

Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ  
Уральского отделения Российской академии наук

УДК: 612.111.11

*На правах рукописи*

БРИЛЛИАНТ СВЕТЛАНА АЛЕКСАНДРОВНА

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

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

*Юшков Борис Германович*, член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

Екатеринбург – 2023

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

	С.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА 1 – ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕОДНОРОДНОСТИ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>	14
1.1 – Гетерогенность клеток эритроидного ряда	14
1.2 – Гетерогенность системы гемоглобинов и её роль в физиологии и патофизиологии	20
1.3 – Полифункциональность системы гемоглобинов	23
1.4 – Физические свойства изоформ гемоглобина	28
1.5 – Изменения структурных характеристик гемоглобина	32
1.6 – Формирование неоднородности эритроцитов и изоформ гемоглобина	35
1.7 – Роль гетерогенности системы гемоглобинов в процессе адаптации организма к действию различных экстремальных факторов	38
<b>ГЛАВА 2 – МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	46
2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных	46
2.2 – Моделирование острой массивной кровопотери	47
2.3 – Моделирование острого асептического воспаления	47
2.4 – Моделирование иммобилизационного стресса	47
2.5 – Оценка гематологических показателей экспериментальных животных	47
2.6 – Исследование содержания эритроцитов, несущих фетальные изоформы гемоглобина (метод Betke-Kleihauer)	48
2.7 – Исследование содержания ретикулоцитов	49

2.8 – Исследование диаметров эритроцитов, ретикулоцитов и эритроцитов, несущих кислотоустойчивые (фетальные) изоформы гемоглобина	49
2.9 – Исследование соотношения изоформ гемоглобина крыс методом электрофореза в ПААГ	50
2.10 – Разделение эритроцитов крыс методом фракционного центрифугирования	53
2.11 – Исследование изоформ гемоглобина в эритроцитах крыс методом спектроскопии комбинационного рассеяния света	55
2.12 – Оценка показателей костного мозга экспериментальных животных	58
2.13 – Исследование средних диаметров эритроцитов и их осмотической стойкости методом малоуглового светорассеяния частиц с помощью лазерного анализатора микрочастиц «Ласка 1-К»	58
2.14 – Статистические методы анализа, используемые для проведения экспериментальной работы	60
<b>ГЛАВА 3 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ</b>	<b>61</b>
3.1 – Связь размеров эритроцитов с состоянием гемоглобина	61
3.2 – Изоформы гемоглобина в цельной крови и костном мозге	63
3.3 – Распределение изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов	65
3.4 – Характеристика изоформ гемоглобина с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (или Рамановской спектроскопии)	69
Список публикаций по материалам 3 главы	76
<b>ГЛАВА 4 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ОСТРОЙ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРИ</b>	<b>77</b>
4.1 – Неоднородность клеточного состава крови при действии на организм острой массивной кровопотери	77

4.2 – Характеристика гемоглобинового профиля в периферической крови и в костном мозге при действии на организм острой массивной кровопотери	86
4.3 – Содержание изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов при острой массивной кровопотере	89
Список публикаций по материалам 4 главы	98
<b>ГЛАВА 5 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ОСТРОГО АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ</b>	99
5.1 – Реакция системы крови на острое асептическое воспаление	99
5.2 – Характеристика гемоглобинового профиля в периферической крови и в костном мозге при действии на организм острого асептического воспаления	107
5.3 – Содержание изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов при остром асептическом воспалении	110
Список публикаций по материалам 5 главы	117
<b>ГЛАВА 6 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА</b>	119
6.1 – Неоднородность клеточного состава крови при действии на организм иммобилизационного стресса	119
6.2 – Характеристика гемоглобинового профиля в периферической крови и в костном мозге при действии на организм иммобилизационного стресса	127
Список публикаций по материалам 6 главы	132
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	133
<b>ВЫВОДЫ</b>	139
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	140
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b>	141
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b>	143

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** 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 [3, 25, 42, 51, 120], функций [2, 28, 31, 80, 110, 199] и эволюционного происхождения [11, 60, 87, 125].

До недавнего времени считалось, что у позвоночных гемоглобин содержится только в эритроидных клетках. Однако накапливаются данные об экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ - глобинов в большом спектре неэритроидных клеток, включая клетки мозга грызунов (нейроны коры головного мозга, гиппокампа и мозжечка, но не астроциты и олигодендроциты), нейроны эмбрионов и взрослых мышей и крыс [86, 157, 178]. Есть сведения о продукции гемоглобина в эндометрии эмбриона и взрослой мыши, макрофагах мыши, хрусталике глаза, мезангиальных клетках крысы, альвеолярных эпителиальных клетках II типа как крысы, так и человека, а также клетках рака молочной железы и глиобластомы человека [84, 97, 102, 113, 156].

Известно, что гемоглобины состоят из смеси близких по структуре молекул, которые методом электрофореза на различных носителях (полиакриламид, агар, бумага, крахмал) разделяют на компоненты. Электрофоретические различия между отдельными компонентами определяются, в первую очередь, отличием первичной структуры белковой молекулы. Тем самым, фракционный состав гемоглобина находится под строгим генетическим контролем. 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 отличающихся друг от друга [31, 61]. Установлено, что у взрослого человека в крови циркулирует пять изоформ гемоглобина ( $HbA_{12\alpha2\beta}$ ,  $HbA_{22\alpha2\delta}$ ,

HbA<sub>3</sub>2α2δ-глутатион, HbF2α2γ, HbP Gower I- 4ε и Gower II- 4ε 2α2ε), у рыб – от трех до пяти (Hbα-3.1, Hbα-3.2, Hbα-3.3, Hbβ-3.1, Hbβ-3.2), у птиц – от двух до трех (HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>2</sub>, HbD), лягушек, собак, лошадей, кошек – две (HbA, HbD), у крыс – шесть (Hb<sub>1</sub>α<sup>a</sup>β<sup>a</sup>, Hb<sub>2</sub>α<sup>b</sup>β<sup>a</sup>, Hb<sub>3</sub>α<sup>a</sup>β<sup>b</sup>, Hb<sub>4</sub>α<sup>b</sup>β<sup>b</sup>, Hb<sub>5</sub>α<sup>a</sup>β<sup>c</sup>, Hb<sub>6</sub>α<sup>b</sup>β<sup>c</sup>), а, по некоторым данным, девять изоформ [31, 46, 56, 61, 138, 188].

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 определённое количество гемоглобина А [30, 57].

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 (130 кДа) наименее токсичен для почек и обладает меньшей вазоактивностью по сравнению с нормальным гемоглобином - 64 кДа [91]. На кинетику полимеризации HbS влияют HbA<sub>2</sub> и HbF [79]. 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  $\beta$ - 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  $S\alpha_2\beta_2^{6 \text{ глут} \leftarrow \text{вал}}$ , выпадая в осадок, приводит к изменению формы красных клеток крови [36, 71].

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

Физиологический смысл изменения соотношения между изоформами гемоглобина у птиц и рыб заключается в их возможности адаптироваться к резким перепадам кислородного режима во время полета или при погружении на дно. Так, у птиц высокогорья (беркутов) гипоксия преодолевается благодаря уникальным взаимодействиям в межсубъединичных контактах гемоглобина. Отмечено, что HbA беркута был адаптирован к гипоксии [77]. У рыб (бычка-кругляка) в условиях экспериментальной гипоксии методом электрофореза выделяют 4 компонента (2 основных – F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> и 2 второстепенных (минорных) - M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>). Элюировав и проведя исследования основных фракций, было отмечено, что гемоглобиновая система рыб претерпевает изменения в соотношении фракций. При этом уровень F<sub>1</sub>- снижается на 26,8%, а F<sub>2</sub>- увеличивается на 41,8% и повышается её сродство к O<sub>2</sub>. Следовательно, активная перестройка системы гемоглобинов донных рыб позволяет им адаптироваться к условиям гипоксии [183].

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

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

В целом, несмотря 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 гемопозза.

**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 «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина».

**Достоверность полученных результатов.** Автором проведен анализ большого количества данных современной литературы по исследуемой теме и на основании этого сделаны главные теоретические заключения. Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объёмом выборки, использованием современных высокоинформативных методов исследования (метод электрофореза в 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 (Москва, 2022), на XV Всероссийской конференции патофизиологов Урала (Екатеринбург, 2022), на VI Междисциплинарной конференции с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций, посвященной 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова (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» (Екатеринбург, 2021), на XXIII Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (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» (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» (Екатеринбург, 2017), на Всероссийской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина», посвящённой памяти В.С. Мархасина (Екатеринбург, 2016), на XXI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2015), на IX Всероссийской молодежной научной конференции «Физиология человека и животных: от эксперимента к практике» (г. Сыктывкар, Республика Коми, 2010), на XXI научной конференции «Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова» (Москва, 2010), на XV Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (г. Казань, 2010), на VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (г. Новосибирск, 2009), на XIII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2009), на II Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2009» (г. Пермь, 2009), на I Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Украина, г. Донецк, 2009), на IX Международном конгрессе РУДН «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2008), на V Международной конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация коррекция» (Москва, 2008), на II Международной научно-практической конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (г. Челябинск, 2008).

**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.

**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.

# ГЛАВА 1 – ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕОДНОРОДНОСТИ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 – Гетерогенность клеток эритроидного ряда

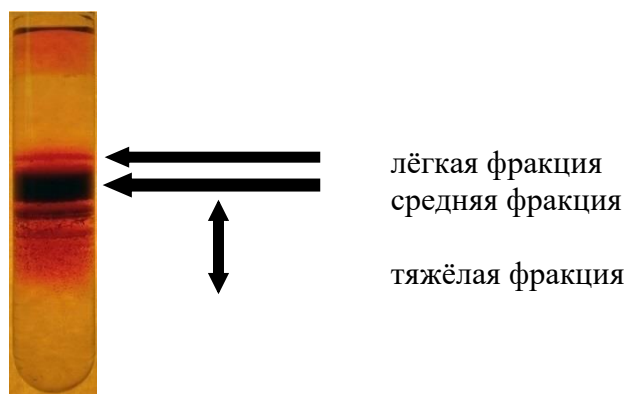
Известно, что в периферической крови взрослого человека циркулирует  $25\text{-}30 \cdot 10^{12}$  эритроцитов. В среднем у человека за 70 лет жизни (при весе 70 кг) нарабатывается 460 кг эритроцитов [27]. Данные различных авторов относительно средних значений нормального содержания эритроцитов и гемоглобина не претерпели значительного изменения за последние годы.

Однако огромное количество информации теряется, когда свойства эритроцитов сводятся к набору единичных «средних» значений, а эта информация имеет существенное значение при оценке тяжести заболевания или эффективности терапии у отдельных пациентов.

Так, со временем стало ясно, что реакции эритроцитов на действия экстремальных факторов не обязательно затрагивают все циркулирующие клетки, среди которых можно выделить «отвечающие» и «неотвечающие» [123, 145, 176], что привело к признанию существования множества фракций эритроцитов, которые функционально отличаются друг от друга. Различия распространяются на количество копий белков на клетку, активность ферментов и переносчиков ионов, формы, различия в плотности, деформируемость, стабильность мембран, окислительно-восстановительное состояние и набор вариантов гемоглобина в данной клетке [87]. Отличаются они и по количеству свободного кальция и активности кальциевых каналов [107, 123, 176], редокс-потенциалу [112].

При центрифугировании в изотоническом растворе образцов крови с образованием непрерывных или прерывистых градиентов эритроциты распределяются в них в соответствии с их плотностью. Поскольку эритроциты

здоровых доноров-людей фракционируют в самообразующемся градиенте Перколла, можно собрать от трех до пяти фракций (рисунк 1).



**Рисунок 1 - Пример неоднородности эритроцитов, выявленных при их фракционировании по градиенту плотности Перколла**

*Примечание:* Состав легкой, средней и высокой плотности фракций различается в зависимости от состояния здоровья человека и экологического стресса. Около 15–20% эритроцитов здоровых доноров с низкой плотностью являются ретикулоцитами. Однако наряду с молодыми клетками эта фракция «загрязнена» набухшими эритроцитами в стадии терминального старения. Средняя фракция образована зрелыми эритроцитами, а тяжелые обезвоженные клетки - это клетки со стареющим фенотипом [136].

Небольшая фракция клеток с полосами более низкой плотности в качестве верхнего стоя, за которым следует одна или несколько популяций эритроцитов со средней плотностью и незначительная фракция клеток, представлены с самой высокой плотностью [87, 141, 145]. Эритроциты больных наследственными гемолитическими анемиями обычно характеризуются более широкой дисперсией плотности [186-187].

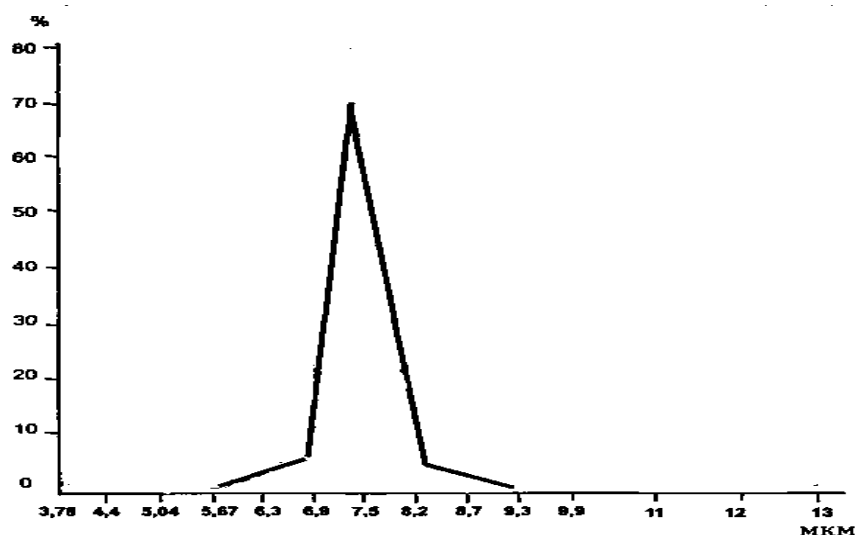
В последние годы внимание исследователей стало смещаться в сторону изучения различных вариантов неоднородности эритроцитов.

***Неоднородность популяции эритроцитов по размерам.*** Размеры эритроцитов в нормальной крови могут сильно варьировать.

Одним из важных показателей эритроцитов является средний объем эритроцита (MCV), измеряемый в фемтолитрах (fl) или кубических микрометрах ( $\text{mkm}^3$ ). Значения MCV, находящиеся в пределах 80-100 fl, характеризуют эритроцит как нормоцит, меньше 80 fl – микроцит, больше 100 fl – макроцит.

Установлено, что большинство эритроцитов имеют диаметр около 7,5 мкм и называются нормоцитами. Благодаря двояковогнутой форме нормоцита его поверхность больше, чем, если бы он имел форму шара. Объем эритроцита 90 мкм<sup>3</sup>, площадь 140 мкм<sup>2</sup>. Такое соотношение площади к объёму способствует деформабельности (обратимому изменению размеров и формы) эритроцитов при прохождении их через капилляры. При этом эритроцит перекручивается в средней узкой части, его содержимое из более широкого конца перетекает к центру, благодаря чему эритроцит свободно входит в узкий капилляр без изменения объема или площади поверхности, т.е. без растяжения мембраны.

Остальная часть эритроцитов представлена микроцитами и макроцитами. Микроциты имеют диаметр <7 мкм, а макроциты >8 мкм. Для оценки распределения эритроцитов по величине применяют эритроцитометрическую кривую Прайс-Джонса. Как известно, ширина основания данной кривой характеризует анизоцитоз. Кривая Прайс-Джонса в норме правильной формы с вершиной на 7,5 мкм и довольно узким основанием в пределах 6-9 мкм (рисунки 2) [44].



**Рисунок 2 - Кривая Прайс-Джонса у здоровых людей**

При макроцитозе и мегалоцитозе кривая имеет пологую форму, основание расширяется, имеет две или несколько вершин, и сдвинута вправо в сторону больших диаметров эритроцитов, что встречается при В<sub>12</sub> - (фолиево-) дефицитных



анемиях. При микроцитозе эритроцитометрическая кривая сдвигается влево, становится ассиметричной, ширина её при этом увеличивается.

**Неоднородность эритроцитов по форме.** В нормальной крови человека основную массу составляют эритроциты двояковогнутой формы — дискоциты (80—90%). Кроме того, имеются planoциты (с плоской поверхностью) и стареющие формы эритроцитов — шиповидные эритроциты, или эхиноциты, куполообразные, или стоматоциты, и шаровидные, или сфероциты. Процесс старения эритроцитов идет двумя путями — кренированием (образованием зубцов на плазмолемме) или путем инвагинации участков плазмолеммы. При кренировании образуются эхиноциты с различной степенью формирования выростов плазмолеммы, которые впоследствии отпадают. При этом формируется эритроцит в виде микросфероцита. При инвагинации плазмолеммы эритроцита образуются стоматоциты, конечной стадией которых также является микросфероцит. Одним из проявлений процессов старения эритроцитов является их гемолиз, сопровождающийся выходом гемоглобина; при этом в крови обнаруживаются «тени» эритроцитов – их оболочки. Специфическая форма эритроцитов обуславливает более высокое отношение поверхности к объему, что увеличивает возможности газообмена. У акул, лягушек и птиц эритроциты овальной или округлой формы, содержат ядра.

Известно, что мембрана эритроцитов обладает свойством сохранять постоянными площадь поверхности и толщину при любой деформации [92]. Наружная поверхность мембраны эритроцита несет отрицательный заряд. Мембрана эритроцитов составляет всего 1% от веса эритроцита [62], но именно она определяет гомеостаз и функциональное состояние эритроцита.

Плазмолемма эритроцита состоит из бислойа липидов и белков, представленных приблизительно в равных количествах, а также небольшого количества углеводов, формирующих гликокаликс. В плазмолемме эритроцита идентифицировано 15 главных белков. Более 60% всех белков составляют: примембранный белок - спектрин и мембранный белок — гликофорин. Основной частью эритроцитов является высокоспециализированный белок - гемоглобин.

Впервые гемоглобин появляется у некоторых кольчатых червей. С его помощью осуществляется газообмен у рыб, амфибий, рептилий, птиц, млекопитающих и человека. В крови некоторых моллюсков, ракообразных кислород переносится белковой молекулой — гемоцианином, содержащим не железо, а медь. У некоторых кольчатых червей перенос кислорода осуществляется с помощью гемэритрина или хлорокруорина.

**Неоднородность по уровню  $Ca^{2+}$  (статические и динамические тесты) и электрофизиологические свойства.** В эритроцитах здоровых людей была зарегистрирована неоднородность базального уровня свободного  $Ca^{2+}$  [107, 123, 145]. Стимуляция захвата  $Ca^{2+}$  путем обработки красных клеток человека ПГЕ<sub>2</sub> [96], лизофосфатидной кислотой [124, 200] или глутаматом [115, 145] увеличивает дисперсию внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Не все клетки реагируют на напряжение сдвига или прооксидантное состояние увеличением  $Ca^{2+}$ .

**GSH и GSSG неоднородность эритроцитов.** Показано, что плотные клетки лишены GSH и обогащены GSSG по сравнению со зрелыми эритроцитами средней плотности. Накопление GSSG и снижение GSH не сопровождалось какими-либо существенными изменениями внутриклеточного уровня АТФ и НАДФН [94].

**Антигенная неоднородность эритроцитов.** Значительным открытием было обнаружение в одном из образцов клеток крови человека нескольких популяций клеток, о чем свидетельствовала их способность связывать антитела. Это исследование подтверждает, что данный нормальный фенотип на самом деле представляет собой смесь антигенно различных популяций клеток [171].

Большой вклад в межклеточную гетерогенность вносит присутствие фетального гемоглобина в небольшой фракции клеток (F-клеток) у здоровых людей [174]. Поглощение <sup>59</sup>F фракцией в организме взрослого человека указывает на синтез фетального гемоглобина после рождения [150]. Содержание F-клеток увеличивается при воздействии высокогорья [155]. Беременность оказывает влияние на этот параметр [168]. Более того, обилие F-клеток, а также количество HbF в них могут различаться у пациентов с β-талассемией [155].

Кроме того, при серповидноклеточной анемии содержание HbF сильно зависит от гаплотипа [149]. Признак серповидноклеточной анемии приводит к неравномерному распределению HbS между клетками, и модель такой изменчивости, по-видимому, является наследственной [81]. Одной из возможных причин, поддерживать гетерогенность, являются градиенты различных сигнальных мессенджеров, факторов роста, хемокинов, уровней кислорода и возникающих в результате активных форм кислорода и другие факторы [184, 193], создающие условия, при которых клетки-предшественники дифференцируются, уникальными и зависящими от их расположения в костном мозге. Элегантная модель, предложенная Koury M.J. и Bondurant M.C. [130], объясняет основу различной чувствительности к эритропоэтину как встроенный механизм предотвращения апоптоза всех эритроидных предшественников при низких уровнях эритропоэтина в кровотоке, например, у пациентов с почечной недостаточностью. Работа нескольких других групп [133, 152, 154] показала, что гетерогенный ответ на эритропоэтин в одной и той же популяции предшественников не может быть связан с количеством рецепторов эритропоэтина, афинностью или структурой, тем самым предполагая различия в передаче сигнала как вероятный механизм существования гетерогенности в ответ на эритропоэтин. Основываясь на этих находках, можно оценить существование гетерогенности передачи сигналов внутри компартмента эритроидных предшественников как необходимого компонента в процессе развития для получения зрелых эритроцитов.

Недавно разработанные подходы к внутриклеточной проточной цитометрии [139] должны дополнительно раскрыть ранее неизвестные уровни регуляторной гетерогенности во время развития эритроидных клеток. Внутри эритроидного компартмента, особенно на ранних стадиях эритропоэза, по-видимому, существует значительный уровень транскриптомной изменчивости и неоднородности, по крайней мере, на основе эритроидных предшественников костного мозга мыши. В том же исследовании было обнаружено, что клеточный цикл эритроидных предшественников постоянно ремоделируется во время программы дифференцировки, но, в соответствии с очень ранними исследованиями с

использованием объемных эритроидных предшественников (КОЕ-Э), подавляющее большинство клеток находилось в S-фазе клеточного цикла.

Феномен гетерогенности эритроцитов неизбежно ставит вопрос о вкладе в неё и гетерогенности гемоглобинов.

## **1.2 – Гетерогенность системы гемоглобинов и её роль в физиологии и патофизиологии**

Многолетние исследования гемоглобина в различных лабораториях мира привели к значительному прогрессу в описании физических, химических и биологических характеристик. В настоящее время описаны первичные структуры более 700 гемоглобинов различных организмов [31]. Молекулярная масса большинства изоформ пигмента колеблется в пределах 64,5–68,0 кДа, размер составляет 6,8 нм.

Гемоглобины представляют собой мультимерные белки. Считается, что все типы гемоглобина являются тетрамерами, построенными из пары  $\alpha$ -субъединиц, и специфической для каждого типа иной пары [8]. Каждый из четырех протомеров построен из двух неравных частей: небелковая структура – гем (4% массы молекулы гемоглобина, обеспечивает окраску и ковалентную связь с кислородом) и белковая глобула – глобин (96% массы, чаще представлен либо 141 ( $\alpha$ -цепь), либо 146 ( $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -цепи) аминокислотными остатками) [22, 33, 116, 173, 181].

Все многообразие вариантов гемоглобина можно разделить на две составляющие: первые - постоянно присутствующие в крови и вторые - появляющиеся в крови только на определенных этапах развития организма и патологические формы. Кроме того, выделяют функциональные формы гемоглобина (дезоксигемоглобин, оксигемоглобин, карбгемоглобин и метгемоглобин) и его производные – результат взаимодействия с различными веществами (карбксигемоглобин, циангемоглобин, солянокислый гематин, метгемоглобин, азид-метгемоглобин и другие). В процессе эволюции отмечены изменения фракций гемоглобина: разделение миоглобина и гемоглобина, дублирование генов, образование тетрамерной архитектуры, развитие  $\alpha$ - и  $\beta$ - генов,

способность нескольких субъединиц гемоглобина совместно связывать кислород и аллостерически регулироваться и др.) [167, 188-190]. Благодаря современным методам исследований в настоящее время стало возможным реконструировать структуру ранних предковых гемоглобинов и рассчитать скорость их эволюции на разных этапах [99, 140].

Показано, что в крови одного организма довольно часто присутствуют несколько гемоглобинов, которые могут быть близкими по определенным свойствам, и различными по структуре и выполняемым функциям [70, 82-83, 89, 146, 158, 172, 192], их принято называть изоформами. У человека выделяются как минимум пять (HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>2</sub>, HbA<sub>3</sub>, HbF, HbP) изоформ. Изоформы HbA<sub>1</sub> и HbA<sub>2</sub> являются основными. Важными изотипами человека являются и антенатальные гемоглобины – фетальный (или плодовый) - HbF и эмбриональный (или примитивный) – HbP [13, 30].

Примитивный гемоглобин P (синоним эмбриональный – HbE) обладает более высоким, чем HbA<sub>1</sub>, сродством к кислороду. Его синтез активируется в раннем эмбриогенезе и протекает в эмбриональном желточном мешке. HbP находится в эритроцитах эмбриона человека с 4-й по 18-ю неделю гестации, в основном между 5-й и 12-й неделями. HbP подразделяется на подтипы, главные - Gower-I, Gower-II, Hb-Portland и другие. Они все являются тетрамерами, различающимися только своей структурой одной из двух пар полипептидных цепей: Gower I –  $\epsilon_4$ ; Gower II –  $\alpha_2\epsilon_2$ , Hb-Portlandz  $2g_2$ . По физико-химическим свойствам эмбриональный гемоглобин сходен с фетальным гемоглобином, поскольку обладает близкими параметрами по спектру поглощения, коэффициенту седиментации – 4, 5 S, и характеризуется высокой щелочной резистентностью, однако имеет меньшую электрофоретическую подвижность [8].

Фетальный гемоглобин - тетрамер, который состоит из двух  $\alpha$ - и двух  $\gamma$ -протомеров. В  $\gamma$ -цепи, в отличие от  $\beta$ -цепи, содержится меньше валина, пролина, гистидина, но больше – изолейцина, серина, треонина. В состав  $\beta$ -цепи входит дополнительно изолейцин, который отсутствует в гемоглобинах A и A<sub>2</sub>. Общее количество аминокислотных остатков в  $\gamma$ -цепи, как и в  $\beta$ - и  $\delta$ -цепях, равно 146.

Фетальный гемоглобин начинает активно синтезироваться с 12-й недели гестации (2 неделя после формирования печени плода), а к 6 месяцам эмбрионального развития полностью замещает HbP, становясь основным гемоглобином плода. Он составляет 90–95% общего количества Hb у плода вплоть до 34–36–недель гестации. После 6 месяца гестации постепенно появляется уже обыкновенный гемоглобин человека (HbA<sub>1</sub>). Количество фетального гемоглобина экспоненциально снижается параллельно увеличению количества HbA<sub>1</sub> и к моменту рождения составляет, 50–80 % от общего гемоглобина крови. Данное замещение происходит вследствие постепенного снижения синтеза β-цепей глобина и постепенного увеличения продукции β-цепей в ходе эритропоэза в красном костном мозге. В крови взрослого человека на долю HbF приходится не более 1,5% от общего гемоглобина [8, 63].

HbF, как и HbP, устойчив к денатурирующему воздействию щелочей, что используется при его клиническом определении [50, 55]. Благодаря большому сродству антенатальных гемоглобинов к кислороду, эритроциты эмбриона и плода могут поглощать и отдавать кислород при более низком парциальном давлении, чем эритроциты взрослого. Осмолярность кислорода в крови плода примерно в 2 раза ниже, чем у взрослого человека, тем, не менее, высокая тропность HbF к кислороду позволяет обеспечить адекватную оксигенацию тканей плода в условиях физиологической гипоксии. Кроме того, эритроциты, содержащие HbF, обладают повышенной устойчивостью к гемолизу [6, 54, 122, 146, 182, 191-192, 201]. Количественный анализ антенатальных гемоглобинов в крови человека часто используется в клинической практике.

Феномен гетерогенности изоформ гемоглобина широко представлен в живой природе.

Известно, что эритроциты птиц содержат от двух до трех изоформ гемоглобина. По одним данным, выделяют - HbA (основную), составляющую ~70-80% от общего количества гемоглобина, и HbD (минорную), которая характеризуется более высоким сродством к кислороду по сравнению с основной формой [56]. По другим источникам, у высокогорных птиц гемоглобин более

неоднороден, по сравнению с птицами, проживающими на равнинах. Этот факт расширяет норму реакций и создаёт определенные преимущества в приспособлении птиц к условиям высотной гипоксии. Было доказано, что трехфракционный гемоглобин чаще встречается у птиц горных популяций, двухфракционный – у горных и равнинных, а гомогенный гемоглобин больше всего распространен у равнинных видов [26, 114, 158].

Различия изоформ гемоглобина выделены и у других видов животных. В частности, у собаки, лошади, кошки выделяют две изоформы, у рыб и лягушек – от трех до пяти, соотношение которых может варьировать от эмбриональной к постнатальной жизни. У крысы – шесть, по некоторым данным, девять фракций, отличающихся по своей молекулярной структуре [56, 95, 99, 119, 160, 189-190]. В настоящее время ставится вопрос: «Один эритроцит несет в себе несколько изоформ гемоглобина или одну с заданными свойствами и определёнными функциями?» Этот момент до сих пор до конца не исследован и требует тщательной проработки.

Таким образом, гетерогенность гемоглобинов является универсальным явлением в живой природе. При этом разные виды животных отличаются по количественному составу отдельных изоформ гемоглобина, которые изменяются от эмбрионального к постнатальному периоду жизни. Одни изоформы гемоглобина присутствуют постоянно в организме, другие возникают временно или могут появляться в определенные периоды жизни. Вместе с тем, понимание этого феномена пока не получило достаточного объяснения.

### **1.3 – Полифункциональность системы гемоглобинов**

В настоящее время признано, что функции гемоглобина не ограничиваются двумя основными: транспорт кислорода и буферная, а значительно разнообразнее.

В литературе активно обсуждаются эти дополнительные (новые) функции гемоглобина: теплопередача через цикл оксигенации-дезоксигенации, модуляция метаболизма эритроцитов, окисление гемоглобина как начало старения эритроцитов, влияние на генетическую устойчивость к малярии, ферментативная

активность и взаимодействие с лекарственными препаратами, физиологически активными веществами, связывание экзогенных лигандов, роль в сигнале, образование биоактивных сигнальных молекул [105, 111, 125, 189, 194].

Гемоглобины являются уникальными белками, поскольку способны взаимодействовать, как с NO, так и с его метаболитами. Роль NO в организме велика, поскольку он выполняет ряд важнейших функций: является нейромедиатором, вазодилататором, мощным фактором гемостаза, антиагрегантом, регулятором деятельности дыхательной, мочеполовой и других физиологических систем, а также участвует в регуляции микроциркуляции. Эритроцитарный Hb может связывать NO разными способами: по железу гемовой группы с образованием nitrosylHb (гем-[FeIIINO]), по SH-группе Cys $\beta$ 93 с образованием S-nitrosoHb (SNO-Hb) и по той же группе – с образованием динитрозильных комплексов железа (Hb-ДНКЖ). Связанные с Hb S-нитрозотиолы и ДНКЖ являются *формами депонирования оксида азота*, с помощью которых NO защищается от окисления и перемещается с током крови из артериального сегмента кровообращения в венозный, где из-за низкой концентрации кислорода – одного из субстратов NO-синтазы – невозможен эндотелиальный синтез NO. В то же время в венозном сегменте NO может образовываться из нитритов при гипоксии [29].

Топунов А.Ф., Космачевская О.В. описали, что гемоглобины, помимо того, что способны взаимодействовать с низкомолекулярными лигандами (O<sub>2</sub>, CO и NO), могут ещё образовывать прочные комплексы с довольно крупными молекулами, такими как: гетероциклические соединения с атомом азота в гетероцикле, либо с изохинолином и никотиновой кислотой. Гемоглобины способны *формировать комплексы и с алкилизоцианидами и нитрозоароматическими соединениями*. Комплексы с гемоглобинами могут образовывать алкильные радикалы, такие как: метильный, этильный, п-пропильный, трет-бутильный, изобутильный. Гемоглобины могут взаимодействовать с нитрозоароматическими соединениями, например, с нитрозобензолом и нитрозотолуолом. Все эти соединения относят к «необычным» лигандам гемоглобина. Взаимодействие гемоглобина с нитрозобензолом является комплексным, так как лиганд связывается не только с



железом гема, но и с белком. Комплексы гемоглобинов с гетероциклическими соединениями могут образовываться как результат присутствия в окружающей среде токсичных веществ и при связывании некоторых лекарственных препаратов. Например, такие комплексы были обнаружены в крови людей, работающих на химических заводах, как результат их хронического отравления. Однако роль взаимодействия гемоглобинов с нитрозоароматическими, гетероциклическими соединениями и с алкилизоцианидами в настоящее время до конца не ясна [61].

Установлено, что обратимое связывание белков с компонентами мембраны и цитоскелета является одним из *механизмов управления клеточным метаболизмом*. Данный механизм имеет огромное значение для регуляции метаболизма в безъядерных клетках – эритроцитах млекопитающих, где он реализуется за счет перехода гемоглобина в мембраносвязанное состояние. Взаимодействовать с мембранами гемоглобин может в разных лигандных и окислительно-восстановительных состояниях. Через взаимодействие с основным интегральным белком мембраны эритроцита – белком полосы 3 дезоксигенированный гемоглобин в зависимости от кислородных условий изменяет энергетический обмен, морфологию и деформируемость эритроцитов, высвобождение регуляторов сосудистого тонуса – NO и АТФ. Сигнальную функцию выполняют также и продукты окислительной денатурации гемоглобина – необратимые гемихромы. Накапливаясь со временем или в результате окислительного стресса, гемихромы несут информацию о редокс-условиях и продолжительности функционирования эритроцита [2, 129].

Показано, что эритроцитарный гемоглобин *принимает активное участие в общем теплообмене организма*, данный факт о способности гемоглобина транспортировать тепло был отмечен еще в 1937 г. В целом при оксигенации каждая грамм-молекула гемоглобина выделяет ~60 ккал тепла [24, 25], что значительно превышает поглощаемое при дезоксигенации. Обратимость реакции обеспечивается конформационными переходами от R- к Т-состоянию молекулы гемоглобина в цикле оксигенации–дезоксигенации.

Особый прикладной интерес представляет в последние годы значение *селективной индикации этих протеинов как диагностических маркеров*, незаменимых в клинической оценке разнообразных патологических состояний. Данные исследования основаны на иммунохимических методах определения основных типов гемоглобина (гемоглобина A<sub>1</sub>, плодового и эмбрионального). Показан рост продукции HbF при хронических гипоксиях различного генеза. Сходный компенсаторно-адаптивный рост концентрации гемоглобина наблюдается и у людей, проживающих в горах. Значительное повышение продукции плодового гемоглобина отмечено при тяжелых формах героиновой наркомании.

Изначально, до применения иммунохимических методов индикации, сведения о прикладном значении примитивного гемоглобина как клинко-диагностического маркера были довольно немногочисленны. Поскольку продукция HbF полностью ингибирована как у детей, так и у взрослых, следовательно, и интерес к данному белку как диагностическому маркеру был невелик. Однако проведенные дальнейшие исследования с применением иммунохимических методик показали, что статистически значимое повышение концентраций примитивного и плодового гемоглобинов в крови регистрируется при некоторых онкологических заболеваниях красной крови (эритремия, сублейкемический миелоз, острый и хронический лимфолейкоз), что свидетельствует о высоком диагностическом значении этих протеинов как канцероэмбриональных антигенов. Достоверный рост уровня HbF и появление в крови HbF наблюдается при тяжелых гипоксических состояниях новорожденных, сопровождающихся задержкой внутриутробного развития или гемолитической болезнью [31].

Доказано, что гемоглобины могут *взаимодействовать с лекарственными препаратами*. При влиянии лекарственных средств на структурно-функциональные свойства белков отмечаются изменения в структуре ферментов, клеточных мембран, рецепторов и других биополимеров, составляющих молекулярную основу жизни. Детальное исследование взаимодействия лекарств с белками-ферментами и их надмолекулярными комплексами имеет большое

значение для выявления механизмов как лекарственного, так и побочного действия на биосистемы. Гемоглобин является удобной моделью для изучения влияния различных агентов на белки, в частности, на ферменты, так как простетическую группу данного гемопротеида – гем – можно рассматривать как аналог активного центра.

В работах Макеевой Л.В. с соавторами отмечено, что при воздействии галоперидола на гемоглобин нарушений в целостности тетрамерной структуры белка не происходит. В присутствии галоперидола структурным превращениям подвергаются гемовый и глобиновый компоненты молекулы оксигемоглобина [39].

