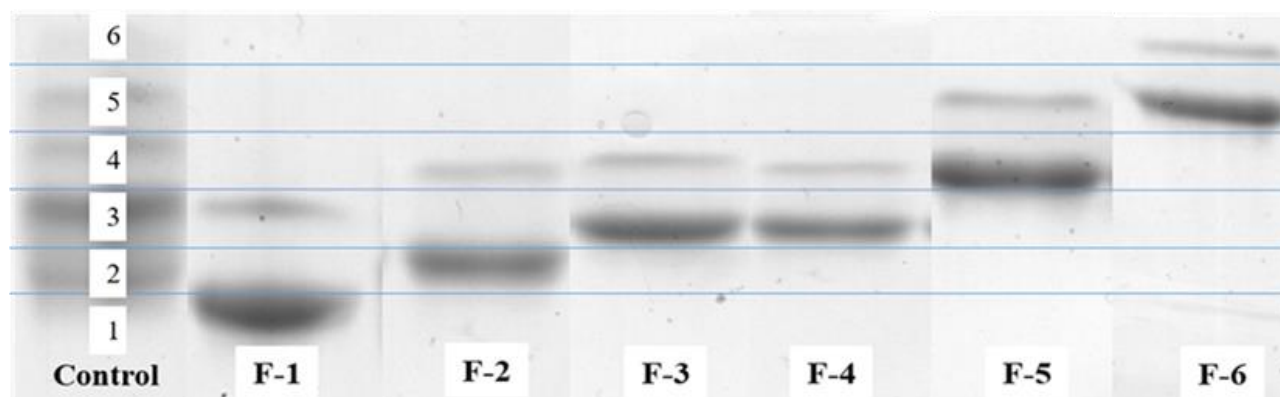


Рисунок – 2 Разгонка белковых фракций гемоглобина в норме и после фракционного центрифугирования

Примечание: F1-F6 - фракции эритроцитов, с 1 по 6 – полосы гемоглобина без центрифугирования.

Достоверность отличий в сравниваемых выборках проводили с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Статистическую обработку осуществляли с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0). Полученные данные представляли в виде среднего значения (M) ± ошибки среднего (m). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Неоднородность изоформ гемоглобина у интактных животных

Связь размеров эритроцитов с состоянием гемоглобина. В физиологических условиях анализ размеров эритроцитов крыс колебался в пределах 5,72-7,03 мкм и зависел от насыщения гемоглобина кислородом, так как в артериальной крови показатель приближался к нижней границе, а в венозной крови - к верхней границе физиологического диапазона (*рисунок 3*).

Поскольку на мембране эритроцитов располагаются рецепторы к инсулину, эндотелину, церулоплазмину, α_2 -макроглобулину, α - и β - адренорецепторам, следовательно, и изменение размеров клеток пытаются объяснить гормональными влияниями. В частности, есть предположение, что увеличение диаметра красных клеток при инкубации с адреналином может быть обусловлено тем, что адреналин,

взаимодействуя с β -адренорецепторами на мембране, способен изменять её проницаемость, в первую очередь, для ионов Na^+ . Тем самым, ионы Na^+ , накапливаются в клетке, вызывая её увеличение (Rodrigo, R., 2007; Radosinska, J., 2021).

Однако, нет данных о колебаниях уровня гормонов в артериальной и венозной крови. В то же время адреналин (эпинефрин) как гормон аминокислотной группы свободно проникает через клеточную мембрану и способен оказывать прямое действие на гемоглобин, увеличивая диаметры красных клеток. Инсулин (белковый гормон, не проникающий в клетку) и ацетилхолин (медиатор), которые действуют через мембранные рецепторы, и для которых прямое действие на гемоглобин не показано, такого эффекта не вызывали. Эффект адреналина можно объяснить с его влиянием на кислород связывающую способность пигмента (рисунок 3).

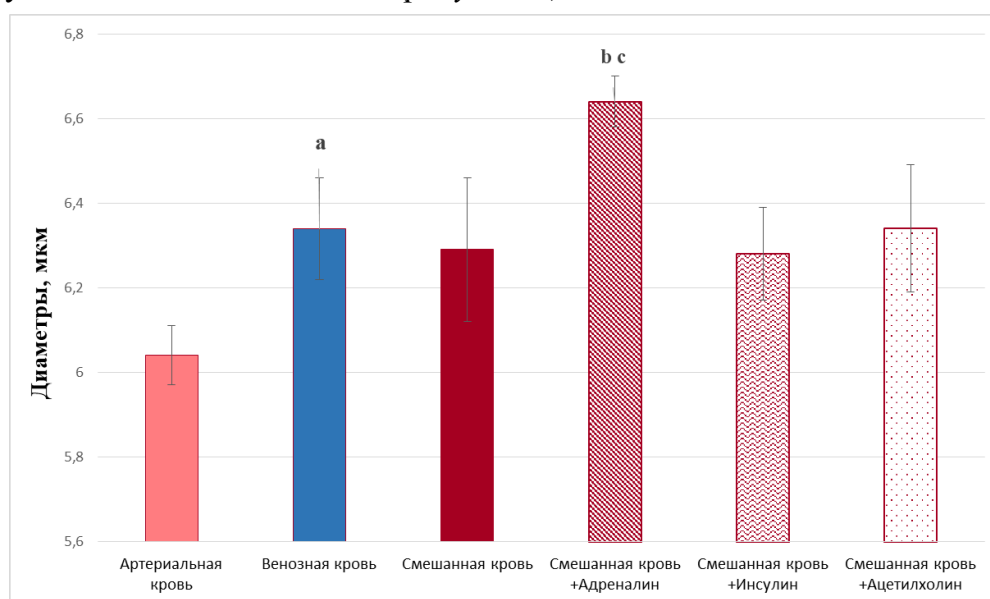


Рисунок 3 - Различия между средними диаметрами эритроцитов артериальной, венозной и смешанной крови у интактных крыс

Примечание: **a** – статистически значимые различия диаметров эритроцитов интактных крыс венозной крови и артериальной ($p < 0,05$), **b** - статистически значимые различия диаметров эритроцитов артериальной крови при добавлении гормонов (адреналина, инсулина, ацетилхолина) ($p < 0,05$), **c** - статистически значимые различия диаметров эритроцитов венозной крови при добавлении гормонов (адреналина, инсулина, ацетилхолина) ($p < 0,05$).

