

## ВЛИЯНИЕ ЛИЗИСА ЭРИТРОЦИТОВ НЕКОТОРЫХ ЖИВОТНЫХ НА СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ОКСИГЕМОГЛОБИНА

© 2018 г. Н.Л. Лаврик, Т.Н. Ильичёва\*

*Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,  
630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3*

*E-mail: lavrik@kinetics.nsc.ru*

*\*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,  
630559, Кольцово Новосибирской области*

Поступила в редакцию 09.11.15 г.

После доработки 09.07.16 г.

Изучены спектры поглощения лизированных и нелизированных образцов эритроцитов, выделенных из крови петуха, гуся и морской свинки. Установлено, что положение максимумов полос Соре для лизированных образцов эритроцитов из крови петуха и гуся смещается относительно исходных образцов эритроцитов в коротковолновую область спектра. Для эритроцитов морской свинки сдвига полосы не наблюдается. При интерпретации коротковолнового сдвига полосы Соре рассмотрены следующие факторы, которые могут обуславливать этот эффект: физические (изменение угла наклона фона спектра поглощения, наличие ядра в эритроците, изменение величины диэлектрической постоянной) и химический (возможность образования метгемоглобина и гемихрома). Показано, что вклад в коротковолновый сдвиг этих факторов мал и его при интерпретации можно не учитывать. Предложена гипотеза, согласно которой коротковолновый сдвиг обусловлен образованием свободных молекул оксигемоглобина при диссоциации комплекса «оксигемоглобин – внутренняя поверхность мембраны эритроцита». В рамках этой гипотезы также непротиворечиво объясняются различия в положении максимумов полосы Соре для разных животных.

*Ключевые слова: эритроциты из крови петуха, гуся, морской свинки; оксигемоглобин; лизис; спектры поглощения; полоса Соре.*

DOI: 10.1134/S0006302918050095

Изучение спектральных параметров хромофоров биомолекул позволяет получать сведения об электронном состоянии биомолекул в норме, в условиях изменения их микроокружения, при действии физико-химических агентов, при развитии в организме патологических процессов и т.д.

Гемоглобин (в частности, оксигемоглобин (HbO<sub>2</sub>)) является одним из важнейших компонентов клеток эритроцитов крови. Изучению его структурных модификаций, деструкции и функциональных свойств различными физико-химическими методами, в частности абсорбционными, посвящено множество работ и монографий (см., например, работу [1]). В спектрах поглощения в видимой области молекула HbO<sub>2</sub> имеет характерные три наиболее интенсивные полосы с максимумами на  $\lambda \sim 415$  нм (полоса Соре), на  $\lambda \sim 545$  нм ( $\beta$ -полоса) и на  $\lambda \sim 580$  нм ( $\alpha$ -полоса) [2,3]. Природа спектров по-

глощения HbO<sub>2</sub> в настоящее время надежно установлена: она определяется электронными свойствами гемов, которые являются простетическими группами в структуре гемоглобина [4]. Полоса Соре в металлопорфинах (молекулы гемов в эритроцитах) обусловлена электронным  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходом  $2^1E_a \leftarrow 1^1A_g$ , если верхнее состояние дважды вырожденное (симметрия D<sub>4h</sub>) и электронными  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходами  $2^1B_{3u} \leftarrow 1^1A_g$  и  $2^1B_{2u} \leftarrow 1^1A_g$  в случае снятия вырождения (симметрия D<sub>2h</sub>) [2,3]. Экспериментально спектр полосы Соре оксигемоглобина в эритроците имеет одну полосу, что позволяет приписать природу наблюдаемого спектра электронному переходу  $2^1E_a \leftarrow 1^1A_g$ .

Несмотря на многочисленность работ по изучению спектров поглощения HbO<sub>2</sub> в различных условиях, систематическая информация об изменении спектральных свойств полосы Соре при лизисе эритроцитов практически отсутствует. Одной из возможных причин отсутствия сообщений по этому вопросу может быть за-

Сокращение: HbO<sub>2</sub> – оксигемоглобин.