В качестве одного из способов направленного *транспорта лекарственных средств* и наиболее реальным на данный момент выступают форменные элементы крови. Методы модификации свойств клеток крови используются с целью создания внутриклеточного депо препарата и осуществления направленного транспорта, объединены под общим названием «экстракорпоральная фармакотерапия». Клетки крови, нагруженные лекарственным веществом, обозначают термином «фармакоциты». В качестве «фармакоцитов» используют эритроциты, лейкоциты и тромбоциты, обладающие различными транспортными потенциалом и тропностью. Эти системы доставки лекарств более выгодны в связи с их биологической совместимостью. С помощью эритроцитов обеспечивается транспорт лекарств и в ткани лёгких. Для коррекции иммунитета предложено использовать связывание эритроцитами тимических пептидов и глюкокортикоидных гормонов. В онкогематологии эритроциты применяют для переноса L-аспарагиназы, которая при введении в кровь вызывает гибель аспарагиназависимых лейкозных клеток. Другие препараты, например, андромицин, блеомицин, метотрексат, введенные в строму эритроцитов, хорошо себя зарекомендовали при лечении опухолей печени. Описано применение направленного транспорта канамицина в «тенях» эритроцитов для лечения гнойно-воспалительных заболеваний желчных путей и показана его эффективность по сравнению с традиционным введением этого препарата [194].

Таким образом, система гемоглобинов полифункциональна. Эта полифункциональность обусловлена его гетерогенностью.

#### **1.4 – Физические свойства изоформ гемоглобина**

Применив метод электрофореза на различных носителях (на бумаге, агар-агаре, крахмале, ПААГ), можно выделить отдельные фракции гемоглобина. Оказалось, что эти фракции различаются не только по своим функциональным, но и по физическим свойствам.

*Сродство к кислороду.* В сравнении с гемоглобином человека функциональные свойства многообразных вариантов гемоглобина крысы наиболее изучены. Методом электрофореза в ПААГ у крыс выделяют 6 изоформ гемоглобина. Очищенные препараты гемоглобина крысы обладает существенно более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин человека:  $p_{50}$  для гемоглобина крысы составляет 1,57 гПа [15, 29]. Показано, что достоверные отличия между  $P_{50}$  2,4-6 фракций гемоглобина крыс отсутствуют, фракция 3 обладает существенно более высоким сродством к кислороду. АТФ снижает сродство гемоглобина к кислороду для изоформ гемоглобина 4, 5 и 6.

По устойчивости к действию щёлочи гемоглобины крысы распределяются следующим образом: за 1 минуту действия щелочного раствора происходит денатурация 76% белка, а оставшаяся часть его превышает по количеству содержание белковых фракций 5, 6 в препарате; при увеличении времени денатурации до 2 минут сокращается оставшееся количество белка до 18%, что соответствует содержанию фракций 5, 6 в тотальном препарате гемоглобина [56]. Таким образом, наибольшей щелочеустойчивостью обладают изоформы гемоглобина 5, 6.

Исследование воздействия кислоты на препараты гемоглобина показало, что кривые кислотной денатурации для фракций гемоглобина 5, 6 существенно отличаются от других типов гемоглобина. При этом гемоглобин фракций 5, 6 наиболее устойчив к действию кислоты. Опираясь на данные исследования,

Стародуб Н. Ф. применил данный метод для исследования распределения фракций гемоглобина в эритроцитах крыс [55-56].

Mairbäurl H., Weber R.E. в своей работе описали процессы связывания кислорода с гемоглобином с помощью аллостерических регуляторов. Регуляция была обусловлена изменениями аллостерических эффекторов: протонов (H<sup>+</sup>), двуокси углерода (CO<sub>2</sub>), органических фосфатов и хлоридов (Cl<sup>-</sup>) [143-144].

Известно, что большинство разновидностей гемоглобина человека имеют идентичные α-цепи и различаются по другим цепям. К каждой цепи глобина в специфическом участке присоединяется молекула небелковой природы — гемогруппа, или гем. Синтез небелковой гемогруппы контролируется генами, поскольку они кодируют ферменты, обеспечивающие биосинтез гема.

Kakar S. с соавторами показали, что гем-простетическая группа в гемоглобинах чаще всего присоединяется к глобину через координацию одной или двух гистидиновых боковых цепей. Эти белки с одним гистидином, координирующим гем железа, называются «пентакоординатными» гемоглобинами, группа которых представлена гемоглобином эритроцитов и большинством других переносчиков кислорода. Те, у кого есть два гистидина, называются «гексакоординатными гемоглобинами», которые имеют широкое представительство среди эукариот. Координация второго гистидина в гексакоординате Hbs обратима, что позволяет связывать экзогенные лиганды, такие как кислород, монооксид углерода и оксид азота. Исследования последних нескольких лет позволили получить достаточно детальную картину строения и биохимии гексакоординатных гемоглобинов нескольких видов, включая нейроглобин и цитоглобин у животных, а также несимбиотические гемоглобины у растений. Однако четкое понимание физиологических функций этих белков остается неуловимой целью [109, 162].

Суминым М.Н. [56] описано, что у головастика лягушки рода *Rana Catesbiana* можно проследить изменения кислородсвязывающих свойств. Так, головастики длиной 25 мм обладают гемоглобином, величина p<sub>50</sub> которого составляет 4 мм рт. ст., а с длиной 90 мм - 16 мм рт. ст. Данное явление обусловлено

функциональными различиями изоформ, доминирующих на этих этапах. Установлено, что компонент I гемоглобина, превалирующий на ранних стадиях развития головастика, обладает наибольшим сродством к кислороду, чем гемоглобины III и IV, преобладающие позднее.

Проводили оценку функциональных свойств у рыб. В качестве объекта исследования были отобраны два типа японского угря – морской и пресноводный. В ходе исследования было отмечено, что первый тип японского угря (E1) характеризуется повышенным сродством к кислороду:  $p_{50}$  - 2,1 мм рт. ст. (при  $pCO_2$  7 мм рт. ст.,  $T = 20^\circ C$ , кислородная ёмкость равна 2,4 мл  $O_2$  на 100 мл крови), а у второго (E2) - сродство к  $O_2$  почти в 7 раз было ниже по сравнению с HbE<sub>1</sub>. При этом значение  $p_{50}$  составляло 14 мм рт. ст.

Таким образом, появление разных типов гемоглобина, отличающихся по своим функциональным свойствам, имеет приспособительный (адаптивный) характер.

**Полимеризация и протеолиз гемоглобинов.** Широко известно, что в эритроцитах гемоглобин подвергается полимеризации и деградации. Одним из процессов, который может лежать в основе образования различных изоформ гемоглобина, является полимеризация. Благодаря способности некоторых тетрамерных гемоглобинов позвоночных образовывать крупные полимеры, тетрамер гемоглобина можно рассматривать в качестве основной полимерообразующей единицы через образование дисульфидных связей, что довольно часто встречается у млекопитающих, рыб, птиц и рептилий — черепах [93, 105, 121, 163, 170, 196].

Изоформы гемоглобина могут полимеризоваться в эритроците при слипании молекул, образуя длинные волокна и стержни [103, 153]. Например, цепь  $\beta_2$  соединяется с  $\beta_1$ , и этот процесс относительно медленно повторяется, формируя основу для будущей нити. После того как образуется ядро, начинается 2-й процесс, при котором волокна формируются относительно быстро, потому что молекулы присоединяются к уже существующей структуре [51]. Серповидноклеточная

анемия связана с мутантным гемоглобином HbS, который образует полимеры в эритроцитах пациентов. Полимеризация гемоглобина S лежит в основе изменения мембраны эритроцита [132]. Результаты экспериментов с нокаутными серповидно-клеточными мышами, которых излечили путем задержки полимеризации HbS, подтверждают основную роль полимеризации в патогенезе заболевания [161].

Полимеризация гемоглобина происходит одинаково как в растворах, так и в клетках [51]. Формирование волокна проходит 2 основных этапа. На 1-м из них примерно 7 молекул гемоглобина должны собраться вместе, чтобы сформировать ядро, которое будет точкой отсчета для будущего волокна. Феномен полимеризации используется при получении кислородоносителей на основе гемоглобина. В частности, при молекулярной массе тетрамера 64 кДа получают монодисперсные рекомбинантные полимеры человеческого гемоглобина 130 и 260 кДа и пен-тетрамер с молекулярной массой 320 кДа, [76, 148], отличающиеся по вазоактивному действию и способности переносить кислород. При удалении гемоглобина из цитозоля эритроцитов с помощью катионообменной хроматографии в последнем удается обнаружить более 600 разных белков [85].

Протеолиз (деградация) гемоглобина – это процесс разложения белков на более мелкие полипептиды или аминокислоты. Деградация гема, возможно, является эволюционно консервативной реакцией на окислительный стресс. Поскольку, когда клетки подвергаются воздействию свободных радикалов, происходит быстрая индукция экспрессии реагирующего на стресс изофермента гemoоксигеназы-1 (HMOX1), который катаболизирует гем. Таким образом, получается, что клетки должны экспоненциально увеличивать свою способность разлагать гем в ответ на окислительный стресс, но почему это так происходит, пока неизвестно. Вероятно, этот эффект может являться частью цитопротекторного ответа, позволяющего избежать вредных эффектов свободного гема. И в тот момент, когда идет накопление большого количества свободного гема, системы детоксикации (разложения гема) перегружаются, тем самым позволяют гему оказывать свое разрушительное воздействие [1, 201, 202].

Таким образом, многообразные варианты гемоглобина отличаются своими функциональными и физическими свойствами. Благодаря полимеризации и деградации – двум этим важнейшим процессам, могут образовываться различные новые изоформы гемоглобина, поскольку полимеризация - процесс образования высокомолекулярного соединения с различной молекулярной массой путем многократного присоединения молекул низкомолекулярного вещества (мономера, олигомера) к активным центрам в растущей молекуле полимера, где из тетрамера с молекулярным весом 64 кДа можно получить монодисперсные рекомбинантные полимеры человеческого гемоглобина 130 и 260 кДа и пентетрамер с молекулярной массой 320 кДа, которые будут отличаться своим вазоактивным действием и способностью переносить кислород. А распад гемоглобина, начинающийся в макрофагах селезенки, костном мозге и звездчатых клетках печени, наоборот, позволяет удалять старые и поврежденные эритроциты. Общеизвестно, что срок жизни эритроцитов, сухое вещество которых на 90-95% состоит из гемоглобина, составляет 110-120 дней.

### **1.5 - Изменения структурных характеристик гемоглобина**

На данный момент различия между изоформами гемоглобинов по электрофоретической активности и молекулярной массе описаны довольно подробно. Однако остается неясным момент, как они отличаются по своим структурным характеристикам. Последние современные методы исследования, в частности метод спектроскопии комбинационного рассеяния света или RAMAN-спектроскопии, позволили исследователям расширить данные о изменении структурных характеристик гемоглобина.

Федяшкина А. Н., Максимов Г. В. в своей работе [106] описали, что молекула гемоглобина может находиться в двух конформациях – напряженной и расслабленной. Расслабленная конформация связывает кислород в 70 раз быстрее, чем напряженная. Если вероятность перехода от напряженной формы гемоглобина к расслабленной больше, то возрастает сродство гемоглобина к кислороду, и наоборот. Одной из важных причин нарушения кислородтранспортной системы



может быть изменение конформации гемопорфирина гемоглобина и его сродства к кислороду ( $O_2$ ). Используя метод спектроскопии комбинационного рассеяния, авторам удалось выявить изменения конформации гемопорфирина при развитии гипоксии, связанной с разной физической нагрузкой. Они показали, что относительное количество оксигемоглобина в суспензии эритроцитов снижается при слабых и средних интенсивностях физических нагрузок на 3 и 12 % по отношению к контролю, которое восстанавливалось при более длительном воздействии. Способность гемоглобина связывать лиганды (в том числе  $O_2$ ) значительно снижается при слабых и высоких интенсивностях на 42 % по сравнению с контролем. При воздействии средней интенсивности происходит снижение связывающей способности на 27 %. Тем самым установлено, что функциональное состояние крыс при слабой и высокой интенсивности физических нагрузок отражается в способности связывать и отдавать кислород.

Слатинской О.В., Луновой О.Г. с соавторами показано, что при гипоксии меняется конформация гемоглобина за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов, а также выявлены изменения вклада валентных симметричных и ассиметричных колебаний  $CN_2$ - и  $CN_3$ - радикалов аминокислот гистидина (2850, 2860, 2900  $cm^{-1}$ ) и лизина (2880, 2860  $cm^{-1}$ ) [53].

Щупловой Е.А., Фадеевым С.Б. установлено, что продукты жизнедеятельности стафилококков могут вызывать конформационные изменения белковой части гемоглобина, делая для бактерий доступным «порфириновый карман», содержащий собственно гем. Причем стафилококки с высоким уровнем АнтиНвА нарушают белковую структуру гемоглобина в большей степени, чем микроорганизмы с низкими показателями активности. При воздействии бактерий на гемоглобин повышается доля его производного – метгемоглобина, содержащего не двух-, а трехвалентные ионы железа. Неспособность метгемоглобина рыхло и обратимо связывать кислород в конечном итоге может быть одним из факторов развития тканевой гипоксии. При этом штаммы с высоким уровнем АнтиНвА были более «успешны», под их действием доля метгемоглобина увеличивалась до 13%,

тогда как под влиянием стафилококков с низкой АнтиHbA доля метгемоглобина через 6 часов инкубации достигала 10 %, а к 24-м часам снижалась до 4 %. В последнем случае трансформация гемоглобина носит отчасти обратимый характер. Тем самым, спектральный анализ структуры гемоглобина под действием микроорганизмов с разным уровнем антигемоглобиновой активности показал, что продукты жизнедеятельности бактерий способны нарушать конформационную структуру белковой части гемоглобина, а также влиять на гем, увеличивая долю метгемоглобина [72].

Установлено, что изменения структурно-функционального состояния гемоглобина при гестозе наблюдаются в виде увеличения относительного количества оксигемоглобина в эритроцитах, уменьшения относительной способности гемоглобина связывать лиганды, роста относительной способности гемоглобина выделять лиганды, снижения сродства гемоглобина к лигандам, а также повышения уровня колебания метиновых мостиков гемоглобина. Наиболее уязвимыми к изменениям являются показатели: сродство гемоглобина к лигандам и колебания метиновых мостиков гемоглобина. Выявленные изменения структурно-функционального состояния гемоглобина являются отягощающим фактором не только для беременной женщины, но и плода [18].

Показано, что при инфаркте миокарда наблюдаются морфофункциональные изменения эритроцитов, которые проявляются в снижении объема клеток, с одновременным ростом способности всего гемоглобина в пробе связывать лиганды и сродства гемоглобина к лигандам. Конформационные изменения в молекуле гемоглобина проявляются в повышении сродства гемоглобина к кислороду и снижении способности отдавать кислород. Кроме этого, происходящее значительное уменьшение доли оксигемоглобина в эритроцитах венозной крови больных инфарктом миокарда свидетельствует об общей гипоксии [64].

Показано, что при облучении крови дозами 1,2 Дж/см<sup>2</sup> и 6 Дж/см<sup>2</sup> наблюдается дозозависимое изменение конформации гемопорфирина гемоглобина, которое проявляется в снижении относительного количества

оксигемоглобина и увеличении способности гемоглобина связывать и выделять лиганды, в том числе кислород [43].

Однако во всех представленных выше исследованиях не ясно, вызваны ли отличия феноменом изменения только в молекулах гемоглобина или это результат сдвигов в соотношении изоформ гемоглобина.

Таким образом, исследование механизмов структурирования и образования различных новых форм гемоглобина является актуальной задачей как для фундаментальных исследований, так и для практической медицины. Сам метод спектроскопии комбинационного рассеяния света на данный момент оказывается очень перспективным, поскольку позволяет провести оценку изменений соотношений между изоформами гемоглобина, отражающими сдвиги между популяциями эритроцитов в процессе их адаптации к экстремальным воздействиям.

## **1.6 – Формирование неоднородности эритроцитов и изоформ гемоглобина**

Многочисленные данные указывают на тот факт, что межклеточная гетерогенность формируется уже на ранних стадиях дифференцировки клеток, а точнее на уровне клеток, чувствительных к различным ростковым факторам, и обусловлена различиями в содержании рецепторов к хемокинам на клетках-предшественниках. Со стадии полихроматофильного нормоцита, когда клетки уже не делятся и отмечается резкое уменьшение их размеров, содержания хроматина и денуклеация большинства клеток, гетерогенность выражена значительно меньше [21, 87].

То, что каждая клетка обладает своей чувствительностью к эритропоэтину, а часть клеток подвергается апоптозу в кроветворной ткани, формируя «неэффективный эритропоэз», тоже свидетельствует о межклеточной гетерогенности.

Как бы то ни было, такая гетерогенность является критической в плане обеспечения быстрых изменений эритропоэза для оптимизации доставки тканям

кислорода при кровопотере, развитии анемии при почечной недостаточности, под влиянием противовоспалительных цитокинов, в условиях оксидативного стресса и других [7, 12, 23, 32, 45, 65, 67, 98, 101].

В основе формирования гетерогенности может лежать несколько механизмов. Она может формироваться из-за различных пулов эритроидных клеток-предшественников, которые снабжают ретикулоциты различными наборами белков (в том числе и гемоглобинов), которые могут продуцировать только до тех пор, пока механизм синтеза активен до энуклеации. Другой причиной гетерогенности являются возрастные различия между молодыми, зрелыми и стареющими эритроцитами. Третья причина, возникающая на системном уровне, связана с изменениями микро- и макросреды (изменения гормонального и метаболического уровней, воспаление, сдвиговая стрессовая нагрузка, гипертермия и др.). Все три механизма действуют одновременно.

Так, на эритроцитах человека было показано, что включение  $^{59}\text{F}$  во фракцию  $\text{Hb-A}_1$  значительно ниже, чем в компонент  $\text{Hb-A}_0$ . Поглощение  $^{59}\text{F}$  фракцией  $\text{Hb-F}_0$  указывает на синтез фетального гемоглобина после рождения. Фракции  $\text{Hb-A}_1$ ,  $\text{Hb-F}_1$ ,  $\text{Hb-S}_1$  и  $\text{Hb-E}_1$  обладают высокой связывающей способностью по отношению к  $^{51}\text{Cr}$ , а добавление относительно больших количеств хромата натрия к растворам гемоглобина приводит к частичной конверсии среднего компонента  $\text{Hb}$  в соответствующую быстродвижущую фракцию гемоглобина. В этом отношении фракция  $\text{Hb-A}_2$  ведет себя как компонент  $\text{Hb-A}_0$ . Различий в сродстве к кислороду изолированных фракций гемоглобина  $\text{Hb-A}_2$ ,  $\text{Hb-A}_0$ ,  $\text{Hb-F}_1$ ,  $\text{Hb-F}_0$  нет, в то время как  $\text{Hb-A}_2$  показывает повышенное сродство к кислороду. Сделан вывод, что компонент  $\text{Hb-A}_1$ , а также компоненты  $\text{Hb-F}_1$ ,  $\text{Hb-S}_1$  и  $\text{Hb-E}_1$  образуются *in vivo* в результате изменений в соответствующей молекуле гемоглобина, а количество этих фракций зависит от возраста циркулирующих эритроцитов. Свойства, наблюдаемые для компонента  $\text{Hb-A}_2$ , подтверждают гипотезу о том, что эта фракция гемоглобина является биологической единицей со своими собственными характеристиками [150].

### *Содержание различных изоформ гемоглобина в отдельном эритроците.*

Важным представляется вопрос о количестве изоформ гемоглобина в одном эритроците. Данных по этому вопросу в настоящее время довольно немного.

В работах Brazhe N.A., Abdali S. с соавторами описаны 2 популяции гемоглобина в эритроцитах: субмембранная и цитозольная, каждая из которых отличается по конформации молекул гемоглобина [90].

Большое значение в последнее время приобрело исследование мембраносвязанного гемоглобина в норме и при патологических состояниях. Показано, что гемоглобин способен связываться с мембраной и с белками цитоскелета. Образование связи гемоглобина с мембраной эритроцита происходит путем электростатического взаимодействия, дисульфидных связей и гидрофобных взаимодействий, причем этот процесс связывания может быть как обратимым, так и необратимым. Основным местом связывания гемоглобина с мембраной является интегральный белок полосы 3, который является  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  анионообменником и участником в регуляции транспорта кислорода и сопряжении данного процесса в ферментном ансамбле гликолиза. Считается, что дезоксигемоглобин проявляет высокое сродство к белку полосы 3. К примеру, в условиях гипоксии повышение концентрации дезоксигемоглобина способствует диссоциации N-концевого домена белка полосы 3 и ферментов гликолиза, что впоследствии приводит их в растворимое активное состояние. Тем самым, отмечается активация гликолиза с увеличением синтеза АТФ при уменьшении интенсивности пентозофосфатного пути. В механизме высвобождения АТФ из красных клеток крови основную роль отводят мембраносвязанному гемоглобину [128]. Показано, что уровень мембранного связанного гемоглобин возрастает у беременных на фоне развития анемии хронического воспаления, однако при хронических воспалительных заболеваниях данный показатель остается в норме [195].

## **1.7 – Роль гетерогенности системы гемоглобинов в процессе адаптации организма к действию различных экстремальных факторов**

Роль гемоглобина в адаптации организма к гипоксии может быть связана с изменениями его количества, свойств в результате мутаций и соотношения между изоформами. Значение каждого из этих путей определяется тем, является ли низкое содержание кислорода показателем естественной среды обитания, к примеру, высокогорья, или действует ограниченное время, а также величиной гипоксии и видом животного.

Возникает вопрос о физиологическом значении гетерогенности системы гемоглобинов. Можно выделить два типа организмов: животные, для которых гипоксические условия являются постоянной средой обитания или возникают при патологических процессах, и животные, которые в процессе своей жизни резко перемещаются из условий гипероксии в условия гипоксии и обратно. Если в первом случае адаптация связана с активацией образования эритроцитов и гемоглобинов, соответствующих этим условиям (эритропоэзом), то во втором этот механизм малоэффективен.

У животных, естественная среда обитания которых характеризуется низким содержанием кислорода – высокогорье, эволюционное увеличение сродства гемоглобина к кислороду может быть связано с мутациями аминокислот, которые увеличивают собственно сродство белка к  $O_2$ , и/или мутациями, которые подавляют чувствительность Hb к ингибирующему действию аллостерических кофакторов в эритроцитах, таких как  $Cl^-$  ионы и органические фосфаты. У млекопитающих эволюция повышения сродства гемоглобина к кислороду у высокогорных популяций шла как в направлении изменения собственно аффинности белка к  $O_2$ , так и, в ряде случаев, в направлении снижения чувствительности к действию анионов. У птиц эволюция сродства гемоглобина к кислороду шла в направлении повышения аффинности независимо от аллостерической регуляции. При этом у птиц отмечается сильная положительная

связь между сродством гемоглобина к кислороду и высотой обитания, в то время как у млекопитающих эта корреляция весьма неоднозначна [188].

Суминым М.Н. [56] в работе «Гетерогенная система гемоглобина в условиях нормального и измененного эритропоэза» было показано, что при переходе организма из обычных условий обитания в гипоксические наблюдается его перестройка (адаптация). Огромную роль в данном случае играет смещение соотношения изоформ гемоглобина в сторону видов с большим сродством к кислороду.

В условиях стимуляции эритропоэза при кровопотере и гипоксии наблюдались изменения гемоглобинового профиля уже в первые шесть часов, в то время как при гипероксии - только после седьмого сеанса. На основании направленности изменений гемоглобинового профиля были выявлены кислородзависимые фракции: в большей степени - пятая и шестая белковые фракции гемоглобина, а в меньшей - первая. Доля пятой и шестой фракций гемоглобина в циркулирующей крови возрастала при гипоксии различного генеза и снижалась при гипероксии. Первая фракция в гипоксических условиях практически не изменялась, уменьшалась при кровопотере, возрастала при длительной гипероксии. Причём в последнем случае имеет место и абсолютное увеличение содержания этой фракции. Изменения процентного содержания второй фракции гемоглобина имеют следующие особенности: первоначально показатель снижается независимо от вида воздействия, а затем повышается, достигая исходной величины, либо превышая её. Третья и четвёртая изоформы достаточно резистентны к используемым экстремальным факторам. Их изменения наблюдаются только при гипоксической гипоксии. Доля четвёртой фракции снижается лишь после седьмого сеанса, а третьей - уже после первого. Описанные изменения гемоглобинового профиля при экстремальных воздействиях позволяют поставить вопрос о физиологическом смысле наблюдаемых явлений.

Исследование изменений структуры гемоглобина в экстремальных условиях Арктики приводились учеными из Новосибирска. Они изучали электронные характеристики – сопряженной (ароматической) простетической группы-гема и

содержание элементов вторичной структуры глобина в Hb. Гем и глобин связаны между собой ван-дер-ваальсовыми силами. Ими обнаружен сдвиг полосы поглощения гема  $417 \pm 0,5$  нм в коротковолновую область на 8-10 нм у народов, проживающих в Арктике на разных широтах (ш) (Ямал, 64 и 70° с.ш.), по сравнению с жителями средних широт (Новосибирск, 55° с.ш.), свидетельствующий об увеличении упорядоченности структуры гема по мере повышения широты проживания населения. Изучение содержания элементов вторичной структуры с помощью ИК-Фурье спектроскопии показало увеличение упорядоченности гемоглобина у жителей в экстремальных условиях Арктики по мере повышения широты. Учитывая полученные результаты, можно заключить, что сродство Hb к кислороду у жителей Арктики выше, чем у жителей средних широт. Причина изменения структуры Hb и сродства к кислороду у жителей Арктики, скорее всего, обусловлена гелиофизическими факторами [34].

При кратковременной (однократной) гипоксии сложно ожидать быстрого изменения соотношения между изоформами, и адаптация обеспечивается изменением количества гемоглобина за счет поступления в кровь депонированных эритроцитов и активации нормобластического кроветворения.

Гемоглобин играет заметную роль в защитных реакциях организма. CD163 — скавенджер рецептор гемоглобина экспрессируется в системе моноцит-макрофаг в наибольшей степени на «альтернативно активированных» макрофагах, играющих важную роль в подавлении воспалительной реакции. Опосредованный CD163 эндоцитоз гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов, образующихся при гемолизе эритроцитов, приводит к лизосомальной деградации белка-лиганда и метаболизму гема с участием цитозольной гем-оксигиназы. Этот механизм, наряду с повышением экспрессии гаптоглобина, CD163 и гемоксигеназы-1, регулирует воспаление по меньшей мере двумя путями: 1 — через связанные с CD163 сигнальные пути стимулирует секрецию противовоспалительных цитокинов и 2 — метаболиты гема сами обладают мощным противовоспалительным действием. Кроме того, слушивание CD163 с клеточной мембраны под влиянием воспалительных стимулов приводит к



повышению в плазме растворимого рецептора, участвующего в подавлении иммунитета. Дифференцировка моноцитов крови человека в макрофаги как *in vitro*, так и *in vivo* приводит к увеличению экспрессии CD163. Глюкокортикоиды активируют поляризацию моноцитов в M2/альтернативно активированный фенотип, экспрессирующий CD163.

Повышение уровня CD163 отмечено также на циркулирующих моноцитах у кардиохирургических пациентов при выполнении операции искусственного кровообращения. Связывание гемоглобин: гаптоглобинового комплекса с CD163-несущими клетками вызывает мощную секрецию интерлейкина-10, которая может быть ингибирована анти-CD163 антителом RM3/1. Высвобождение интерлейкина-10, в свою очередь, индуцирует синтез белка стресса гемм-оксигеназы-1 через аутокринный механизм. Такая индукция гемм-оксигеназы-1 наблюдается *in vivo* через 24–48 ч после начала операции искусственного кровообращения [166].

Показано, что CD163 обнаружены и на нейронах при кровоизлияниях в мозг. При гипоксии в клетках глиобластомы возрастает содержание эмбрионального, фетального и взрослого гемоглобинов [102]. Полимеризованный бычий гемоглобин восстанавливает сердечно-сосудистую и почечную функции при эндотоксиноиндуцированном шоке у крыс [117]. Инъекция гемоглобин-ассоциированных белков сыворотки крови, выделенных от животных, несущих опухоль — саркому Эрлиха, приводит к регрессии опухоли [100]. Существует множество нозологических форм, при которых имеет важное значение не только изменение количества общего гемоглобина крови, но и отдельных его типов, изменение соотношения которых в клинической практике используют для диагностики различных патологических состояний [4, 135].

Доказано, что семейные - высокие и низкие значения HbF наследуются. Показан рост продукции HbF при хронических гипоксиях различного генеза [31]. Содержание гемоглобина HbF достоверно изменяется при талассемиях, анемиях, патологии новорожденных, гипоксических состояниях, онкогематологии, заболеваниях легких и ожоговой болезни. Значительное повышение продукции

плодового гемоглобина отмечено при тяжелых формах героиновой наркомании, преждевременной отслойке плаценты, угрозе прерывания беременности. Значительное снижение уровня HbF обнаружено у новорожденных с синдромом Дауна, у больных с различными типами эритробластозов, с лимфогрануломатозом, сфероцитарной гемолитической анемией, тромбоцитопенической пурпурой. Статистически значимое повышение концентрации примитивного гемоглобина HbP в крови регистрируется при некоторых онкологических заболеваниях красной крови (эритремия, сублейкемический миелоз, острый и хронический лимфолейкоз), при тяжелых гипоксических состояниях новорожденных, сопровождающихся задержкой внутриутробного развития или гемолитической болезнью [9, 10, 30].

При серповидноклеточной патологии механически хрупкие, плохо деформируемые эритроциты способствуют нарушению кровотока и другим проявлениям патологии. Считается, что в основе радикального изменения формы эритроцитов при низком содержании кислорода, неспособности их правильно деформироваться и проходить через микроциркуляторное русло лежит полимеризация HbS. В дополнение к изменению формы образование полимеров HbS вызывает механическое напряжение на мембране эритроцитов, что приводит к ее изменению, а также потере материала мембраны, о чем свидетельствует увеличение циркулирующих микрочастиц эритроцитов.

На кинетику полимеризации HbS влияют HbA<sub>2</sub> и фетальный Hb (HbF). Известно, что у людей сохранение экспрессии HbF плода во взрослом возрасте улучшает патологические эффекты серповидноклеточной анемии [78, 159]. В крови больных серповидноклеточной анемией выявляются эритроциты как с низким, так и высоким содержанием фосфатидилсерина. Первая группа включает в себя много молодых трансферрин-рецептор-позитивных клеток (TfR+). Плотные серповидные клетки 2 группы имеют более низкий процент фетального гемоглобина [203].

Адаптация организма при развитии воспалительной реакции довольно обширно изучается в настоящее время. Показано, что при хронических

воспалительных процессах, продолжающихся более 1 месяца, наблюдается снижение гемоглобина до 110-90 г/л, и были указаны причины происхождения анемий: 1) блокада перехода железа из ретикулоэндотелиальных клеток в эритробласты костного мозга; 2) увеличение расходов железа на синтез железосодержащих ферментов и, соответственно, уменьшение количества железа, идущего на синтез гемоглобина; 3) укорочение продолжительности жизни эритроцитов, обусловленное усилением активности клеток ретикулоэндотелиальной системы; 4) нарушение выделения эритропоэтина в ответ на анемию при хроническом воспалении и, как следствие этого, снижение эритропоэза; 5) снижение всасывания железа при лихорадке.

Адаптация организма при развитии стресс-реакции описана у Папаян А.В. и Л.Ю. Жуковой [44]. Они показали, что тяжелые стрессы могут вызвать апластическую анемию, которая чаще нормохромная и макроцитарная, число ретикулоцитов снижено, концентрация гемоглобина может падать до 20 - 30 г/л. В ряде случаев отмечается повышение уровня фетального гемоглобина и эритропоэтина (поскольку продукция эритроцитов резко снижена, то либо существует ингибитор эритропоэтина, либо костный мозг к нему нечувствителен). СОЭ обычно увеличена до 40-60 мм/ч.

Хронический стресс способен вызывать ускорение старения эритроцитов [41].

Тихомировой И.А. с соавторами описано [58] исследование по изучению особенностей адренореактивности организма и функциональных свойств эритроцитов человека при адренергических воздействиях в норме и при разных формах патологии. В состоянии нормы выявлена [58] максимальная адренореактивность организма, что выразилось и в максимальном повышении степени агрегации под влиянием катехоламинов.

При травматическом шоке наблюдалось достоверное уменьшение числа эритроцитов, общего содержания гемоглобина и увеличение показателя агрегации красных клеток крови (соответственно 91 % и 123 % от исходной величины) [41].

Согласно данным Vitrichenko E.E. [197], нейропсихический стресс является

одним из лидирующих факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Изучение влияния стресса на состояние эритроцитов представляется интересным, т.к. нарушение их функций, задействованных в процессе газообмена, влечет за собой изменения всех параметров метаболизма. Исследования проводились на крысах, и было выявлено, что нервный стресс увеличивает интенсивность окисления свободных радикалов на липидном слое мембран. Кроме того, стресс различной продолжительности имеет устойчивое влияние на параметры эритроцитов: хотя не было выявлено заметных изменений в общем объеме эритроцитов (исходя из показателей гематокрита), увеличивалась концентрация гемоглобина. Наиболее заметное увеличение происходило после 1 порции стресса (со 130 г/л до 141 г/л). В дальнейшем увеличение становилось менее сильным.

Ройтман Е.В. с соавторами исследовали [47] осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) у пациентов с органической патологией сердечно-сосудистой системы вследствие влияния полиморфного стресса, создаваемого операцией с искусственным кровообращением. Величина ОРЭ различалась в зависимости от исходной патологии, однако в целом не выходила за пределы значений, считающихся нормальными. Одновременно установлено, что ОРЭ в артериальной крови во всех наблюдениях на 20-25 % достоверно ниже, чем в венозной. Обращают на себя внимание различия в поведении ОРЭ в зависимости от температуры (проведение холодной перфузии и глубокой гипотермии). При температуре ниже 27-28°C ОРЭ оставалась стабильно низкой, однако при повышении температуры отмечался выраженный рост устойчивости эритроцитов к осмотическому стрессу.

Полученные данные свидетельствуют, прежде всего, о выраженной зависимости регуляции ОРЭ от температуры. По-видимому, температуру 27-28°C можно рассматривать как необходимое условие клеточного гомеостаза для формирования устойчивости эритроцитов человека к осмотическому стрессу, температуру 28°C – критической для удовлетворительного функционирования реакций регуляции ОРЭ [47]. При сохранении в течение недели стрессовых

условий, стимулирующих эритропоэз, 5,7–57 % клеток приобретают новые признаки в результате перестройки эритропоэза.

Виды животных, которые в процессе жизни претерпевают резкие изменения от гипероксигенации до тяжелой гипоксии, такие как радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) [104] или белоголовый сип Рюппеля (*Gyps guerepelli*), который был замечен на высоте 37000 футов (11277,6 м) при столкновении с самолетом [134], постоянно обладают несколькими вариантами гемоглобина, что не требует перестройки эритропоэза. Цепи гемоглобина А и D присутствуют в эритроцитах грифов, производя варианты гемоглобинов с высоким и низким сродством к кислороду и позволяют этим уникальным птицам летать на высоте более 10000 метров без необходимости запуска каких-либо сложных адаптивных процессов при приземлении.

Взрослые люди имеют гораздо более низкую адаптационную способность, обладая, как правило, одним вариантом гемоглобина, HbA с некоторыми незначительными добавками HbF.

Таким образом, кровь, при общей тенденции к сохранению постоянства своего морфологического и химического состава, в то же время является одним из наиболее чувствительных показателей изменений, происходящих в организме под влиянием различных физиологических состояний и экстремальных воздействий. Гетерогенность эритроцитов сочетается с гетерогенностью гемоглобина. Роль системы гемоглобинов в процессе адаптации организма к действию различных экстремальных факторов требует дальнейших исследований.

## ГЛАВА 2 – МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных

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.).

Крыс содержали в условиях обычного вивария, где они получали стандартный рацион в соответствии с Межгосударственным стандартом ГОСТ 33216-2014. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». В поилках и кормушках крыс была постоянно чистая вода и свежий корм - комбикорм для лабораторных животных (крыс, мышей) Дельта Фидс, ЛБК 120 С-19 (БиоПро, Россия). Дезинфекцию клеток осуществляли 1 раз в неделю, в остальные дни проводили их санитарную обработку. Всех животных содержали в условиях комнатной температуры ( $T = 23-24^{\circ}\text{C}$ ). В каждой клетке находилось по 5-6 голов. В качестве подстилки использовалась крупная стружка. Для исследования и проведения экспериментов отбирались только здоровые животные, которые хорошо питались, пили воду, были спокойны и адаптированы к условиям жизни в лаборатории.

В ходе проведения исследовательской работы всех животных делили на 4 экспериментальные группы. 1 группа – интактные животные ( $n=16$ ), 2 группа – острая массивная кровопотеря ( $n=34$ ), 3 группа – острое асептическое воспаление ( $n=32$ ), 4 группа – иммобилизационный стресс ( $n=21$ ). Выведение животных из

эксперимента проводили путем подачи наркоза крысам по следующей схеме: за 15 мин до основного наркоза с целью премедикации крысам внутримышечно вводили Ксилазин (препарат Ксила) в дозе 0,1 мл/ 100 г массы тела животного, затем через 10 мин вводили «Zoletil 100» в дозе 0,03 мл/ 100 г массы тела животного.