Таким образом, степень насыщения гемоглобина кислородом способна оказывать влияние на размеры клеток. В результате этого объем эритроцитов с гемоглобином в дезокси- форме приближается к верхней границе физиологического диапазона, а в окси – к нижней границе. Эта идея находит подтверждение и в наблюдениях других авторов и на других животных. Так, Кухарева Т.А. показала на некоторых видах черноморских донных рыбах, что снижение содержания кислорода в воде до уровня 15% приводит к увеличению объема эритроцитов до $270,4 \pm 1,7$ мкм³, что на 4,1% ($p < 0,01$) выше контрольных значений

(259,7±1,73 мкм³), а при 30% насыщении воды кислородом, напротив, сопровождается уменьшением клеток в объеме на 4% (p<0,01) (249,1±1,5 мкм³) (Кухарева Т.А., 2019)

Изоформы гемоглобина в цельной крови и в костном мозге. При разделении гемоглобина периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) крыс методом электрофореза в ПААГ были выделены 6 изоформ гемоглобина, различающихся по молекулярной массе, а также по относительным (%) и абсолютным единицам (г/л) в общем количестве гемоглобинов (*таблица 1*).

Наиболее часто указывают в литературе, что молекулярная масса неразделенного гемоглобина равна 64,5 – 68 кДа, а одной цепочки глобина - 16-17 кДа. Из 6 выделенных изоформ в этот диапазон укладывались две - 3 и 4 изоформы, которые нами рассматривались как основные, поскольку в сумме они составляли 64,49% - в периферической крови и 63,82% - в костном мозге. В то время, как молекулярные массы 2 изоформы – больше (72-76 кДа), а 5 изоформы меньше (56-60 кДа), то они отличались от основных на половину массы одной цепочки глобина (8-8,5 кДа), а 1 и 6 изоформ на три четверти - 12 кДа (76-80 кДа и 52-56 кДа, соответственно) (*таблица 1*). В костном мозге распределения изоформ по количеству и молекулярной массе были аналогичны периферической крови (*таблица 1*).

Таблица 1 - Соотношение изоформ гемоглобина в периферической крови и в костном мозге интактных крыс, M±m

Показатели n=8	Изоформа 1	Изоформа 2	Изоформа 3	Изоформа 4	Изоформа 5	Изоформа 6	Среднее по всем
Периферическая кровь							
Молекулярная масса, кДа	86,86±0,54 a b	81,67±0,98 a b	70,71±0,32	63,00±1,43	56,90±1,22 a	52,27±1,33 a b	68,56833±5 ,60
Диапазон (min-max)	83,5-89,8	76,9-89,6	68,6-72,5	52,2-70,6	47,5-63,3	42,1-59,4	42,1-89,8
%	10,93±0,9	13,09±1,1	43,97±0,8	20,52±0,5	8,64±1,30	2,85±0,57	100
г/л	14,8±1,2	17,7±1,5	59,6±1,1	27,85±0,6	11,75±1,7	3,9±0,8	135,6±1,9
Костный мозг							
Молекулярная масса, кДа	87,02±0,63 a b	81,69±0,85 a b	69,58±0,21	63,95±1,46	56,89±1,09 a b	52,36±1,25 a b	68,58167±2 ,17
Диапазон (min-max)	83,2-89,3	75,8-87,4	68,3-71,8	53,1-69,8	47,4-63,3	42,2-59,5	42,2-89,3
%	10,41±0,2	12,58±0,2	44,87±0,5	18,95±0,3	9,06±0,58	4,13±0,2	100
г/л	0,8±0,01	1,0±0,01	3,6±0,12	1,55±0,1	0,72±0,1	0,33±0,01	8,0±0,61

Примечание: **a** – статистически значимые различия фракций гемоглобина от 3 изоформы (p<0,05); **b** - статистически значимые различия фракций гемоглобина от 4 изоформы (p<0,05).

Таким образом, соотношение между различными изоформами гемоглобина в крови интактных животных определяется, скорее всего, не воздействием на циркулирующий в крови гемоглобин, а обеспечивается состоянием эритропоэза (*таблица 1*).

При фракционном центрифугировании в цельной крови крыс нами было выделено 6 фракций эритроцитов, которые различались по своим морфологическим показателям, по содержанию ретикулоцитов и F-клеток. Однако каждая из фракций была достаточно однородна по составу клеток, о чём свидетельствовал показатель анизоцитоза (RDW) (таблица 2).

Содержание ретикулоцитов и F-клеток в различных фракциях эритроцитов интактных крыс распределялись неравномерно. Во F2 фракции ретикулоцитов содержалось больше, а в F5 и F6 фракциях меньше по сравнению с клетками без разделения. Количество F-клеток было больше в F3, но меньше в F5 и F6 фракциях эритроцитов. Диаметр F-клеток был меньше в F5, F6 фракциях эритроцитов (таблица 2).

Таблица 2 - Морфологические характеристики различных фракций эритроцитов интактных крыс, $M \pm m$

Фракции эритроцитов	D_{RBC} , мкм	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	ЦП	RDW, %	Rt, %	HbF, %	D_{Rt} , мкм	D_{HbF} , мкм
Без разделения на фракции	7,02± 0,05	55,63± 0,11	18,39± 0,66	35,4± 1,1	0,54±0, 09	13,96± 0,43	1,23± 0,06	1,32± 0,09	9,72± 0,06	10,98 ±0,14
F1	7,96± 0,03 a	54,95± 0,17	19,26± 0,11	35,05± 0,26	0,57± 0,13	14,68± 0,15	4,4± 0,9	2,27± 0,06	9,79± 0,19	11,38 a ±0,15
F2	7,61± 0,18	54,09± 0,08 a	18,81± 0,14	34,50± 0,44	0,56± 0,11	14,51± 0,24	2,98± 0,22 a	2,47± 0,01	9,81± 0,14	11,33 a ±0,17
F3	7,25± 0,21	53,60± 0,10 a	18,32± 0,08	34,19± 0,22	0,50± 0,15	14,85± 0,17	1,32± 0,05	2,67± 0,11 a	9,63± 0,16	11,09 ±0,14
F4	6,54± 0,09 a	53,31± 0,08 a	18,52± 0,13	35,70± 0,16	0,60± 0,21	13,91± 0,21	1,14± 0,40	2,62± 0,09	9,58± 0,11	10,58 ±0,28
F5	6,33± 0,07 a	49,61± 1,20 a	19,07± 0,16	37,27± 0,47	0,86± 0,18	13,98± 0,25	0,67± 0,1 a	0,70± 0,06 a	9,50± 0,19	9,72± 0,16 a
F6	6,27± 0,02 a	52,42± 0,19 a	17,78± 0,11	34,13± 0,42	0,55± 0,15	14,91± 0,21	0,01±0, 01 a	0,02± 0,001 a	8,98± 0,27	9,62± 0,18 a

Примечание: D_{RBC} – диаметр эритроцита; MCV – средний объём эритроцита; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; ЦП – цветовой показатель; RDW – распределение эритроцитов по размерам; Rt – ретикулоциты; HbF – красные клетки, содержащие фетальные формы гемоглобина; D_{Rt} – диаметр ретикулоцита; D_{HbF} – диаметр клетки, несущей фетальный гемоглобин; **a** – статистически значимые различия нефракционированных клеток от фракционированных у интактной группы животных ($p < 0,05$); F1- F6 – фракции эритроцитов.