ключение, сделанное еще в работе [5], об отсутствии различия в положении максимума этой полосы для лизированных и исходных (нелизированных) образцов эритроцитов, выделенных из крови человека. Однако внимательное рассмотрение спектров поглощения лизированных образцов, которые были получены по точкам, показывает заметную тенденцию к сдвигу максимума полосы Сорe относительно спектров исходных образцов в коротковолновую область. Действительно, в работе [6], выполненной на современной аппаратуре, было установлено, что гемолиз эритроцитов из крови крыс приводит к сдвигу полосы Сорe примерно на 3 нм в коротковолновую область спектра. В литературе также отсутствует количественная информация об изменении (или постоянстве) соотношения величин оптических плотностей на  $\lambda_{\max} \sim 415$  нм и  $\lambda_{\max} \sim 545$  нм в спектрах поглощения оксигемоглобина при лизисе эритроцитов. Изменение этого соотношения при лизисе могло бы свидетельствовать об изменении состояния электронных термов молекулы гема.

Изменения в спектре поглощения  $\text{HbO}_2$  при лизисе клеток эритроцитов априори можно ожидать, поскольку в процессе лизиса имеет место выход молекул оксигемоглобина из клетки эритроцита. При этом гем не выходит в раствор, а продолжает находиться в молекуле оксигемоглобина [7]. В исходных эритроцитах приблизительно до 10%  $\text{HbO}_2$  может быть связано с внутренней поверхностью мембраны [8–11], т.е. имеет место образование мембранно-связанного оксигемоглобина, который образуется в результате взаимодействия молекулы  $\text{HbO}_2$  с компонентами мембраны (белок полосы 3, спектрин, гликоферин, мембранные липиды). Спектральные параметры мембранно-связанных молекул  $\text{HbO}_2$  могут отличаться от спектральных параметров свободных молекул оксигемоглобина. В результате спектр поглощения исходных образцов эритроцитов является неоднородным и состоит из компонент, принадлежащих связанным и свободным молекулам  $\text{HbO}_2$ . Таким образом, при лизисе, если имеет место уменьшение концентрации мембранно-связанных молекул оксигемоглобина, т.е. уменьшение интенсивности одной из компонент, возможно изменение спектра поглощения молекулы  $\text{HbO}_2$ .

Положение максимумов полос поглощения определяется состоянием электронных орбиталей порфириновых колец. Чувствительность электронных переходов между орбиталями к структурным изменениям порфириновых колец, которые образуют гем, надежно установлена [2,3]. Как уже указывалось выше, полоса

Сорe обусловлена электронным переходом  $\pi \rightarrow \pi^*$ . В общем случае для электронных переходов  $\pi \rightarrow \pi^*$  природы комплексобразование молекул приводит к длинноволновому сдвигу полосы поглощения [12]. В частности, для полосы Сорe было установлено, что при связывании порфиринов с ДНК она претерпевает длинноволновой сдвиг до 20 нм при внутреннем интеркалировании и до 8 нм при внешнем интеркалировании [13]. Также к батохромному сдвигу до 10 нм полосы Сорe в спектре поглощения хлорина, который содержат порфириновые кольца, приводит добавление белка [14]. Соответственно, можно ожидать, что при лизисе, т.е. в случае уменьшения доли мембранно-связанных молекул оксигемоглобина (уменьшение концентрации комплексов), может наблюдаться коротковолновый сдвиг.

Другой возможной причиной изменения параметров спектров поглощения оксигемоглобина, лизированных относительно исходных эритроцитов, может быть изменение диэлектрической проницаемости окружения молекулы оксигемоглобина, поскольку величины  $\epsilon$  внутри эритроцита и для плазмы крови различаются [15], а влияние изменения диэлектрической проницаемости на спектры поглощения надежно установлено [16].

Таким образом, изучение вопроса о влиянии лизиса на спектральные параметры оксигемоглобина представляется актуальным, поскольку полученные сведения об эффективности взаимодействия оксигемоглобина с мембраной эритроцитов могли бы дать информацию об изменении параметров электронных орбиталей молекулы гемоглобина в этом процессе и, соответственно, об изменении ее структуры. Для практики дальнейшее получение данных о связи спектральных свойств полосы Сорe с медицинскими показателями крови могло бы служить весьма простым способом диагностики ее состояния, что представляется важным для клинического мониторинга гемолиза. Однако несмотря на простоту изучения процессов лизиса эритроцитов с применением одного из самых распространенных физико-химических методов – метода абсорбции, систематические сведения об изучении изменения такого простого спектрального параметра, как положение максимума полосы Сорe при гемолизе, отсутствуют.