## **2.2 – Моделирование острой массивной кровопотери**

Острую массивную кровопотерю у крыс вызывали кровопусканием из хвостовой вены из расчета 2,5 % от массы тела животного. Анализ показателей проводили на сроки: 30 минут, 6 часов и 2 сутки после экстремального воздействия [73, 74].

## **2.3 – Моделирование острого асептического воспаления**

Воспаление вызывали однократным введением 0,5 мл скипидара под кожу спины крыс. Скипидарное воспаление было выбрано для наших исследований как легко воспроизводимая, точно дозируемая и безопасная для исследователей классическая модель острого локального асептического воспаления с выраженной клеточной реакцией [73, 177]. После инициирования воспалительного процесса у крыс проводили забор материала и исследовали показатели на 6 часов, 2 сутки и 4 сутки.

## **2.4 – Моделирование иммобилизационного стресса**

Иммобилизационный стресс проводили однократно, привязывая животных к предметному столику за лапки, в положении лежа на спине и удерживали на протяжении 6 часов (Экспериментальная модель Г. Селье) [180]. Анализ показателей проводился спустя 6 часов и 2 сутки после нервно-мышечного напряжения.

## **2.5 – Оценка гематологических показателей экспериментальных животных**

Для исследования показателей периферической крови проводили забор из хвостовых сосудов крыс V=1 мл. С помощью гематологического анализатора Celly 70 Biocode Nysel (Франция) делали общий анализ крови. Кровь помещали в

специальные пробирки, обработанные  $K_3$ ЭДТА в качестве антикоагулянта. Геманализатор Celly 70 Biocode Hysel позволил охарактеризовать кровь по 18 показателям: WBC, Г/л; Lym, Г/л; Mid, Г/л; Grn, Г/л; Lym, %; Mid, %; Grn, %; RBC, Т/л; Hb, г/л; Hct, %; MCV, фл; MCH, пг; MCHC, г/л; RDW, %; Plt, Г/л; Pct, %; MPV, фл и PDW, %.

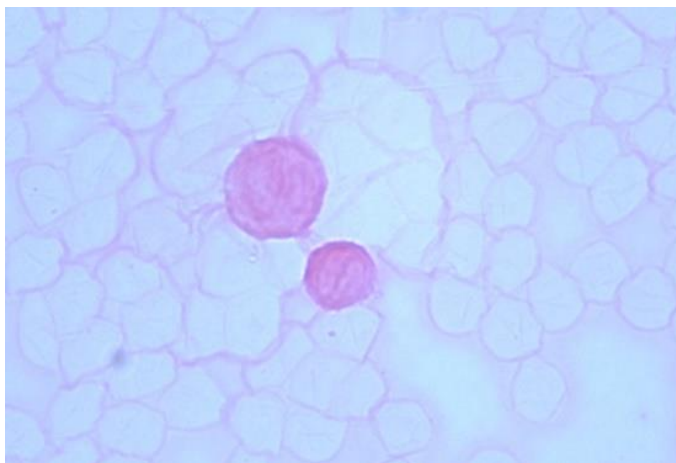
## **2.6 – Исследование содержания эритроцитов, несущих фетальные изоформы гемоглобина (метод Betke-Kleihauer)**

Для исследования содержания эритроцитов, несущих фетальные формы гемоглобина, готовили следующие растворы: 1) цитратно-фосфатный буфер (рН=4.5), получаемый при смешивании 25 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты (21,01 г лимонной кислоты доводили до 1 литра дистиллированной водой) и 12 мл 0,2 М раствора гидрофосфата натрия двузамещённого  $-Na_2HPO_4$  (35,6 г  $Na_2HPO_4$  доводили дистиллированной водой до 1 литра). 2) 1% раствор эозина. 3) 80% этиловый спирт.

Свежеприготовленные мазки крови фиксировали в этиловом спирте в течение 5 минут. Промывали дистиллированной водой и высушивали. Затем препараты погружали на 5 минут в прогретый до 37 °С цитратно-фосфатный буфер, периодически помешивая раствор стеклянной палочкой для удаления пузырьков воздуха. После инкубации мазки ополаскивали дистиллированной водой и высушивали фильтровальной бумагой. Затем мазки на 2 минуты помещали в 1% раствор эозина. Далее тщательно промывали в проточной воде и смотрели под микроскопом (*рисунок 3*).

При микроскопии чётко выявляли эритроциты, несущие кислотоустойчивые (фетальные) изоформы гемоглобина. Они имели ярко розовую окраску. Клетки с разрушенным гемоглобином имели вид «теней» эритроцитов. Подсчёт клеток, содержащих устойчивые к кислоте фракции гемоглобина, производили на 1000 клеток, выражали в процентах (%). Затем вели пересчет на общее количество красных клеток, получая результат в абсолютных величинах (Г/л).





**Рисунок 3 – Эритроциты, несущие кислотоустойчивые (фетальные) изоформы гемоглобина**

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

### **2.7 – Исследование содержания ретикулоцитов**

Для выявления ретикулоцитов производили окрашивание свежих мазков крови бриллиантовым крезиловым синим. Подсчет содержания ретикулоцитов производили на 1000 клеток, затем выражали в процентах. Далее пересчитывали на общее количество красных клеток крови, получая результат в абсолютных величинах (Г/л).

### **2.8 – Исследование диаметров эритроцитов, ретикулоцитов и эритроцитов, несущих кислотоустойчивые (фетальные) изоформы гемоглобина**

Для определения диаметров эритроцитов, ретикулоцитов и эритроцитов, несущих кислотоустойчивые (фетальные) изоформы гемоглобина (F-клетки), готовили мазки цельной крови. Часть мазков оставляли неокрашенными (в них определяли диаметры у эритроцитов), а вторую часть мазков крови окрашивали согласно их методикам выявления ретикулоцитов и F-клеток. Далее проводили измерения диаметров эритроцитов, ретикулоцитов и F-клеток с помощью программы ВидеоТест «Морфология 5.0» (Видеотест, Россия) [16], подсчитывая их количество в единице площади в двадцати полях зрения при увеличении x1000, показатель выражали в мкм.

## 2.9 – Исследование соотношения изоформ гемоглобина крыс методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

С целью определения соотношения между фракциями гемоглобина крыс использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле, предложенном Г. Маурером [40].

*Приготовление гемолизата.* Забор крови на исследование у крыс производили при разрезании брюшной аорты. Для приготовления гемолизата периферическую кровь разводили изотоническим раствором NaCl в отношении 1:3, затем центрифугировали 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Разведение и центрифугирование проводили трехкратно. Для осуществления гемолиза к клеткам добавляли дистиллированную воду, а через 5 минут - хлороформ в соотношении 1:1, встряхивали в течение 1 минуты и центрифугировали 5 минут при 3000 оборотов. Смесь разделялась на три слоя: нижний – хлороформ, средний – разрушившиеся эритроциты и верхний – гемолизат. К гемолизату добавляли глицерин в отношении 1:1 и использовали для проведения электрофореза.

Для приготовления гемолизата костного мозга брали бедренные кости у крысы, затем выдували при помощи трубки и груши в эппендорф. Далее разводили полученную массу в соотношении 1:1 в физиологическом растворе. Центрифугировали в течение 15 мин на 3000 оборотах, затем полученную взвесь клеток еще 2 раза отмывали, потом собрали верхнюю часть – гемолизат. Добавляли к гемолизату глицерин в соотношении 1:1 и прогоняли через электрофоретическую решетку. После разгонки фракций проводили окраску бензидином для более четкого разделения белков.

Работа выполнена на оборудовании и реактивах фирмы "Bio-Rad" (Венгрия). Для электрофореза гемоглобина была использована система гелей № 1 по Г. Мауреру [40]. Сборку гелевой ячейки проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к оборудованию. Выбор спейсеров и толщины стенок камеры осуществлялся с целью достижения толщины геля 1,5 мм. При данной толщине геля имело место наиболее качественное разделение гемоглобина у крыс.

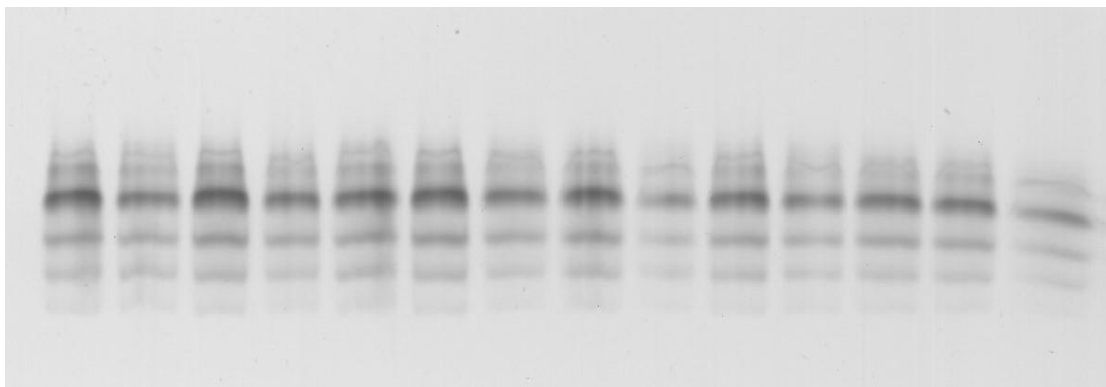
**Приготовление разделяющего геля.** Для приготовления разделяющего геля готовили растворы: Раствор № 1. 1н HCl 48,0 мл, Трис (гидроксиметил) аминметан 36,6 г, тетраметилэтилендиамин (ТМЭД) 0,23 мл; Раствор № 2. Акриламид 30,0 г, метиленбисакриламид 0,8 г; Раствор № 3. Персульфат аммония 0,14 г. Все растворы готовились из расчёта на 100 мл. Соотношение растворов в смеси: 1 часть №1, 2 части №2, 1 часть воды, 4 части №3. pH разделяющего геля 8,9.

Приготовленную смесь заливали в герметично собранную гелевую ячейку до уровня, соответствующего 2 см от верхнего края передней стенки ячейки. Сверху залитой смеси осторожно с помощью фильтровальной бумаги и инсулинового шприца наслаивали воду. Слой воды над раствором обеспечивал формирование чёткой верхней границы геля, а также препятствовал доступу кислорода, обладающего способностью ингибировать полимеризацию. Далее ячейку со смесью оставляли на 40 минут на ровной поверхности в вертикальном положении. Этого времени достаточно для полной полимеризации и образования полиакриламидного геля. Избыток персульфата аммония отрицательно сказывался на качестве деления, а длительное хранение данного катализатора вызывало необратимые химические изменения, снижающие его активность.

**Приготовление концентрирующего геля.** Для приготовления концентрирующего геля готовили растворы: Раствор №4. 1н HCl 48,0 мл, трис (гидроксиметил) аминметан 5,98г, тетраметилэтилендиамин 0,46 мл; Раствор № 5 Акриламид 10,0 г, метиленбисакриламид 2,5 г; Раствор № 6 Рибофлавин 4,0 мг; Раствор № 7 Сахароза 40,0 г. Все растворы готовили из расчёта на 100 мл. pH концентрирующего геля 6,9. Все растворы хранили в сосудах из тёмного стекла в холодильнике не более, чем 1 месяц. Раствор № 7 обновляли каждые 3-4 дня. Соотношение растворов в смеси: 1 часть № 4, 2 части № 5, 1 часть № 6, 4 части № 7. Данную смесь наслаивали на готовый разделяющий гель до верхнего края передней стенки ячейки, сверху помещали "гребёнку" для формирования в геле отсеков для нанесения образцов. Затем проводили полимеризацию под действием ультрафиолетовых лучей в течение 30 минут.

**Приготовление электродного буфера.** Маточный раствор готовили из расчёта на 1000 мл: трис (гидроксиметил) аминметан 6,0 г, глицин 28,8 г. В качестве электродного буфера использовали 10% водный раствор, рН 8,3. Верхний и нижний электродный буфер хранили в холодильнике в отдельных сосудах из тёмного стекла неограниченно долго. После каждой процедуры разгонки буфер сливали обратно. При этом каждый буфер использовали в строго своей электродной камере (верхний - в верхней, нижний - в нижней).

**Проведение электрофореза.** Ячейку помещали между электродными камерами, куда заливали верхний и нижний электродный буферы соответственно. В лунки геля наносили образцы. Электроды устанавливали так, чтобы в верхнем электродном буфере располагался катод, а в нижнем - анод, поскольку гемоглобин по своей природе является полианионом. Это обеспечивало движение образца от катода к аноду. В электродные отсеки помещали систему трубок, по которым протекала холодная водопроводная вода, обеспечивая охлаждение системы. Электрофорез проводили в одной гелевой ячейке (конструкцией прибора предусмотрено использование двух ячеек). После полной подготовки системы к работе устанавливали силу тока 10 мА на время вхождения образца в концентрирующий гель, а затем 50 мА в течение 1 часа, что соответствовало нахождению полосы маркерного красителя (бромфеноловый синий 0,001%, добавленный в верхний электродный буфер) в нижней трети разделяющего геля. 1 часа разделения достаточно для получения чётко интерпретируемой электрофореграммы, а более длительная разгонка приводит к размыванию полос. После отключения источника питания электродные буферы сливали в сосуды, извлекали гелевую ячейку и отслаивали от геля переднюю стенку. Для лучшей диагностики проводили окрашивание полос бензидиновым раствором (смешивали 0,025 г основного бензидина и 0,1 г перекиси бария, перед исследованием добавляли 5 мл 50%-ного раствора уксусной кислоты и взбалтывали до полного растворения бензидина) (рисунки 4).



**Рисунок 4 – Электрофореграмма костного мозга крыс**

*Примечание:* Окраска бесцветных полос костного мозга бензидином.

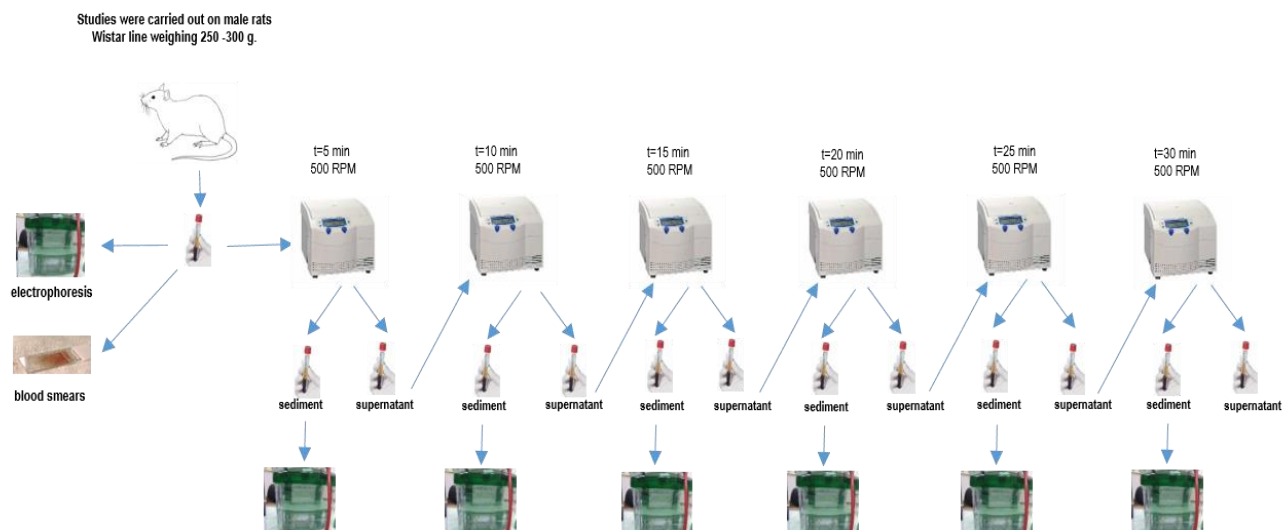
Электрофореграмму подвергали моментальному сканированию и денситометрической обработке. Соотношение фракций выражали в процентах, а затем пересчитывали в абсолютные величины, исходя из общего количества гемоглобина крови и костного мозга (г/л). Общее количество гемоглобина определяли в гемолизате костного мозга с помощью спектрофотометрического гемиглобинцианидного метода Д. Дробркина [20].

#### **2.10 – Разделение эритроцитов крыс методом фракционного центрифугирования**

Из хвостовой вены наркотизированных крыс забирали кровь в объеме 6 мл. 1 мл цельной крови использовали для проведения общего анализа и определения фракций гемоглобина. Оставшуюся кровь использовали для разделения эритроцитов на фракции. Для этого 5 мл цельной крови разводили физиологическим раствором для внутривенных инъекций (производство Solopharm ООО Гротекс, Россия) в соотношении 1:1 и центрифугировали на центрифуге Sigma 3R30 (Россия) в течение 5 мин (1-я проба) при 500 об/мин (RCF=19,56g). Полученный осадок разводили физиологическим раствором до объема 0,5 мл и прогоняли через гематологический анализатор. Надосадочную жидкость доводили до 10 мл и повторно центрифугировали при 500 об/мин (RCF=19,56g), и так же, как и осадок, проводили измерения на гематологическом анализаторе Celly 70 фирмы Biocode-Nucel (Франция) в каждой пробе. Процедуру повторяли 6 раз, увеличивая

время центрифугирования для каждой последующей пробы: 2-я проба – 10, 3-я проба – 15, 4-я – 20, 5-я – 25 и 6-я проба – 30 минут (рисунок 5). После шестого центрифугирования эритроциты в надосадочной жидкости не выявлялись.

Таким образом удавалось разделить эритроциты на 6 фракций.



**Рисунок 5 – Схема разделения эритроцитов на фракции**

Для определения изоформ гемоглобина готовили гемолитат из периферической крови (по- Г. Мауреру). К полученному гемолитату добавляли равный объем 50%-ного раствора глицерина и содержали в холодильной камере при температуре 3-5<sup>0</sup> С. Данные образцы могли храниться в течение 2 недель.

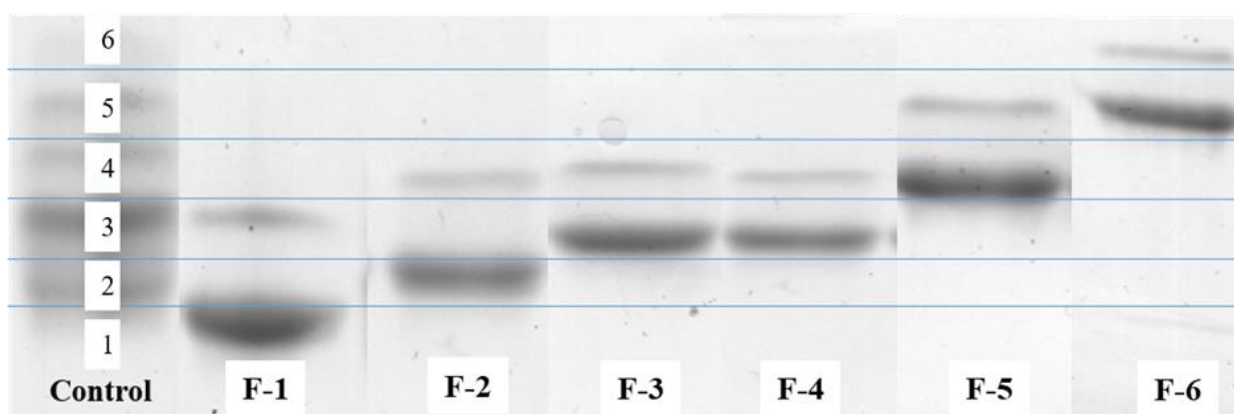
Для определения соотношения между белковыми фракциями гемоглобина использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по – Мауреру [40]. Электрофорез осуществлялся в ПААГ 10%-ной концентрации с помощью оборудования фирмы Bio-Rad (США).

В лунки геля вносились образцы в количестве 200 мкл на 1 лунку. Для точного определения молекулярных масс в первую лунку вносился 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 гемолитата.

После завершения электрофореза проводили окрашивание полученных полос бензидином.

Далее сканировали электрофореграмму и обрабатывали с помощью программы Image Lab 6.0.1. фирмы Bio-Rad (США), определяющей как соотношение отдельных изоформ гемоглобина, так и его молекулярную массу (рисунок 6).



**Рисунок 6 – Разгонка белковых фракций гемоглобина в норме и после фракционного центрифугирования**

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

## **2.11 – Исследование изоформ гемоглобина в эритроцитах крыс методом спектроскопии комбинационного рассеяния света**

Забор крови осуществляли из хвостовой вены наркотизированных животных в объеме 5 мл. Периферическую кровь использовали для разделения эритроцитов на фракции. Для этого 5 мл цельной крови разводили физиологическим раствором (производство Solopharm ООО «Гротекс», Россия) в соотношении 1:1 и центрифугировали с помощью центрифуги Sigma 3R30 (Россия) в течение 5 минут (1-я проба) при 500 об/мин ( $RCF=19,56g$ ). Процедуру повторяли 6 раз, увеличивая время центрифугирования для каждой последующей пробы: 2-я проба – 10 минут, 3-я проба – 15 минут, 4-я – 20 минут, 5-я – 25 минут и 6-я проба – 30 минут. После шестого центрифугирования эритроциты в надосадочной жидкости не выявлялись.

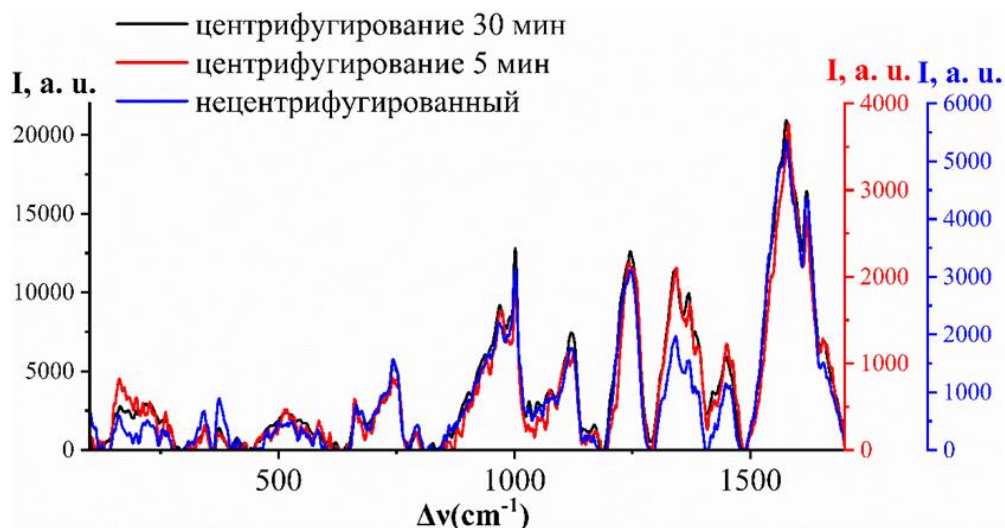
Изоформы гемоглобина исследовали как в эритроцитах цельной крови, так и отдельных фракциях клеток. Для этого готовили гемолизат клеток, а затем проводили разгонку методом электрофореза в ПААГ (по Г. Мауреру) [40]. Для РАМАН-спектроскопии гемолизат после каждого центрифугирования высушивали в термостате при  $T=53,8^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток. Оценку конформации гема и его белкового окружения в глобине оценивали с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) [53, 142, 198].

Для записи спектров КРС использовали конфокальный рамановский микроскоп Renishaw inVia Qontor (Великобритания), оборудованный двумя полупроводниковыми твердотельными лазерами с длинами волн 532 нм (измеряемый диапазон частот от 50 до 4000  $\text{cm}^{-1}$ , 100% мощность равна 200 мВт) и 785 нм (диапазон от 50 до 3500  $\text{cm}^{-1}$ , 100% мощность равна 300 мВт) и ICDD-детектором (оптическая чувствительность до 1,08 мкм), а также системой стабилизации положения лазеров и измерительной сотовой плиты.

Перед началом работы прибор был откалиброван в режиме Static, при помощи лазера на 532 нм, по положению линии Si ( $520 \text{ cm}^{-1}$ ) при помощи кремниевой пластины. Порошкообразные образцы были горизонтально размещены на препаративном стекле, которое, при закрытой шторке лазера, было установлено в пазах сотовой плиты и закреплено пружинным фиксатором. Для съемки был выбран лазер на 785 нм. Съемка производилась в режиме Extended в диапазоне от 100 до 3200  $\text{cm}^{-1}$  с автоматической калибровкой по центральной частоте 750  $\text{cm}^{-1}$ . Для лазера 785 нм (режим точечной съемки – Edge) была выбрана дифракционная решетка 1200 штрихов/мм. При съемке было задано минимально возможное время экспозиции 10 с и мощность лазера 10% от максимальной. Съемка проводилась в режиме накопления сигнала с числом шагов, равным 3 за одно измерение. Для каждой точки в автоматическом режиме проводилось по три измерения с временным зазором между измерениями 2 секунды. Для каждого образца было проведено 4 независимых измерения в разных точках. Фокусировка лазерного луча на зернах и поверхностях образцов осуществлялась при помощи стереоскопической системы (бинокулярные линзы) и системы регулировки



положения сотовой плиты, состоящей из двух рукояток – грубой и более тонкой настройки, расположенных под сотовой плитой. Посредством инструментов, включённых в пакет программного обеспечения, обеспечивающего связь между ПК и прибором, была проведена цифровая очистка полученных спектров от фонового сигнала и шумоподавление при помощи фильтра Савицкого-Голея (фильтр 7-го порядка, длина кадров – 24) (рисунок 7).



**Рисунок 7 – КР-спектры гемоглобина при разном времени центрифугирования**

Анализируя частоты колебаний и отношения интенсивностей линий ( $I$ ) в спектрах КРС, в геме оценивали различия в состоянии пиррольных полуколец ( $1170\text{см}^{-1}$ ,  $1355\text{см}^{-1}$ ,  $1375\text{см}^{-1}$ ,  $I_{1375}/I_{1172}$ ,  $I_{1375}/I_{1127}$ ), метиновых мостиков между пирролами ( $1550\text{ см}^{-1}$ ,  $1580\text{см}^{-1}$ ), винилов ( $1620\text{ см}^{-1}$ ), атомов железа ( $1567\text{ см}^{-1}$ ,  $1550\text{см}^{-1}$ ,  $1580\text{см}^{-1}$ ,  $1640\text{см}^{-1}$ ,  $1355\text{см}^{-1}$ ) и  $\text{-C=C-}$ ,  $\text{-C=N-}$  групп ( $1620\text{см}^{-1}$ ,  $1640\text{см}^{-1}$ ), а в глубине – в валентных колебаниях аминокислот, симметричном/ассиметричном растяжении  $\text{CH}_3$ -групп, колебаниях  $\text{CH-}$  концевых метиленовых групп аминокислот ( $2850\text{см}^{-1}$ ,  $2880\text{см}^{-1}$ ,  $I_{2930}/I_{2850}$ ), полярном окружении аминокислот ( $2930\text{см}^{-1}$ ,  $2940\text{см}^{-1}$ ) и плотности упаковки белка ( $I_{2850}/I_{2880}$ ), отдельно оценивали лиганд-связывающую способность гемоглобина ( $1355\text{см}^{-1}$ ,  $1375\text{см}^{-1}$ ,  $1618\text{см}^{-1}$ ,  $I_{1375}/I_{1355}$ ,  $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ ,  $I_{1618}/(I_{1355}+I_{1375})$ ,  $I_{1618}/I_{1580}$ ,  $I_{1688}/I_{1580}$ ,  $I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$ ,  $I_{1355}/I_{1550}$ ,  $I_{1375}/I_{1580}$ ,  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ ) [53, 198].

## **2.12 – Оценка показателей костного мозга экспериментальных животных**

Морфологическое исследование форменных элементов с подсчетом миелограммы (процентного содержания различных миелокариоцитов) осуществляли с помощью унифицированного метода. Для подсчета миелограммы костный мозг выдували на чашку Петри, гомогенизировали в небольшом количестве физиологического раствора и делали мазки. Окраска мазков проводилась по Нохту. Для подсчета миелограммы продифференцировали более 500 миелокариоцитов в разных участках препарата.

Клеточность костного мозга определяли путем разведения пунктата костного мозга 0,02 мл, внося его в пробирку с 4 мл слабого раствора уксусной кислоты, окрашенного метиленовым синим. Содержимое пробирки тщательно перемешивали, набирали в меланжер до метки 0,5, остальное доводили до метки 11 3%-раствором уксусной кислоты с метиленовым синим. Уксусную кислоту использовали с целью разрушения эритроцитов. Заполняли счетную камеру Горяева и подчитывали в 25 больших квадратах. Полученные данные выражали в процентах, а затем пересчитывали в абсолютные величины (млн.).

## **2.13 – Исследование средних диаметров эритроцитов и их осмотической стойкости методом малоуглового светорассеяния частиц с помощью лазерного анализатора микрочастиц «Ласка 1-К»**

Оценка распределения эритроцитов по диаметрам и изменению их осмотической стойкости производилась методом малоуглового светорассеяния с помощью лазерного анализатора микрочастиц «Ласка 1-К» (производства НПФ ООО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург, Россия, регистрационный номер в Госреестре СИ РФ №28224-04).

*Исследование особенности распределения эритроцитов по размерам в артериальной, венозной и смешанной крови крыс.* Исследование проводили на белых беспородных крысах. Забор крови осуществляли из брюшной аорты и нижней полой вены путем надсечения сосуда скальпелем. Так же для сравнения

брали на анализ периферическую кровь из хвоста крысы. Кровь помещали в пробирки, содержащие 1мл изотонического раствора следующего состава: NaCl - 140 ммоль/л, KCl – 5 ммоль/л, HEPES – 5 ммоль/л, glucose – 5 ммоль/л и CaCl<sub>2</sub> – 1 ммоль/л (pH= 7,4), в которой впоследствии проводили измерения с целью оценки распределения эритроцитов по размерам. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Ласка -1К» [151].

***Исследование диаметров эритроцитов крыс при добавлении адреналина, инсулина и ацетилхолина (в условиях in vitro).*** Оценка распределения эритроцитов производилась методом малоуглового светорассеяния с помощью лазерного анализатора микрочастиц «Ласка 1-К». Измерения с целью оценки распределения эритроцитов по размерам производились в изотоническом растворе состава: NaCl - 140 ммоль/л, KCl – 5 ммоль/л, HEPES – 5 ммоль/л, glucose – 5 ммоль/л и CaCl<sub>2</sub> – 1 ммоль/л (pH 7.4) [151]. Концентрация клеток в инкубационной среде не превышала  $3 \cdot 10^5$  клеток на мл. Адреналин, ацетилхолин, инсулин добавляли в данные образцы эритроцитов в концентрациях, при которых отношение содержания вещества в единице объёма к количеству эритроцитов в этом объёме соответствовало их физиологической норме. Для расчетов брали концентрации адреналина, инсулина и ацетилхолина в плазме крови крыс равными  $0,046 \pm 0,003$  нг/мг,  $1,02 \pm 0,16$  нг/мл и  $0,01 \pm 0,001$  нг/мл [17, 56, 69, 175, 179]. После добавления адреналина, ацетилхолина и инсулина эритроциты инкубировали в течение 30 минут, после чего производили оценку распределения эритроцитов по размерам.

***Исследование особенности распределения эритроцитов по размерам в разных локализациях у крыс.*** Эритроциты для анализа получали из магистральных органов: печени, лёгкого, селезёнки, полости сердца, почки и хвоста. Брали каплю крови и помещали в эппендорф с изотонической средой объемом 1000 мкл. Далее полученную суспензию клеток перемешивали. Затем помещали в кювету (Ласка 1-К), наполненную 8000 мкл изотонической среды состава: NaCl - 140 ммоль/л, KCl – 5 ммоль/л, HEPES – 5 ммоль/л, glucose – 5 ммоль/л и CaCl<sub>2</sub> – 1 ммоль/л (pH=7.4), в которой впоследствии проводили измерения с целью оценки распределения

эритроцитов по размерам. Концентрация клеток в инкубационной среде не превышала  $3 \cdot 10^5$  клеток на мл. После каждой записи распределения эритроцитов по диаметрам кювету промывали дистиллированной водой.

*Изучение стойкости эритроцитов крыс к осмотической нагрузке.* Для изучения кинетики аммонийного гемолиза эритроциты помещались в гипоосмотичную среду ( $V = 8000$  мкл) состава:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - 140 ммоль/л;  $\text{KCl}$ - 5 ммоль/л;  $\text{HEPES}$  - 5 ммоль/л;  $\text{glucose}$  - 5 ммоль/л и  $\text{CaCl}_2$  - 1 ммоль/л (рН 7.4), отличающуюся от исходной среды тем, что ион натрия замещен на ион аммония.

Исследовали следующие характеристики осмотического гемолиза эритроцитов:

1. Временной интервал до пика набухания (мин) – характеризует стойкость клетки к осмотической нагрузке.

2. Временной интервал до разрушения половины клеток (мин) – характеризует среднюю скорость протекания гемолиза.

3. Средний диаметр эритроцитов на пике набухания (мкм) – характеризует стойкость клетки к осмотической нагрузке.

4. Средний диаметр эритроцитов на момент разрушения половины клеток (мкм) – характеризует динамику изменений размеров частиц после начала гемолиза.

Для регистрации временных значений использовались показатели угла 0 градусов. Для регистрации среднего диаметра эритроцитов использовались показания угла 1 градус [151]. Цитометрические и кинетические показатели рассчитывали с помощью программного обеспечения “Lasca\_32”.

## **2.14 – Статистические методы анализа, используемые для проведения экспериментальной работы**

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0). Данные представлены в виде среднего значения ( $M$ )  $\pm$  ошибки среднего ( $m$ ). Достоверность отличий в сравниваемых выборках проводили с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни (Mann-Whitney U- test). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ

#### 3.1 – Связь размеров эритроцитов с состоянием гемоглобина

Анализ размеров эритроцитов крыс свидетельствует, что их диаметр в физиологических условиях колебался в пределах 5,72-7,03 мкм (*таблица 1*) и зависел от насыщения гемоглобина кислородом, поскольку в артериальной крови показатель приближался к нижней, а в венозной крови - к верхней границам физиологического диапазона (*таблица 1*).

**Таблица 1 - Различия между средними диаметрами эритроцитов артериальной, венозной и смешанной крови интактных крыс,  $M \pm m$**

Периферическая кровь (n=8)	Диаметр эритроцитов (мкм)
Физиологический диапазон (физиологические границы)	5,72-7,03
Артериальная кровь	6,04±0,07
Смешанная кровь	6,29±0,17
Венозная кровь	6,34±0,12 <sup>a</sup>
Смешанная кровь +Адреналин	6,64±0,06 <sup>b c</sup>
Смешанная кровь +Инсулин	6,28±0,11
Смешанная кровь +Ацетилхолин	6,34±0,15

*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) ( $p < 0,05$ ).

Так как экспериментально доказано наличие на мембране эритроцитов рецепторов к инсулину, эндотелину, церулоплазмину,  $\alpha_2$ -макроглобулину,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов [68], то 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  $\beta$ -адренорецепторами на мембране, способен изменять её проницаемость, в первую очередь, для ионов  $\text{Na}^+$ . Тем самым, ионы  $\text{Na}^+$ , накапливаются в клетке, вызывая её увеличение [169, 175].

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. Так, показано, что в водном растворе гемоглобина в присутствии ионов двухвалентного железа данный гормон вызывает трансформацию гемоглобина до метгемоглобина, что, естественно, сопровождается снижением его кислород связывающих свойств [131].

Интересно, что 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 вызывают. Следовательно, эффект адреналина можно связать с его влиянием на кислород связывающую способность пигмента.

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 рыб, что снижение содержания кислорода в воде до уровня 15% приводит к увеличению объема эритроцитов до  $270,4 \pm 1,7 \text{ мкм}^3$ , что на 4,1% ( $p < 0,01$ ) выше контрольных значений ( $259,7 \pm 1,73 \text{ мкм}^3$ ), а при 30% насыщении воды кислородом, напротив, сопровождается уменьшением клеток в объеме на 4% ( $p < 0,01$ ) ( $249,1 \pm 1,5 \text{ мкм}^3$ ) [35].

### 3.2 – Изоформы гемоглобина в цельной крови и в костном мозге

При разделении гемоглобина периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) крыс путем электрофореза в полиакриламидном геле удалось выделить 6 изоформ, что соответствует многочисленным данным разных авторов [56, 60, 188].

Согласно полученным нами данным, эти изоформы гемоглобина различались как по молекулярной массе, так и по относительным и абсолютным единицам в общем количестве гемоглобинов (*таблица 2*).

Наиболее часто в литературе указывается [91, 148], что молекулярная масса неразделенного гемоглобина составляет 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 и можно рассматривать как основные, поскольку в сумме они составили 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), они отличались от основных на половину массы одной цепочки глобина (8-8,5 кДа), а 1 и 6 изоформы на три четверти -12 кДа (76-80 кДа и 52-56 кДа, соответственно) (*таблица 2*).

В костном мозге распределения изоформ по количеству и молекулярной массе аналогичны периферической крови (*таблица 2*).