В цельной крови наибольшая доля (65%) приходилась на основные изоформы гемоглобина с молекулярной массой 60-70 кДа, 11% составляли тяжелые (более 70 кДа), 24% – лёгкие (менее 60 кДа) изоформы (таблица 3). Можно предположить, что наличие тяжёлых изоформ было обусловлено полимеризацией, а лёгких – деградацией белка.

Различные фракции эритроцитов, разделенные методом фракционного центрифугирования, содержали лишь по 2 из 6 изоформы в одной клетке – одну наиболее

лёгкую и одну наиболее тяжёлую: 1-я фракция эритроцитов - содержала тяжёлую форму и нормальные варианты гемоглобина ($84,84 \pm 1,50$ кДа - $74,51 \pm 0,84$ кДа), 2 -я - тяжёлую и нормальные изоформы ($83,32 \pm 1,0$ кДа - $66,68 \pm 0,83$ кДа), 3-я и 4-я – нормальные изоформы в различных сочетаниях ($71,89 \pm 0,57$ кДа - $64,04 \pm 1,08$ кДа и $73,46 \pm 1,04$ кДа - $64,55 \pm 0,46$ кДа), 5-я - нормальные варианты гемоглобинов и лёгкую форму ($61,70 \pm 0,52$ кДа - $55,3 \pm 0,80$ кДа) и 6-я - лёгкие изоформы ($59,09 \pm 0,75$ кДа - $50,76 \pm 0,82$ кДа) (таблица 3).

Таким образом, гемоглобины диапазона 64-68 кДа были обнаружены в F1, F2, F3, F4 и F5 фракциях эритроцитов, что являлось ещё одним аргументом (помимо наибольшего их суммарного процента в крови) в пользу того, чтобы их можно рассматривать в качестве основных. Кроме того, различия в соотношении F3 и F4 фракциях эритроцитов никак не сказывалось на их физических и функциональных характеристиках (таблица 3).

Таблица 3 - Характеристика различных изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов по молекулярной массе, $M \pm m$

Фракции эритроцитов	Изоформы гемоглобина, кДа						Соотношение вариантов гемоглобинов, %	Варианты гемоглобинов
	IF1	IF2	IF3	IF4	IF5	IF6		
Цельная кровь	$86,86 \pm 0,54$	$81,67 \pm 0,97$	$70,71 \pm 0,31$	$63,0 \pm 1,43$	$56,9 \pm 1,21$	$52,27 \pm 1,33$	100	-
F1	$84,84 \pm 1,50$ b c	-	$74,51 \pm 0,84$ a b c	-	-	-	$46,0 \pm 0,96$ / $54,00,96$	T + H_T
F2	-	$83,32 \pm 1,00$ b c	-	$66,68 \pm 0,83$ a b	-	-	$40,0 \pm 0,45$ / $60,0 \pm 0,45$	T + H_T
F3	-	-	$71,89 \pm 0,57$	$64,04 \pm 1,08$ b	-	-	$66,7 \pm 0,76$ / $33,3 \pm 0,76$	H_T + H_L
F4	-	-	$73,46 \pm 1,04$ a	$64,55 \pm 0,46$ b	-	-	$56,5 \pm 0,88$ / $43,5 \pm 0,88$	H_T + H_L
F5	-	-	-	$61,70 \pm 0,52$ b c	$55,30 \pm 0,80$ b c	-	$62,9 \pm 1,56$ / $37,1 \pm 1,56$	H_L + L
F6	-	-	-	-	$59,09 \pm 0,75$ b c	$50,76 \pm 0,82$ b c	$67,5 \pm 1,4$ / $32,5 \pm 1,4$	L + L

Примечание: **a** – статистически значимые различия фракций эритроцитов до и после фракционирования ($p < 0,05$); **b** – статистически значимые различия фракций эритроцитов от F3 ($p < 0,05$); **c** – статистически значимые различия фракций эритроцитов от F4 ($p < 0,05$). Сокращения: **T+H_T** – тяжёлая изоформа+нормальные варианты гемоглобина, **H_T+H_L** – нормальные (основные) варианты гемоглобина; **H_L+L** – нормальные варианты гемоглобина+лёгкая форма, **L+L** – лёгкие варианты гемоглобина. **F1- F6** – фракции эритроцитов, **IF1-IF6** – изоформы гемоглобина.

Характеристика изоформ гемоглобина с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (или Рамановской спектроскопии).

При исследовании методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (RAMAN-спектроскопии) смесей гемоглобинов, было установлено, что изоформы гемоглобина отличаются своими структурными характеристиками: жёсткостью белкового окружения гема, его «скрученной» конформацией, маркером спинового состояния,

плотностью упаковки, колебаниями метиновых радикалов, относительной способностью дезоксигемоглобина связывать O_2 и другими (рисунк 4).

Таким образом, наблюдаемые отличия в структурных характеристиках изоформ гемоглобина отражались и на лиганд связывающей способности. Типы основных гемоглобинов - 3 и 4, полученных из F3, F4 фракций эритроцитов, не отличались своими структурными характеристиками. Смеси гемоглобинов (Т+Н_Т, Н_Л+Л, Л+Л) различались своими структурами белка, а также обладали наименьшей лиганд связывающей способностью по сравнению с основными вариантами гемоглобинов (Н_Т+Н_Л) (рисунк 4).