Целью настоящей работы было изучение влияния лизиса эритроцитов, выделенных из крови гуся, петуха и морской свинки, на спектральные параметры полосы Сорe. Результаты проведенных экспериментов показали, что положения максимумов полос Сорe в спектрах поглощения для образцов лизированных эрит-

роцитов относительно исходных претерпевают коротковолновый сдвиг для эритроцитов, выделенных из крови гуся и петуха. Сдвиг положения максимума полосы Соре практически отсутствует для образцов эритроцитов, выделенных из крови морской свинки.

## МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Для приготовления эритроцитов брали образцы свежей крови петуха, морской свинки, гуся с добавлением 5–10 ед./мл гепарина, фильтровали через стерильную хлопковую марлевую салфетку (кат. № 22-415-469, Fisher Scientific, США) в коническую пробирку объемом 50 мл. Затем аккуратно наполняли ее холодным 0,01 М фосфатно-солевым буфером, рН 7,2, закрывали пробкой и слегка перемешивали, переворачивая пробирку. Центрифугирование проводили при 1200 об/мин в течение 10 мин при 4°C. После этого удаляли надосадочную жидкость, используя пипетку объемом 10 мл. Затем следовала двукратная промывка холодным фосфатно-солевым буфером. Оставшийся супернатант удалялся при помощи микропипетки. Уплотненные эритроциты хранили на льду. 1%-ю суспензию эритроцитов готовили добавлением 2,5 мл уплотненных эритроцитов к 247,5 мл холодного фосфатно-солевого буфера в стеклянной колбе объемом 500 мл и перемешивали вращением. Концентрации эритроцитов из крови морской свинки, петуха и гуся составляли  $30 \cdot 10^{12}$ ,  $40 \cdot 10^{12}$  и  $12 \cdot 10^{12}$  шт/л соответственно. Форму эритроцитов характеризовали величиной коэффициента сферичности  $k$ , который определяли как отношение продольной и поперечной осей эритроцитов [17].

В экспериментах по разбавлению использовали стандартный физиологический раствор (0,9% NaCl, Fluka, Германия).

Лизированные образцы эритроцитов готовили двумя способами.

*Способ 1* («водный» лизис). К уплотненным эритроцитам добавляли стерильную дистиллированную воду и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при 4°C.

*Способ 2* («градиентный»). Исследуемый свежий раствор эритроцитов от каждого животного, разбавленный примерно в 10 раз, распределялся по пяти пробиркам и через два часа отстаивания отбирали пробы с разных высот пробирок (0, 1, 3, 5 и 9 см, считая от дна), которые заливали в рабочую кювету спектрофотометра. В этом способе получения лизированных образцов эритроцитов получалось, что на дне (0 см) в основном концентрируются осевшие неразрушенные (исходные) эритроциты.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре HP 6041 (Hewlett Packard, США). Использовали стандартные кварцевые кюветы толщиной 1 см. Для определения положения максимума полосы поглощения использовали процедуру взятия первой производной спектра поглощения. За положение максимума принимали значение абсциссы, при котором величина первой производной равнялась нулю.

Для анализа изменений контура спектра поглощения оксигемоглобина при лизисе эритроцитов использовали величину  $\Omega$ , которая определялась как отношение величин оптических плотностей ( $OD$ ) полос поглощения в максимуме на  $\lambda = 415$  нм и 545 нм ( $\Omega = OD_{415}/OD_{545}$ ). За величину  $OD$  принимали разность величин поглощения в максимуме полосы и величины  $OD$  фона (см. рис. 1).