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

**Таблица 2 - Соотношение изоформ гемоглобина в цельной периферической крови и костном мозге интактных крыс,  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Изоформа 1	Изоформа 2	Изоформа 3	Изоформа 4	Изоформа 5	Изоформа 6	Среднее по всем изоформам
Периферическая кровь							
Молекулярная масса, кДа	86,86±0,54 <sup>a b</sup>	81,67±0,98 <sup>a b</sup>	70,71±0,32	63,00±1,43	56,90±1,22 <sup>a</sup>	52,27±1,33 <sup>a b</sup>	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±1,10	43,97±0,80	20,52±0,50	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 <sup>a b</sup>	81,69±0,85 <sup>a b</sup>	69,58±0,21	63,95±1,46	56,89±1,09 <sup>a b</sup>	52,36±1,25 <sup>a b</sup>	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±0,23	44,87±0,52	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:* а – статистически значимые различия фракций гемоглобина от 3 изоформы ( $p < 0,05$ ); b - статистически значимые различия фракций гемоглобина от 4 изоформы ( $p < 0,05$ ).



### 3.3 – Распределение изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов

У интактных крыс средний диаметр неразделенных эритроцитов был равен  $7,02 \pm 0,05$  мкм, средний объём красных клеток крови составил  $55,63 \pm 0,11$  фл, среднее содержание гемоглобина в эритроците –  $18,39 \pm 0,66$  пг, а средняя концентрация гемоглобина в эритроците -  $35,4 \pm 1,104$  г/л, цветовой показатель –  $0,539 \pm 0,09$  и степень анизоцитоза составила  $13,96 \pm 0,43$  % (таблица 3).

**Таблица 3 - Морфологические характеристики различных фракций эритроцитов интактных крыс,  $M \pm m$**

Фракции эритроцитов (n=10)	$D_{RBC}$ , мкм	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	Цветовой показатель	RDW, %
Без разделения на фракции	$7,02 \pm 0,05$	$55,63 \pm 0,11$	$18,39 \pm 0,66$	$35,4 \pm 1,104$	$0,539 \pm 0,09$	$13,96 \pm 0,43$
F1	$7,96 \pm 0,03$ а	$54,95 \pm 0,17$	$19,26 \pm 0,11$	$35,05 \pm 0,26$	$0,568 \pm 0,13$	$14,68 \pm 0,15$
F2	$7,61 \pm 0,18$	$54,09 \pm 0,08$ а	$18,81 \pm 0,14$	$34,50 \pm 0,44$	$0,558 \pm 0,11$	$14,51 \pm 0,24$
F3	$7,25 \pm 0,21$	$53,60 \pm 0,10$ а	$18,32 \pm 0,08$	$34,19 \pm 0,22$	$0,499 \pm 0,15$	$14,85 \pm 0,17$
F4	$6,54 \pm 0,09$ а	$53,31 \pm 0,08$ а	$18,52 \pm 0,13$	$35,70 \pm 0,16$	$0,604 \pm 0,21$	$13,91 \pm 0,21$
F5	$6,33 \pm 0,07$ а	$49,61 \pm 1,2$ а	$19,07 \pm 0,16$	$37,27 \pm 0,47$	$0,863 \pm 0,18$	$13,98 \pm 0,25$
F6	$6,27 \pm 0,02$ а	$52,42 \pm 0,19$ а	$17,78 \pm 0,11$	$34,13 \pm 0,42$	$0,549 \pm 0,15$	$14,91 \pm 0,21$

*Примечание:*  $D_{RBC}$  – диаметр эритроцита;  $MCV$  – средний объём эритроцита;  $MCH$  - среднее содержание гемоглобина в эритроците;  $MCHC$  – средняя концентрация гемоглобина в эритроците;  $RDW$  - распределение эритроцитов по размерам; а – статистически значимые различия нефракционированных клеток от фракционированных у интактной группы животных ( $p < 0,05$ ); F1- F6 - фракции эритроцитов.

При фракционном центрифугировании в цельной крови крыс мы выделили 6 фракций эритроцитов (таблица 2), которые различались по своим морфологическим показателям (таблица 3), по содержанию ретикулоцитов и F-клеток (таблица 4), по молекулярной массе гемоглобина (таблица 5), по своим структурным характеристикам и способности связывать или, наоборот, отдавать

лиганды (таблица 6). Однако каждая из фракций достаточно однородна по составу клеток, о чем свидетельствовал показатель RDW.

При анализе фракций эритроцитов средний диаметр красных клеток больше в F1, но меньше в F4, F5, F6 фракциях эритроцитов по сравнению с фракциями без деления. Средний объём (MCV) красных клеток крови меньше в F2, F3, F4, F5 и F6 фракциях эритроцитов. Среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), цветовой показатель и степень анизоцитоза (RDW) у интактных животных достоверно не изменялись по сравнению с фракциями без деления (таблица 3).

Общее количество ретикулоцитов в крови интактных крыс составило  $1,23 \pm 0,06\%$ , общее количество F-клеток равнялось  $1,32 \pm 0,09\%$ . Диаметр ретикулоцитов был равен  $9,72 \pm 0,055$  мкм, а диаметр F-клеток -  $10,98 \pm 0,138$  мкм, соответственно (таблица 4).

**Таблица 4 – Содержание ретикулоцитов и F-клеток в различных фракциях эритроцитов интактных крыс,  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Rt, %	HbF, %	$D_{Rt}$ , мкм	$D_{HbF}$ , мкм
Без деления на фракции	$1,23 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,09$	$9,72 \pm 0,055$	$10,98 \pm 0,138$
F1	$4,4 \pm 0,88$	$2,27 \pm 0,06$	$9,79 \pm 0,19$	$11,38 \pm 0,15^a$
F2	$2,98 \pm 0,22^a$	$2,47 \pm 0,01$	$9,81 \pm 0,14$	$11,33 \pm 0,17^a$
F3	$1,32 \pm 0,05$	$2,67 \pm 0,11^a$	$9,63 \pm 0,16$	$11,09 \pm 0,14$
F4	$1,14 \pm 0,4$	$2,62 \pm 0,09$	$9,58 \pm 0,11$	$10,58 \pm 0,28$
F5	$0,67 \pm 0,07^a$	$0,7 \pm 0,06^a$	$9,50 \pm 0,19$	$9,72 \pm 0,16^a$
F6	$0,01 \pm 0,008^a$	$0,02 \pm 0,001^a$	$8,98 \pm 0,27$	$9,62 \pm 0,18^a$

*Примечание:* **Rt** – ретикулоциты; **HbF** – фетальный гемоглобин;  **$D_{Rt}$**  – диаметр ретикулоцитов;  **$D_{HbF}$**  – диаметр клеток, содержащих фетальные изоформы гемоглобина; **a** – статистически значимые различия нефракционированных клеток от фракционированных у интактной группы животных ( $p < 0,05$ ); F1- F6- фракции эритроцитов.

Однако в различных фракциях клеток они распределялись неравномерно. Во F2 ретикулоцитов содержалось больше, а в F5 и F6 фракциях меньше по сравнению с клетками без деления. Количество F-клеток больше в F3 и меньше в F5 и F6

фракциях эритроцитов. Диаметр F-клеток меньше в F5, F6 фракциях эритроцитов. Диаметры ретикулоцитов достоверно не изменялись (*таблица 4*).

В цельной крови наибольшая доля 65% приходилась на основные изоформы гемоглобина с молекулярной массой 60-70 кДа (в литературе чаще указывают 64-68 кДа), 11% составляли тяжелые (более 70 кДа), 24% - более легкие (менее 60 кДа) изоформы (*таблица 5*). Возникновение тяжёлых изоформ можно связать с полимеризацией, а лёгких - с 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 содержала тяжёлую форму и нормальные варианты гемоглобина ( $84,84 \pm 1,50$  кДа -  $74,51 \pm 0,84$  кДа), 2-я - тяжёлую и нормальную изоформы ( $83,32 \pm 1,0$  кДа -  $66,68 \pm 0,83$  кДа), 3-я и 4-я – нормальные 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 нормальную и лёгкую ( $61,70 \pm 0,52$  кДа -  $55,3 \pm 0,80$  кДа) и 6-я исключительно лёгкие изоформы ( $59,09 \pm 0,75$  кДа -  $50,76 \pm 0,82$  кДа) (*таблицы 5, 6*).

Гемоглобины диапазона 64-68 кДа обнаружены в 1, 2, 3, 4 и 5 фракциях эритроцитов, что является еще одним аргументом (помимо наибольшего их суммарного процента в крови) в пользу того, чтобы рассматривать их в качестве основных. Кроме того, различия в их соотношении в F3 и F4 фракциях эритроцитов никак не сказывались на физических и функциональных характеристиках смеси (*таблица 6*).

**Таблица 5 – Характеристика различных изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов (по молекулярной массе),  $M \pm m$**

Фракции эритроцитов (n=10)	Изоформы гемоглобина, кДа						Соотношение вариантов гемоглобинов, %	Варианты гемоглобинов
	Изоформа 1	Изоформа 2	Изоформа 3	Изоформа 4	Изоформа 5	Изоформа 6		
Цельная кровь	86,86±0,54	81,67 ± 0,97	70,71 ± 0,31	63,0 ± 1,43	56,9 ± 1,21	52,27 ± 1,33	100	-
F1	84,84±1,50 <b>b c</b>	-	74,51±0,84 <b>a b c</b>	-	-	-	46,0±0,96 / 54,00,96	<b>T + H<sub>T</sub></b>
F2	-	83,32±1,00 <b>b c</b>	-	66,68±0,83 <b>a b</b>	-	-	40,0±0,45 / 60,0±0,45	<b>T + H<sub>T</sub></b>
F 3	-	-	71,89±0,57	64,04±1,08 <b>b</b>	-	-	66,7±0,76 / 33,3±0,76	<b>H<sub>T</sub> + H<sub>L</sub></b>
F 4	-	-	73,46±1,04 <b>a</b>	64,55±0,46 <b>b</b>	-	-	56,5±0,88 / 43,5±0,88	<b>H<sub>T</sub> + H<sub>L</sub></b>
F 5	-	-	-	61,70±0,52 <b>b c</b>	55,30±0,80 <b>b c</b>	-	62,9±1,56 / 37,1±1,56	<b>H<sub>L</sub> + Л</b>
F6	-	-	-	-	59,09±0,75 <b>b c</b>	50,76±0,82 <b>b c</b>	67,5±1,4 / 32,5±1,4	<b>Л + Л</b>

*Примечание:* **a** – статистически значимые различия фракций эритроцитов от цельной крови ( $p < 0,05$ ); **b** – статистически значимые различия фракций эритроцитов от 3 фракции ( $p < 0,05$ ); **c** - статистически значимые различия фракций эритроцитов от 4 фракции ( $p < 0,05$ ); **T + H<sub>T</sub>** - тяжёлые варианты гемоглобина+ нормальные варианты, **H<sub>T</sub>+H<sub>L</sub>**- нормальные (основные) варианты гемоглобина; **H<sub>L</sub>+Л** – нормальные варианты+ лёгкая форма, **Л+Л** – лёгкие варианты гемоглобина; F1-F6 – фракции эритроцитов.

### 3.4 – Характеристика изоформ гемоглобина с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (или Рамановской спектроскопии)

При исследовании методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (РАМАН-спектроскопии) смесей гемоглобинов удалось показать, что мы имеем дело с различными изоформами гемоглобина, отличающимися по своим структурным характеристикам (*таблица 6*).

Данные спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) или РАМАН-спектроскопии свидетельствовали, что варианты гемоглобинов, содержащиеся в различных фракциях эритроцитов, отличались не только по молекулярной массе и электрофоретической подвижности, но и имели ряд структурных особенностей.

Тяжёлые и лёгкие варианты гемоглобина в одинаковой степени отличались от основных форм более низкими показателями жесткости белкового окружения гема ( $I_{1170}/I_{1127}$ ), более высокими показателями колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован ( $I_{1550}$ ), колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию ( $I_{1580}$ ), повышенным маркером спинового состояния ( $I_{1567}$ ), спиновым состоянием железа в дезокси-форме, степенью погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца ( $I_{1550}$ ), спиновым состоянием железа в окси-форме, степенью погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца ( $I_{1580}$ ), колебаниями  $-C=C-$ связей ( $I_{1580}$ ), редокс и спиновым состоянием железа, содержанием (наличием) лиганда, NO-Гб ( $I_{1618}$ ). Таким образом, как увеличение, так и уменьшение молекулярной массы гемоглобина одинаково сказывались на состоянии гема (*таблица 6*). Все эти показатели дают основание рассматривать эти гемоглобины в качестве отдельных изоформ.

Таблица 6 – Общие характеристики гема и глобина крыс фракционированных эритроцитов,  $M \pm m$ 

Фракции эритроцитов (n=10)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>
Изоформы гемоглобина	84,84±1,50 74,51±0,84	83,32±1,0 66,68±0,83	71,89±0,57 64,04±1,08	73,46±1,04 64,55±0,46	61,70±0,52 55,3±0,80	59,09±0,75 50,76±0,82
Соотношение изоформ гемоглобина	0,85:1	0,66:1	2:1	1,32:1	1,7:1	2,04:1
«Скрученная» конформация гема, $I_{1172}/I_{1375\text{см}}^{-1}$	0,25±0,02	0,41±0,02 <b>a b c</b>	0,25±0,06	0,17±0,04	0,37±0,11	0,25±0,05
Жёсткость белкового окружения гема, $I_{1170}/I_{1127\text{см}}^{-1}$	0,27±0,04 <b>a b d e</b>	0,77±0,04	0,80±0,06	0,61±0,06	0,76±0,24	0,32±0,11 <b>a b d e</b>
Виниловая полоса - C=C-, $I_{1620\text{см}}^{-1}$	11015,25±2201,64 <b>a b d e</b>	1916,00±493,90	2457,75±645,16	3917,25±1240,14	6038,01±650,70 <b>d</b>	10669,50±2095,50 <b>a b d e</b>
Вклад боковых CH <sub>3</sub> - групп колебаний полуколец пиррола гема, $I_{1375}/I_{1127\text{см}}^{-1}$	1,33±0,10 <b>b e</b>	3,07±1,16	3,53±1,12	4,27±1,13	2,35±0,35	1,189±0,06 <b>b e</b>

Продолжение таблицы 6

Колебание метиновых радикалов, $I_{1127\text{см}}^{-1}$	4534,50±928,39 <b>a b d e</b>	808,00±160,98 <b>f</b>	1039,66±227,97	1107,75±288,35	2549,66±390,43 <b>a d</b>	4927,75±1040,26 <b>a b</b>
Колебания метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, $I_{1550\text{см}}^{-1}$	10596,25±2854,19 <b>a b d</b>	1385,67±320,33 <b>a b c e f</b>	2623,00±767,00	4185,60±1024,62	6181,00±841,26 <b>a</b>	12603,90±1316,54 <b>a b d e</b>
Ассиметричные колебания пиррольных полуколец оксигемоглобина, $I_{1170\text{см}}^{-1}$	1523,50±169,26	625,25±128,26 <b>b c e f</b>	864,25±146,67	656,50±174,21	2237,75±699,80	1257,25±186,76
Симметричные колебания пиррольных полуколец в дезокси-Гб, $I_{1355\text{см}}^{-1}$	8360,66±1073,03	1435,68±382,79 <b>b c e f</b>	4359,00±2221,80	5594,60±1514,80	5820,33±873,01	7205,19±497,95

Симметричные колебания пиррольных полуколец в молекулах гемоглобина, связанного с лигандами, $I_{1375\text{см}^{-1}}$	6420,25±689,57	1396,33±374,25 <b>b c e f</b>	3999,66±2047,55	5025,50±1827,60	4129,00±1186,02	6604,30±821,67
Маркер спинового состояния, $I_{1567\text{см}^{-1}}$	13379,02±488,81 <b>a b d e</b>	2324,00±586,02 <b>f</b>	3334,01±661,19	4718,00±1449,67	8005,66±920,88 <b>a</b>	13329,00±2473,4 0 <b>a b</b>
Спиновое состояние железа в окси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, $I_{1580\text{см}^{-1}}$	13847,75±2511,70 <b>a d</b>	2343,62±382,09 <b>f</b>	3283,33±585,04	4897,22±861,41	6238,62±1270,55 <b>f</b>	14245,71±1648,5 7 <b>a d e</b>
Спиновое состояние железа в дезокси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, $I_{1550\text{см}^{-1}}$	10596,25±2854,19 <b>a d</b>	1385,67±320,33 <b>f</b>	2623,01±767,00	4185,60±1024,62	6181,01±841,26 <b>a</b>	12603,90±1316,5 4 <b>a b d</b>
Симметричное СНз-растяжение (оксигемоглобин) $I_{2930}$	315,64±45,84 <b>b</b>	324,60±59,82	357,51±64,03	747,22±146,03	766,25±57,37 <b>f</b>	306,86±35,61 <b>b</b>



Продолжение таблицы 6

Плотность упаковки $I_{2850}/I_{2880}$	0,54±0,06	0,29±0,07 <b>a b c e f</b>	0,41±0,05	0,75±0,12	0,35±0,04	0,70±0,16
Редокс и спиновое состояние железа, наличие лиганда, NO- Гб, $I_{1618}$	12990,01±1642,10 <b>a b d e</b>	1917,01±488,40 <b>a e f</b>	2646,33±754,33	4473,40±1093,02	6038,01±650,62	11610,01±1256,1 7 <b>a b e</b>
Относительная способность дезоксигемоглобина связывать O <sub>2</sub> , $I_{1355}/I_{1550см}^{-1}$	0,64±0,011 <b>a b d e</b>	1,26±0,25	1,47±0,33	1,30±0,10	0,94±0,04	0,60±0,04 <b>a b d e</b>
Способность оксигемоглобина выделять лиганды, $I_{1375}/I_{1580см}^{-1}$	0,49±0,07 <b>a</b>	0,94±0,24	1,06±0,25	0,97±0,11	0,82±0,23	0,52±0,08 <b>a</b>

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

Добавление к нормальному варианту гемоглобина тяжёлой формы приводило к повышению «скрученной» конформации гема ( $\Gamma_{1172}/\Gamma_{1375}$ ), к снижению (замедлению) симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах дезоксигемоглобина ( $\Gamma_{1355}$ ) и симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах гемоглобина, связанного с лигандами, ( $\Gamma_{1375}$ ), более низким показателям колебаний метиновых радикалов ( $\Gamma_{1127}$ ) и колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован ( $\Gamma_{1550}$ ) (таблица 6).

Добавление к нормальному варианту гемоглобина лёгкой формы приводило к повышению колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию ( $\Gamma_{1580}$ ). Спиновое состояние железа в дезокси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца повышалась в два раза по сравнению с основными - 3, 4 изоформами (таблица 6).

Анализ смесей нормальные гемоглобины+лёгкая форма (Нл+Л) и нормальные+тяжёлая форма (Нт+Т), показал, что наибольшие различия между ними касались симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах оксигемоглобина ( $\Gamma_{1170}$ ), симметричных колебаний пиррольных полуколец дезоксигемоглобина ( $\Gamma_{1355}$ ), колебаний метиновых радикалов, колебаний метиновых мостиков, спинового состоянием железа в дезокси-форме, степени погруженности атома железа в плоскости порфиринового кольца ( $\Gamma_{1580}$ ), колебаний  $-C=C-$  связей, плотности упаковки, редокс и спинового состоянии железа, наличия лигандов, NO-Гб ( $\Gamma_{1618}$ ) (таблица 6).

Тяжёлые варианты гемоглобина+ нормальные варианты (F1) в сравнении с смесью нормальными+тяжёлая форма (F2) отличались «скрученной» конформацией гема, также отмечались различия между смесью нормальные+тяжёлая форма (Нт+Т) и основными изоформами (Нт+Нл). Жесткость белкового окружения гема ( $\Gamma_{1170}/\Gamma_{1127}$ ) повышалась в F2 (Нт+Т), F3- F4 (Нт+Нл) фракциях по сравнению с F1 фракцией эритроцитов (таблица 6), что вероятно обусловлено уменьшением расстояния между ковалентно-связанными атомами. Так, в литературе описано, что атомы, располагающиеся наиболее близко друг к другу и имеющие тесные межатомные контакты, будут являться наиболее

жесткими (твердыми), что обусловлено заданными ковалентными связями и углами [118].

Лёгкие варианты гемоглобина (Л+Л) отличались от смеси нормальные+лёгкая форма (Нл+Л) повышением колебаний метиновых радикалов, колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован (I<sub>1550</sub>), колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию (I<sub>1580</sub>), симметричным растяжением СН<sub>3</sub>- групп (I<sub>2930</sub>), редоксом и спиновым состоянием железа, наличием лиганда NO-Гб (I<sub>1618</sub>) а также более низкими показателями виниловой полосы (I<sub>1620</sub>) и спинового состояния железа в дезокси-форме (*таблица б*).

**Лиганд связывающая способность.** Отмеченные различия в характеристиках изоформ гемоглобина нашли свое отражение и в их лиганд связывающей способности. Тяжёлая форма+нормальные варианты гемоглобина (F1) и лёгкие (F6) изоформы обладали наиболее низкой, по сравнению с основными изоформами (F3-F4), лиганд связывающей способностью. В одинаковой степени снижены как относительная способность гемоглобина связывать лиганды (I<sub>1355</sub>/I<sub>1550</sub>), так и его способность выделять их (I<sub>1375</sub>/I<sub>1580</sub>) (*таблица б*).

Таким образом, конформация белковой молекулы влияет на силу связывания кислорода. Варианты гемоглобинов, полученные из F3 и F4 фракций эритроцитов, отличаются по соотношению основных изоформ (молекулярному весу), но не отличаются по своим структурным характеристикам.

### **Резюме**

Таким образом, в гематологии давно и прочно устоялось представление о неоднородности красных клеток крови, которое находит своё отражение в анизоцитозе, пойкилоцитозе, различиях в степени насыщения клеток гемоглобином (гипер- и гипохромия), в циркуляции в крови определённого количества клеток с его фетальными формами, ретикулоцитами. Открытие различных изоформ гемоглобинов ставит вопрос о их вкладе в формирование эритроцитарной неоднородности, которая обуславливается неоднородностью её гемоглобинового профиля.

Соотношение между различными изоформами гемоглобина в крови у интактных животных определяется, скорее всего, не воздействием на циркулирующий в крови гемоглобин, а обеспечивается состоянием эритропоэза.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле определяется 6 изоформ гемоглобина как в периферической крови, так и в костном мозге, соотношение которых отличается между собой. Преобладающими фракциями в периферической крови и костном мозге являются - 3 и 4. Можно предположить, что эти фракции отвечают за выполнение ключевых функций (кислородтранспортной и буферной), поэтому в норме их нарабатывается больше в костном мозге, а затем они поступают в кровотоки. Все остальные 1, 2, 5 и 6 изоформы выполняют дополнительные функции, их численность меньше.

Методом фракционного центрифугирования удастся разделить эритроциты по молекулярному весу на 2 фракции – одну лёгкую и одну тяжёлую, сочетание которых для каждой фракции строго специфично.

Наибольшей лиганд связывающей способностью обладают основные изоформы гемоглобина, в сравнении с тяжёлыми и лёгкими вариантами гемоглобина. Смеси гемоглобинов, полученные из F3 и F4 фракций эритроцитов, отличаются по соотношению основных изоформ (молекулярному весу), но не отличаются по своим структурным характеристикам.

### Список публикаций по материалам 3 главы

1. 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.

2. 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.

## ГЛАВА 4 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ОСТРОЙ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРИ

### 4.1 – Неоднородность клеточного состава крови при действии на организм острой массивной кровопотери

При острой массивной кровопотере (ОМК) в периферической крови отмечались типичные и многократно описанные изменения показателей красной крови: снижение общего числа эритроцитов, падение гематокритного показателя и концентрации гемоглобина, что свидетельствует о развитии анемии и активации эритропоэза, выявляемых со 2-х суток (*таблица 7*).

Со стороны клеток белого ряда на 6 часов после кровопотери отмечалось снижение общего числа лейкоцитов и понижение лимфоцитов в 2 раза. Увеличивалось количество гранулоцитов (*Grn, %*). После 2 суток кровопотери число моноцитов, эозинофилов, базофилов (*Mid*) снижалось, а общее количество гранулоцитов (*Grn*) повышалось по сравнению с интактной группой животных.

Со стороны тромбоцитарного звена наблюдалось снижение общего числа тромбоцитов и тромбокрита на ранние сроки (30 минут и 6 часов) после кровопотери (*таблица 7*). На 2 сутки после ОМК уровень тромбоцитов достоверно не изменялся.

В крови циркулировали более однородные эритроциты. Показатель RDW (степень анизоцитоза) понижался спустя 6 часов после кровопотери по сравнению с интактной группой (*таблица 7*).

**Таблица 7 – Гемограмма крыс в норме и при действии на организм острой массивной кровопотери, М±m**

Показатели (n=10)	Интактные	Кровопотеря 30 минут	Кровопотеря 6 часов	Кровопотеря 2 суток
WBC, Г/л	17,13±1,67	17,6±0,93	9,44±0,76 <sup>a</sup>	13,89±1,15
Lym, Г/л	14,16±1,57	14,29±0,73	7,5±0,55 <sup>a</sup>	11,14±0,9
Mid, Г/л	3,35±0,56	2,4±0,13	2,33±0,14	1,13±0,2 <sup>a</sup>
Grn, Г/л	0,75±0,17	0,81±0,02	0,91±0,03	1,63±0,26 <sup>a</sup>
Lym, %	75,25±2,52	80±0,16	80,63±0,14	80,38±1,11
Mid, %	18,25±2,44	14,49±0,08	14,39±0,15	8,13±1,4 <sup>a</sup>
Grn,%	2,6±0,5	5,37±0,01 <sup>a</sup>	4,82±0,05 <sup>a</sup>	11,5±1,01 <sup>a</sup>
RBC, Т/л	7,515±0,02	5,79±0,16 <sup>a</sup>	4,74±0,2 <sup>a</sup>	6,42±0,36 <sup>a</sup>
Hb,г/л	135,6±1,9	108,3±0,2 <sup>a</sup>	98,7±0,27 <sup>a</sup>	109,5±0,45 <sup>a</sup>
Hct,%	43,24±1,94	33,8±0,69 <sup>a</sup>	32,13±1,77 <sup>a</sup>	33,29±1,87 <sup>a</sup>
MCV, фл	55,63±0,11	56±0,05	57,06±0,29 <sup>a</sup>	51,93±1,14
MCH, пг	18,39±0,66	20,09±0,02 <sup>a</sup>	20,25±0,11 <sup>a</sup>	17,2±0,45
MCHC, г/дл	35,4±1,104	37,92±0,06 <sup>a</sup>	36,19±0,12	33,1±0,64
RDW,%	13,96±0,43	12,43±0,28	12,01±0,17 <sup>a</sup>	13,33±0,24
Plt, Г/л	736,5±56,36	550,13±20,27 <sup>a</sup>	500±17,5 <sup>a</sup>	637,13±27,56
Pct,%	0,48±0,04	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>a</sup>	0,42±0,02
MPV,фл	6,38±0,19	6,64±0,13	7,06±0,09 <sup>a</sup>	6,54±0,18
PDW,%	10,99±0,21	11,25±0,24	11,88±0,2 <sup>a</sup>	11,33±0,19

*Примечание:* **WBC** – общее количество лейкоцитов; **Lym** – лимфоциты; **Mid** – моноциты; **Grn** – гранулоциты; **RBC** - эритроциты; **Hb** - гемоглобин; **Hct** - гематокрит; **MCV** - средний объём эритроцитов; **MCH** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **MCHC** – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; **RDW** – показатель анизоцитоза; **Plt** - количество тромбоцитов; **Pct** - тромбокрит; **MPV**- средний объём тромбоцитов; **PDW** - распределение тромбоцитов по размерам; **a** – статистически значимые отличия от интактной группы животных (p<0,05).

Через 6 часов после кровопотери наряду со снижением абсолютного количества зрелых эритроцитов отмечалось уменьшение в крови числа клеток, содержащих фетальные формы гемоглобина (F- клеток) (таблица 8).

Однако на 2 сутки после экстремального воздействия число F- клеток и ретикулоцитов в крови повышалось по сравнению с интактной группой, что свидетельствует об активации эритропоэза (таблица 8). Данный факт обусловлен тем, что после острой массивной кровопотери организм в костном мозге активно нарабатывает эритроидные клетки с последующим их выходом в кровоток, для

того, чтобы восстановить общий объём циркулирующей крови и компенсировать популяцию красных клеток крови до нормальных физиологических показателей.

**Таблица 8 – Изменения количества эритроидных клеток в циркулирующей крови при кровопотере,  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Эритроциты, Г/л	Ретикулоциты, Г/л	F- клетки, Г/л	Ретикулоциты/ F- клетки
Интактные	7515,01±23,31	117,84±8,85	114,91±4,81	1,03
30 минут	5790,02±164,01 <sup>a</sup>	109,54±6,14	96,05±3,85	1,14
6 часов	4739,9±295,95 <sup>a</sup>	99,49±8,81	38,36±2,4 <sup>a</sup>	2,59
2 суток	6420,03±365,43 <sup>a</sup>	145,5±8,3 <sup>a</sup>	128,21±3,7 <sup>a</sup>	1,13

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Соотношение числа ретикулоцитов к клеткам, содержащим фетальные формы гемоглобина на 6 часов после кровопотери, увеличивалось в 2 раза по сравнению с группой интактных животных, в то время как на 2 сутки данный показатель приближался к значениям интактной группы животных (*таблица 8*).

Анализ миелограммы при острой массивной кровопотере свидетельствует, что спустя 6 часов после воздействия наблюдалось уменьшение общего числа клеток эритроидного ряда за счет снижения количества эритробластов, пронормоцитов, базофильных и оксифильных нормоцитов. Однако количество полихроматофильных нормоцитов и ретикулярных клеток, наоборот, возрастало на данный срок. На 2 сутки после воздействия общее число клеток эритроидного ряда увеличивалось за счет роста базофильных и полихроматофильных нормоцитов. Отмечалось повышение в 3 раза ретикулярных клеток и клеток базофильного ряда (2 сутки после кровопотери) по сравнению с интактной группой животных (*таблица 9*).

Таким образом, наличие полихроматофилии на 2 сутки после острой массивной кровопотери указывает на усиление регенераторной деятельности костного мозга. Если на 6 часов после кровопотери отмечалось снижение большинства показателей крови, то на 2 суток, наоборот, мы наблюдали их повышение за счет активации эритропоэза (*таблица 9*).

**Таблица 9 – Миелограмма крыс в норме и после острой массивной кровопотери (в млн./100 г массы тела),  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Интактная группа	Кровопотеря 30 мин	Кровопотеря 6 ч	Кровопотеря 2 сут
Общая клеточность	41,43±4,73	41,1±2,02	40,58±2,83	45,62±4,75
Эритробласты и пронормоциты	2,85±0,33	2,81±0,31	0,98±0,03 <sup>a</sup>	3,28±1,03
Базофильный нормоцит	2,102±0,18	2,09±0,16	0,94±0,04 <sup>a</sup>	2,88±0,05 <sup>a</sup>
Полихроматофильный нормоцит	1,52±0,11	1,5±0,09	2,71±0,22 <sup>a</sup>	5,66±0,17 <sup>a</sup>
Оксифильный нормоцит	0,81±0,12	0,79±0,15	0,27±0,03 <sup>a</sup>	0,33±0,09 <sup>a</sup>
Эритроидный ряд	7,28±1,03	7,19±0,92	4,9±0,32 <sup>a</sup>	12,15±2,06 <sup>a</sup>
Миелобласты	4,85±0,52	4,83±0,32	5,05 ± 0,11	1,81 ± 0,22 <sup>a</sup>
Миелоциты	4,96±0,21	4,91±0,2	4,92 ± 0,45	5,07± 0,09
Нейтрофильный метамиелоцит	1,01±0,04	1±0,02	1,03 ± 0,06	0,92 ± 0,11
Нейтрофилы (палочкоядерные/ сегментоядерные)	9,15±0,55	9,14±0,54	9,51 ± 0,92	9,92 ± 1,48
Нейтрофильный ряд	19,97±1,32	19,88±1,08	20,51 ± 1,54	17,72 ± 1,9
Эозинофильный ряд	0,901 ± 0,15	0,9±0,11	0,61 ± 0,07	0,75 ± 0,08
Базофильный ряд	0,68±0,05	0,61±0,03	1,13±0,11 <sup>a</sup>	2,86±0,15 <sup>a</sup>
Моноцитарный ряд	1,74 ± 0,35	1,71±0,33	1,55 ± 0,05	1,82 ± 0,04
Лимфоидный ряд	10,03 ± 0,64	10,0±0,16	10,02 ± 0,12	8,52 ± 0,18 <sup>a</sup>
Мегакариоциты	0,51 ± 0,11	0,49±0,09	0,91±0,56	0,62± 0,19
Ретикулярные клетки	0,33 ± 0,08	0,32±0,05	0,95 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,18± 0,15 <sup>a</sup>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Следует отметить, что изменения содержания эритроцитов в периферической крови крыс после экстремального воздействия напрямую взаимосвязано с качественными изменениями красных клеток крови. Так, средний диаметр циркулирующих эритроцитов крыс возрастал спустя 6 часов и 2 суток после воздействия по сравнению с группой интактных животных. Средние диаметры ретикулоцитов и F-клеток также увеличивались на 6 часов после кровопотери (таблица 10). Средний объем эритроцитов (*MCV*) увеличивался на 6 часов после кровопотери. Среднее содержание гемоглобина в эритроците (*MCH*) повышалось достоверно на ранние сроки (30 минут и 6 часов) после экстремального



воздействия. На 2 сутки показатели *MCV*, *MCH* и *MCHC* достоверно не изменялись (таблица 7).

**Таблица 10 – Диаметры эритроидных клеток при кровопотере,  $M \pm m$**

Показатели, мкм (n=10)	Эритроциты	Ретикулоциты	F- клетки
Интактные	6,29±0,17	9,72±0,055	10,98±0,138
30 минут	6,39±0,05	9,81±0,02	10,99±0,06
6 часов	6,82±0,105 <sup>a</sup>	10,7±0,093 <sup>a</sup>	11,54±0,05 <sup>a</sup>
2 суток	7,44±0,230 <sup>a</sup>	9,69±0,091	11,06±0,125

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

В литературе описано, что потребление кислорода различными тканями (мл\*мг/ч) значительно отличается между собой, так, в почках оно составляет 21,0, в печени – 17,0, в селезенке – 12,0, в сердце – 8,0-10,0 [66, 75].

Обращает на себя внимание и изменение средних диаметров эритроцитов во внутренних органах крыс после кровопотери (таблица 11).

**Таблица 11 – Средние диаметры эритроцитов в изотоническом растворе разных органов при кровопотере,  $M \pm m$**

Показатели, мкм (n=10)	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	6,42±0,17	6,01±0,12	6,21±0,12	6,3±0,15	6,31±0,15
30 минут	7,25±0,3 <sup>a</sup>	7,04±0,02 <sup>a</sup>	6,68±0,17	6,78±0,09	6,67±0,13
6 часов	7,38±0,3 <sup>a</sup>	7,17±0,39 <sup>a</sup>	6,85±0,33	6,48±0,09	6,34±0,16
2 суток	8,91±0,66 <sup>a</sup>	8,25±0,45 <sup>a</sup>	6,12±0,1	7,42±1,2	5,53±0,15 <sup>a</sup>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

На все сроки после экстремального воздействия в селезёнке и печени увеличивался средний диаметр эритроцитов при сравнении с группой интактных животных. В почках данный показатель снижался только на 2 сутки после ОМК. В лёгком и сердце, где относительно высокая скорость потребления кислорода, средний диаметр эритроцитов достоверно не изменялся (таблица 11). Эти данные согласуются с показателями, представленными в предыдущей главе, иллюстрирующими увеличение размеров эритроцитов в венозной крови (таблица 1).

Уже давно и хорошо известно, что кровопотеря сопровождается дополнительным разрушением эритроцитов (эритродиерезом) – феномен Богомольца-Ужанского. Сыворотка крови приобретает гемолитические свойства уже через 10 минут, но наиболее интенсивно они проявляются через 2 часа после кровопотери. Позднее в процесс разрушения форменных элементов включаются иммунные механизмы [75].

Поскольку полученные данные свидетельствуют, что средний объем циркулирующих в ранние сроки (на 6 часов) после кровопотери эритроцитов приближался к показателям более крупных эритроцитов, то можно предположить, что прежде всего разрушаются более мелкие красные клетки.