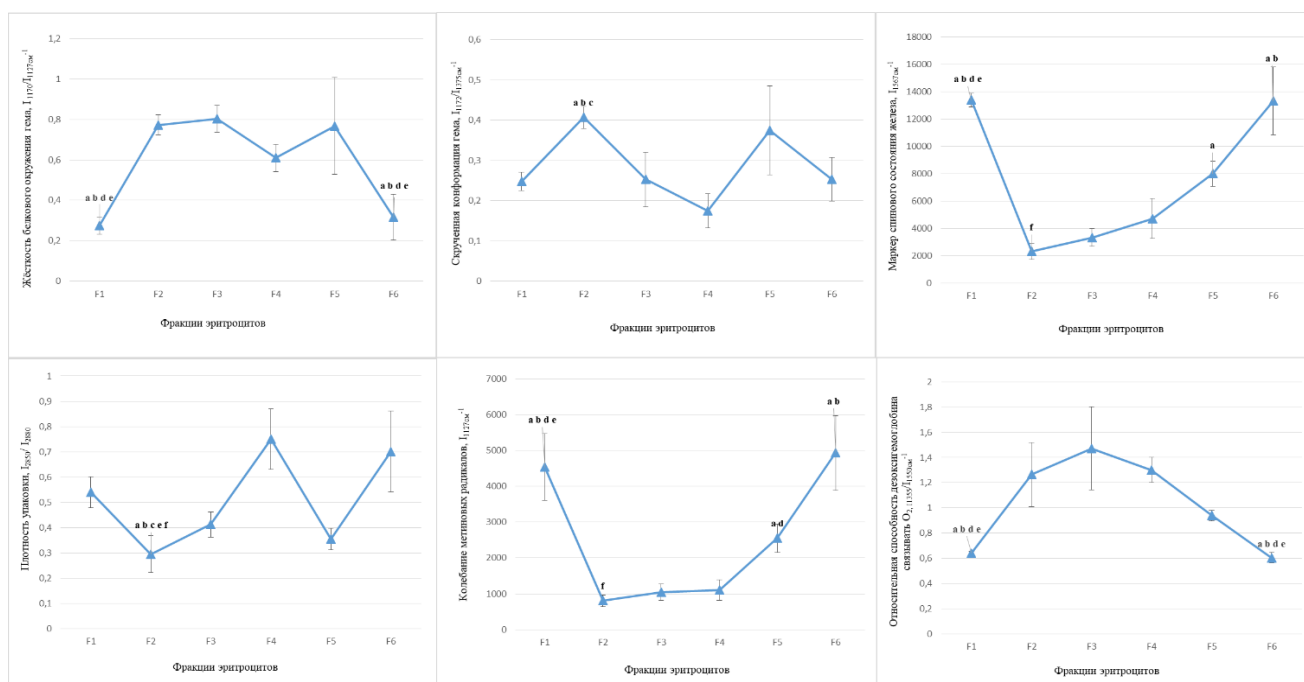


Рисунок 4 - Общие характеристики гема и глобина крыс фракционированных эритроцитов

Примечание: статистически значимые различия фракций эритроцитов, ($p < 0,05$): **a** – от F3; **b** – от F4; **c** – от F1; **d** – от F2; **e** – от F5; **f** – от F6. Сокращения: F1-F6 - фракции эритроцитов.

Неоднородность изоформ гемоглобина при действии на организм экстремальных факторов

Неоднородность гемоглобинового спектра отражалась и в реакциях на воздействия.

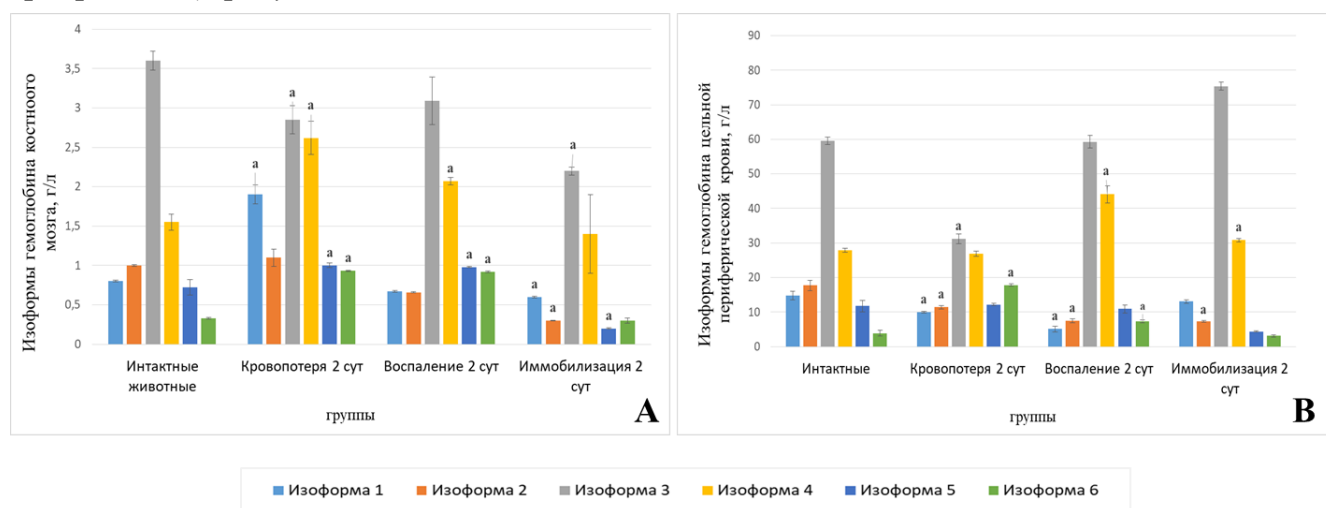
При экстремальных воздействиях (кровопотеря, воспаление, стресс) нами было показано, что изоформы гемоглобина различаются своими морфологическими показателями, соотношением между изоформами гемоглобинов (периферической крови и костного мозга), а также молекулярным весом.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле по Г. Мауреру в периферической крови и в костном мозге у крыс с острой массивной кровопотерей (ОМК), с острым асептическим воспалением (ОАВ) и с иммобилизационным стрессом (ИС) выявлялись 6 изоформ гемоглобина у крыс (рисунк 5).

После ОМК на 2 сутки в костном мозге повышались - 4, 5, 6 изоформы и снижалась - 3 изоформа. Помимо этого, в костном мозге наблюдалось повышение 1 изоформы. В периферической крови отмечалось снижение - 1, 2, 3 изоформ и повышение - 6 (рисунк 5). Известно, что 5 и 6 изоформы гемоглобина являются физиологическим эквивалентом фетального гемоглобина крыс, и их увеличение на эритрофореграмме и в наших экспериментах совпадало с повышением общего содержания F-клеток в крови.