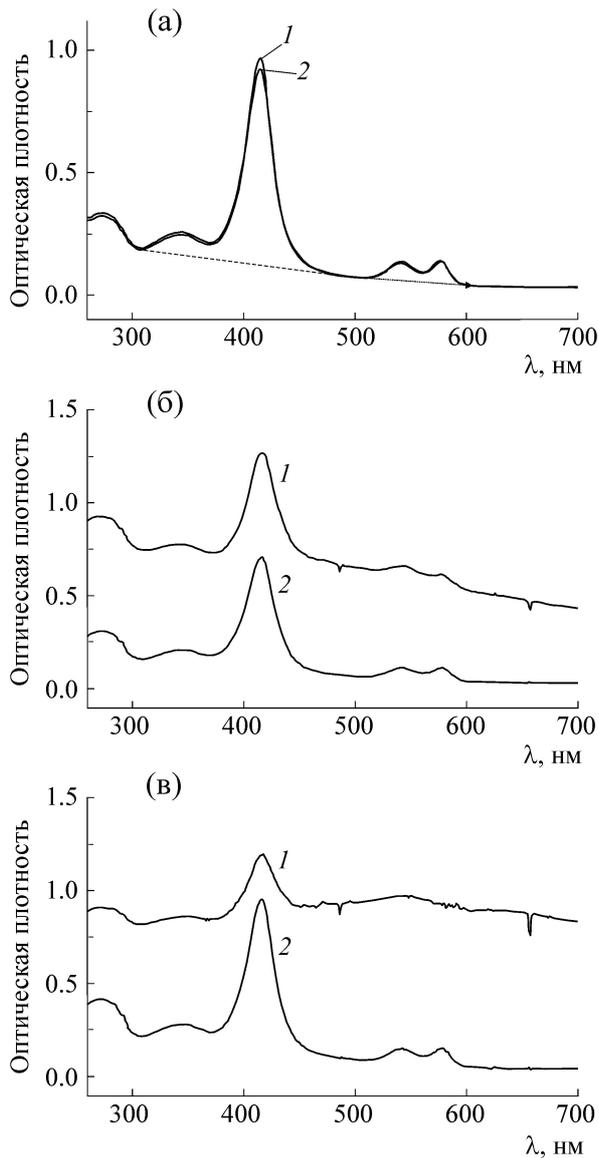
При моделировании экспериментальных спектров полосы Соре использовали распределение Гаусса со следующими параметрами: положение максимумов 515, 510 и 505 нм и полуширины полос 17, 17 и 20 нм для оксигемоглобина, гемихрома и метгемоглобина соответственно [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены спектры поглощения исходных и лизированных образцов эритроцитов, выделенных из крови морской свинки, петуха и гуся. Полученные спектры исходных и лизированных образцов эритроцитов хорошо совпадают с известными данными для оксигемоглобина, для спектров которых характерно наличие полос в районе  $\lambda \sim 415$  нм,  $\lambda \sim 545$  нм и на  $\lambda \sim 580$  нм [4]. Наличие характерных полос на  $\lambda \sim 545$  нм и на  $\lambda \sim 580$  нм для спектров лизированных образцов свидетельствует о том, что при лизисе регистрируются именно молекулы оксигемоглобина, поскольку для других производных молекул гемоглобина (дезоксигемоглобин, метгемоглобин, карбоксигемоглобин, гемихром) этот дублет отсутствует [4,8,17].

Из рис. 1 видно, что спектры поглощения оксигемоглобина образцов эритроцитов, выделенных из крови гуся и петуха и претерпевших лизис (рис. 1б, в), имеют значительно больший фон и менее интенсивное поглощение полосы Соре, чем спектры исходных образцов. Этот эффект носит название тиндалевского гипохромизма [4,6] и наблюдался ранее (например, в работах [5,6]).

Из данных, представленных на рис. 1, следует, что изменений величин оптической плотности и фона в спектрах поглощения оксиге-



**Рис. 1.** Спектры поглощения лизированных и нелизированных образцов эритроцитов из крови морской свинки (а), петуха (б) и гуся (в). 1 – Лизированный образец эритроцитов, 2 – исходный образец эритроцитов.

моглобина из крови морской свинки не происходит. Этот факт имел место в обоих типах экспериментов по лизированию. Отсутствие из-

менений в спектре поглощения при гемолизе означает, что вклад тиндалевского гипохромизма для сравниваемых образцов одинаков. Это свидетельствует о том, что лизис эритроцитов, выделенных из крови морской свинки, не приводит к изменению параметров рассеивающих и поглощающих объектов.

В таблице представлены результаты численной обработки экспериментов по влиянию лизирования клеток эритроцитов исследуемых животных на положение максимума полосы Соре. Из полученных данных следует, что абсолютные положения максимумов полос поглощения несколько различаются. Так, максимумы полосы Соре  $\lambda_{\max}$  для эритроцитов в исходном состоянии находятся на  $414 \pm 0,02$  нм,  $416 \pm 0,02$  нм и  $417 \pm 0,02$  нм для морской свинки, петуха и гуся соответственно. Следует заметить, что значения  $\lambda_{\max}$  возрастают с увеличением размеров эритроцитов и с увеличением величины коэффициента  $k$  (таблица).