В первые часы (спустя 30 минут после кровопотери) диаметр клеток на пике набухания увеличивался в периферической крови и понижался в органах - в селезенке, печени, лёгком и сердце. Спустя 6 часов после воздействия диаметр эритроцитов снижался в селезенке, печени, лёгком, сердце, почке, а на 2 сутки после ОМК данный показатель уменьшался - в лёгком, сердце и почке (*таблица 12*). На ранние сроки (30 минут и 6 часов) после воздействия осмотическая стойкость красных клеток снижена. Однако, на 2 сутки после кровопотери осмотическая устойчивость эритроцитов повышалась в сердце и почках, но понижалась в селезенке, печени, лёгком и периферической крови (*таблица 14*). Средний диаметр эритроцитов (на момент разрушения половины клеток) увеличивался в печени и лёгком на все экспериментальные сроки после ОМК. Хотя в сердце и почке данный показатель снижался на 6 часов и 2 сутки после воздействия. В периферической крови он достоверно падал спустя 6 часов после кровопотери в сравнении с группой интактных животных (*таблица 13*). На ранние сроки (30 минут и 6 часов) после ОМК сокращался временной интервал наступления гемолиза 50% красных клеток крови и снижалась их осмотическая стойкость (*таблица 15*). Этот факт подтверждается работами других авторов. Так, Li Q., Jungmann V. с соавторами [137] показали, что активированные в результате кровопотери тромбоциты выделяют Простогландин E<sub>2</sub>, который способен понижать не только осмотическую стойкость, но и уменьшать размер эритроцитов.

Параллельно со снижением содержания клеток малого диаметра возрастало абсолютное количество крупных эритроцитов, что взаимосвязано с выходом крупных клеток из кроветворных органов и депо крови (селезёнки, печени, костного мозга, легких и т.д.). Поскольку в первые часы (спустя 30 минут и 6 часов) экстремального состояния активация эритропоэза отсутствовала, адаптивные реакции, скорее всего, реализовались за счет преобразованных клеток в организме.

На 2 сутки после кровопотери осмотическая устойчивость красных клеток становилась выше - в селезенке, печени, лёгком и периферической крови в сравнении с группой интактных крыс. В сердце и почке данный параметр достоверно не изменялся (*таблица 15*). Тем самым, при острой массивной кровопотере спустя 2 суток в циркулирующей крови преобладали молодые эритроциты более крупных форм (*таблицы 12, 13*), чему способствовала активация эритропоэза. Этот факт подтверждается ещё и данными других авторов, которые отмечают, что нормальный эритроцит способен противостоять гипоосмотической среде (аммонийному гемолизу) благодаря своей двояковогнутой форме, которая позволяет клетке увеличиваться в объёме на 70% до её предела растяжения и лизиса [19, 37].

**Таблица 12 – Изменение среднего диаметра эритроцитов на пике набухания в гипоосмотической среде после кровопотери,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мкм (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	7,76±0,35	9,06±0,38	8,79±0,1	8,74±0,18	8,78±0,06	9,05±0,41
30 минут	8,71±0,17 <sup>a</sup>	7,98±0,11 <sup>a</sup>	7,7±0,12 <sup>a</sup>	6,44±0,09 <sup>a</sup>	6,54±0,08 <sup>a</sup>	8,18±0,06
6 часов	7,92±0,22	6,96±0,02 <sup>a</sup>	7,03±0,05 <sup>a</sup>	6,17±0,02 <sup>a</sup>	6,09±0,04 <sup>a</sup>	6,47±0,09 <sup>a</sup>
2 суток	7,58±0,09	8,16±0,2	8,7±0,11	6,42±0,73 <sup>a</sup>	7,06±0,07 <sup>a</sup>	6,92±0,08 <sup>a</sup>

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 13 – Изменение среднего диаметра эритроцитов на середине гемолиза в гипоосмотической среде после кровопотери,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мкм (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	6,85±1,37	7,35±1,64	6,375±0,08	6,98±0,07	8,004±0,21	8,71±0,03
30 минут	6,69±0,06	7,305±0,13	7,93±0,14 <sup>a</sup>	7,32±0,12 <sup>a</sup>	8,11±0,05	9,22±0,06
6 часов	6,05±0,13 <sup>a</sup>	6,278±0,102	7,45±0,04 <sup>a</sup>	8,18±0,01 <sup>a</sup>	6,44±0,06 <sup>a</sup>	6,27±0,04 <sup>a</sup>
2 суток	6,99±0,1	8,33±0,03	7,15±0,04 <sup>a</sup>	7,17±0,08	6,72±0,15 <sup>a</sup>	6,94±0,09 <sup>a</sup>

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 14 – Время наступления пика набухания эритроцитов в гипосмотической среде,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мин (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	2,3±0,19	1,77±0,11	1,828±0,12	1,03±0,061	1,84±0,074	2,48±0,05
30 минут	2,38±0,08	1,542±0,06	1,85±0,07	1,15±0,18	1,35±0,12 <sup>a</sup>	1,04±0,08 <sup>a</sup>
6 часов	2,611±0,1	0,96±0,09 <sup>a</sup>	1,301±0,12 <sup>a</sup>	1,41±0,08	1,22±0,07 <sup>a</sup>	0,92±0,009 <sup>a</sup>
2 суток	4,86±0,03 <sup>a</sup>	3,81±0,02 <sup>a</sup>	4,65±0,3 <sup>a</sup>	6,97±1,18 <sup>a</sup>	11,25±0,6 <sup>a</sup>	19,15±0,72 <sup>a</sup>

Примечание: **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 15 – Время наступления середины гемолиза эритроцитов в гипосмотической среде,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мин (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	4,91±0,48	4,35±0,25	3,849±0,16	2,85±0,45	4,012±0,17	4,55±0,15
30 минут	4,34±0,11	3,02±0,08 <sup>a</sup>	3,413±0,01 <sup>a</sup>	3,13±0,08	3,47±0,02 <sup>a</sup>	3,43±0,13 <sup>a</sup>
6 часов	3,678±0,1 <sup>a</sup>	2,293±0,2 <sup>a</sup>	2,91±0,18 <sup>a</sup>	3,36±0,02	2,55±0,25 <sup>a</sup>	1,27±0,003 <sup>a</sup>
2 сутки	10,68±0,09 <sup>a</sup>	13,88±0,97 <sup>a</sup>	17,76±1,1 <sup>a</sup>	14,32±0,15 <sup>a</sup>	3,77±0,19	5,57±0,11

Примечание: **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2 – Характеристика гемоглобинового профиля в периферической крови и в костном мозге при действии на организм острой массивной кровопотери**

Методом электрофореза в полиакриламидном геле по Г. Мауреру в периферической крови и в костном мозге у крыс с ОМК выявлялись 6 изоформ гемоглобина. Перестройка эритроидного ростка при кровопотере сопровождалась изменениями в показателях соотношений между ними.

На ранние сроки (30 минут, 6 часов) после кровопотери как в периферической крови, так и в костном мозге наблюдалось увеличение 5, 6 изоформ и понижение 3 фракции по сравнению с интактной группой крыс. В костном мозге на 30 минут после кровопотери ещё отмечалось понижение 2 изоформы гемоглобина (*таблицы 16, 17*).

На 2 сутки после экспериментального воздействия в костном мозге повышались 4, 5, 6 изоформы и снижалась 3 фракция. Помимо этого, в костном мозге наблюдался рост 1 фракции. В периферической крови отмечалось снижение 1, 2, 3 изоформ и повышение 6 (*таблицы 16, 17*). Согласно представлениям Стародуба Н. Ф. [55], 5 и 6 изоформы гемоглобина являются физиологическим эквивалентом фетального гемоглобина крыс, и их увеличение на эритрофореграмме в наших экспериментах совпадало с повышением общего содержания F-клеток в крови.

Примечательно, что в ходе исследования было установлено, что у интактных крыс общее содержание гемоглобина в костном мозге составило  $8,0 \pm 0,6$  г/л, в то время как в периферической крови -  $135,6 \pm 1,9$  г/л (*таблица 17*), о чём также свидетельствуют данные других авторов [49, 56].

**Таблица 16 – Изменение белковых фракций гемоглобина крыс при острой массивной кровопотере (в относительных величинах),  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Hb, %	1 фракция, %	2 фракция, %	3 фракция, %	4 фракция, %	5 фракция, %	6 фракция, %
Интактная группа							
Костный мозг	100	10,41±0,2	12,58±0,23	44,87±0,52	18,95±0,3	9,06±0,58	4,13±0,2
Периферическая кровь	100	10,93±0,9	13,09±1,1	43,97±0,8	20,52±0,5	8,64±1,3	2,85±0,57
30 минут							
Костный мозг	100	10,0±0,1	10,06±0,2 <sup>a</sup>	35,89±0,51 <sup>a</sup>	17,87±0,4	11,82±0,3 <sup>a</sup>	14,36±0,7 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	9,21±0,6	10,53±0,2	34,17±0,3 <sup>a</sup>	19,51±1,3	12,82±0,6 <sup>a</sup>	13,76±0,4 <sup>a</sup>
6 часов							
Костный мозг	100	10,98±0,15	13,05±0,29	22,45±0,5 <sup>a</sup>	19,67±0,9	19,42±0,3 <sup>a</sup>	14,43±0,53 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	9,82±0,7	12,09±1,2	23,42±1,5 <sup>a</sup>	21,94±1,0	13,97±0,5 <sup>a</sup>	18,76±0,8 <sup>a</sup>
2 суток							
Костный мозг	100	18,67±0,6 <sup>a</sup>	10,44±0,3 <sup>a</sup>	27,03±1,3 <sup>a</sup>	25,31±0,7 <sup>a</sup>	9,91±0,2	8,64±0,19 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	9,12±0,2	10,43±1,0	28,52±1,3 <sup>a</sup>	24,55±0,6 <sup>a</sup>	11,13±0,3 <sup>a</sup>	16,25±1,3 <sup>a</sup>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 17 – Изменение белковых фракций гемоглобина крыс при острой массивной кровопотере (в абсолютных величинах),  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Нб, г/л	1 фракция, г/л	2 фракция, г/л	3 фракция, г/л	4 фракция, г/л	5 фракция, г/л	6 фракция, г/л
Интактная группа							
Костный мозг	8,0±0,61	0,8±0,01	1,0±0,01	3,6±0,12	1,55±0,1	0,72±0,1	0,33±0,01
Периферическая кровь	135,6±1,9	14,8±1,2	17,7±1,5	59,6±1,1	27,85±0,6	11,75±1,7	3,9±0,8
30 минут							
Костный мозг	8,1±0,12	0,8±0,01	0,8±0,01 <sup>a</sup>	2,9±0,12 <sup>a</sup>	1,4±0,11	1,0±0,01 <sup>a</sup>	1,2±0,1 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	128,3±2,2 <sup>a</sup>	11,8±0,3 <sup>a</sup>	13,5±0,3 <sup>a</sup>	43,8±0,4 <sup>a</sup>	25,0±1,4	16,5±0,1 <sup>a</sup>	17,7±0,6 <sup>a</sup>
6 часов							
Костный мозг	12,8±0,51 <sup>a</sup>	1,4±0,01 <sup>a</sup>	1,7±0,2	2,9±0,12 <sup>a</sup>	2,5±0,2 <sup>a</sup>	2,5±0,18 <sup>a</sup>	1,8±0,1 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	98,7±2,7 <sup>a</sup>	9,7±0,4 <sup>a</sup>	11,9±0,2 <sup>a</sup>	23,1±1,4 <sup>a</sup>	21,7±1,5	13,8±0,5	18,5±1,3 <sup>a</sup>
2 суток							
Костный мозг	10,4±0,24 <sup>a</sup>	1,9±0,12 <sup>a</sup>	1,1±0,11	2,85±0,18 <sup>a</sup>	2,62±0,21 <sup>a</sup>	1,0±0,03 <sup>a</sup>	0,93±0,01 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	109,5±4,5 <sup>a</sup>	10,0±0,2 <sup>a</sup>	11,4±0,5 <sup>a</sup>	31,2±1,4 <sup>a</sup>	26,9±0,7	12,2±0,3	17,8±0,3 <sup>a</sup>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).



### 4.3 – Содержание изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов

Полученные данные свидетельствуют, что усредненный показатель молекулярной массы гемоглобина цельной крови крыс составил  $68,568 \pm 5,608$  кДа. При этом выделялись 6 его изоформ: три с молекулярной массой более 68 кДа – 1, 2, 3 и три с молекулярной массой менее 64 кДа – 4, 5 и 6. Основными являлись 3-я -  $70,71 \pm 0,32$  (68,6-72,5) кДа и 4-я -  $63,0 \pm 1,43$  (52,2-70,6) кДа, которые практически в одинаковом количестве содержались в 1, 2 и 5-й фракциях эритроцитов (таблица 18).

Согласно таблице 18, молекулярная масса каждой отдельной изоформы при кровопотере не изменялась, за исключением 4-й, которая несколько увеличивалась по сравнению с интактной группой животных.

**Таблица 18 – Молекулярные массы изоформ гемоглобина в цельной периферической крови крыс в норме и после кровопотери на 2-е сутки (кДа),  $M \pm m$**

Изоформы гемоглобинов (n=10)	Изоформа 1	Изоформа 2	Изоформа 3	Изоформа 4	Изоформа 5	Изоформа 6	Среднее по всем фракциям
<b>Интактная группа</b> Диапазон (min-max)	$86,86 \pm 0,54$ (83,5-89,8)	$81,67 \pm 0,98$ (76,9-89,6)	$70,71 \pm 0,32$ (68,6-72,5)	$63,00 \pm 1,43$ (52,2-70,6)	$56,90 \pm 1,22$ (47,5-63,3)	$52,27 \pm 1,33$ (42,1-59,4)	$68,568 \pm 5,608$
<b>Кровопотеря 2 сут</b> Диапазон (min-max)	$86,04 \pm 0,54$ (82,6-88,5)	$78,12 \pm 0,45$ (75,6-79,5)	$71,82 \pm 0,14$ (71,2-72,5)	$69,04 \pm 0,14^a$ (68,8-69,8)	$56,53 \pm 0,13$ (56,1-57,3)	$54,49 \pm 0,37$ (53,0-56,8)	$69,34 \pm 0,3$

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ), F1- F6 - изоформы гемоглобинов.

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 1, 2, 4, 5 и 6 фракциях эритроцитов по сравнению с интактной группой. Снижение показателя МСНС обычно отмечается при заболеваниях с нарушением синтеза гемоглобина.

При этом другие эритроцитарные индексы, которые определяют размер эритроцита и содержание в нём гемоглобина – средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) и распределение

эритроцитов по величине (RDW) достоверно не изменялись (таблица 19). Поскольку показатель степени анизоцитоза достоверно не менялся, можно говорить о том, что каждая из популяций эритроцитов являлась однородной.

**Таблица 19 – Характеристика различных фракций эритроцитов при кровопотере на 2 сутки,  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	MCV, фл		MCH, пг		MCHC, г/дл		Цветовой показатель		RDW, %	
	Интактная	ОМК 2 сут	Интактная	ОМК 2 сут	Интактная	ОМК 2 сут	Интактная	ОМК 2 сут	Интактная	ОМК 2 сут
Цельная кровь	55,63± 0,11	51,93± 1,14	18,39± 0,66	17,2± 0,45	35,4± 1,104	33,1± 0,64	0,539± 0,09	0,511± 0,14	13,96± 0,43	13,33± 0,24
F1	54,95± 0,17	54,70± 0,35	19,26± 0,11	18,52± 0,17	35,05± 0,26	33,92 ±0,11 <i>a</i>	0,568± 0,13	0,610± 0,11	14,68± 0,15	14,61± 0,11
F2	54,09± 0,08	54,82± 0,68	18,81± 0,14	18,65± 0,16	34,5± 0,44	33,07 ±0,33 <i>a</i>	0,558± 0,11	0,574± 0,12	14,51± 0,24	14,52± 0,18
F3	53,6± 0,1	53,5± 0,43	18,32± 0,08	18,7± 0,27	34,19± 0,22	32,67 ±0,90	0,499± 0,15	0,518± 0,14	14,85± 0,18	14,79± 0,15
F4	53,31± 0,08	52,2± 0,61	18,52± 0,13	18,37± 0,67	35,7± 0,16	25,27 ±4,42 <i>a</i>	0,604± 0,21	0,564± 0,18	13,91± 0,21	13,86± 0,17
F5	49,61± 1,2	52,82± 0,93	19,07± 0,16	18,72± 0,52	37,27± 0,47	24,62 ±3,47 <i>a</i>	0,863± 0,18	0,525± 0,15	13,98± 0,25	13,65± 0,15
F6	52,42± 0,19	54,17± 1,15	17,78± 0,11	19,27± 0,47	34,13± 0,42	23,5± 1,05 <i>a</i>	0,549± 0,15	0,566± 0,11	14,91± 0,21	14,35± 0,19

*Примечание:* **MCV** – средний объём эритроцитов; **MCH** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **MCHC** – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; **RDW** – показатель анизоцитоза; **a** – статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); F1-F6 – фракции эритроцитов.

При определении различных изоформ гемоглобина в отдельном эритроците каждой фракции оказалось, что и после кровопотери на 2 сутки каждая клетка, как и у интактных животных, содержала только две изоформы – одну более тяжёлую и одну более лёгкую. При этом, если у интактных животных в 1, 2 фракциях эритроцитов доминировали более лёгкие изоформы, а в 3-6-й фракциях эритроцитов – более тяжёлые, то после кровопотери процент тяжелых изоформ – возрастал. При рассмотрении соотношения между изоформами гемоглобина при кровопотере на 2 сутки, следует отметить, что оно менялось на противоположное в первых двух фракциях, а в 3-6 оставалось таким же по

сравнению с интактной группой (таблицы 20-22). Аналогичная картина наблюдалась и в их абсолютном количестве (таблицы 20-22).

**Таблица 20 – Изменение содержания отдельных изоформ гемоглобина в одном эритроците различных фракции на 2-е сутки после кровопотери, М±m**

Показатели (n=10)	МСН, пг	Тяжелая изоформа, кДа	Лёгкая изоформа, кДа	Тяжелая изоформа, %	Лёгкая изоформа, %	Тяжелая изоформа, количество в эритроците, пг	Лёгкая изоформа, количество в эритроците, пг
<b>Фракция эритроцитов 1</b>							
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 <sup>а</sup>	7,95±0,2 <sup>а</sup>
<b>Фракция эритроцитов 2</b>							
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±3,51	10,82±0,27 <sup>а</sup>	7,83±0,27 <sup>а</sup>
<b>Фракция эритроцитов 3</b>							
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 <sup>а</sup>	7,84±0,27 <sup>а</sup>
<b>Фракция эритроцитов 4</b>							
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 <sup>а</sup>	6,71±0,28 <sup>а</sup>
<b>Фракция эритроцитов 5</b>							
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 <sup>а</sup>	5,05±0,32 <sup>а</sup>
<b>Фракция эритроцитов 6</b>							
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±2,17	14,60±0,42 <sup>а</sup>	4,67±0,42 <sup>а</sup>

*Примечание:* **ОМК** – острая массивная кровопотеря; **МСН** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **а** - статистически значимые отличия от группы интактных животных (p<0,05).

Установлено, что в пяти фракциях эритроцитов преимущественно содержались нормальные типы гемоглобина (64-68 кДа). В то время как в 1-й фракции эритроцитов содержались тяжелая форма+нормальные варианты гемоглобина, а в 6 фракции, наоборот, только лёгкие изоформы гемоглобина (таблицы 20-22). Молекулярная масса изоформ гемоглобина в каждом эритроците не изменялась, общее количество гемоглобина в клетке также не изменялось на протяжении первых 2-х суток. Следовательно, уменьшение

абсолютного количества гемоглобина в цельной крови – результат гемоделюции, а не качественных изменений эритроцитов.

Таблица 21 – Изменение изоформ гемоглобина в различных фракциях эритроцитов (в пг),  $M \pm m$ 

Фракции эритроцитов, пг (n=10)	Изоформы гемоглобинов											
	Изоформа 1		Изоформа 2		Изоформа 3		Изоформа 4		Изоформа 5		Изоформа 6	
	86,86±0,54 (83,5-89,8)		81,67±0,98 (76,9-89,6)		70,71±0,32 (68,6-72,5)		63,00±1,43 (52,2-70,6)		56,90±1,22 (47,5-63,3)		52,27±1,33 (42,1-59,4)	
	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК
	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут	2 сут
Цельная кровь	14,8±1,2	10,0±0,2 <i>a</i>	17,7±1,5	11,4±0,5 <i>a</i>	59,6±1,1	31,2±1,4 <i>a</i>	27,85±0,6	26,9±0,7	11,75±1,7	12,2±0,3	3,9±0,8	17,8±0,3 <i>a</i>
F1	8,86±0,18	10,57±0,20 <i>a</i>			10,4±0,18	7,95±0,2 <i>a</i>						
F2			6,26±0,14	10,82±0,27 <i>a</i>			12,55±0,14	7,83±0,27 <i>a</i>				
F3					12,22±0,14	10,85±0,27 <i>a</i>	6,10±0,14	7,84±0,27 <i>a</i>				
F4					10,54±0,17	11,66±0,28 <i>a</i>	7,98±0,17	6,71±0,28 <i>a</i>				
F5							11,99±0,31	13,67±0,32 <i>a</i>	7,08±0,31	5,05±0,32 <i>a</i>		
F6									12,00±0,23	14,60±0,42 <i>a</i>	5,78±0,23	4,67±0,42 <i>a</i>

Примечание: *a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); F1-F6 – фракции эритроцитов.

**Таблица 22 – Изменение изоформ гемоглобина в различных фракциях эритроцитов (по молекулярной массе), М±m**

Фракции Эритроцитов, кДа (n=10)	Изоформы гемоглобинов											
	Изоформа 1		Изоформа 2		Изоформа 3		Изоформа 4		Изоформа 5		Изоформа 6	
	86,86±0,54 (83,5-89,8)		81,67±0,98 (76,9-89,6)		70,71±0,32 (68,6-72,5)		63,00±1,43 (52,2-70,6)		56,90±1,22 (47,5-63,3)		52,27±1,33 (42,1-59,4)	
	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК	Интактная	ОМК
я	2 сут	я	2 сут	я	2сут	я	2 сут	я	2 сут	я	2 сут	
Цельная кровь	86,86±0,5 4	86,04±0,5 4	81,67±0,9 8	78,12±0,4 5	70,71±0,3 2	71,82±0,14	63,00±1,43	69,04±0,14 <i>a</i>	56,90±1,22	56,53±0,1 3	52,27±1,3 3	54,49± 0,37
F1	84,84±1,5	88,6±1,26			74,51±0,8 4	75,8±0,6						
F2			83,32±1,0 5	80,77±0,7 8			66,68±0,83	72,52±1,56				
F3					71,89±0,5 7	70,47±0,35	64,04±1,08	67,75±0,88				
F4					73,46±1,0 4	67,4±0,52	64,55±0,46	56,17±2,71				
F5							61,7±0,52	64,2±0,42	55,3±0,8	55,57±0,3 9		
F6									59,09±0,75	53,8±1,18	50,76±0,8 2	48,32± 2,8

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); F1-F6 – фракции эритроцитов.

## Резюме

Как известно, в компенсации острой постгеморрагической анемии выделяют три стадии: рефлекторно-сосудистую, гидремическую и костномозговую. В раннюю рефлекторно-сосудистую фазу компенсации кровопотери (первые сутки) благодаря возбуждению симпатико-адреналовой системы наблюдается вазоконстрикция и усиление сопротивления периферических сосудов, стабилизация гемодинамики за счет централизации кровообращения с первоочередным кровоснабжением головного мозга и сердца, уменьшение возврата крови к сердцу и сердечного выброса. Концентрация эритроцитов, гемоглобина и гематокрита пока близки к норме («скрытая» анемия). Вторая гидремическая фаза компенсации (2-3 сутки) сопровождается аутогемодилюцией — поступлением в кровеносное русло тканевой жидкости и восполнением объема плазмы. Усиление секреции катехоламинов и альдостерона надпочечниками, вазопрессина – гипоталамусом способствует стабильности уровня электролитов в плазме крови. Происходит прогрессирующее снижение показателей эритроцитов и гемоглобина (общего и в единице объема), гематокрита; значение цветового показателя в норме (постгеморрагическая нормохромная анемия). В третью, костномозговую фазу компенсации (4-5 сутки) из-за недостатка железа анемия становится гипохромной, усиливается образование эритропоэтина почками с активацией ретикулоэндотелиальной системы, эритропоэза костного мозга, очагов экстрамедуллярного кроветворения. В красном костном мозге наблюдается гиперплазия эритроидного ростка и увеличение общего числа нормоцитов, в периферической крови — значительное повышение количества молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов) и клеток, содержащих фетальные формы гемоглобина (F-клеток), обладающих наибольшими кислотоустойчивыми свойствами. Уровни гемоглобина, эритроцитов и гематокритного числа снижены.

Если процессы, определяющие третью стадию, исследуются давно и хорошо изучены, то особенности состояния эритроцитов на 1-й и 2-й стадии оценены недостаточно.

В исследованные сроки, соответствующие 1 и 2 стадиям, развивающаяся после кровопотери анемия еще не носит гипохромный характер, вследствие того, что кроветворная ткань не успевает в достаточной степени отреагировать активацией эритропоэза, поэтому не выявляются изменения в содержании гемоглобина в отдельных клетках, цветовом показателе, размерах эритроцитов и их анизоцитозе, но гипоксия уже есть. Адаптация к возникающей гипоксии осуществляется на уровне изоформ гемоглобина.

На ранние сроки (30 минут и 6 часов после кровопотери) эритроциты увеличиваются в размерах, вероятно, в результате ингибирования активности  $\text{Na, K+ATP}$ азы, что считается одним из самых ранних событий при гипоксии, критичном для жизни клеток [88, 108, 165], а в эритроците основная доля энергии АТФ расходуется на транспорт ионов, функционирование АТФ-азных систем и поддержание электролитного баланса клетки. С активацией эритропоэза (2-е сутки после кровопотери) размеры клеток возвращаются к нормальному уровню.

Кроме того, осмотически менее стойкими являются малые или «старые» клетки, которые быстрее разрушаются, поскольку их мембраны более чувствительны к гипоосмотическим нагрузкам.

С активацией эритропоэза в крови циркулируют клетки с меньшей плотностью упаковки гемоглобина, о чем свидетельствуют изменения показателя МНСН. Понижение МНСН обычно связывают с нарушением синтеза гемоглобина при ряде заболеваний.

Перестройка эритроидного ростка при кровопотере сопровождается изменениями в соотношении между изоформами гемоглобина в костном мозге и периферической крови. Так, на эритрофореграмме спустя 30 минут и 6 часов после воздействия как в периферической крови, так и в костном мозге происходит повышение 5-й и 6-й изоформ и снижение 3-й. Отмечается уменьшение 2-й изоформы гемоглобина в костном мозге на 30 минут после ОМК. При кровопотере ко вторым суткам уменьшается концентрация в крови 1-й, 2-й, 3-й изоформ гемоглобина и возрастает 5-й и 6-й (4-я или не изменяется, или растет).



Полученные данные свидетельствуют о том, что в цельной крови усредненный показатель молекулярной массы гемоглобина крыс составляет  $68,56 \pm 6,60$  кДа – у интактных животных и  $69,34 \pm 0,3$  кДа – у крыс с ОМК. При этом у крыс с ОМК, как и у животных интактной группы, выделяется шесть изоформ: три с молекулярной массой более 68 кДа – 1, 2, 3 и три с молекулярной массой менее 64 кДа – 4, 5 и 6 изоформы гемоглобина. Основными являются 3-я изоформа -  $70,71 \pm 0,31$  (68,6-72,5) кДа и 4-я изоформа -  $63,0 \pm 1,43$  (52,2-70,6) кДа, которые практически в одинаковом количестве содержатся в 1, 2 и 5-й фракциях эритроцитов.

Однако, фракции эритроцитов отличаются своим содержанием- в 1-й фракции эритроцитов содержится тяжелая изоформа+ нормальные варианты гемоглобина, во 2-5-й – основные типы гемоглобинов (с молекулярным весом 64-68 кДа), а в 6-й фракции - более лёгкие. Если наличие основных типов гемоглобина в 3, 4 фракциях эритроцитов обуславливается их физиологической нормой, то появление тяжёлых или лёгких изоформ можно связать с конформационными изменениями (структурными характеристиками) гемоглобина – снижением жёсткости белкового окружения гема, понижением вклада боковых  $\text{CH}_3$ -групп колебаний полуколец пиррола гема, повышением трансформации виниловой полосы, возрастанием колебаний метиновых радикалов и метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, повышением маркера спинового состояния и понижением относительной способности дезоксигемоглобина связывать кислород, которые приводят к снижению лиганд связывающей способности.

При кровопотере в отдельных эритроцитах различных фракций количество гемоглобина не меняется. Молекулярная масса изменяется лишь в 4 изоформе.

Вероятно, изоформы гемоглобина могут выступать в качестве индикаторов отдельных фракций эритроцитов. В частности, изоформы 1, 2, 5 и 6 – индикаторы соответствующих фракций эритроцитов.

Уменьшение в периферической крови 1-й и 2-й изоформ гемоглобина указывает на уменьшение в ней 1-й и 3-й фракций эритроцитов – клеток,

содержащих тяжелую изоформу+нормальные варианты гемоглобина, а увеличение 6-й свидетельствует о возрастании числа клеток, содержащих только лёгкие изоформы (5-й и 6-й), параллельное увеличение 4-й и 5-й говорит об увеличении в циркуляции 5-й фракции эритроцитов, содержащей одну основную и одну лёгкую изоформы.

Анализ содержания изоформ гемоглобина в костном мозге даёт основание утверждать, что в ранние сроки имеет место повышение поступления в циркуляцию 4 и 5 фракций эритроцитов (уменьшение количества) и задержка в нём 1, 2, 5 и 6 –й фракций (увеличение показателя), а активация эритропоэза, на которую указывает возрастание в крови эритроцитов (хотя и не достигает исходной величины), ретикулоцитоз и повышение числа F-клеток, что приводит к повышению образования всех фракций клеток с последующим их выходом в кровь.

Таким образом, адаптация организма к гипоксии на ранних сроках после острой массивной кровопотери обеспечивается гетерогенностью изоформ гемоглобина.

#### **Список публикаций по материалам 4 главы**

1. **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. – С. 17-18.

2. **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.

3. **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.

4. 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.

## ГЛАВА 5 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ОСТРОГО АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

### 5.1 – Реакция системы крови на острое асептическое воспаление

Общеизвестно, что при остром асептическом воспалении (ОАВ) наибольшие изменения, происходящие в периферической крови и костном мозге, обусловлены в большей степени клетками гранулоцитарного и лимфоцитарного рядов. Однако имеющиеся изменения красной крови требуют более детального рассмотрения.

Со стороны клеток белого ряда на 6 часов при введении крысам скипидара отмечалось увеличение общего числа лейкоцитов за счет повышения количества гранулоцитов (*Grn*, *г/л*). На 2 и 4 сутки после ОАВ общее количество лейкоцитов продолжало увеличиваться за счет роста гранулоцитов (*Grn*, *г/л* и *%*) и лимфоцитов (*Лум*, *г/л*) по сравнению с группой интактных животных (*таблица 23*). Повышение общего числа лейкоцитов на разные сроки после ОАВ обусловлено увеличением числа нейтрофилов (сегментоядерных и палочкоядерных), поступающих из костного мозга и мигрирующих к очагу воспаления. Показано, что нейтрофилы фагоцитируют омертвевшие ткани и микроорганизмы, а также поддерживают каскад воспалительно-репаративного процесса. На 4 сутки после экстремального воздействия наблюдалось значительное увеличение количества моноцитов (предшественников макрофагов), базофилов и эозинофилов (*Mid*, *%*) (*таблица 23*). Установлено, что макрофаги совместно с нейтрофилами ограничивают пораженный участок тканей, образуя тем самым нейтрофильно-макрофагальный барьер [5, 127].

Значимых изменений тромбоцитарного звена на протяжении всего эксперимента не обнаружено (*таблица 23*).

**Таблица 23 – Гемограмма крыс в норме и при действии на организм острог асептического воспаления, М±m**

Показатели (n=10)	Интактные	Воспаление 6 часов	Воспаление 2 сутки	Воспаление 4 сутки
WBC, Г/л	17,13±1,67	18,2±1,05 <sup>a</sup>	18,91±0,51 <sup>a</sup>	19,8±0,6 <sup>a</sup>
Lym, Г/л	14,16±1,57	14,96±0,18	15,22±0,11 <sup>a</sup>	15,6±0,86 <sup>a</sup>
Mid, Г/л	3,35±0,56	3,32±0,55	3,5±0,08	3,8±0,63
Grn, Г/л	0,75±0,17	1,32±0,09 <sup>a</sup>	1,05±0,09	1,2±0,1 <sup>a</sup>
Lym, %	75,25±2,52	73,02±1,98	73,01±0,02	75,0±1,3
Mid, %	18,25±2,44	18,3±2,08	21,04±0,18	21,65±0,15 <sup>a</sup>
Grn,%	2,6±0,5	3,05±0,4	3,9±0,15 <sup>a</sup>	2,8±0,2
RBC, Т/л	7,515±0,02	7,48±0,16	6,48±0,11 <sup>a</sup>	7,42±0,18
Hb,г/л	135,6±1,9	135,98±1,25	133,36±1,1 <sup>a</sup>	134,7±0,16
Hct,%	43,24±1,94	44,03±0,71	41,1±0,82 <sup>a</sup>	41,15±1,12
MCV, фл	55,63±0,11	55,28±0,75	51,24±0,38 <sup>a</sup>	51,61±0,71 <sup>a</sup>
MCH, пг	18,39±0,66	18,12±0,47	17,15±0,72	18,53±0,5
MCHC, г/дл	35,4±1,104	35,41±0,65	35,12±1,2	35,3±0,59
RDW,%	13,96±0,43	13,72±0,22	13,98±0,21	13,54±0,21
Plt, Г/л	736,5±56,36	739,0±60,87	698,1±54,12	765,05±0,11
Pct,%	0,48±0,04	0,45±0,04	0,44±0,06	0,49±0,05
MPV,фл	6,38±0,19	6,43±0,14	6,51±0,12	6,61±0,27
PDW,%	10,99±0,21	11,03±0,16	10,95±0,14	10,82±0,16

*Примечание:* **WBC** – общее количество лейкоцитов; **Lym** – лимфоциты; **Mid** – моноциты; **Grn** – гранулоциты; **RBC** - эритроциты; **Hb** - гемоглобин; **Hct** - гематокрит; **MCV** - средний объём эритроцитов; **MCH** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **MCHC** – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; **RDW** – показатель анизоцитоза; **Plt** - количество тромбоцитов; **Pct** - тромбокрит; **MPV**- средний объём тромбоцитов; **PDW** - распределение тромбоцитов по размерам; **a** – статистически значимые отличия от интактной группы животных (p<0,05).

Со стороны клеток красного ряда на 6 часов после воспаления достоверных изменений не отмечалось. Спустя 2 суток после экстремального воздействия у крыс наблюдалось понижение числа эритроцитов, гемоглобина и гематокритного показателя по сравнению с интактной группой животных. Средний объём эритроцитов (*MCV, фл*) уменьшался (*таблицы 23, 24*). К 4 суткам при иницировании воспаления показатели красной крови приближались к нормальным физиологическим значениям, за исключением среднего объема

эритроцитов ( $MCV$ , фл), который снижался по сравнению с интактной группой (таблица 23).

На 2 сутки при остром асептическом воспалении концентрация в периферической крови клеток, содержащих фетальные формы гемоглобина (F-клетки) достоверно не менялась. Выявленный статистически значимый ретикулоцитоз на 2 и 4 сутки после экстремального воздействия свидетельствует о стимуляции эритропоэза (таблица 24).

Соотношение числа ретикулоцитов к клеткам, содержащим фетальные формы гемоглобина, на 2 сутки после введения крысам скипидара увеличивалось практически в 2 раза (таблица 24).

**Таблица 24 – Изменения количества эритроидных клеток в циркулирующей крови крыс при остром асептическом воспалении,  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Эритроциты, г/л	Ретикулоциты, г/л	F- клетки, г/л	Ретикулоциты/ F- клетки
Интактные	7515,01±23,31	117,84±8,85	114,91±4,81	1,03
6 часов	7480,05±160,1	126,20±3,15	112,51±1,4	1,12
2 сутки	6481,10±110,4 <sup>a</sup>	216,03±4,08 <sup>a</sup>	110,54±1,98	1,95
4 сутки	7421,08±182,3	196,55±5,12 <sup>a</sup>	114,35±2,18	1,72

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Средние диаметры циркулирующих F-клеток не изменялись на все сроки после воздействия, в то время как средние диаметры ретикулоцитов увеличивались на 2 и 4 сутки при ОАВ, что связано с их выходом из костного мозга и поступлением в периферическую кровь (таблица 25).

**Таблица 25 – Диаметры эритроидных клеток при остром асептическом воспалении,  $M \pm m$**

Показатели, мкм (n=10)	Эритроциты	Ретикулоциты	F- клетки
Интактные	6,29±0,17	9,72±0,055	10,98±0,138
6 часов	6,25±0,07	9,91±0,04	10,86±0,01
2 сутки	6,12±0,03	10,12±0,15 <sup>a</sup>	10,94±0,04
4 сутки	6,21±0,08	10,25±0,05 <sup>a</sup>	11,02±0,15

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

В миелограмме на 6 часов при инициировании воспалительного процесса отмечалось увеличение общего числа эритробластов и базофильных нормоцитов, миелоцитов, мегакариоцитов, тучных и ретикулярных клеток, что указывает на задержку дифференцировки клеток-предшественников в костном мозге (таблица 26).