При ОАВ содержание гемоглобина в костном мозге - 4, 5, 6 изоформ гемоглобинов (4-я, 5-я и 6-я фракции) повышалось на 2-е сутки (рисунк 5). Концентрация 4-ой и 6-ой изоформ повышалась и в периферической крови. Концентрации тяжелых изоформ (1-я и 2-я фракции) в костном мозге снижались на 6 часов, что приводило к уменьшению показателя в периферической крови на 2-е сутки (рисунк 5).

При стрессе (6 часов) в костном мозге отмечалось снижение - 1, 2 изоформ. В периферической крови наблюдалось снижение - 1, 2 и увеличение - 3, 6 изоформ гемоглобина. На 2 сутки после ИС в костном мозге и в периферической крови уменьшалась 2 изоформа гемоглобина, что указывает на снижение образования клеток их содержащих. Уменьшение концентрации в костном мозге - 1, 3 изоформ с одновременным возрастанием их в периферической крови, что было связано с выходом данных клеток в циркуляцию. Понижалась 5-я изоформа в костном мозге. В периферической крови после стрессорного воздействия на 2 сутки возрастала 4 изоформа гемоглобина (основная 4-я фракция эритроцитов) (рисунк 5).



Рисунк 5 - Соотношение изоформ гемоглобина в костном мозге и в цельной периферической крови крыс при воздействии на организм экстремальных факторов

Примечание: а – статистически значимые различия от группы интактных животных ($p < 0,05$).

Таким образом, перестройка эритроидного роста при экстремальных воздействиях сопровождалась изменениями в соотношении между изоформами гемоглобина в костном

мозге и в периферической крови. Сдвиги в соотношении между изоформами гемоглобина свидетельствовали об изменениях в соотношении между фракциями эритроцитов.

В ходе наших исследований было выявлено, что усредненный показатель молекулярной массы крыс с кровопотерей (2 сут) составлял $69,34 \pm 0,3$ кДа, у животных с воспалением (2 сут) - $68,90 \pm 1,61$ кДа (у интактных животных - $68,57 \pm 5,61$ кДа).

Так, молекулярная масса каждой отдельной изоформы при кровопотере не изменялась в 5 фракциях эритроцитов, за исключением 4-й, которая несколько увеличивалась при сравнении с интактной группой животных (рисунк 6). При воспалении молекулярный вес достоверно изменялся в 3-х изоформах, причем во 2 изоформе он понижался, в 3, 4 изоформах, наоборот, увеличивался (рисунк 6).

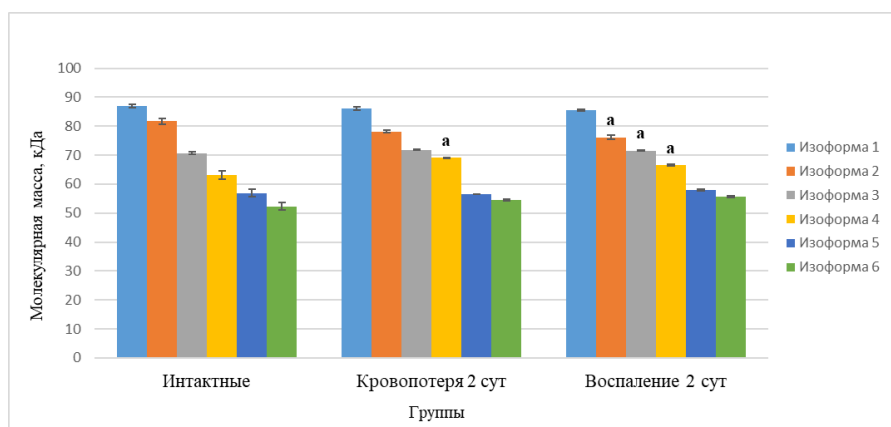


Рисунок 6 – Изменение молекулярных масс изоформ гемоглобина в цельной периферической крови крыс на 2-е сутки после экстремальных воздействий

Примечание: а – статистически значимые различия от группы интактных животных ($p < 0,05$).

При определении различных изоформ гемоглобина в отдельном эритроците каждой фракции оказалось, что как у интактных животных, так и у крыс с кровопотерей (2 сут) и воспалением (2 сут) в отдельном эритроците, содержались только две изоформы – одна более тяжёлая и одна более лёгкая (таблица 4).

При этом, если у интактных животных в F1, F2 фракциях эритроцитов доминировал процент более лёгких изоформ, а в F3-6 фракциях эритроцитов – более тяжёлых, то после кровопотери процент тяжелых изоформ - возрастал. При рассмотрении соотношения между изоформами гемоглобина при кровопотере 2 сут, следует отметить, что оно менялось на противоположное в первых двух фракциях, а в 3-6 фракциях оставалось таким же по сравнению с интактной группой. Аналогичная картина наблюдалась и в их абсолютном количестве (таблица 4).

Установлено, что при ОМК с 1-ой по 5-ую фракциях эритроцитов преимущественно содержались нормальные типы гемоглобина (64-68 кДа). В то время, как в F1 фракции эритроцитов содержалась смесь - тяжелой изоформы+ нормальные варианты гемоглобина, а в F6 фракции эритроцитов, наоборот, только лёгких изоформ гемоглобина (таблица 4).

Общее количество гемоглобина в клетке не изменялось на протяжении первых 2 –х суток. Следовательно, уменьшение абсолютного количества гемоглобина в цельной крови при ОМК - результат гемоделиции, а не качественных изменений эритроцитов.

При разделении красных клеток крови методом фракционного центрифугирования на фоне активации эритропоэза (кровопотеря 2 сутки) наибольшие изменения наблюдались в показателе насыщения эритроцита гемоглобином (МСНС), который понижался в F1, F2, F4, F5 и F6 фракциях эритроцитов по сравнению с интактной группой. Так, снижение показателя МСНС обычно отмечается при заболеваниях с нарушением синтеза гемоглобина.