Как следует из таблицы, положения максимумов полосы Соре для образцов эритроцитов, лизированных с помощью первого способа, сдвигаются в коротковолновую область длин волн относительно образцов исходных клеток. Этот сдвиг составляет для спектров поглощения эритроцитов из крови гуся 2 нм, а из крови петуха – 1 нм. Изменения положения максимума полосы поглощения для эритроцитов из крови морской свинки при лизировании в пределах экспериментальной погрешности не наблюдаются.

На рис. 2 показаны результаты эксперимента по лизированию эритроцитов вторым способом. Отчетливо видно, что спектры поглощения эритроцитов петуха и гуся во времени претерпевают изменения (величины оптической плотности в максимуме, величина и угол наклона фона), а спектры поглощения эритроцитов морской свинки практически остаются неизменными. Эти данные качественно соответствуют таковым, полученным в результате лизирования образцов эритроцитов по первому способу (рис. 1) – заметное изменение вида спектра для образцов эритроцитов гуся и петуха и практически полное отсутствие изменений

#### Размеры и спектральные параметры эритроцитов животных

Животное	Размеры эритроцитов, мкм [17]	$k$	$(\lambda_{\max} \pm 0,02)$ , нм	Изменения при лизисе $(\Delta\lambda_{\max} \pm 0,03)$ , нм
Морская свинка	$7,2 \times 7,2$	1,0	414	0
Петух	$12 \times 7,5$	1,6	416	-1
Гусь	$13,8 \times 6,6$	2,09	417	-2

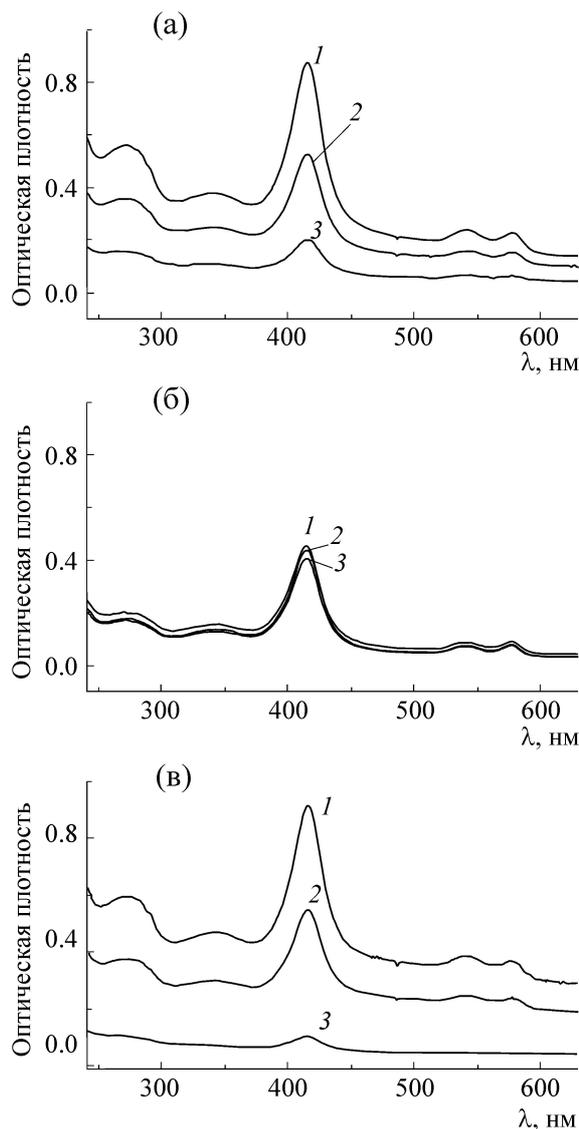
для образцов эритроцитов морской свинки. Однако количественные (абсолютные) значения различий положения максимумов спектра для лизированных и исходных образцов одного животного несколько отличаются: они меньше, если лизис проводился по второму способу. Так, для эритроцитов, лизированных по второму способу (забор пробы с поверхности пробирки), коротковолновые сдвиги положения максимума полосы  $Sore$   $\Delta\lambda_{max}$  для гуся, петуха и морской свинки составили  $1,30 \pm 0,02$  нм,  $0,47 \pm 0,02$  нм и  $0,03 \pm 0,02$  нм соответственно, что заметно меньше величин сдвига для лизированных эритроцитов, полученных первым способом. Это количественное различие, по-видимому, связано с тем, что за время выдерживания образцов в течение 2 часов полного разделения лизированной части эритроцитов от нелизированной (исходной) не происходило. Таким образом, в момент забора пробы всегда отбирали раствор, содержащий оксигемоглобин как из нативных, так и лизированных образцов эритроцитов. В дальнейшем будут обсуждаться данные спектральных изменений полосы  $Sore$  в результате проведения лизиса по первому способу.