**Таблица 26 – Миелограмма крыс при остром асептическом воспалении (млн/100 г массы тела),  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Интактная группа	Воспаление 6 часов	Воспаление 2 сутки	Воспаление 4 сутки
Общая клеточность	41,43 ± 4,73	46,12 ± 2,85	26,34 ± 3,61 <sup>a</sup>	68,72±2,15 <sup>a</sup>
Эритробласты	2,85 ± 0,33	4,15 ± 0,52 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,05±0,02 <sup>a</sup>
Базофильный нормоцит	2,102 ± 0,18	3,54 ± 0,11	2,10 ± 0,33	1,96±0,11
Полихроматофильный нормоцит	1,52 ± 0,11	1,5 ± 0,10	1,75 ± 0,24	1,59±0,52
Оксифильный нормоцит	0,81 ± 0,12	0,83 ± 0,05	1,46 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,89±0,01
Эритроидный ряд	7,28± 1,03	8,12 ± 0,08	6,87 ± 0,86	6,18±0,22
Миелобласты	4,85 ± 0,52	5,01 ± 0,12	1,86 ± 0,19 <sup>a</sup>	8,5±0,56 <sup>a</sup>
Миелоциты	4,96 ± 0,21	6,91 ± 0,40 <sup>a</sup>	7,64 ± 0,18	3,57±0,18 <sup>a</sup>
Нейтрофильный метамиелоцит	1,01 ± 0,04	1,01 ± 0,08	1,82 ± 0,10	7,92±0,92 <sup>a</sup>
Нейтрофилы (палочкоядерные/ сегментоядерные)	9,15 ± 0,55	9,42 ± 0,75	4,53 ± 0,49 <sup>a</sup>	27,51±1,93 <sup>a</sup>
Нейтрофильный ряд	19,97 ± 1,32	22,05 ± 0,84 <sup>a</sup>	15,88 ± 0,96 <sup>a</sup>	45,69±2,14 <sup>a</sup>
Эозинофильный ряд	0,901 ± 0,15	0,66 ± 0,15	0,79 ± 0,09	0,61±0,02
Базофильный ряд	0,68±0,05	1,23±0,1 <sup>a</sup>	0,96±0,08 <sup>a</sup>	0,63±0,01
Моноцитарный ряд	1,74 ± 0,35	2,41 ± 0,03	1,92 ± 0,11	2,01±0,24
Лимфоидный ряд	10,03 ± 0,64	9,15 ± 0,54	7,11 ± 0,32 <sup>a</sup>	12,25±0,50 <sup>a</sup>
Мегакариоциты	0,51 ± 0,11	1,37 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,51± 0,18	0 <sup>a</sup>
Ретикулярные клетки	0,33 ± 0,08	1,04 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,12± 0,38	1,18±0,40 <sup>a</sup>

Примечание: **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

При остром асептическом воспалении на 2 сутки общая клеточность костного мозга снижалась за счет уменьшения числа клеток всех ростков - эритроидного (эритробластов), нейтрофильного (миелобластов, нейтрофилов палочкоядерных и

сегментоядерных) и лимфоидного рядов (*таблица 26*), что обусловлено выходом этих типов клеток из костного мозга и их миграцией к очагу воспаления.

Литературные данные указывают на то, что миелобласты (клетки-предшественницы гранулоцитов) и мегакариоциты (предшественники тромбоцитов) являются неотъемлемыми участниками воспалительного процесса. Белые клетки крови, образовавшись в костном мозге, перемещаются в очаг воспаления. Тромбоциты, сформировавшись в цитоплазме мегакариоцитов, отшнуровываются в синусы костного мозга, а затем поступают в циркуляцию [52, 59].

При инициировании воспаления на 4-е сутки отмечалось увеличение общего количества миелокариоцитов за счет увеличения клеток лимфоидного и нейтрофильного рядов. Число нейтрофилов палочкоядерных и сегментоядерных увеличивалось в 2-2,5 раза по сравнению с интактной группой. Миелограмма при остром асептическом воспалении свидетельствовала о нарастающей гиперплазии гранулоцитарного ростка и лимфоидной инфильтрации костного мозга, отмечалась активация гранулоцитопоэза.

При этом количество эритробластов снижалось, а число ретикулярных клеток возрастало в 3 раза по сравнению с группой интактных животных (*таблица 26*).

Таким образом, в первые часы (6 часов) после ОАВ наблюдалось торможение наработки эритроидных клеток в костном мозге, а к 2-4 суткам - выход молодых клеток из костного мозга в периферическую кровь. Отмечался ретикулоцитоз, что указывает на усиление эритропоэза.

Средние диаметры эритроцитов во внутренних органах крыс уменьшались в селезёнке и почке (спустя 2 суток), и в лёгком (спустя 4 суток). В остальных локализациях изменения средних диаметров эритроцитов не наблюдались (*таблица 27*).

**Таблица 27 – Средние диаметры эритроцитов в изотоническом растворе разных органов при воспалении на ранние сроки,  $M \pm m$**

Показатели, мкм (n=10)	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	6,42±0,17	6,01±0,12	6,21±0,12	6,3±0,15	6,31±0,15
6 часов	6,51±0,09	6,42±0,18	6,28±0,08	6,24±0,07	6,01±0,11
2 сутки	5,21±0,23 <sup>a</sup>	5,98±0,03	6,12±0,05	6,15±0,12	5,97±0,05 <sup>a</sup>
4 сутки	6,12±0,04	5,61±0,02	5,96±0,1 <sup>a</sup>	6,28±0,15	6,24±0,1

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

В первые часы (6 часов) при ОАВ диаметр клеток на пике набухания понижался в печени, на 2-е сутки - в селезёнке, печени, лёгких и сердце, а к 4-м суткам - в сердце. В периферической крови и почках данный показатель не менялся на протяжении всего эксперимента (*таблица 28*). Средний диаметр эритроцитов на середине гемолиза (на момент разрушения 50% клеток) повышался в печени (на 6 часов, 2 суток) и лёгких (на 2 суток). Однако в сердце данный показатель, наоборот, снижался. В периферической крови, селезёнке и почках он не менялся (*таблица 29*). Следовательно, при воспалении в периферической крови помимо клеток с малыми диаметрами присутствуют и клетки с более крупными диаметрами, поступающими из органов-депо (печени, лёгких), т.е. имеет место наличие разных популяций эритроцитов.

Наши данные согласуются и с литературными сведениями. Так, в работе Борсаковой Д.В. описано, что эритроциты в суспензии после гипоосмотического воздействия подразделяются (по проницаемости мембраны клетки для ионов натрия и калия) на три популяции: первая – поры которой резко закрываются («запечатываются»), вторая - поры закрываются медленно, и третья популяция, у которой целостность мембраны не восстанавливается. Относительное содержание трех типов эритроцитов зависит от условий, существующих в суспензии клеток, до и после гемолиза [14].

При остром асептическом воспалении осмотическая устойчивость клеток повышалась на 6 часов – в селезенке, печени, лёгких, сердце, и на 2-е сутки – в селезенке, лёгких, сердце, а к 4-м суткам данный показатель постепенно возвращался к исходному значению (*таблица 30*). Скорость протекания гемолиза в первые часы (6 часов) снижалась («замедлялась»), а к 2-4-м суткам приближалась к группе интактных животных (*таблица 31*), что свидетельствует о включении компенсаторно-приспособительных механизмов (поступлении молодых клеток из костного мозга в кровь для восполнения популяций эритроцитов).



**Таблица 28 – Изменение среднего диаметра эритроцитов на пике набухания в гипоосмотической среде при воспалении,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мкм (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	7,76±0,35	9,06±0,38	8,79±0,1	8,74±0,18	8,78±0,06	9,05±0,41
6 часов	8,23±0,43	8,65±0,29	6,93±0,36 <sup>a</sup>	8,61±0,5	9,13±0,59	9,09±0,34
2 сутки	6,88±0,52	6,69±0,21 <sup>a</sup>	7,71±0,34 <sup>a</sup>	7,64±0,45 <sup>a</sup>	6,401±0,17 <sup>a</sup>	7,72±0,58
4 сутки	7,72±0,15	8,96±0,21	8,2±0,01 <sup>a</sup>	8,64±0,15	7,96±0,15 <sup>a</sup>	8,95±0,22

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 29 – Изменение среднего диаметра эритроцитов на середине гемолиза в гипоосмотической среде при воспалении,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мкм (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	6,85±1,37	7,35±1,64	6,375±0,08	6,98±0,07	8,004±0,21	8,71±0,03
6 часов	7,63±0,75	7,21±0,68	7,01±0,24 <sup>a</sup>	7,48±0,41	8,66±0,82	8,42±0,51
2 сутки	7,55±0,58	7,45±0,22	9,47±0,46 <sup>a</sup>	8,6±0,43 <sup>a</sup>	6,87±0,24 <sup>a</sup>	8,701±0,62
4 сутки	6,55±0,12	7,19±0,5	6,84±0,18	7,01±0,02	7,95±0,06	8,5±0,16

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 30 – Время наступления *ника набухания* эритроцитов в гипоосмотической среде при воспалении,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мин (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	2,3±0,19	1,77±0,11	1,828±0,12	1,03±0,061	1,84±0,074	2,48±0,05
6 часов	4,12±0,82	6,13±0,72 <sup>a</sup>	4,627±0,71 <sup>a</sup>	3,12±0,39 <sup>a</sup>	6,23±0,66 <sup>a</sup>	3,47±0,22
2 сутки	1,89±0,06	2,21±0,08 <sup>a</sup>	1,74±0,19	2,62±0,39 <sup>a</sup>	2,69±0,23 <sup>a</sup>	2,33±0,17
4 сутки	2,5±0,09	1,52±0,05	1,84±0,11	1,15±0,01	1,62±0,01	2,5±0,02

Примечание: **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 31 – Время наступления *середины гемолиза* эритроцитов в гипоосмотической среде при воспалении,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мин (n=10)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	4,91±0,48	4,35±0,25	3,849±0,16	2,85±0,45	4,012±0,17	4,55±0,15
6 часов	8,68±1,26 <sup>a</sup>	7,81±0,15 <sup>a</sup>	8,293±0,25 <sup>a</sup>	6,08±1,006 <sup>a</sup>	8,66±0,82	6,77±0,13 <sup>a</sup>
2 сутки	3,134±0,02 <sup>a</sup>	3,55±0,21 <sup>a</sup>	3,43±0,15	4,52±0,76	4,87±0,24	3,63±0,27
4 сутки	5,89±0,15	5,01±0,11	3,52±0,08	2,64±0,12	3,61±0,18	4,52±0,02

Примечание: **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

## **5.2 – Характеристика гемоглобинового профиля в периферической крови и в костном мозге при действии на организм острого асептического воспаления**

В периферической крови и костном мозге у крыс с острым асептическим воспалением при помощи метода электрофореза в полиакриламидном геле выявлялось 6 изоформ гемоглобина (*таблицы 32, 33*).

В результате исследования установлено, что при воспалении общее содержание гемоглобина в костном мозге и периферической крови увеличивалось на 6 часов. При этом в костном мозге оно составило  $9,76 \pm 0,56$  г/л ( $8,0 \pm 0,6$  г/л – у интактных) и в периферической крови составило  $153,1 \pm 2,1$  г/л ( $135,6 \pm 1,9$  г/л – у интактных). Это может быть объяснено сгущением крови. К 2-м суткам данный показатель возвратился к исходному уровню, а на 4-е сутки он достоверно снизился в периферической крови, где равнялся  $130,75 \pm 0,13$  г/л. В костном мозге не изменялся (*таблица 33*).

При воспалении концентрации в костном мозге лёгких изоформ гемоглобинов (5-я и 6-я фракция) повышались на 2-е и 4-е сутки (*таблица 32, 33*). Концентрация лёгких изоформ повышалась и в периферической крови на те же сроки (*таблицы 32, 33*). При этом 6-я изоформа реагировала быстрее всех и изменялась на 6 часов после инициации ОАВ.

Концентрации тяжелых изоформ (1-я и 2-я) в костном мозге снижались уже через 6 часов, что приводило к уменьшению показателя в периферической крови на 2-е сутки, но к 4-м суткам они практически нормализовались (*таблица 33*).

Основные изоформы гемоглобинов возрастали как в костном мозге (3-я изоформа - на 6 часов, 4-я изоформа - на 2-е и 4 сутки), так и в периферической крови (4-я изоформа - на 2-е сутки) (*таблица 33*).

**Таблица 32 – Изменение белковых фракций гемоглобина крыс при острой остром асептическом воспалении (в относительных величинах),  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	Нв, %	1 фракция, %	2 фракция, %	3 фракция, %	4 фракция, %	5 фракция, %	6 фракция, %
<b>Интактные</b>							
Костный мозг	100	10,41±0,2	12,58±0,23	44,87±0,52	18,95±0,3	9,06±0,58	4,13±0,2
Периферическая кровь	100	10,93±0,9	13,09±1,1	43,97±0,8	20,52±0,5	8,64±1,3	2,85±0,57
<b>6 часов</b>							
Костный мозг	100	4,34±0,008 <sup>a</sup>	6,82±0,59 <sup>a</sup>	52,53±1,03 <sup>a</sup>	19,78±0,57	8,55±0,83	7,98±0,51 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	7,43±0,34	10,28±0,36 <sup>a</sup>	40,22±1,18	19,83±0,82	10,67±0,31	11,57±1,12 <sup>a</sup>
<b>2 суток</b>							
Костный мозг	100	8,07±0,23 <sup>a</sup>	8,06±0,57 <sup>a</sup>	35,98±0,53 <sup>a</sup>	24,65±1,59	11,75±0,61	11,49±1,08 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	3,81±0,21 <sup>a</sup>	5,59±0,15 <sup>a</sup>	44,19±0,31	32,85±0,84 <sup>a</sup>	8,14±0,62	5,42±0,22 <sup>a</sup>
<b>4 суток</b>							
Костный мозг	100	9,86±0,24	11,48±0,47 <sup>a</sup>	34,94±0,61 <sup>a</sup>	26,65±1,23 <sup>a</sup>	10,99±0,47 <sup>a</sup>	6,08±0,31 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	8,72±0,23 <sup>a</sup>	11,81±0,3	41,28±0,41	20,93±0,41	9,52±0,19	7,74±0,14 <sup>a</sup>

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 33 – Изменение белковых фракций гемоглобина крыс при острой остром асептическом воспалении (в абсолютных величинах), М±m**

Показатели (n=10)	Hb, г/л	1 фракция, г/л	2 фракция, г/л	3 фракция, г/л	4 фракция, г/л	5 фракция, г/л	6 фракция, г/л
<b>Интактные</b>							
Костный мозг	8,0±0,61	0,8±0,01	1,0±0,01	3,6±0,12	1,55±0,1	0,72±0,1	0,33±0,01
Периферическая кровь	135,6±1,9	14,8±1,2	17,7±1,5	59,6±1,1	27,85±0,6	11,75±1,7	3,9±0,8
<b>6 часов</b>							
Костный мозг	9,76±0,56 <sup>a</sup>	0,42±0,01 <sup>a</sup>	0,66±0,12	5,14±0,2 <sup>a</sup>	1,93±0,18	0,83±0,01	0,78±0,01 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	153,09±2,1 <sup>a</sup>	11,39±0,9	15,64±1,3	61,65±2,8	30,41±1,1 <sup>a</sup>	16,36±1,9	17,64±1,2 <sup>a</sup>
<b>2 суток</b>							
Костный мозг	8,39±0,58	0,67±0,01	0,66±0,01	3,09±0,3	2,07±0,05 <sup>a</sup>	0,98±0,01 <sup>a</sup>	0,92±0,01 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	134,2±4,56	5,11±0,8 <sup>a</sup>	7,501±0,52 <sup>a</sup>	59,3±1,8	44,08±2,5 <sup>a</sup>	10,92±1,2	7,27±0,4 <sup>a</sup>
<b>4 суток</b>							
Костный мозг	10,11±1,18	1,01±0,02 <sup>a</sup>	1,12±0,013 <sup>a</sup>	3,52±0,03	2,72±0,05 <sup>a</sup>	1,12±0,05 <sup>a</sup>	0,62±0,003 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	130,75±0,13 <sup>a</sup>	11,41±0,2	15,4±0,11	53,58±0,51 <sup>a</sup>	27,95±0,23	12,29±0,19	10,12±0,11 <sup>a</sup>

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных (p<0,05).

### 5.3 – Содержание изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов при остром асептическом воспалении

В цельной периферической крови на 2 сутки после инициации острого асептического воспаления, как и у интактных крыс, определялись 6 изоформ гемоглобина (таблица 34) и 6 фракций эритроцитов (таблицы 35-38). Усредненный показатель молекулярной массы крыс с воспалением составил  $68,90 \pm 1,61$  кДа (у интактных -  $68,57 \pm 5,61$  кДа).

Молекулярная масса достоверно изменялась в 3-х изоформах, причем во 2-й изоформе она понижалась, а в 3, 4 – увеличивалась. В 5, 6 изоформах гемоглобина она не изменялась по сравнению с интактной группой животных (таблица 34).

**Таблица 34 – Молекулярные массы изоформы гемоглобина в цельной периферической крови крыс на 2-е сутки после воспаления,  $M \pm m$**

Изоформы гемоглобинов, кДа (n=10)	Изоформа 1	Изоформа 2	Изоформа 3	Изоформа 4	Изоформа 5	Изоформа 6	Среднее по всем фракциям
<b>Интактная группа</b> Диапазон (min-max)	86,86±0,54 (83,5-89,8)	81,67±0,98 (76,9-89,6)	70,71±0,32 (68,6-72,5)	63,00±1,43 (52,2-70,6)	56,9±1,22 (47,5-63,3)	52,27±1,3 (42,1-59,4)	68,568±5,608
<b>Воспаление 2 сут</b> Диапазон (min-max)	85,44±0,34 (84,7-86,7)	76,16±0,63 <sup>a</sup> (75,4-78,5)	71,58±0,27 <sup>a</sup> (70,9-72,2)	66,56±0,22 <sup>a</sup> (65,8-66,3)	57,98±0,21 (57,3-58,6)	55,7±0,21 (55,1-55,8)	68,903±1,61

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ), F1-F6 - изоформы гемоглобинов.

Согласно морфологическим характеристикам различных фракций эритроцитов крыс на 2 сутки острого асептического воспаления, объём красных клеток (MCV) в цельной крови снижался почти во всех фракциях эритроцитов, за исключением F5. Среднее содержание гемоглобина (MCH) уменьшалось в F1, F2, F4 и F5 фракциях эритроцитов. Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC) была сниженной в F1, F4, F5 и F6, что можно связать с нарушением синтеза гемоглобина. Показатель степени анизоцитоза увеличивался в F5, что

свидетельствует о её гетерогенности, остальные фракции эритроцитов не изменялись, то есть являлись более однородными (таблица 35).

**Таблица 35 – Характеристика различных фракций эритроцитов при воспалении на 2 сутки,  $M \pm m$**

Показатели (n=10)	MCV, фл		MCH, пг		MCHC, г/дл		Цветовой показатель		RDW, %	
	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут
Цельная кровь	55,63± 0,11	51,24± 0,38 <i>a</i>	18,39± 0,66	17,15± 0,72	35,4±1 ,104	35,12± 1,2	0,539± 0,09	0,617± 0,05	13,96± 0,43	13,98± 0,21
F1	54,95± 0,17	50,64± 0,16 <i>a</i>	19,26± 0,11	17,42± 0,15 <i>a</i>	35,05± 0,26	33,09± 0,29 <i>a</i>	0,568± 0,13	0,709± 0,11	14,68± 0,15	14,05± 0,09
F2	54,09± 0,08	50,14± 0,51 <i>a</i>	18,81± 0,14	17,04± 0,07 <i>a</i>	34,5±0 ,44	33,16± 0,19	0,558± 0,11	0,508± 0,16	14,51± 0,24	14,01± 0,06
F3	53,6±0 ,1	49,9±0 ,46 <i>a</i>	18,32± 0,08	16,88± 0,5	34,19± 0,22	33,02± 0,75	0,499± 0,15	0,423± 0,11	14,85± 0,18	14,12± 0,31
F4	53,31± 0,08	49,6±0 ,18 <i>a</i>	18,52± 0,13	17,06± 0,38 <i>a</i>	35,7±0 ,16	32,99± 0,44 <i>a</i>	0,604± 0,21	0,483± 0,10	13,91± 0,21	14,32± 0,29
F5	49,61± 1,2	48,62± 0,23	19,07± 0,16	16,92± 0,39 <i>a</i>	37,27± 0,47	26,9±0 ,72 <i>a</i>	0,863± 0,18	0,442± 0,2	13,98± 0,25	15,59± 0,03 <i>a</i>
F6	52,42± 0,19	50,18± 0,91 <i>a</i>	17,78± 0,11	16,46± 1,05	34,13± 0,42	23,8±0 ,17 <i>a</i>	0,549± 0,15	0,454± 0,15	14,91± 0,21	12,7±3 ,18

*Примечание:* **MCV** - средний объём эритроцитов; **MCH** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **MCHC** – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; **RDW** – показатель анизоцитоза; **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); F1-F6 – фракции эритроцитов.

При оценке распределения изоформ гемоглобина в эритроцитах различных фракций показано, что и при воспалении клетки одной фракции содержали только по 2 из 6 изоформ гемоглобина – одну лёгкую и одну тяжёлую, сочетание которых для каждой фракции специфично (таблицы 36-38).

При остром асептическом воспалении на 2 сутки возрастал процент тяжёлых форм эритроцитов в 1F, 2F, 3F, 4F и 5F фракциях, кроме 6F, где преобладала лёгкая изоформа. Кроме того, при воспалении количество гемоглобина в эритроците (пг) снижено во всех фракциях эритроцитов, кроме 6F, т.е. в 5 из 6 фракций отмечалась гипохромия (таблицы 36-38).

**Таблица 36 – Изменение содержания отдельных изоформ гемоглобина в одном эритроците различных фракций после воспаления на 2-е сутки, М±m**

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

*Примечание:* **ОАВ** – острое асептическое воспаление; **МСН** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **a** - достоверные различия между интактной группой животных и группой с воспалением на 2 сутки ( $p < 0,05$ ).



Таблица 37 – Изменение содержания изоформ гемоглобина в различных фракциях эритроцитов (в пг),  $M \pm m$ 

Фракции Эритроцитов, пг (n=10)	Изоформы гемоглобинов											
	Изоформа 1		Изоформа 2		Изоформа 3		Изоформа 4		Изоформа 5		Изоформа 6	
	86,86±0,54 (83,5-89,8)		81,67±0,98 (76,9-89,6)		70,71±0,32 (68,6-72,5)		63,00±1,43 (52,2-70,6)		56,90±1,22 (47,5-63,3)		52,27±1,33 (42,1-59,4)	
	Интакт- ная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактн ая	ОАВ 2 сут
Цельная кровь	14,8±1, 2	5,11±0,8 <i>a</i>	17,7±1,5	7,501±0,5 2 <i>a</i>	59,6±1,1	59,3±1,8	27,85±0,6	44,08±2,5 <i>a</i>	11,75±1,7	10,92±1,2	3,9±0,8	7,27±0, 4 <i>a</i>
F1	8,86±0, 18	8,81±0,26			10,4±0,18	8,61±0,26 <i>a</i>						
F2			6,26±0,1 4	9,64±0,11			12,55±0,14	7,4±0,11 <i>a</i>				
F3					12,22±0,1 4	9,94±0,09 <i>a</i>	6,10±0,14	6,94±0,09 <i>a</i>				
F4					10,54±0,1 7	10,8±0,9	7,98±0,17	6,25±0,9				
F5							11,99±0,31	11,85±1,8	7,08±0,31	5,07±1,8		
F6									12,00±0,23	4,45±0,52 <i>a</i>	5,78±0,2 3	12,01±0, 52 <i>a</i>

Примечание: *a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Таблица 38 - Изменение изоформ гемоглобина в фракциях эритроцитов (по молекулярной массе),  $M \pm m$ 

Фракции эритроцитов, к/Да (n=10)	Изоформы гемоглобинов											
	Изоформа 1		Изоформа 2		Изоформа 3		Изоформа 4		Изоформа 5		Изоформа 6	
	86,86±0,54 (83,5-89,8)		81,67±0,98 (76,9-89,6)		70,71±0,32 (68,6-72,5)		63,00±1,43 (52,2-70,6)		56,90±1,22 (47,5-63,3)		52,27±1,33 (42,1-59,4)	
	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут	Интактная	ОАВ 2 сут
Цельная кровь	86,86±0,5 4	85,44±0,3 4	81,67±0,9 8	76,16±0,6 3 <i>a</i>	70,71±0,3 2	71,58±0,27 <i>a</i>	63,00±1,4 3	66,56±0,22 <i>a</i>	56,90±1,22	57,98±0,2 1	52,27±1,33	55,7±0,21
F1	84,84±1,5	85,98±0,2 8			74,51±0,8 4	75,38±0,26						
F2			83,32±1,0 5	78,32±0,4 <i>a</i>			66,68±0,8 3	72,48±0,35 <i>a</i>				
F3					71,89±0,5 7	72,7±0,4	64,04±1,0 8	67,08±0,4 <i>a</i>				
F4					73,46±1,0 4	67,19±0,35 <i>a</i>	64,55±0,4 6	66,16±0,41 <i>a</i>				
F5							61,7±0,52	65,51±0,25 <i>a</i>	55,3±0,8	63,42±0,3 8 <i>a</i>		
F6									59,09±0,75	57,04±0,3 8 <i>a</i>	50,76±0,82	55,92±1,5

Примечание: *a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

## Резюме

Полученные данные свидетельствуют о том, что при остром асептическом воспалении имеет место не только активация лейкопоэза, но и существенные качественные сдвиги в красной крови, которые проявляются снижением числа эритроцитов, гемоглобина и гематокритного показателя. Средний объём эритроцитов снижается. К 4-м суткам при иницировании воспаления количественные показатели красной крови приближаются к нормальным физиологическим значениям. Отмечается ретикулоцитоз (2-4 сутки), что свидетельствует о стимуляции эритропоэза.

Общее содержание гемоглобина в костном мозге и периферической крови растёт на 6 часов, что свидетельствует о сгущении крови, к 2-м суткам данный показатель достигает нормальных физиологических значений, а уже к 4-м суткам он понижается в периферической крови, при этом в костном мозге не изменяется.

Осмотическая устойчивость эритроцитов при воспалении повышается в первые часы (6 часов) и к 2-4 суткам приближается к группе интактных животных. Различия в изменении средних диаметров эритроцитов в органах-депо при аммонийном гемолизе свидетельствуют о наличии в крови не одной, а нескольких популяций эритроцитов.

В цельной периферической крови при остром асептическом воспалении на 2 сутки определяются 6 фракций эритроцитов и 6 изоформ гемоглобина.

При рассмотрении морфологических характеристик 6-ти фракций эритроцитов крыс, при воспалении на 2 сутки, следует отметить, что почти во всех фракциях эритроцитов, за исключением F5, объём красных клеток в цельной крови уменьшается. Среднее содержание гемоглобина и средняя концентрация гемоглобина в эритроците снижены в F1, F2, F4 и F5 фракциях эритроцитов.

Гипохромия при воспалении на 2-е сутки обусловлена уменьшением содержания гемоглобина в F1, F2, F4 и F5 фракциях эритроцитов.

Усредненный показатель молекулярной массы гемоглобинов крыс с воспалением равен  $68,90 \pm 1,61$  кДа (у интактных крыс -  $68,568 \pm 5,608$  кДа).

Молекулярная масса 1-й и 2-й изоформ гемоглобина понижается, в 3-й, 4-й изоформах – повышается, а в 5-й и 6-й – не изменяется.

В отдельных фракциях эритроцитов изоформы гемоглобина распределяются таким же образом, что у интактных животных - клетки одной фракции содержат только по 2 из 6 изоформ гемоглобина – 1 лёгкую и 1 тяжёлую. При воспалении (2 сутки) процент тяжёлых форм эритроцитов возрастает в пяти фракциях, кроме 6-й, где преобладает лёгкая форма.

Изменение соотношения между изоформами гемоглобина свидетельствует об изменении соотношения между фракциями эритроцитов.

Так, снижение 1 изоформы гемоглобина (в цельной крови и костном мозге), которая характеризуется снижением жёсткости белкового окружения гема, уменьшением колебаний полуколец пиррола гема и колебаний метиновых радикалов, повышением колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, возрастанием маркера спинового состояния, что свидетельствует об уменьшении 1 фракции эритроцитов.

Снижение 2 изоформы гемоглобина, которая характеризуется увеличением «скрученной» конформации гема, снижением колебаний метиновых радикалов и колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, уменьшением ассиметричных колебаний пиррольных полуколец оксигемоглобина, снижением плотности упаковки молекулы гемоглобина, что свидетельствует об уменьшении 2 фракции эритроцитов.

Увеличение 5 изоформы гемоглобина, отличающейся более высокой виниловой полосой, высокими колебаниями метиновых радикалов и колебаниями метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, повышением маркера спинового состояния, более высокими симметричными СН<sub>3</sub>-растянутыми связями оксигемоглобина, что свидетельствует об увеличении 5 фракции эритроцитов.

Повышение 6 изоформы гемоглобина, которое характеризуется понижением жесткости белкового окружения гема, увеличением маркера спинового состояния железа в окси-форме, степенью погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, уменьшением симметричного СНз-растяжения связей оксигемоглобина, снижением относительной способности дезоксигемоглобина связывать  $O_2$  и уменьшением способности оксигемоглобина выделять лиганды, что говорит об увеличении 6 фракций эритроцитов.

Повышение 3, 4 изоформ гемоглобина (основных) свидетельствует о возрастании 3, 4 фракций эритроцитов и усилении их лиганд связывающей способности.

Следовательно, при воспалении имеет место не только реакция со стороны клеток белого ряда, но и существенные качественные сдвиги в эритропоэзе, что находит своё отражение в изменении соотношения между изоформами гемоглобина. Изоформы гемоглобина и популяции эритроцитов при воспалении гетерогенны по своей электрофоретической подвижности, молекулярной массе и структурным характеристикам.

В результате, изменение соотношения между фракциями эритроцитов приводит к возрастанию суммарной лиганд связывающей способности циркулирующего гемоглобина на фоне развивающегося воспаления.

### **Список публикаций по материалам 5 главы**

1. **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.

2. **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. 10.22138/2500-0918-2020-17-1-18-25.

3. Yushkov, B.G. 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.

## ГЛАВА 6 – НЕОДНОРОДНОСТЬ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

### 6.1 – Неоднородность клеточного состава крови при действии на организм иммобилизационного стресса

Уже давно и хорошо известно, что изменения в системе крови являются одним из важнейших компонентов стресс-реакции. Однако, исследователи в основном уделяют внимание характеристике белой крови.

В наших экспериментах со стороны клеток белого ряда спустя 6 часов и 2 сутки после иммобилизации наблюдалось уменьшение общего числа лейкоцитов за счет снижения количества лимфоцитов (*Lym*, *г/л*). Количество гранулоцитов (*Grn*, *г/л*) на оба экспериментальных срока (6 часов и 2 сутки) увеличивалось. Общее число моноцитов, базофилов и эозинофилов (*Mid*, *г/л*) на 2 сутки после иммобилизационного стресса снижалось в 2 раза по сравнению с интактными животными (*таблица 39*).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при иммобилизационном стрессе (ИС) в периферической крови на 6 часов отмечались достоверные изменения показателей и красной крови: увеличение общего числа эритроцитов и гематокрита по сравнению с интактной группой животных. Возрастающий показатель анизоцитоза (*RDW*, *%*) свидетельствовал о неоднородности эритроидной популяции клеток (*таблица 39*). На 2 сутки после экстремального воздействия общее число эритроцитов в периферической крови, оставаясь повышенным, приближалось к показателям интактных животных. Средний объем красных клеток (*MCV*, *фл*) повышался (*таблица 39*).

Данный феномен обусловлен тем, что на 6 часов после ИС происходило разрушение старых эритроцитов и ускоренный выход молодых эритроидных клеток (ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные формы гемоглобина) из костного мозга в периферическую кровь для восстановления популяции

эритроцитов. На 2 сутки после иммобилизации количество эритроцитов в кровотоке приближалось к группе интактных животных, поскольку начинали запускаться компенсаторно-приспособительные механизмы при адаптации организма к стрессу.

Тромбоцитарное звено достоверно не изменялось на данные экспериментальные сроки (таблица 39).

**Таблица 39 – Гемограмма крыс в норме и при действии на организм иммобилизационного стресса, М±m**

Показатели (n=9)	Интактные	Иммобилизация 6 часов	Иммобилизация 2 сутки
WBC, г/л	17,13±1,67	11±2,03 <sup>a</sup>	10,47±1,27 <sup>a</sup>
Lym, г/л	14,16±1,57	5,06±0,48 <sup>a</sup>	7,17±1,08 <sup>a</sup>
Mid, г/л	3,35±0,56	2,22±0,66	1,21±0,18 <sup>a</sup>
Grn, г/л	0,75±0,17	4,21±0,97 <sup>a</sup>	2,08±0,35 <sup>a</sup>
Lym, %	75,25±2,52	46,25±4,95 <sup>a</sup>	67,75±3,61
Mid, %	18,25±2,44	16,41±4,25	12±2,02
Grn, %	2,6±0,5	31,5±4,49 <sup>a</sup>	20,25±2,98 <sup>a</sup>
RBC, Т/л	7,515±0,02	9,98±0,19 <sup>a</sup>	7,88±0,07 <sup>a</sup>
Hb, г/л	135,6±1,9	138,8±1,8	134,1±2,5
Hct, %	43,24±1,94	55,05±1,03 <sup>a</sup>	43,08±0,63
MCV, фл	55,63±0,11	55,23±0,09	56,7±0,39 <sup>a</sup>
MCH, пг	18,39±0,66	19,51±0,16	18,4±0,3
MCHC, г/дл	35,4±1,104	34,93±0,26	33,62±0,21
RDW, %	13,96±0,43	14,68±0,14 <sup>a</sup>	13,18±0,07
Plt, г/л	736,5±56,36	797,87±84,05	729±18,03
Pct, %	0,48±0,04	0,51±0,05	0,45±0,007
MPV, фл	6,38±0,19	6,17±0,05	6,31±0,12
PDW, %	10,99±0,21	11,22±0,17	11,3±0,18

*Примечание:* **WBC** – общее количество лейкоцитов; **Lym** – лимфоциты; **Mid** – моноциты; **Grn** – гранулоциты; **RBC** - эритроциты; **Hb** - гемоглобин; **Hct** - гематокрит; **MCV** - средний объем эритроцитов; **MCH** – среднее содержание гемоглобина в эритроците; **MCHC** – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; **RDW** – показатель анизоцитоза; **Plt** - количество тромбоцитов; **Pct** - тромбокрит; **MPV**- средний объем тромбоцитов; **PDW** - распределение тромбоцитов по размерам; **a** – статистически значимые отличия от интактной группы животных (p<0,05).

После иммобилизационного стресса на оба срока исследования в периферической крови, наряду с эритроцитами, увеличивалось содержание ретикулоцитов и F-клеток (таблица 40), что свидетельствует об ускоренном выбросе молодых клеток из костного мозга в периферическую кровь.



Соотношение ретикулоцитов к клеткам с фетальным гемоглобином на 6 ч после воздействия возрастало в 3 раза. Ко 2-м суткам после иммобилизации данный показатель приближался к показателям интактной группы животных (*таблица 40*).

**Таблица 40 – Изменение количества эритроидных клеток в циркулирующей крови при иммобилизационном стрессе,  $M \pm m$**

Показатели (n=9)	Эритроциты, г/л	Ретикулоциты, г/л	F- клетки, г/л	Ретикулоциты/ F- клетки
Интактные	7515,01±23,31	117,84±8,85	114,91±4,81	1,03
6 часов	9985,1±198,68 <sup>a</sup>	440,65±28,07 <sup>a</sup>	144,54±7,34 <sup>a</sup>	3,05
2 сутки	7881,2±77,14 <sup>a</sup>	306,72±10,37 <sup>a</sup>	224,09±10,37 <sup>a</sup>	1,37

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

В миелограмме в первые часы (6 часов) после иммобилизационного стресса наблюдалось снижение общей клеточности костного мозга за счет уменьшения числа клеток эритроидного (эритробластов и пронормоцитов), нейтрофильного (миелоцитов и нейтрофильных метамиелоцитов), лимфоидного и мегакариоцитарного рядов (*таблица 41*).

На 2 сутки после данного экстремального воздействия общая клеточность костного мозга восстанавливалась. Однако количественный состав эритроидного ростка на 2-е сутки после иммобилизации достоверно снижался за счет падения числа эритробластов и пронормоцитов, базофильных нормоцитов, что, вероятно, обусловлено значительным выбросом данных типов клеток из резервного пула (костного мозга) на фоне стресса.