Таблица 4 - Изменение содержания отдельных изоформ гемоглобина в одном эритроците различных фракций при разных экстремальных воздействиях, М±m

Показатели (n=10)	МСН, пг	Тяжелая изоформа, кДа	Лёгкая изоформа, кДа	Тяжелая изоформа, %	Лёгкая изоформа, %	Тяжелая изоформа, пг	Лёгкая изоформа, пг
Фракция эритроцитов 1							
Интактные	19,26±0,11	84,84±1,50	74,51±0,84	46,0±0,96	54,0±0,96	8,86±0,18	10,4±0,18
ОМК 2 сут	18,52±0,17	88,6±1,26	75,8±0,6	57,0±1,08	43,0±1,08	10,57±0,20 <i>a</i>	7,95±0,2 <i>a</i>
ОАВ 2 сут	17,42±0,15 <i>a</i>	85,98±0,28	75,38±0,26	50,6±0,4	49,4±0,4	8,81±0,26	8,61±0,26 <i>a</i>
Фракция эритроцитов 2							
Интактные	18,81±0,14	83,32±1,05	66,68±0,83	40,0±0,45	60,0±0,45	6,26±0,14	12,55±0,14
ОМК 2 сут	18,65±0,16	80,77±0,78	72,52±1,56	53,75±3,51	46,25±3,5	10,82±0,27 <i>a</i>	7,83±0,27 <i>a</i>
ОАВ 2 сут	17,04±0,07 <i>a</i>	78,32±0,4 <i>a</i>	72,48±0,35 <i>a</i>	56,6±0,81	43,4±0,81	9,64±0,11	7,4±0,11 <i>a</i>
Фракция эритроцитов 3							
Интактные	18,32±0,08	71,89±0,57	64,04±1,08	66,7±0,76	33,3±0,76	12,22±0,14	6,10±0,14
ОМК 2 сут	18,7±0,27	70,47±0,35	67,75±0,88	58,0±1,47	42,0±1,47	10,85±0,27 <i>a</i>	7,84±0,27 <i>a</i>
ОАВ 2 сут	16,88±0,5	72,7±0,4	67,08±0,4 <i>a</i>	58,9±0,45	41,1±0,45	9,94±0,09 <i>a</i>	6,94±0,09 <i>a</i>
Фракция эритроцитов 4							
Интактные	18,52±0,13	73,46±1,04	64,55±0,46	56,9±0,88	43,1±0,88	10,54±0,17	7,98±0,17
ОМК 2 сут	18,37±0,67	67,4±0,52	56,17±2,71	63,5±1,5	36,5±1,5	11,66±0,28 <i>a</i>	6,71±0,28 <i>a</i>
ОАВ 2 сут	17,06±0,38 <i>a</i>	67,19±0,35 <i>a</i>	66,16±0,41 <i>a</i>	63,36±0,37	36,64±0,3	10,8±0,9	6,25±0,9
Фракция эритроцитов 5							
Интактные	19,07±0,16	61,70±0,52	55,3±0,80	62,9±1,56	37,1±1,56	11,99±0,31	7,08±0,31
ОМК 2 сут	18,72±0,52	64,2±0,42	55,57±0,39	73,25±1,7	26,75±1,7	13,67±0,32 <i>a</i>	5,05±0,32 <i>a</i>
ОАВ 2 сут	16,92±0,39 <i>a</i>	65,51±0,25 <i>a</i>	63,42±0,38 <i>a</i>	70,08±0,73	29,92±0,7	11,85±1,8	5,07±1,8
Фракция эритроцитов 6							
Интактные	17,78±0,11	59,09±0,75	50,76±0,82	67,5±1,4	32,5±1,4	12,00±0,23	5,78±0,23
ОМК 2 сут	19,27±0,47	53,8±1,18	48,32±2,8	75,75±2,17	24,25±2,1	14,60±0,42 <i>a</i>	4,67±0,42 <i>a</i>
ОАВ 2 сут	16,46±1,05	57,04±0,38 <i>a</i>	55,92±1,5	27,02±0,55	72,98±0,5	4,45±0,52 <i>a</i>	12,01±0,52 <i>a</i>

Примечание: **ОМК** – острая массивная кровопотеря; **ОАВ** – острое асептическое воспаление; **МСН** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **кДа** - килодальтон; **пг** – пикограмм; **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных (p<0,05).

При воспалении на 2- е сутки возрастал процент тяжёлых изоформ эритроцитов в F1, F2, F3, F4 и F5 фракциях, кроме F6, где преобладала лёгкая изоформа. Количество в эритроците гемоглобина (пг) понижалось во всех фракциях эритроцитов, кроме 6-й, т.е. в 5 из 6 фракций отмечалась гипохромия (таблица 4). Следовательно, при воспалении имела

место не только реакция со стороны клеток белого ряда, но и существенные качественные сдвиги в эритропоэзе, что находило своё отражение в изменении соотношения между изоформами гемоглобина. Изоформы гемоглобина и популяции эритроцитов при воспалении были гетерогенны по своей электрофоретической подвижности, молекулярной массе и структурным характеристикам. Однако, при рассмотрении морфологических характеристик 6-ти фракций эритроцитов крыс, при развитии воспалительной реакции (2 сут), следует отметить, что почти во всех фракциях эритроцитов, за исключением пятой (F5), объём красных клеток в цельной крови уменьшался. Среднее содержание гемоглобина и средняя концентрация гемоглобина в эритроците были снижены F1, F2, F4 и F5 фракциях эритроцитов (*таблица 4*).

Заключение. Физиологическая гетерогенность гемоглобинов приобретает особую значимость при действии на организм экстремальных факторов, в той или иной степени влияющих на гемопоэз (кровопотеря, воспаление, стресс). Можно предположить, что гетерогенность гемоглобина и фракций эритроцитов обеспечивает адаптацию организма к резким и кратковременным колебаниям содержания кислорода в окружающей среде, а, следовательно, им не требуется соответствующая перестройка гемопоэза и метаболических процессов в организме.

При проведении исследований удалось выделить неспецифические (типовые) и специфические реакции гемоглобинового профиля крыс. Неспецифические реакции обусловлены феноменом стресса и проявляются одинаково при всех экстремальных воздействиях. Они представлены снижением 1, 2 и увеличением 6 изоформ гемоглобина в периферической крови и в костном мозге на оба срока исследования (6 часов и 2 суток). Специфические реакции различны при активации эритропоэза и лейкопоэза на 2-е сутки. В условиях гипоксии наблюдается снижение - 3 и увеличение - 5 изоформ гемоглобина, как в крови, так и в костном мозге. Увеличение количества 1-й изоформы гемоглобина в костном мозге при уменьшении в периферической крови свидетельствует о повышении образования содержащих её клеток в кроветворной ткани и повышенном разрушении при поступлении в циркуляцию, а увеличение в костном мозге 4-й изоформы гемоглобина свидетельствует о повышении образования эритроцитов с гемоглобином молекулярной массы - $69,04 \pm 0,14$ кДа, с высокой лиганд связывающей способностью. При активации лейкопоэза - в гемоглобиновом профиле периферической крови и костного мозга, наряду с отмеченными стрессорными изменениями наблюдается повышение 4-й изоформы гемоглобина.