Наблюдалось снижение числа всех клеток лимфоидного и базофильного рядов. Уменьшалось количество клеток нейтрофильного ряда – миелобластов и нейтрофилов (палочкоядерных и сегментоядерных (*таблица 41*)). Полученные нами данные (*таблицы 39, 41*) подтверждаются и литературными. К примеру, Макаровой О.А. и Васильевой Л.С. показано, что при стрессе происходит истощение резерва зрелых нейтрофилов в костном мозге в результате неадекватно низкой скорости нейтрофилопоэза в сочетании с сильным выбросом нейтрофилов в кровь. При этом отмечалось опустошение депо зрелых нейтрофилов

(палочкоядерных и сегментоядерных) в костном мозге (таблица 41) и увеличение их числа в периферической крови в 2 и 4 раза [38].

**Таблица 41 – Миелограмма крыс при иммобилизационном стрессе (млн/100 г массы тела),  $M \pm m$**

Показатели (n=9)	Интактная группа	Иммобилизация 6 часов	Иммобилизация 2 сутки
Общая клеточность	41,43±4,73	28,59±0,48 <sup>a</sup>	24,81±1,02
Эритробласты и пронормоциты	2,85±0,33	0,68±0,01 <sup>a</sup>	0,52±0,02 <sup>a</sup>
Базофильный нормоцит	2,102±0,18	1,65±0,2	1,62±0,07 <sup>a</sup>
Полихроматофильный нормоцит	1,52±0,11	1,05±0,11	1,40±0,21
Оксифильный нормоцит	0,81±0,12	0,61±0,03	0,74±0,02
Эритроидный ряд	7,28±1,03	4,19±0,24	4,31±0,35 <sup>a</sup>
Миелобласты	4,85±0,52	2,88±0,27	1,86±0,16 <sup>a</sup>
Миелоциты	4,96±0,21	2,96±0,3 <sup>a</sup>	2,51±0,6 <sup>a</sup>
Нейтрофильный метамиелоцит	1,01±0,04	0,65±0,04 <sup>a</sup>	0,96±0,7
Нейтрофилы (палочкоядерных/ сегментоядерные)	9,15±0,55	8,52±0,22	7,13±0,62 <sup>a</sup>
Нейтрофильный ряд	19,97±1,32	15,64±1,45 <sup>a</sup>	13,96±0,84
Эозинофильный ряд	0,901±0,15	0,71±0,05	0,85±0,62
Базофильный ряд	0,68±0,05	0,65±0,07	0,42±0,01 <sup>a</sup>
Моноцитарный ряд	1,74±0,35	0,60±0,04	0,61±0,05
Лимфоидный ряд	10,03±0,64	7,04±0,27 <sup>a</sup>	5,64±0,14 <sup>a</sup>
Мегакариоциты	0,51±0,11	0,2±0,01 <sup>a</sup>	0,38±0,12
Ретикулярные клетки	0,33±0,08	0,21±0,08	0,31±0,01

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

После иммобилизации отмечалось увеличение диаметра зрелых эритроцитов и ретикулоцитов как на 6 часов, так и на 2 суток после экстремального воздействия. Диаметр F-клеток достоверно не менялся на оба экспериментальных срока (таблица 42).

**Таблица 42 - Диаметры эритроидных клеток при иммобилизационном стрессе,  $M \pm m$**

Показатели, мкм (n=9)	Эритроциты	Ретикулоциты	F- клетки
Интактные	6,29±0,17	9,72±0,055	10,98±0,138

6 часов	7,48±0,231 <sup>a</sup>	9,96±0,074 <sup>a</sup>	10,81±0,140
2 сутки	7,10±0,26 <sup>a</sup>	10,38±0,095 <sup>a</sup>	10,45±0,092

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

Увеличение средних диаметров эритроцитов при иммобилизационном стрессе наблюдалось в органах–депо – селезёнке, лёгких на оба срока после экстремального воздействия, в печени – на ранний срок (6 часов). Следует отметить, что в сердце и почках данные показатели достоверно не изменялись (*таблица 43*).

**Таблица 43 – Средние диаметры эритроцитов в изотоническом растворе разных органов при иммобилизации,  $M \pm m$**

Показатели, мкм (n=9)	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	6,42±0,17	6,01±0,12	6,21±0,12	6,3±0,15	6,31±0,15
6 часов	8,71±0,18 <sup>a</sup>	7,26±0,28 <sup>a</sup>	7,08±0,13 <sup>a</sup>	6,77±0,64	7,55±0,63
2 сутки	8,38±0,46 <sup>a</sup>	6,22±0,08	10,26±0,2 <sup>a</sup>	5,94±0,11	7,12±0,42

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных.

Анализ кинетики аммонийного гемолиза эритроцитов показал, что при действии на организм иммобилизационного стресса на 6 часов отмечалось достоверное уменьшение средних диаметров эритроцитов на пике набухания клеток во всех исследуемых локализациях (за исключением периферической крови) (*таблица 44*). Полученные изменения можно связать со структурной перестройкой мембраны эритроцита вследствие нарушения клеточного метаболизма и снижением осмотической устойчивости клеток эритроцитарного ряда к гемолизу [40]. Спустя 2 суток после иммобилизационного стресса средний диаметр на пике набухания ниже только в печени и в почке, а в остальных локализациях данный показатель достоверно не изменялся (*таблица 44*).

Средний диаметр эритроцитов на момент разрушения 50% клеток выше в печени и лёгком на оба срока после стресса, в остальных органах изменения не обнаружены. При этом время наступления середины гемолиза эритроцитов в гипоосмотической среде у данных органов увеличивалось (*таблица 45*).

В первые часы после ИС осмотическая устойчивость эритроцитов низкая – старые красные клетки очень быстро набухают и разрушаются, а в кровотоки поступают молодые клетки (крупных размеров) из резервного пула (костного мозга). Однако, уже на 2-е сутки после экстремального воздействия осмотическая стойкость клеток повышалась в печени, легких и периферической крови, в селезенке и сердце – снижалась. В почках на 2 сутки после иммобилизации осмотическая устойчивость эритроцитов достоверно не изменялась.

Следовательно, в условиях иммобилизационного стресса популяция эритроцитов по показателю аммонийной стойкости становилась более гетерогенной, и эта гетерогенность выражена тем больше, чем сильнее активирована стресс-реализующая система (*таблицы 46, 47*).

**Таблица 44 – Изменение среднего диаметра эритроцитов на пике набухания в гипоосмотической среде при иммобилизации,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мкм (n=9)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	7,76±0,35	9,06±0,38	8,79±0,1	8,74±0,18	8,78±0,06	9,05±0,41
6 часов	7,01±0,35	7,32±0,16 <sup>a</sup>	7,34±0,1 <sup>a</sup>	7,41±0,14 <sup>a</sup>	7,59±0,14 <sup>a</sup>	7,13±0,34 <sup>a</sup>
2 сутки	8,38±0,54	8,16±0,49	7,002±0,3 <sup>a</sup>	8,47±0,29	8,31±0,7	7,87±0,3 <sup>a</sup>

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 45 – Изменение среднего диаметра эритроцитов на середине гемолиза в гипоосмотической среде при иммобилизации,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мкм (n=9)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	6,85±1,37	7,35±1,64	6,375±0,08	6,98±0,07	8,004±0,21	8,71±0,03
6 часов	9,06±0,65	9,26±0,51	10,86±0,5 <sup>a</sup>	8,42±0,48 <sup>a</sup>	8,35±0,15	7,99±0,41
2 сутки	9,95±0,6	10,27±0,42	8,67±0,63 <sup>a</sup>	9,83±0,72 <sup>a</sup>	8,01±0,34	9,38±0,55

*Примечание: a* - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 46 – Время наступления пика набухания эритроцитов в гипоосмотической среде при иммобилизации,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мин (n=9)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	2,3±0,19	1,77±0,11	1,828±0,12	1,03±0,061	1,84±0,074	2,48±0,05
6 часов	2,56±0,07	2,15±0,05 <sup>a</sup>	2,56±0,13 <sup>a</sup>	2,94±0,05 <sup>a</sup>	2,59±0,14 <sup>a</sup>	2,9±0,13
2 сутки	2,02±0,1	1,59±0,02	2,03±0,11	2,01±0,15 <sup>a</sup>	2,07±0,08	1,65±0,13 <sup>a</sup>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 47 – Время наступления середины гемолиза эритроцитов в гипоосмотической среде при иммобилизации,  $M \pm m$  (Аммонийный гемолиз эритроцитов)**

Показатели, мин (n=9)	Периферическая кровь	Селезёнка	Печень	Лёгкое	Сердце	Почка
Интактные	4,91±0,48	4,35±0,25	3,849±0,16	2,85±0,45	4,012±0,17	4,55±0,15
6 часов	8,54±0,36 <sup>a</sup>	6,99±0,39 <sup>a</sup>	8,43±0,47 <sup>a</sup>	6,09±0,86 <sup>a</sup>	5,56±0,03 <sup>a</sup>	9,39±0,56 <sup>a</sup>
2 сутки	4,36±0,39	3,22±0,12 <sup>a</sup>	5,12±0,49 <sup>a</sup>	4,65±0,27 <sup>a</sup>	2,83±0,39 <sup>a</sup>	4,11±0,26

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

## **6.2 – Характеристика гемоглобинового профиля в периферической крови и в костном мозге при действии на организм иммобилизационного стресса**

В абсолютных величинах общее содержание гемоглобина в костном мозге после иммобилизационного стресса (ИС) понижалось до  $7,4 \pm 0,3$  г/л - спустя 6 часов и до  $5,0 \pm 0,3$  г/л - спустя 2 суток (у интактных животных данный показатель равен  $8,01 \pm 0,61$  г/л). В периферической крови общее содержание гемоглобина по параметрам приближалось к нормальным значениям ( $135,6 \pm 1,9$  г/л – у интактных), на 6 часов после ИС оно составило  $138,8 \pm 1,8$  г/л и на 2 суток после воздействия –  $134,1 \pm 1,1$  г/л, соответственно (*таблицы 48, 49*). В относительных величинах изменения схожи, как и в абсолютных значениях (*таблицы 48, 49*).

В условиях иммобилизации в периферической крови и в костном мозге у крыс, как и у интактных животных, на эритрофореграмме в ПААГ определялись 6 изоформ гемоглобина.

На 6 часов после воздействия в костном мозге отмечалось снижение 1, 2 изоформ. В периферической крови наблюдалось снижение 1, 2 и увеличение 3, 6 изоформ гемоглобина (*таблицы 48, 49*).

На 2 суток после экстремального воздействия в костном мозге и периферической крови достоверно уменьшалось содержание 2 изоформы гемоглобина, что указывает на снижение образования клеток, их содержащих. Уменьшение концентрации в костном мозге 1, 3 изоформ с одновременным возрастанием в периферической крови указывает на выход содержащих их клеток в циркуляцию. Следует отметить, что в периферической крови после ИС на 2 суток возрастало содержание 4 изоформы гемоглобина (*таблицы 48, 49*).

Сравнивая группы после эксперимента на 6 часов и на 2 суток, в костном мозге наблюдалось снижение только 3-й изоформы, поскольку все остальные не изменялись. В периферической крови происходило увеличение 1 изоформы гемоглобина и падение 4, 5 и 6 изоформ гемоглобина (*таблица 49*).

**Таблица 48 – Изменение белковых фракций гемоглобина крыс при иммобилизационном стрессе (в относительных величинах),  $M \pm m$**

Показатели (n=9)	Hb, %	1 фракция, %	2 фракция, %	3 фракция, %	4 фракция, %	5 фракция, %	6 фракция, %
<b>Интактные</b>							
Костный мозг	100	10,41±0,2	12,58±0,23	44,87±0,52	18,95±0,3	9,06±0,58	4,13±0,2
Периферическая кровь	100	10,93±0,9	13,09±1,1	43,97±0,8	20,52±0,5	8,64±1,3	2,85±0,57
<b>6 часов</b>							
Костный мозг	100	6,34±0,42 <sup>a</sup>	5,42±0,14 <sup>a</sup>	54,53±1,4	18,78±0,15	6,95±0,11	7,98±0,5
Периферическая кровь	100	6,18±0,2 <sup>a</sup>	4,37±0,1 <sup>a</sup>	55,93±0,5	19,84±0,2	7,22±0,5	6,46±0,3 <sup>a</sup>
<b>2 сутки</b>							
Костный мозг	100	11,07±0,24	5,86±0,3 <sup>a</sup>	44,39±1,9 <sup>b</sup>	28,45±1,1 <sup>a b</sup>	3,14±0,11 <sup>a</sup>	7,09±1,1 <sup>a</sup>
Периферическая кровь	100	8,77±0,4 <sup>b</sup>	5,42±0,2 <sup>a</sup>	56,26±0,6 <sup>a</sup>	22,94±0,9 <sup>a</sup>	3,25±0,1 <sup>a b</sup>	3,36±0,3 <sup>b</sup>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); **b** - статистически значимые отличия параметров костного мозга и периферической крови между группами на 6 часов и 2 сутки при введении крысам скипидара ( $p < 0,05$ ).



**Таблица 49 – Изменение белковых фракций гемоглобина крыс при иммобилизационном стрессе (в абсолютных величинах),  $M \pm m$**

Показатели (n=9)	Hb, г/л	1 фракция, г/л	2 фракция, г/л	3 фракция, г/л	4 фракция, г/л	5 фракция, г/л	6 фракция, г/л
<b>Интактные</b>							
Костный мозг	8,0±0,61	0,8±0,01	1,0±0,01	3,6±0,12	1,55±0,1	0,72±0,1	0,33±0,01
Периферическая кровь	135,6±1,9	14,8±1,2	17,7±1,5	59,6±1,1	27,85±0,6	11,75±1,7	3,9±0,8
<b>6 часов</b>							
Костный мозг	7,4±0,32	0,5±0,01 <b>a</b>	0,4±0,01 <b>a</b>	4,0±0,02	1,4±0,1	0,5±0,01	0,6±0,02
Периферическая кровь	138,8±1,8	8,6±0,5 <b>a</b>	6,1±0,1 <b>a</b>	77,6±0,7 <b>a</b>	27,5±0,2	10,0±0,7	9,0±0,4 <b>a</b>
<b>2 сутки</b>							
Костный мозг	5,0±0,33 <b>a</b>	0,6±0,01 <b>a</b>	0,3±0,001 <b>a</b>	2,2±0,05 <b>a b</b>	1,4±0,5	0,2±0,01 <b>a</b>	0,3±0,03
Периферическая кровь	134,1±1,1 <b>b</b>	13,1±0,5 <b>b</b>	7,3±0,3 <b>a</b>	75,4±1,2	30,8±0,5 <b>a b</b>	4,4±0,1 <b>b</b>	3,1±0,4 <b>b</b>

*Примечание:* **a** - статистически значимые отличия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); **b** - статистически значимые отличия параметров костного мозга и периферической крови между группами на 6 часов и 2 сутки при введении крысам скипидара ( $p < 0,05$ ).

## Резюме

Иммобилизационное воздействие приводит к последовательной активации отдельных звеньев единого каскадного механизма регуляции кроветворения. Пусковым звеном, определяющим адаптивный ответ кроветворной ткани, при этом служат центральные нейроэндокринные механизмы, осуществляющие влияние посредством универсальных стресс-реализующих (гипофиз-адреналовой и симпатико-адреналовой) систем.

При иммобилизации в первые часы в периферической крови отмечается увеличение числа эритроцитов и гематокрита, что свидетельствует о сгущении крови. Увеличивается показатель анизоцитоза, что указывает на рост неоднородности эритроидной популяции клеток в первые часы при развитии стрессорной реакции. Ко 2-м суткам после экстремального воздействия число красных клеток, оставаясь повышенным, приближается к показателям интактных животных. Средний объем красных клеток крови на 2-е сутки после иммобилизационного стресса увеличивается (в кровотоке циркулируют клетки крупных размеров).

В условиях стресса популяция эритроцитов по показателю аммонийной стойкости становится более гетерогенной, и эта гетерогенность выражена тем больше, чем сильнее активированы та или иная стресс-реализующие системы.

По данным миелограммы, в первые часы и дни после стресса отмечается снижение общего числа миелокариоцитов за счет уменьшения числа клеток эритроидного (эритробластов и пронормоцитов), нейтрофильного (миелоцитов и нейтрофильных метамиелоцитов), базофильного, лимфоидного и мегакариоцитарного рядов, что, вероятно, обусловлено ускоренным выбросом данных клеток из костного мозга в периферическую кровь.

При иммобилизационном стрессе происходит изменение в составе гемоглобинов как в костном мозге, так и периферической крови. Возрастает количество F-клеток.

В первые часы (6 часов) после воздействия в костном мозге и цельной крови отмечается снижение 1, 2 изоформ. В периферической крови наблюдается увеличение 3, 6 изоформ гемоглобина.

В первые дни (2 сутки) после иммобилизации в костном мозге и периферической крови уменьшаются 2, 5 изоформы гемоглобина, что указывает на снижение образования клеток, их содержащих. Уменьшение 1, 3 изоформ в костном мозге с одновременным их возрастанием в периферической крови указывает на выход содержащих клеток в циркуляцию. В периферической крови после стресса возрастает содержание 4 изоформы, что, вероятно, обусловлено усилением её кислородтранспортной функции.

Учитывая, что 3, 4 фракции гемоглобинов (с молекулярным весом 64,5-68,0 кДа) являются основными фракциями эритроцитов с нормальными структурами, 2 (тяжёлая изоформа+нормальные варианты гемоглобина) и 5 (нормальные варианты гемоглобина+лёгкая изоформа) фракции, являющиеся смесями с небольшими отклонениями в структуре, а 1 (тяжелая форма+нормальные) и 6 (лёгкие изоформы) фракции – с наибольшими конформациями, обусловленные изменением гема, колебаниями метильных мостиков и радикалов, спиновым состоянием железа и др.

При иммобилизационном стрессе рост 3 и 4 изоформ гемоглобина говорит об их высокой лиганд-связывающей способности. Падение 2 и 5 изоформ гемоглобина обусловлены изменениями их структурно-функциональных характеристик (снижением плотности упаковки, уменьшением колебаний  $-C=C-$  связей, понижением симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах дезоксигемоглобина и др.).

Падение содержания 1-й и повышение 6-й изоформ гемоглобина свидетельствует о разрушении клеток, их содержащих, а также о более низкой их лиганд-связывающей способности.

Таким образом, адаптация организма к гипоксии при иммобилизационном стрессе обеспечивается неоднородностью популяции эритроцитов и сдвигами в

соотношении между изоформами гемоглобина с различными структурно-функциональными свойствами.

### **Список публикаций по материалам 6 главы**

1. **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.
2. **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. С.17-18.
3. **Бриллиант, С.А.** Исследование гемоглобинового профиля красной крови и костного мозга крыс после иммобилизации // В мире научных открытий. – 2012. – № 2 (26). – С.27-30.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гемоглобин, казалось бы, наиболее давно и хорошо изученный белок, в последние годы все больше привлекает внимание исследователей. Это касается, прежде всего, его роли в регуляции физиологических функций и адаптации организма к экстремальным воздействиям. Оказалось, что у многих видов животных в крови циркулирует различное количество изоформ гемоглобина. Типы и соотношение между ними могут варьировать от эмбриональной к постнатальной жизни.

Если на первых порах просто констатировалась гетерогенность гемоглобинов циркулирующей крови, то сейчас предпринимаются попытки оценить физиологический смысл этого явления.

Согласно проведенным нами исследованиям, у интактных крыс в периферической крови и костном мозге выявляются 6 изоформ гемоглобина, различающиеся не только по электрофоретической подвижности (на что указывают разные авторы [25, 31, 55-57, 60]), но и по молекулярной массе, кислото- и щелочестойчивости, по конформационным характеристикам и кислород-связывающей способности.

Основная доля гемоглобина (65%) приходится на изоформы с молекулярным весом 64-68 кДа (показатели, наиболее часто приводимые в литературе), но, помимо этого, в крови циркулируют ещё и более лёгкие (с молекулярной массой менее 64 кДа - 24%), и более тяжёлые (с молекулярной массой более 68 кДа – 11%) изоформы. В литературе высказывается предположение, что последние могут образовываться в результате деградации или полимеризации белка [147]. Однако сходство характеристик и соотношения изоформ гемоглобинов периферической крови и костного мозга указывает на то, что они появляются в циркулирующей крови не под действием экстремальных факторов, а образуются в процессе эритропоэза в кроветворной ткани.

Вместе с тем, методом фракционного центрифугирования можно выделить 6 фракций эритроцитов (F1-F6), которые различаются по содержанию и соотношению отдельных изоформ в клетке. В пяти из них содержится хотя бы одна с молекулярной массой 64–68 кДа. Так, в F1 и F2 фракциях эритроцитов смесь гемоглобинов представлена одной из основных изоформ и тяжелой; в F3 и F4 – только основными (нормальными) гемоглобинами в различных сочетаниях; в F5 – смесью основной и лёгкой изоформ, а в F6 – только лёгкими изоформами.

При этом, в отдельном эритроците всегда только две изоформы гемоглобина, из которых одна по молекулярной массе тяжелее другой. Наличие двух разных изоформ гемоглобинов в одной клетке существенно сказывается на суммарных структурных характеристиках смеси.

Эритроциты, содержащие исключительно основные изоформы гемоглобина (64-68 кДа), – F3 и F4 фракции клеток – обладают наибольшей лиганд-связывающей способностью, а соотношение между ними никак не сказывается на физико-химических характеристиках смеси.

Присутствие в эритроцитах наряду с основной самой тяжелой изоформы ( $84,8 \pm 1,5$  кДа) – F1 фракция клеток – снижает показатель жёсткости белкового окружения гема, уменьшает вклад боковых  $\text{CH}_3$ -групп колебаний полуколец пиррола гема, увеличивает колебания метиновых радикалов и метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, повышает маркер спинового состояния, увеличивает спиновое состояние железа в окси- и дезокси- формах.

Наличие, наряду с основной ( $66,68 \pm 0,83$  кДа) тяжелой изоформы ( $83,32 \pm 1,00$  кДа) в эритроцитах F2 повышает показатель «скрученной» конформации гема, уменьшает колебания метиновых радикалов и метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, снижает ассиметричные колебания пиррольных полуколец оксигемоглобина и симметричные колебания пиррольных полуколец в молекулах дезоксигемоглобина, уменьшает плотность упаковки белка.

Лёгкая изоформа ( $55,3 \pm 0,8$  кДа) в смеси с основной ( $61,7 \pm 0,52$  кДа) в эритроцитах F5 повышает показатель виниловой полосы, увеличивает колебания метиновых радикалов и метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, повышает маркер спинового состояния железа.

Смесь только лёгких изоформ ( $59,09 \pm 0,75$  кДа и  $50,76 \pm 0,82$  кДа) – F6 фракция эритроцитов характеризуется понижением жёсткости белкового окружения гема, усиленными колебаниями метиновых радикалов и метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, повышением степени погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, снижением относительной способности дезоксигемоглобина связывать  $O_2$ , уменьшением способности оксигемоглобина выделять лиганды.

В результате, появление в эритроците более тяжёлых или более лёгких изоформ приводит к снижению лиганд-связывающих свойств фракций эритроцитов F1, F2, F5 и F6.

Поскольку 1-я изоформа гемоглобина содержится только в первой фракции эритроцитов (F1), 2 –я в клетках F2, а 6-я только в F6, то и колебания в цельной крови количества этих изоформ гемоглобина будут отражать изменения популяций клеток, их содержащих. Основные изоформы гемоглобина – 3, 4 и 5 изоформа выявляются сразу в нескольких фракциях эритроцитов. Так, 3 изоформа гемоглобина содержится в трех (F1, F3, F4) фракциях эритроцитов, 4 изоформа гемоглобина - в четырех (F2, F3, F4, F5), а 5 изоформа - в двух (F5, F6) фракциях эритроцитов (*рисунок 8*).

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.

Так, 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 фракции 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 соотношение сдвигается в сторону более тяжёлых форм в одинаковой степени при кровопотере и воспалении, а, следовательно, их лиганд-связывающая способность понижается.

В эритроцитах F5, содержащих лёгкую фракцию гемоглобина, соотношение смещается в сторону более тяжелой изоформы, но это основная изоформа гемоглобина, а, следовательно, отмечается повышение лиганд-связывающей активности смеси гемоглобинов.

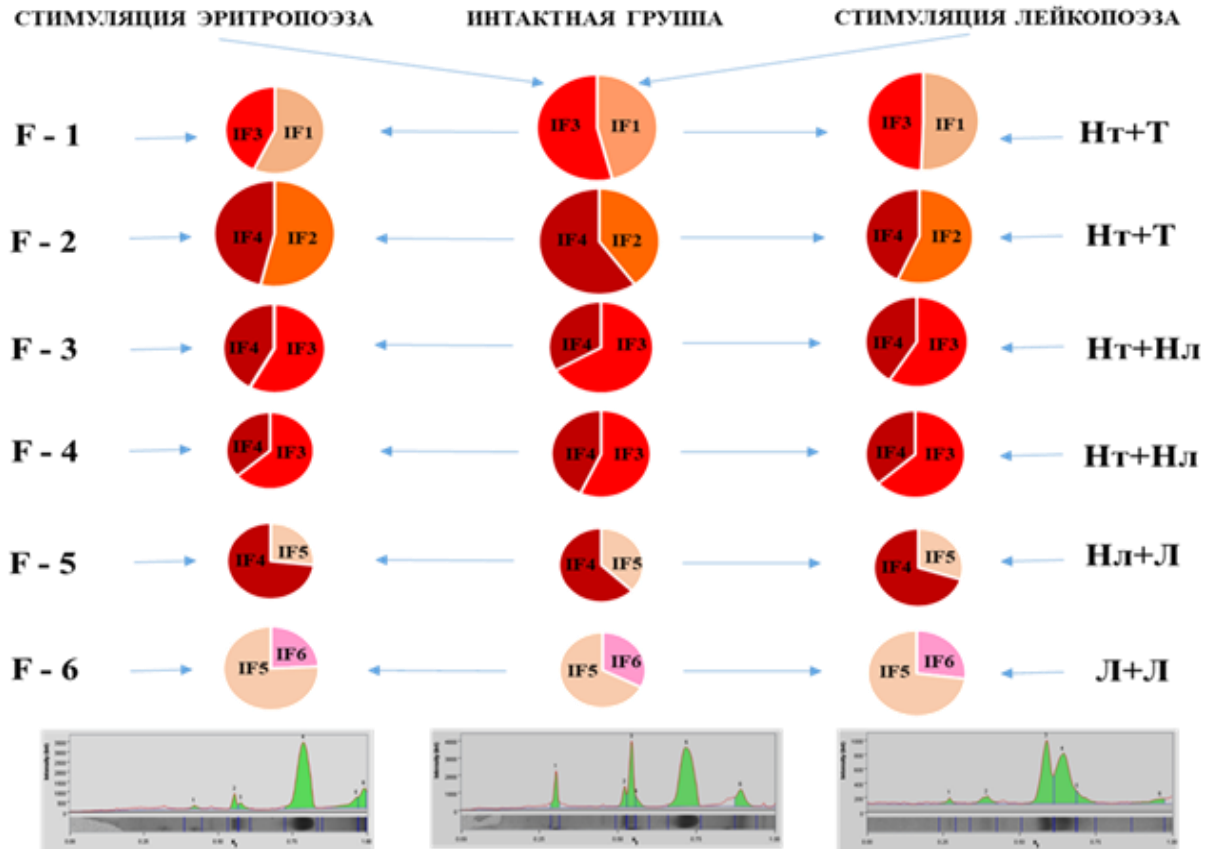


Особое место занимает F6 фракция эритроцитов, содержащая исключительно лёгкие изоформы гемоглобина, а её увеличение совпадает с повышением числа F-клеток и ретикулоцитов.

Однако при активации эритропоэза соотношение в смеси (F5 и F6) 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 (*рисунок 8*):



**Рисунок 8 – Гетерогенность изоформ гемоглобина и фракций эритроцитов при действии на организм различных экстремальных факторов**

*Примечание:* НТ+Т – нормальные варианты+ тяжёлые варианты гемоглобина, НТ+Нл – нормальные (основные) варианты гемоглобина; Нл+Л – нормальные варианты+ лёгкая форма, Л+Л – 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).

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АТФ – аденозинтрифосфат

гПа – гигапаскаль

ИС – иммобилизационный стресс

кДа – килодальтон

КРС – спектроскопии комбинационного рассеяния света

Л+Л – лёгкие варианты гемоглобина

мкм – микрометры

мм рт. ст. – миллиметр ртутного столба

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

Н<sub>Л</sub>+Л – нормальные варианты+ лёгкие варианты гемоглобина

нм – нанометр

Н<sub>Т</sub>+Н<sub>Л</sub> – нормальные (основные) варианты гемоглобина

Н<sub>Т</sub>+Т – нормальные варианты+ тяжёлые варианты гемоглобина

ОАВ – острое асептическое воспаление

ОМК – острая массивная кровопотеря

ОРЭ – осмотическая резистентность эритроцитов

ПААГ – полиакриламидный гель

CD163 – белок, клеточный рецептор

CH<sub>3</sub> – метильная группа

Cl<sup>-</sup> – хлор

CO<sub>2</sub> – углекислый газ

D – диаметр

F1–F6 – фракции эритроцитов

fl – фемтолитры

Grn – гранулоциты

Grn – концентрация гранулоцитов

GSH – глутатион

GSSG – окисленный глутатион

H<sup>+</sup> – водород

Hb – гемоглобин

HbA – основная изоформа гемоглобина птиц

HbD – минорная изоформа гемоглобина птиц

HbF – фетальный гемоглобин

HbP – примитивный гемоглобин

HbS – серповидный гемоглобин

Hct – гематокрит

HMOX1 – гемооксигеназа-1

IF1-IF6 – изоформы гемоглобина

Lym – лимфоциты

M $\pm$ m – среднее значение  $\pm$  ошибка среднего

MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците

MCV – средний объем эритроцита

Mid – средние клетки

MPV – средний объем тромбоцитов

Na<sup>+</sup> – натрий

NaCl – хлорид натрия

NO – оксид азота

Pct – тромбокрит

PDW – распределение тромбоцитов по размерам

Plt – общее количество тромбоцитов

RBC – общее количество эритроцитов

RDW – распределение эритроцитов по размерам (показатель анизоцитоза)

Rt – ретикулоциты

TfR<sup>+</sup> – трансферрин-рецептор-позитивных клеток

WBC – общее количество лейкоцитов

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абрахам, Н.Г. Фармакологические и клинические аспекты гемоксигеназы / Н.Г. Абрахам, А. Капнас // Фармакология. – 2008. Т. 60 (1). – С. 79-127. doi: 10.1124/pr.107.07104.
2. Абрашева, М.В. Эритроцитарный гемоглобин: виды, значения, альтернативные и дополнительные функции / М.В. Абрашева, А.И. Андреева, О.Е. Виноградова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований - 2021. - № 7. - С. 7-11. DOI:10.17513/mjprfi.13240.
3. Акбарходжаева, Х.Н. Гемоглобин человека / Х.Н. Акбарходжаева, Б.З. Нуруллаева, М.Д. Саидова // Oriens. - 2023. - №3 (5). С. 462-468.
4. Андриевская, И.А. Структурно-функциональное состояние гемоглобина у рожениц при герпесной инфекции во время беременности / И.А. Андриевская, М.Т. Луценко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2011. - № 39. - С. 17–19.
5. Андрюков, Б.Г. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.И. Дробот // Здоровье. Медицинская экология. Наука. - 2017. № 1 (68). - С. 4–18. DOI: 10.5281/zenodo.345606.
6. Антоненко, В.Т. Особенности кислород-связывающей функции фетального гемоглобина / В.Т. Антоненко, Ю.Н. Королев // Гематология и трансфузиология. - 2006. - Т.28, № 5. - С.61–64.
7. Барановская, И.Б. Гемоглобин ретикулоцитов в дифференциальной диагностике анемий / И.Б. Барановская, С.А. Онищук // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2008. – Т. 81 (2). С. 31–4.
8. Басалиева, Р.А. Антенатальные гемоглобины человека: биологическая роль и клиничко-диагностическое значение / Р.А. Басалиева, Ю.А. Кривенцев // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2016. - Т. 11 (6). - С.1081-1085.

9. Бахмутова, Л.А. Выявление эмбрионального гемоглобина в крови новорожденных с внутриутробной гипоксией / Л.А. Бахмутова, Ю.А. Кривинцев, Л.А. Огуль // Вопросы практической педиатрии. - 2006. - № 1 (4). - С. 12.

10. Безрукавникова Л.А. Стероид-связывающие белки у больных раком молочной железы / Л.А. Безрукавникова, А.В. Коханов, Ю.А. Кривенцев // Вопросы онкологии. - 2007. - № 53 (4). - С. 409–413.

11. Блюменфельд, Л.А. Гемоглобин / Л.А. Блюменфельд // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - № 4. - С. 33–38.

12. Богомолова, Н.В. Функциональная морфология клеток крови в условиях острого иммобилизационного стресса при облучении электромагнитными волнами миллиметрового диапазона / Н.В. Богомолова, В.Ф. Киричук, С.И. Киреев // Современные наукоемкие технологии. - 2006. - № 6. - С. 43–44.

13. Бойко, О.В. Методические аспекты использования солянокислых спермина и спермидина для идентификации уропатогенной микрофлоры / О.В. Бойко, А.А. Терентьев, А.А. Николаев // Проблемы репродукции. – 2010. – № 3. – С. 77–79.

14. Борсакова, Д.В. Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока: диссертация на соис. учен. степ. канд. биол. наук / Д.В. Борсакова. – Москва, 2019. – 131 с.

15. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. – Москва; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015. – 220 с.

16. ВидеоТест-Морфология 5.0: руководство пользователя. – Санкт-Петербург: ООО «ВидеоТест», 2007. – 138 с.

17. Визир, А.Д. Роль локального и циркулирующего звеньев симпатoadреналовой системы в формировании церебро-ишемической артериальной гипертензии / А.Д. Визир, В.А. Визир, А.Е. Березин // Вестник Харьковского национального университета. – 2001. - Т. 523 (2). - С. 16-23.



18. Власов, А.П. Структурно-функциональное состояние гемоглобина при гестозе / А.П. Власов, В.А. Трофимов, Т.В. Тарасова // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 6. - С. 175-181.

19. Голубева, М.Г. Осмотическая резистентность эритроцитов, методы определения и коррекции, значение при различных патологиях // Успехи совр. биологии. - 2019. Т. 139, № 5. - С. 446–456. DOI: 10.1134/S004213241905003X.

20. Драбкин, Д. Биохимические методы исследования в клинике: справочник. - Москва: Медицина, 1969. - С.345-349.

21. Дыгай, А.М. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоза / А.М. Дыгай, В.П. Шахов. - Томск, 1989. - 224 с.

22. Заводник, И.Б. Активация кислорода гемоглобином и электрон-транспортной цепью митохондрий / И.Б. Заводник, И.К. Дремза, Е.А. Лапшина // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2009. - № 2 (26). - С. 58–60;

23. Замышляева, М.В. Патогенетические механизмы и сигнальные пути изменений агрегации эритроцитов и адгезии лейкоцитов при нарушении сосудистого тонуса и воспалении: автореферат на соискание уч. степени канд. мед. наук. / М. В. Замышляева: ЯрГПИ. – Москва, 2007. - 24 с.

24. Иржак, Л.И. Гемоглобины и их свойства. – 2-е изд., доп. - Москва: Наука, 1983. – 150 с.

25. Иржак, Л.И. Гемоглобины и их свойства. – Москва: Наука, 1975. - 240 с.

26. Ирисов, Э.А. Генеральные факторы высокогорий и адаптации к ним птиц // Сибирский экологический журнал. – 1999. - № 5. С. 487-494.

27. Козинец, Г.И. Интерпретация анализов крови и мочи и их клиническое значение. - Москва: Триада-Х, 1998. - 104 с.

28. Космачевская, О.В. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают пероксинитрит и защищают гемоглобин от окислительной модификации / О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, К. Б. Шумаев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57 (4). С. 315–325.

29. Космачевская, О.В. Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина / О.В. Космачевская, Н.Ф. Топунов // Биохимия. – 2019. - № 84 (1). – С. 3-23.
30. Кривенцев, Ю.А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией / Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, Р.А. Бисалиева // Омский научный вестник. - 2006. - Т. 46, № 9. - С. 272–274.
31. Кривенцев, Ю.А. Гемоглобины человека как диагностические маркеры / Ю.А. Кривенцев, Л.А. Кривенцева // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2018. - № 1. – С. 16–20.
32. Крыжановский, Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. – Москва: Медицина, 1997. - С.216-229.
33. Кузнецова, Н.П. Ассоциация–диссоциация молекул гемоглобина и полимерного гемоглобина в растворах / Н.П. Кузнецова, Л.Р. Гудкин, Р.Н. Мишаева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 2. – С. 237–242.
34. Куницын, В.Г. Изменение структуры гемоглобина в экстремальных условиях Арктики / В.Г. Куницын, Л.Е. Панин, Л.П. Осипова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. - № 2 (48). С. 37-39.
35. Кухарева, Т.А. Клеточный состав крови и гемопоэтических органов у некоторых видов донных рыб (Севастопольская бухта, Черное море): диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Т.А. Кухарева. - Севастополь, 2019. 150с.
36. Легкоева, М.В. Серповидно-клеточная анемия как проявление защитных механизмов организма человека / М.В. Легкоева, Е.А. Хестанова // Молодой ученый. – 2022. – Т. 38 (433). – С. 9-11.
37. Липунова, Е.А. Влияние гипоосмотической нагрузки на устойчивость эритроцитарных мембран / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина, А.С. Зеленцова // Современные наукоемкие технологии. - 2004. - № 1. - С. 94-95.