Отмечаются и качественные изменения эритроцитов. В эритроцитах F1 и F2 фракций соотношение сдвигается в сторону более тяжёлых форм в одинаковой степени при кровопотере и воспалении, а, следовательно, их лиганд связывающая способность понижается. В эритроцитах F5 фракции, содержащих лёгкую фракцию гемоглобина – F-5,

соотношение смещается в сторону более тяжелой изоформы, но это основная изоформа гемоглобина, а, следовательно, отмечается повышение лиганд связывающей активности смеси гемоглобинов. Особое место занимает F6 фракция эритроцитов, содержащая исключительно лёгкие изоформы гемоглобина, её увеличение совпадает с повышением числа F-клеток и ретикулоцитов. Однако, при активации эритропоэза соотношение в смеси (F5 и F6 фракциях эритроцитов) смещается в сторону тяжёлых изоформ, а при активации лейкопоэза, наоборот, в сторону лёгких, что по-разному сказывается на их лиганд связывающей способности. В первом случае (в условиях гипоксии) она увеличивается, а во-втором – снижается. Отмечающиеся изменения при воспалении, выраженные в смещении лейко-эритроидного соотношения в сторону клеток белого ряда, приводят и к изменению реакции клеток эритроидного ростка в сторону повышения эритроцитов с лёгкими изоформами гемоглобина. Следовательно, в результате изменения эритропоэза соотношение между изоформами смещается в сторону основных, лучше всего связывающих кислород, а гетерогенность изоформ гемоглобина отражает неоднородность популяций эритроцитов. Описанные выше процессы, отражающие различия изоформ гемоглобина, содержащихся в разных фракциях эритроцитов, представлены на заключительной схеме (рисунки 7):

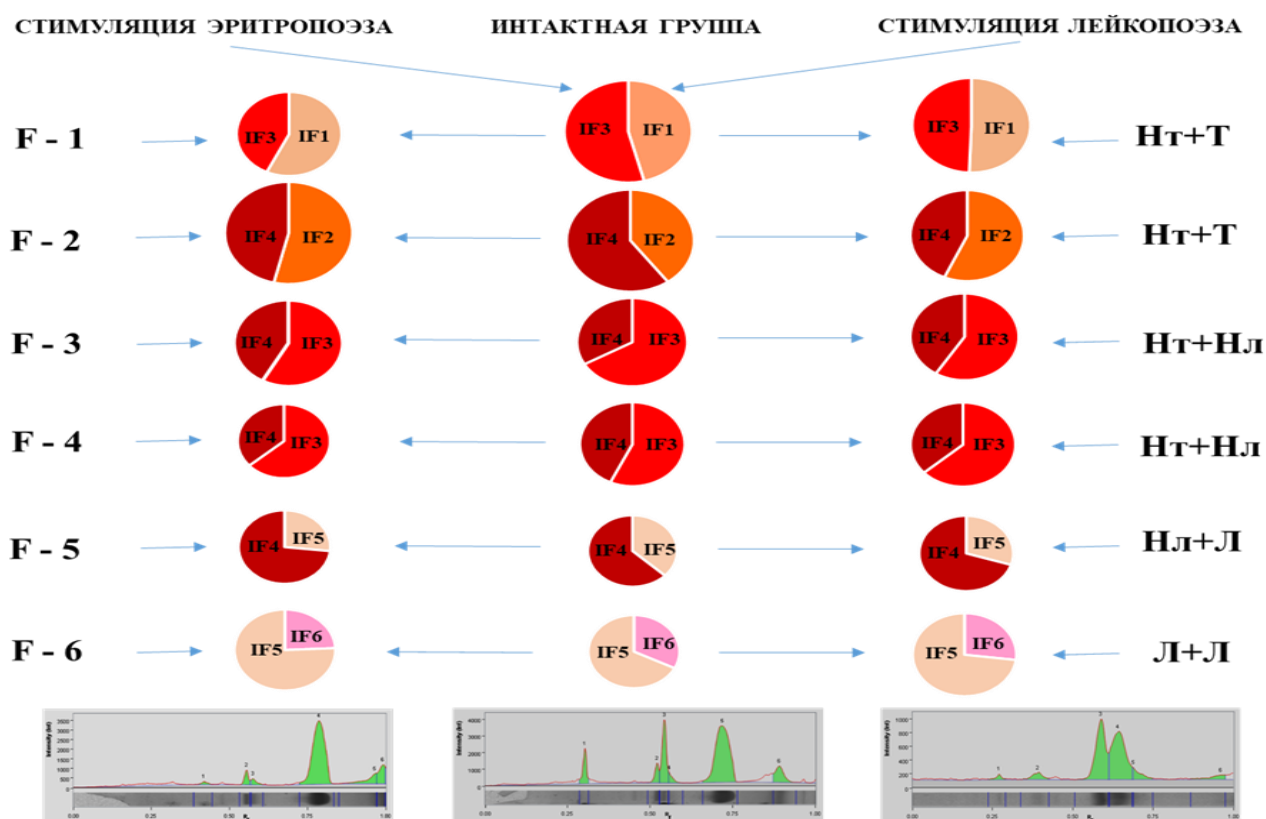


Рисунок 7 – Гетерогенность изоформ гемоглобина и фракций эритроцитов при действии на организм разных экстремальных факторов

Примечание: **H_T+T** – нормальные варианты+тяжёлые варианты гемоглобина, **H_T+H_L** – нормальные (основные) варианты гемоглобина; **H_L+L** – нормальные варианты+ лёгкая форма, **L+L** – лёгкие варианты гемоглобина. Сокращения: **F1-F6** – фракции эритроцитов; **IF1-IF6** – изоформы гемоглобина.

Таким образом, гетерогенность гемоглобинов животных будет обеспечивать адаптацию организма к повседневным колебаниям парциального давления O_2 , резким и кратковременным его изменениям, а если это действие длительное, то оно будет проявляться в перестройке эритропоэза и лейкопоэза.

ВЫВОДЫ

1. В периферической крови и в костном мозге у крыс в нормальных условиях и при действии на организм экстремальных факторов выявляются 6 изоформ гемоглобина, отличающихся соотношением между изоформами и молекулярной массой.
2. На основную массу гемоглобинов с молекулярным весом 64-68 кДа приходится 65% от всех гемоглобинов, на лёгкие (менее 64 кДа) - 24%, на тяжёлые изоформы (более 68 кДа) - 11%.
3. В цельной крови крыс одновременно циркулируют 6 фракций эритроцитов, различающихся содержанием в клетках отдельных изоформ гемоглобина, ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные изоформы гемоглобина; отдельный эритроцит содержит только две изоформы гемоглобина, соотношение между ними существенно сказывается на суммарных структурных характеристиках смеси.
4. Изоформы гемоглобина различаются своими структурными характеристиками: конформацией гема («плоской» или «скрученной» формой, растяжением пиррольного кольца, маркером спинового состояния железа в дезокси- и окси- формах, степенью погруженности атома железа в порфириновое кольцо), характеристиками глобина (колебаниями СН- связей аминокислот глобина, симметричными или асимметричными растяжениями окси- и дезоксигемоглобина), что отражается на их лиганд связывающей способности.
5. Изменения изоформ гемоглобина при действии на организм экстремальных факторов зависят от природы последних: при активации эритропоэза соотношение между изоформами смещается в сторону основных изоформ (F3 и F4 фракции эритроцитов), обладающих наибольшей лиганд связывающей способностью; при стимуляции лейкопоэза, когда гипоксия не развивается, увеличивается доля лёгких изоформ (F6 фракция эритроцитов), что приводит к снижению их кислород связывающей функции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Метод комбинационного рассеяния света может применяться в качестве мониторинга состояния эритропоэза.

Изменения гемоглобинового профиля периферической крови и костного мозга могут являться эффективными показателями эритропоэза при различных гематологических заболеваниях (анемиях, талассемиях, гемобластозах и других).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность профессору, д.х.н., г.н.с. лаборатории оксидных систем Зуеву Михаилу Георгиевичу и м.н.с. лаборатории оксидных систем Васину Андрею Андреевичу за помощь в записи спектров гемоглобина методом спектроскопии комбинационного рассеяния света.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (по специальности 3.3.3. Патологическая физиология) и/или индексируемых в международных базах данных RSCI, Scopus, Web of Science и PubMed:

1. Yushkov, B.G. Heme and globin conformations in fractionated rat erythrocytes by Raman spectroscopy / B. G. Yushkov, M.G. Zuev, **S.A. Brilliant**, A.A. Vasin // Biophysics. – 2023. - V. 68, N.1. - P. 24–30. DOI: 10.1134/S0006350923010207. (IF Scopus - 0.7, Q4; RSCI; ИФ РИНЦ – 0.583, K-1).
2. Hemoglobin isoforms in rat erythrocytes in acute aseptic inflammation / B.G. Yushkov, **S.A. Brilliant** // Bulletin of experimental biology and medicine. - 2022. - V.173, N. 1. - P.10-13. DOI: 10.1007/s10517-022-05481-8. (IF Scopus - 0.7, Q4; RSCI; ИФ РИНЦ – 0.673, K-1).
3. Юшков, Б.Г. Изменения изоформ гемоглобина в периферической крови при экспериментальной постгеморрагической анемии / Б.Г. Юшков, **С.А. Бриллиант**, А.С. Минин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2021. - Т. 171, № 4. - С. 424-428. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-4-424-428. (IF Scopus - 0.7, Q2; RSCI; ИФ РИНЦ – 0.534).
4. **Бриллиант, С.А.** Гемоглобиновый ответ организма на иммобилизационный стресс / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2020. - Т.17, № 4. - С.266-271. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-4-266-271. (ИФ РИНЦ – 0.311).
5. **Бриллиант, С.А.** Исследование неоднородности гемоглобинового профиля костного мозга после инициирования воспалительного процесса / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков, Н.В. Тюменцева // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2020. - Т.17, №1. - С.18-25. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-18-25. (ИФ РИНЦ – 0.311).
6. Юшков, Б.Г. Особенности распределения различных изоформ гемоглобина в эритроцитах крыс / Б.Г. Юшков, **С.А. Бриллиант** // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2020. - Т. 106, № 10. - С. 1312–1320. DOI: 10.31857/S0869813920090095. (RSCI, ИФ РИНЦ – 0.442).
7. **Бриллиант, С.А.** Изменение гемоглобинового профиля костного мозга и периферической крови крыс в условиях острого асептического воспаления /

С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков, Н.В. Тюменцева // Российский иммунологический журнал. - 2019. – Т. 13 (22), № 2-3. - С.1048-1050. DOI:10.31857/S102872210006477-9. (*Scopus, RSCI, PubMed, ИФ РИНЦ – 0.246*).

8. **Бриллиант, С.А.** Исследование гемоглобинового спектра костного мозга крыс при постгеморрагической анемии / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2018. - Т.15, № 4. - С.570-576. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-4-570-576. (*ИФ РИНЦ – 0.230*).

9. **Бриллиант, С.А.** Гетерогенность белковых фракций гемоглобина костного мозга и системы крови при экстремальных воздействиях на организм / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков // Медицинская иммунология. - 2017. - Т.19, № S. С.17-18. (*IF Scopus - 0.384, Q1; RSCI; ИФ РИНЦ – 0.556*).

10. **Бриллиант С.А.** Исследование гемоглобинового профиля красной крови и костного мозга крыс после иммобилизации // В мире научных открытий. - 2012. - № 2 (26). С.27-30. (*IF Scopus – 2.294, Q1; ИФ РИНЦ – 0.195*).

11. **Бриллиант, С.А.** Изменение диаметров эритроцитов и их осмотической стойкости у крыс после воздействия на организм острой массивной кровопотери / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков, М.Н. Сумин // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2009. - № 2 (25). С. 97- 98.

12. **Бриллиант, С.А.** Исследование влияния нейрогуморальных факторов на степень устойчивости эритроцитов к аммонийному гемолизу / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков, М.Н. Сумин // Аллергология и иммунология. - 2009. - Т.10, № 2. - С.173-174.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

кДа – килодальтон

ПААГ- полиакриламидный гель

D - диаметр

F1-F6 – фракции эритроцитов

HbF – эритроциты, несущие фетальные изоформы гемоглобина

IF1-IF6 – изоформы гемоглобина

Rt – ретикулоциты

БРИЛЛИАНТ СВЕТЛАНА АЛЕКСАНДРОВНА

**РОЛЬ НЕОДНОРОДНОСТИ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В АДАПТАЦИИ
ОРГАНИЗМА К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2024