38. Макарова, О.А. Лейкоциты периферической крови и миелопоэз при стрессе и его ограничении / О.А. Макарова, Л.С. Васильева // Сибирский медицинский журнал. - 2002. - Т.31, № 2. - С. 27-28.

39. Макеева, А.В. Исследование структурно-функциональных изменений гемоглобина человека под действием галоперидола / А.В. Макеева, М.В. Лущик, В.И. Болотских // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - № 3. - Р. 550-550.

40. Маурер, Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. - Москва: Мир, 1971. - 271 с.

41. Михайлов, В.В. Основы патологической физиологии. - Москва: Медицина, 2001. - 704 с.

42. Никулина, Д.М. Эмбриональный гемоглобин как критерий оценки гипоксии новорожденных / Д.М. Никулина, Ю.А. Кривенцев, Л.А. Бахмутова // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2009. - № 1 (25). - С. 450-451.

43. Новожилова, О.С. Влияние лазера на конформацию гемоглобина эритроцитов / О.С. Новожилова, Л.В. Кузьмичева, О.А. Майорова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - № 2-2. - С. 154-155.

44. Папаян, А.В. Анемии у детей / А.В. Папаян, Л.Ю. Жукова. – Санкт-Петербург: Питер, 2001. - 384 с. (Серия “Современная медицина”).

45. Потеемина, Т.Е. Системные изменения в организме при воспалении. Хроническое воспаление: методика разработки для самостоятельной работы студентов медицинских вузов / Т.Е. Потеемина, С.В. Ляляев, С.В.Кузнецова. - Нижний Новгород: Изд-во НижГМА, 2010. - 33 с.

46. Проскурина, И.К. Фракционный состав гемоглобина крысы при экспериментальной дегидратации / И.К. Проскурина, А.В. Титовский // Ярославский педагогический вестник. – 1999. - № 3 (21). С. 83–85.

47. Ройтман, Е.В. Осмотическая резистентность эритроцитов при операциях в условиях искусственного кровообращения / Е.В. Ройтман // Гематология и трансфузиология. - 1999. - Т. 44, № 1. - С. 18-21.

48. Сахау, Н.Р. Состояние эритроцитарных мембран, и оценка эффективности антиоксидантной терапии при хроническом пиелонефрите: автореферат дис.на соиск.уч.ст канд.мед.наук / Н.Р. Сахау. - Уфа, 2006. – 21 с.

49. Сачилович, Д.С. Интерпретация показателей крови на автоматическом гематологическом анализаторе / Д.С. Сачилович, О.А. Шумак, Ж.Н. Пугачева. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2018. – 26 с.

50. Северин, Е.С. Биохимия / под ред. Е.С. Северина. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 768 с.

51. Сергунова, В.А. Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация / В.А. Сергунова, Е.А. Манченко, О.Е. Гудкова // Общая реаниматология. – 2016. - № 12 (6). – С. 49-63.

52. Серебряная, Н.Б. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций: ч. 1. Основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток / Н.Б. Серебряная, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева / Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20, № 6. - С. 785-796. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796.

53. Слатинская, О.В. Исследование изменений конформации гема и глобина при изменении температуры и нормобарической гипоксии / О.В. Слатинская, О.Г. Лунева, Л.И. Деев // Биофизика. – 2020. – Т. 65 (2). – С. 250-258. DOI: 10.31857/S0006302920020052.

54. Солоненко, Ю.Т. Фетальный гемоглобин как индикатор длительной гипоксемии / Ю.Т. Солоненко // Достижения медицинской науки Беларуси. – 1999. – № 4. – С.56–58.

55. Стародуб, Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль / Н.Ф. Стародуб, В.И. Назаренко; АН УССР, Институт молекулярной биологии и генетики. - Киев: Наукова думка, 1987. – 198 с.

56. Сумин, М.Н. Гетерогенная система гемоглобина в условиях нормального и измененного эритропоэза: автореферат дис. ... канд. мед. наук / М.Н.Сумин. – Челябинск, 2002. – 170 с.

57. Сумин, М.Н. Гетерогенность гемоглобина в условиях измененного эритропоэза / М.Н. Сумин, А.В. Резайкин, Б.Г. Юшков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - Т. 135, № 6. - С.660-663.

58. Тихомирова, И.А. Адренореактивность организма и агрегатные свойства эритроцитов в норме и при патологии / И.А. Тихомирова, А.В. Муравьев, Е.П. Гусева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2006. - Т. 5. - С. 63-68.

59. Токушева, А.Н. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома / А.Н. Токушева, М.К. Балабекова, С.Е. Мырзагулова // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - № 6. - С. 273.

60. Топунов, А.Ф. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность / А.Ф. Топунов, Н.Э. Петрова // Успехи биологической химии. - 2001. - Т. 41. - С. 199-228.

61. Топунов, А.Ф. Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование / А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская // Биомика. - 2018. - Т.10, № 3. - С.251-267. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-34.

62. Трошкина, Н.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н.А. Трошкина, В.И. Циркин, С.А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. – 2007. - № 2-3. - С.32-40.

63. Турна, А.А. Проблема определения гемоглобина в лабораторной диагностике и методы ее решения // Поликлиника. – 2013. - № 3. – С. 48–53.

64. Ушакова, А.А. Исследование кислородсвязывающих свойств гемоглобина в эритроцитах при инфаркте миокарда / А.А. Ушакова, Н.В. Громова, В.В. Ревин // Архивариус. - 2016. - Т. 2, № 5 (9). - С. 4-9.

65. Филаретова, Л.П. Стресс в физиологических условиях // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2010. - Т. 96, № 9. - С. 924–935.
66. Фридман, Д.Л. Биохимия: монография. - Москва: Высшая школа, 1962. - 616с.
67. Хныченко, Л.К. Стресс и его роль в развитии патологических процессов / Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов //Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. - 2003. - Т.2, № 3. - С.2-15.
68. Чеснокова, Н.П. Особенности структуры и функций эритроцитарной мембраны / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1 (2). - С. 328-331.
69. Чиркин, А.А. Диагностический справочник терапевта / А.А. Чиркин, А.Н. Огороков, И.И. Гончарин. - Минск: Беларусь, 1993. – 688 с.
70. Шамратова, В.Г. Фетальный гемоглобин – маркер кислородного дефицита клеток при гиподинамии / В.Г. Шамратова, Е.Е. Исаева, С.Р. Усманова // Вестник Башкирского университета. – 2015. - № 20 (1). – С. 101–105.
71. Шапченко, А.В. Серповидно-клеточная анемия. Случай из клинической практики / А.В. Шапченко, Г.Г. Арабидзе, О.В. Муслимова // Кардиосоматика. – 2013. - № 4 (3). – С. 52-58.
72. Щуплова, Е.А. Спектральный анализ гемоглобина под действием микроорганизмов с разным уровнем антигемоглобиновой активности / Е.А. Щуплова, С.Б. Фадеев // Современные проблемы науки и образования. - 2013. - № 2. - С. 405-412.
73. Юшков, Б.Г. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, М.В. Северин. - Екатеринбург: УрО РАН, 1999. - 202 с.
74. Юшков, Б.Г. Некоторые особенности структурной организации и функциональная гетерогенность кроветворной ткани / Б.Г. Юшков, С.В. Сазонов // Вестник Уральской государственной медицинской академии. - 1995. - № 1. - С. 30-32.

75. Ястребов, А.П. Регуляция гемопоза при воздействии на организм экстремальных факторов / А.П. Ястребов, Б.Г. Юшков, В.Н. Большаков. - Свердловск: УрО АН СССР, 1988. – 152 с.
76. Abassi, Z. Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats / Z. Abassi, S. Kotob, F. Pieruzzi // *J. Lab. Clin. Med.* – 1997. - № 129 (6). - P. 603–610.
77. Abid, R., S.A. Ali, I. Munir and M. Qaiser. 2014. Hybridization in *Sida ovata* complex (Malvaceae) III. Evidences from seed micro-morphology and seed protein analysis. *Plant Biosys.*, 148(5-6): 1027-1031.
78. Akinsheye, I. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia / A. Alsultan, N. Solovieff, D. Ngo // *Blood.* - 2011. - № 118 (1). - P. 19–27.
79. Alkindi, S. Influence of Voxelotor-hemoglobin complexes in the estimation of hemoglobin S levels by the current standard of care laboratory evaluation techniques / S. Alkindi, A. Al Subhi, E.H. Ali A // *Front Med (Lausanne).* – 2023. – Vol. 10. - № 1149281. doi: 10.3389/fmed.2023.1149281.
80. Angelo, M. An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate / M. Angelo, D. Singel, J. Stamler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2006. - V. 103(22). P. 8366-8371. DOI: 10.1073/pnas.0600942103.
81. Anyaibe, S. Distributions of hemoglobins A and S among erythrocytes of heterozygotes / S. Anyaibe, O. Castro, V. Headings // *Hemoglobin.* – 1985. - Vol. 9 (2). P. 137-155. doi: 10.3109/03630268508996996.
82. Barvitenko, N.N. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance / N.N. Barvitenko, N.C. Adragna, R.E. Weber // *Cell Physiol. Biochem.* - 2005. - V. 15. - P. 1-18.
83. Basu, A. Hemoglobin interacting proteins and implications of spectrin hemoglobin interaction / A. Basu, A. Chakrabarti // *Journal of Proteomics.* – 2015. - V. 128 (14). – P. 469–475.
84. Bhaskaran, M. Hemoglobin is expressed in alveolar epithelial type II cells / M. Bhaskaran, H. Chen, Z. Chen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. - V. 333. - P. 1348-1352, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.042.

85. Bhattacharya, D. Hemoglobin depletion from red blood cell cytosol reveals new proteins in 2-D gel-based proteomics study / D. Bhattacharya, D. Mukhopadhyay, A. Chakrabarti // *Proteomics Clin. Appl.* – 2007. - V. 1 (6). - P. 561–564.
86. Biagioli, M. Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells / M. Biagioli, M. Pinto, D. Cesselli // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. - V. 106 (36). - P. 15454–15459.
87. Bogdanova, A. Heterogeneity of Red Blood Cells: Causes and Consequences / A. Bogdanova, L. Kaestner, G. Simionato, A. Wickrema // *Front. Physiol.* – 2020. – V. 11. – N 392. doi: 10.3389/fphys.2020.00392.
88. Bogdanova, A. Redox+ and oxygen+induced regulation of Na/K ATPase / A. Bogdanova, I. Petrushanko, A. Boldyrev, M. Gassmann // *Curr. Enzyme Inhibition.* - 2006. - V. 2. - P. 37–59.
89. Brantl, V. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins / V. Brantl, C. Gramsch, F. Lottspeich // *Eur. J. Pharmacol.* – 1986. - V. 125 (2). - P. 309–310.
90. Brazhe, N.A., Abdali, S., Brazhe, A.R. et al. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy// *Biophys. J.* 2009, 97(12): 3206.
91. Budhiraja, V. Effect of hemoglobin Polymerization on oxygen transport in hemoglobin solutions / V. Budhiraja, J.D. Hellums // *Microvascular Research.* – 2002. - V. 64 (2). - P. 220–233.
92. Caro, C.G. The mechanics of the circulation / C.G. Caro, [et al.]. – 2nd ed. - Cambridge: Cambridge University Press, 2012. – 551 p. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139013406>.
93. Cobb, J.A. Deoxygenation-linked association of a tetrameric component of chicken hemoglobin / J.A. Cobb, D. Manning, P.R. Kolatkar // *J. Biol. Chem.* – 1992. - V. 267. - P. 1183–1189.
94. D’Alessandro, S. Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings / S. D’Alessandro, B. Posocco, A. Costa // *Front. Plant Sci.* – 2013. - V. 4. doi: 10.3389/fpls.2013.00340.



95. Damsgaard, C. Hemoglobin isoform differentiation and allosteric regulation of oxygen binding in the turtle, *Trachemys scripta* / C. Damsgaard, J.F. Storz, F.G. Hoffmann, A. Fago // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2013. - V. 305 (8). - P. 961–967.
96. Danielczok, J.G. Red blood cell passage of small capillaries Is associated with transient Ca<sup>2+</sup>-mediated adaptations / J.G. Danielczok, E. Terriac, L. Hertz // *Front. Physiol.* - 2017. - V. 8. - N 979. doi: 10.3389/fphys.2017.00979.
97. Dassen, H. Haemoglobin expression in human endometrium / H. Dassen, R. Kamps, C. Punyadeera // *Hum. Reprod.* – 2008. - V. 23. - P. 635-641. doi: 10.1093/humrep/dem430.
98. Datson, N.A. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus / N.A. Datson, J.M. van den Oever, O.B. Korobko // *Endocrinology.* - 2013. - V. 154 (9). - P. 3261–3272.
99. Datta, M.C. Rat hemoglobin heterogeneity: postnatal changes in proportions of multiple components and effects of erythropoietin on marrow cell cultures / M.C. Datta, J.G. Gilman // *Hemoglobin.* – 1981. - V. 5 (7–8). - P. 701–714.
100. Donenko, F.V. Hemoglobin associated proteins isolated from blood serum of Ehrlich carcinoma-bearing mice / F.V. Donenko, S.M. Sitdikova, A.V. Syrtsev // *International journal of oncology.* – 2008. - V. 32 (4). - P. 885–893.
101. Ekiz, C. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system / C. Ekiz, L. Agaoglu, Z. Karakas, et al. // *Hematol. J.* – 2005. - V. 5. - P. 579-583.
102. Emara, M. Hypoxia differentially upregulates the expression of embryonic, fetal and adult hemoglobin in human glioblastoma cells / M. Emara, A.R. Turner, J.A. Allalunis-Turner // *Int. J. Oncol.* – 2014. - V. 44 (3). - P. 950–958.
103. Fabry, M.E. Detection of hemoglobin S polymerization in intact red cells by P-31 NMR // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1980. - V. 97 (4). - P. 1399–1406.

104. Fago, A. Hagfish Hemoglobins: structure, function and oxygen-linked / A. Fago, L. Giangiaco, R. D'avino // *J. Biol. Chem.* – 2001. - V. 276. – N 27415-27423. doi: 10.1074/jbc.M100759200.
105. Fago, A. A polymerising Root-effect fish hemoglobin with high subunit heterogeneity. Correlation with primary structure. / A. Fago, M. Romano, M. Tamburrini // *Eur. J. Biochem.* – 1993. - V. 218 (3). - P. 829–835.
106. Fedyashkina, A. N., Maksimov, G. V. The influence of hypoxia on the molecular state of erythrocyte hemoglobin of rats during physical activity // *Bulletin of the Mordovian University.* 2013, 3-4: 141-144.
107. Fermo, E. Targeted next generation sequencing and diagnosis of congenital hemolytic anemias: A three years' experience monocentric study / E. Fermo, C. Vercellati, A.P. Marcello // *Front. Physiol.* - 2021. - V. 12. N 684569. doi: 10.3389/fphys.2021.684569.
108. Fuller, W. Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress / W. Fuller, V. Parmar, P. Eaton // *Cardiovasc.* – 2003. - 57. – P. 1044–1051.
109. Gardner, A.M. Nitricoxide dioxygenase function of human cytoglobin with cellular reductants and in rat hepatocytes / A.M. Gardner, M.R. Cook, P.R. Gardner// *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 23850–23857.
110. Gell, D.A. Structure and function of haemoglobins // *Blood cells, molecules and diseases.* – 2018. – V. 70. – P. 13–42.
111. Giardina, B. The multiple functions of haemoglobin / B. Giardina, I. Messina, R. Scatena, M. Castagnola // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* – 1995. –V. 30 (3). – P. 165–196.
112. Gilmore, R.A. MicrobiomeR: An R Package for Simplified and Standardized Microbiome Analysis Workflows // *Journal of Open Source Software.* – 2019. – V. 4 (35). - N 1299. doi: 10.21105/joss.01299.
113. Gorr, T.A. Old proteins – new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells / T.A. Gorr, D. Wichmann, C. Pilarsky // *Acta Physiol. (Oxf).* – 2011. – V. 202 (3). P. 563–581.

114. Grispo, M.T. Gene duplication and the evolution of hemoglobin isoform differentiation in birds / M.T. Grispo, C. Natarajan, J. Projecto-Garcia // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287 (45). – P. 37647–37658.
115. Hanggi, P. Red blood cells of sickle cell disease patients exhibit abnormally high abundance of N-methyl d-aspartate receptors mediating excessive calcium uptake / P. Hanggi, A. Makhro, M. Gassmann // *Br. J. Haematol.* – 2014. – V. 167. – P. 252–264. doi: 10.1111/bjh.13028.
116. He, Z. Functional effects of replacing human  $\alpha$ - and  $\beta$ -globins with their embryonic globin homologues in defined hemoglobin heterotetramers / Z. He, L. Lian, T. Asakura, J.E. Russell // *British Journal of Hematology.* – 2000. - V. 109. - P. 882-890. 10.1046/j.1365-2141.2000.02065.
117. Heneka, M.T. Polymerized hemo globin restores cardiovascular and kidney function in endotoxin-induced shock in the rat / M.T. Heneka, P.A. Löschmann, H. Osswald // *J. Clin. Invest.* 1997; 99 (1): 47–54.
118. Holtje, H. Weinheim: Wiley-VCH / H. Holtje, W. Sippl. - Verlag, 2008. – 310 p.
119. Holtze S. Hematologic adaptation to the subterranean environment by the naked mole-rat, *Heterocephalus glaber* (Ctenohystrica: Heterocephalidae) / S. Holtze, R. Koch, T.B. Hildebrandt // *Journal of Mammalogy.* – 2020. – V. 101 (4). – P. 1000–1009. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyaa053>.
120. Huang, Z.A. Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy // *Technology in Cancer Research and Treatment.* – 2005. – V. 4. – P. 283-293. doi: 10.1177/153303460500400308.
121. Hunt von Herbing, I. Hemoglobin Polymerization in Red Blood Cells of Marine Fishes: A Case of Adaptive Phenotypic Plasticity? / I. Hunt von Herbing, K. Schroeder-Spain // *Biol. Bull.* – 2019. – V. 236 (1). – P. 29–42.
122. Ivanov, V.T. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: The concept of tissue-specific peptide pool / V.T. Ivanov, A.F. Karelin, M.M. Philippova // *Peptide Science.* – 1997. – V. 43 (2). – P. 171–188.

123. Kaestner, L. Cation channels in erythrocytes - historical and future perspective // *Open Biol. J.* – 2011. – V. 4. – P. 27–34. doi: 10.2174/1874196701104010027.
124. Kaestner, L. Channelizing the red blood cell: molecular biology competes with patch-clamp // *Front. Mol. Biosci.* – 2015. – V. 2. – N 46. doi: 10.3389/fmolb.2015.00046.
125. Kakar, S. Structure and Reactivity of Hexacoordinate Hemoglobins. *Biophys / S. Kakar, F.G. Hoffman, J.F. Storz // Chem.* – 2010. – V. 152 (1–3). – P. 1–14.
126. Karelin, A.A. Fragments of functional proteins: Role in endocrine regulation / A.A. Karelin, E.Y. Blishchenko, V.T. Ivanov // *Neurochem. Res.* – 1999. – V. 24 (9). – P. 1117–1124.
127. Korneva, E.A. Defensins: antimicrobial peptides with a broad spectrum of biological activity / E.A. Korneva, V.N. Kokryakov // *Neuroimmune Biology.* – 2003. – V. 3. – P. 451-462.
128. Kosmachevskaja, O.V. Gemoglobin kak nositel biologicheskogo signala / O.V. Kosmachevskaja, A.F. Topunov // *Informacionnye tehnologii v medicine, biologii, farmakologii i jekologii: mater. mezhdunar. konf. - Gurzuf, 2018.* - P. 159-163.
129. Kosmachevskaya, O.V. Carbonyl stress in red blood cells and hemoglobin / O.V. Kosmachevskaya, N.N. Novikova, A.F. Topunov // *Antioxidants.* – 2021. – V. 10. – N 253. <https://doi.org/10.3390/antiox10020253>.
130. Koury, M.J. The molecular mechanism of erythropoietin action / M.J. Koury, M.C. Bondurant // *European Journal of Biochemistry.* – 1992. – V. 210. – P. 649 – 663.
131. Kulikov, V.Y. Distant and contact influence of oxidized adrenaline on hemoglobin of human blood in vitro / V.Y. Kulikov, E.A. Archibasova // *Journal of Siberian Medical Sciences.* – 2016. – V. 1. – P. 7.
132. Kuypers, F.A. Hemoglobin S Polymerization and red cell membrane changes. *Hematology // Oncology Clinics of North America.* – 2014. – V. 28 (2). – P. 155–179.

133. Landschulz, K.T. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a highdensity lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of therat / K.T. Landschulz, R.K. Pathak, A. Rigotti // *Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – V. 98. – P. 984–995.
134. Laybourne, R.C. Collision between a vulture and an aircraft at an altitude of 37.000 feet // *Wilson Bull*. 1974. V. 86. P. 461–462.
135. Lee, M.H. Association between enhanced fetal haemoglobin levels and ineffective reticulocyte production in diabetics / M.H. Lee, J.H. Kim, M.W. Im, J.W. Choi // *Acta Haematol*. – 2009. – V. 122 (4). – P. 247–251.
136. Lew, V.L. The terminal density reversal phenomenon of aging human red blood cells / V.L. Lew, T. Tiffert // *Front. Physiol*. - 2013. - V. 4. doi: 10.3389/fphys.2013.00171.
137. Li, Q. Prostaglandin E2 stimulates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability / Q. Li, V. Jungmann, A. Kiyatkin, P.S. Low // *Journal of biological chemistry*. - 1996. - V. 271, N. 31. - P. 18651–18656.
138. Lisitsa, A. Profiling proteomics for biomarker discovery / A. Lisitsa, S. Moshkovskii, A. Chernobrovkin // *Expert review of proteomics*. – 2014. – V. 11 (1). – P. 121–129.
139. Liu, X. Transcriptome profiling of periwinkle infected with Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) / X. Liu, Y. Zheng // *Eur. J. Plant Pathol*. – 2019. – V. 153. - P. 891–906.
140. Luo, H.Y. Embryonic hemoglobins are expressed in definitive cells / H.Y. Luo, X.L. Liang, C. Frye, M. Wonio // *Blood*. – 1999. – V. 94 (1). – P. 359–361.
141. Lutz, H.U. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans / H.U. Lutz, A. Bogdanova // *Front. Physiol*. – 2013. – V. 4. – P. 1-15. doi: 10.3389/fphys.2013.00387.
142. Magsumova, O.A. Raman spectroscopy and its application in different areas of medicine / O.A. Magsumova, V.A. Polkanova, E.V. Timchenko, L.T. Volova // *Stomatologiya*. – 2021. - V. 100 (4). – P. 137–142. DOI: 10.17116 /stomat2021100041137.

143. Mairbäurl, H. The Increase in hemoglobin concentration with altitude differs between world regions and is less in children than in adults / H. Mairbäurl, S. Kilian, S. Seide // *HemaSphere*. - 2023. - V. 7 (4). - N e854. DOI: 10.1097/hs9.0000000000000854.
144. Mairbäurl, H. Oxygen transport by hemoglobin / H. Mairbäurl, R.E. Weber // *Compr. Physiol.* – 2012. - V. 2 (2). - P. 1463-1489. doi: 10.1002/cphy.c080113. PMID: 23798307.
145. Makhro, A. Red cell properties after different modes of blood transportation / A. Makhro, R. Huisjes, L.P. Verhagen // *Front. Physiol.* – 2016. - V. 7. – N 288. doi: 10.3389/fphys.2016.00288.
146. Manca, L. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin / L. Manca, B. Masala // *IUBMB Life*. – 2008. - V. 60 (2). – P. 94–111.
147. Manchenko, E.A. Homogeneous Deformation of Native Erythrocytes During Long-Term Storage / E.A. Manchenko, E.K. Kozlova, V.A. Sergunova, A.M. Chernysh // *Obshchaya Reanimatologiya*. – 2019. - V. 15 (5). P. 4-10. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-5-4-10>.
148. Marquardt, D.A. Monodisperse 130 kDa and 260 kDa Recombinant Human Hemoglobin Polymers as Scaffolds for Protein Engineering of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers / D.A. Marquardt, M.P. Doyle, J.S. Davidson // *J. Funct. Biomater.* – 2012. - V. 3 (1). – P. 61–78.
149. Menzel, S. Genetic modifiers of fetal haemoglobin in sickle cell disease / S. Menzel, S. Thein // *Molecular Diagnosis and Therapy*. – 2019. - V. 23. – P. 235-244. doi: 10.1007/s40291-018-0370-8.
150. Meyering, C.A. Studies on the heterogeneity of hemoglobin: II. The heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in amberlite IRC-50 chromatography; quantitative aspects / C.A. Meyering, A.L.M. Israels, T. Sebens // *Clinica Chimica Acta*. - 1960. - T. 5, № 2. - C. 208-222.
151. Mindukshev, I.V. A new method for studying platelets, based upon the low-angle light scattering technique. 1 / I.V. Mindukshev, I.E. Jahatspanian, N.V. Goncharov

// Theoretical and experimental foundations of the method. – 2006. - Spectroscopy 19. – P. 235–246.

152. Miura, T. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*) / T. Miura, K. Yamauchi, H. Takahashi, Y. Nagahama // Proc Natl Acad Sci USA. – 1991. – V. 88. – P. 5774- 5778.

153. Nagel, R.L. The paradox of hemoglobin SC disease / R.L. Nagel, M.E. Fabry, M.H. Steinberg // Blood. – 2003. – V. 17 (3). P. 167–178.

154. Nakamura, H. Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with gammaaminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A / H. Nakamura, T. Takishima, T. Kometani // Int. J. Food Sci. Nutr. – 2009. – V. 60. - P. 106–113. doi: 10.1080/09637480802558508.

155. Narayan, Y.B. Taxonomy and biostratigraphy of Cenozoic foraminifers from Shell Canada wells, offshore Vancouver Island, Toffino Bay, B.C. / Y.B. Narayan, C.R. Barnes, M.J. Johns // Micropaleontol. - 2005. - V. 51, № 2. - P. 101–167.

156. Newton, D.A. Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells / D.A. Newton, K.M. Rao, R.A. Dluhy, J.E. Baatz // J. Biol. Chem. – 2006. - V. 281. – P. 5668–5676.

157. Ohyagi, Y. Hemoglobin as a novel protein developmentally regulated in neurons / Y. Ohyagi, T. Yamada, I. Goto // Brain Res. – 1994. –V. 635. – P. 323–327.

158. Opazo, J.C. Gene turnover in the avian globin gene families and evolutionary changes in hemoglobin isoform expression / J.C. Opazo, F.G. Hoffmann, C. Natarajan // Mol. Biol. Evol. – 2015. – V. 32 (4). – P. 871-887. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu341>.

159. Pack-Mabien, A.V. Benefits of delayed fetal hemoglobin (HbF) switching in sickle cell disease (SCD): a case report and review of the literature / A.V. Pack-Mabien, H. Imran // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 2013. – V. 35 (8). – P. 347–349.

160. Pan, Y.K. Acclimation to prolonged hypoxia alters hemoglobin isoform expression and increases hemoglobin oxygen affinity and aerobic performance in a marine fish / Y.K. Pan, R. Ern, P.R. Morrison // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – N 7834.

161. Papageorgiou, D.P. Simultaneous polymerization and adhesion under hypoxia in sickle cell disease / D.P. Papageorgiou, S.Z. Abidi, H.Y. Chang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2018. – V. 115 (38), - P. 9473–9478.
162. Perazzolli, M. Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity / M. Perazzolli, P. Dominici // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16. – P. 2785–2794.
163. Petersen, A.G. Hemoglobin polymerization via disulfide bond formation in the hypoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*: implications for antioxidant defense and O<sub>2</sub> transport / A.G. Petersen, S.V. Petersen, S. Frische // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2018. – V. 314 (1). – P. 84–93.
164. Petkova-Kirova, P. Red Blood Cell Membrane Conductance in Hereditary Haemolytic Anaemias / P. Petkova-Kirova, L. Hertz, J. Danielczok // *Front Physiol.* – 2019. – V. 10. – N 386. doi: 10.3389/fphys.2019.00386.
165. Petrushanko, I.Y. Oxy<sup>+</sup> gen<sup>+</sup>induced regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells / I.Y. Petrushanko, N.B. Bogdanov, N. Lapina // *J. Gen. Physiol.* – 2007. – V. 130. – P. 389–398.
166. Philippidis, P. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery / P. Philippidis, J.C. Mason, B.J. Evans // *Circ. Res.* – 2004. – V. 94 (1). – P. 119–126.
167. Pillai, A.S. Origin of complexity in hemoglobin evolution / A.S. Pillai, Chandler, A. Shane // *Nature.* – 2020. – V. 581 (7809). – P. 480–485. doi: 10.1038/s41586-020-2472-9.
168. Prus, E. Heterogeneity of F cells in beta-thalassemia / E. Prus, E. Fibach // *Transfusion.* – 2013. – V. 53. – P. 499–504. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03769.x.
169. Radosinska, J. Erythrocyte Deformability and Na,K-ATPase Activity in Various Pathophysiological Situations and Their Protection by Selected Nutritional Antioxidants in Humans / J. Radosinska, N. Vrbjar // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. - N 11924. [https://doi.org/ 10.3390/ijms222111924](https://doi.org/10.3390/ijms222111924).



170. Reischl, E. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins / E. Reischl, A.L. Dafre, J.L. Franco, D.W. Filho // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2007. – V. 146 (1–2). – P. 22–53.
171. Reyes, F. The heterogeneity of erythrocyte antigen distribution in human normal phenotypes: an immunoelectron microscopy study / F. Reyes, M.F. Gourdin, J.L. Lejone // *British Journal of Haematology.* - 1976. - T. 34, № 4. - C. 613-621.
172. Reynafarje, C. Oxygen transport of hemoglobin in high-altitude animals (Camelidae) / C. Reynafarje, J. Faura, D. Villavicencio // *J. Appl. Physiol.* - 1975. - V. 38 (5). – P. 806–810.
173. Richter, F. Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains / F. Richter, B.H. Meurers, C. Medvedeva // *J. Comp. Neurol.* – 2009. – V. 515 (5). – P. 538–547.
174. Rochette, J. Fetal hemoglobin levels in adults / J. Rochette, J.E. Craig, S.L. Thein // *Blood Rev.* – 1994. – V. 8 (4). – P. 213-24. doi: 10.1016/0268-960x(94)90109-0. PMID: 7534152.
175. Rodrigo, R., Bachler, J.P Relationship between (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase activity, lipid peroxidation and fatty acid profile in erythrocytes of hypertensive and normotensive subjects // *Mol Cell Biochem.* 2007. – V. 303, № 1 (3). - P. 73-81.
176. Rotordam, G.M. A novel gain-of-function mutation of Piezo1 is functionally affirmed in red blood cells by high-throughput patch clamp / G.M. Rotordam, E. Fermo, N. Becker // *Haematologica.* – 2019. – V. 104. - e181. doi: 10.3324/haematol.2018.201160.
177. Sandakov, D. Turpentine-induced fever during stimulation and inhibition of hepatic protein synthesis / D. Sandakov, V. Gerein // *J. Therm. Biol.* - 2003. - V. 28, № 6 - 7. - P. 439-443.
178. Schelshorn, D.W. Expression of hemoglobin in rodent neurons / D.W. Schelshorn // *Journal of Cerebral Blood. Flow and Metabolism.* – 2009. – V. 29. – P. 585–595.
179. Scott, T.A. Concise encyclopedia of biochemistry / T.A. Scott, E.I. Mercer. – Berlin; New York: Walter de Gruyter, 1983. – 516 p.

180. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuousagents // *Nature*. - 1936. - V.138. - P.32.
181. Setton-Avruj, C.P. Presence of alpha-globin mRNA and migration of bone marrow cells after sciatic nerve injury suggests their participation in the degeneration/regeneration process / C.P. Setton-Avruj, P.L. Musolino, C. Salis // *Exp. Neurol.* – 2007. – V. 203 (2). – P. 568–758.
182. Smith, R.D. Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells / R.D. Smith, J. Li, C.T. Noguchi, A.N. Schechter // *Blood*. – 2000. – V. 95 (3). – P. 863-869.
183. Soldatov, A.A. Haemoglobin system of Black Sea round goby under experimental hypoxia conditions / A.A. Soldatov, I.A. Parfyonova, S.V. Konoshenko // *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. - 2004. – V. 76 (3). – P. 85-90.
184. Spencer, C.I. Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia / C.I. Spencer, S. Baba, K. Nakamura // *Stem Cell Rep.* – 2014. – V. 3. – P. 269–281. doi: 10.1016 /j.stemcr.2014.06.003.
185. Stein, S. Preparation and properties of six rat hemoglobins / S. Stein, M.G. Cherian, A. Mazur // *The Journal of Boiological chemistry*. – 1971. – V. 246 (7). – P. 5287–5293.
186. Steinberg, M.H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? / M.H. Steinberg, D.H. Chui, G.J. Dover // *Blood*. – 2014. – V. 123 (4). – P. 481–485.
187. Steinberg, M.H. HbA2: biology, clinical relevance and a possible target for ameliorating sickle cell disease / M.H. Steinberg, G.P. Rodgers // *British Journal of Hematology*. – 2015. – V. 170 (6). – P. 781–787.
188. Storz, J.F. Hemoglobin–oxygen affinity in high-altitude vertebrates: is there evidence for an adaptive trend? // *Journal of Experimental Biology*. – 2016. – V. 219. – P. 3190–3203.
189. Storz, J.F. Oxygenation properties and isoform diversity of snake hemoglobins / J.F. Storz, C. Natarajan, H. Moriyama // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2015. – V. 309 (9). – P. 1178–1191.

190. Storz, J.F. Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins / J.F. Storz, J.C. Opazo, F.G. Hoffmann, G. Federico // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2013. – V. 66 (2). – P. 469–478. doi:10.1016/j.ympev.2012.07.013.
191. Thein S.L. Discovering the genetics underlying fetal hemoglobin production in adults / S.L. Thein, S. Menzel // *British Journal of Hematology*. – 2009. – V. 145 (4). – P. 455–467.
192. Thom, C.S. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates / C.S. Thom, C.F. Dickson, D.A. Gell, M.J. Weiss // *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.* – 2013. – V. 3 (3). - a011858.
193. Thompson, T.Q. Anthropogenic habitat alteration leads to rapid loss of adaptive variation and restoration potential in wild salmon populations / T.Q. Thompson, M.R. Bellinger, S.M. O'Rourke // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2019. – V. 116. – P. 177–186. doi: 10.1073/pnas.1811559115.
194. Ulashchik, V.S. The targeted transport of the medicinal substances and the therapeutic physical factors // *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoi fizicheskoi kulturey*. - 2014. – V. 91 (6). – P. 52-61.
195. Vazenmiller, D. Membrane-binding hemoglobin in erythrocytes of women with pregnancy complications / D. Vazenmiller, D. Omertaeva, I. Beinikova // *The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive*. - 2019. - V. 234. - P. 33-34.
196. Vekilov, P.G. Sick-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? // *Br. J. Haematol.* – 2007. – V. 139 (2). – P. 173–184.
197. Vitrichenko, E.E. State of the erythrocytes in rats with emotional stress // *Translated from Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*. - 1985. -V. 100, № 12. - P. 675-677.
198. Vlasova, I.M. Investigation of ischemia damaging action on blood serum structure by laser spectroscopy methods / I.M. Vlasova, E.V. Dolmatova, V.B. Koshelev, A.M. Saletsky // *Laser Physics Letters*. – 2004. – V. 1 (8). – P. 417-420.

199. Wajcman, H. Haemoglobin from microorganism to man: a single protein folding, a variety of functions / H. Wajcman, L. Kiger // *Comptes Rendus Biologies.* – 2002. – V. 325 (12). – P. 1159-1174. doi.org/10.1016/S1631-0691 (02)01537-8.
200. Wesseling, M.C. Phosphatidylserine Exposure in human red blood cells depending on cell age / M.C. Wesseling, L. Wagner-Britz, H. Huppert // *Cell Physiol. Biochem.* – 2016. – V. 38. – P. 1376–1390. doi: 10.1159/000443081.
201. Wolk, M. Development of fetal haemoglobin-blood cells (F cells) within colorectal tumor tissues / M. Wolk, J.E. Martin, C. Reinus // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – V. 59. - P. 598–602.
202. Wride, M.A. Expression profiling and gene discovery in the mouse lens / M.A. Wride, F.C. Mansergh, S. Adams // *Mol. Vis.* – 2003. –V. 9. – P. 360–396.
203. Yasin, Z. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F / Z. Yasin, S. Witting, M.P. Palascak // *Blood.* – 2003. – V. 102 (1). – P. 365–370.