На рис. 3 представлены концентрационные зависимости величин  $\Omega$  лизированных и исходных образцов эритроцитов разных животных. Как видно из представленных данных, величины  $\Omega$  для лизированных образцов эритроцитов крови гуся и петуха выше, чем для исходных. Этот рост имеет место при любых концентрациях эритроцитов (рис. 3а,б). Изменения величины  $\Omega$  для спектров поглощения лизированных образцов эритроцитов означают, что электронные состояния молекул  $HbO_2$  при лизисе претерпевают изменения. Спектры поглощения лизированных и исходных эритроцитов морской свинки практически не различаются (рис. 1а, 2б), соответственно, величина  $\Omega$  в пределах экспериментальной погрешности не меняется даже при различных концентрациях  $HbO_2$  (рис. 3в).

Резюмируя раздел «Результаты», заключаем, что параметры спектра полосы  $Sore$  ( $\Delta\lambda_{max}$ ,  $\Delta OD$ ,  $\Omega$ ) при гемолизе эритроцитов гуся и петуха претерпевают изменения, а параметры спектра полосы  $Sore$  лизированных образцов эритроцитов, выделенных из крови морской свинки, при лизисе не изменяются.

## ОБСУЖДЕНИЕ

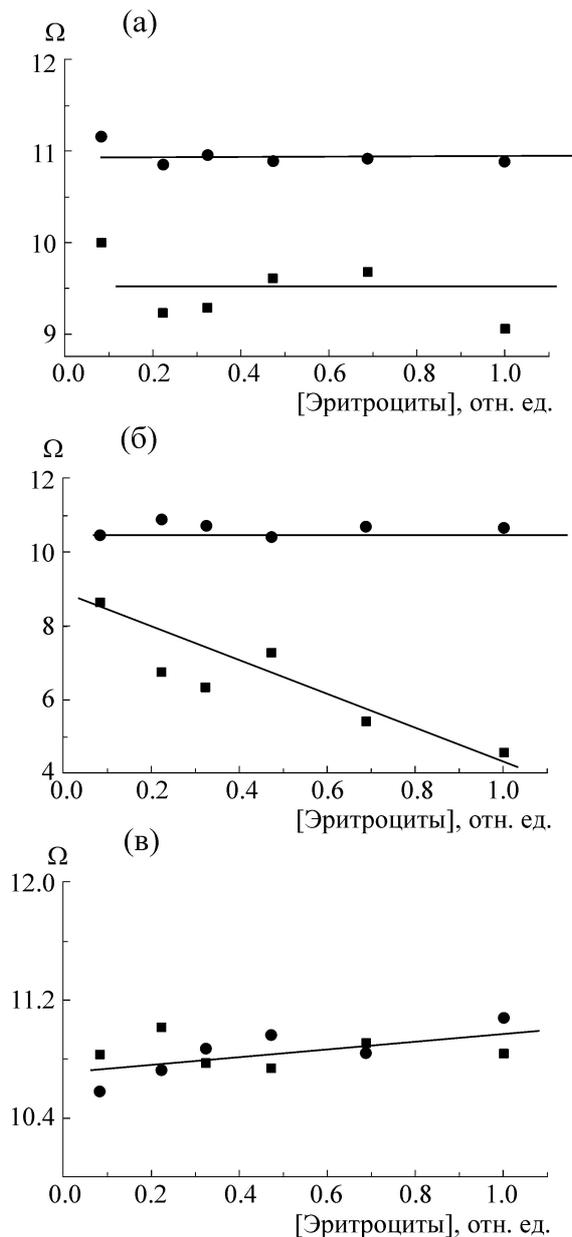
**Природа изменения спектральных параметров полосы  $Sore$  при лизисе.** Коротковолновый сдвиг полосы  $Sore$  при лизисе эритроцитов может быть обусловлен несколькими фактора-



**Рис. 2.** Спектры поглощения образцов эритроцитов из крови петуха (а), морской свинки (б) и гуся (в). Лизирование по второму способу. 1 – Отбор со дна, 2 – отбор с уровня 5 см от дна, 3 – отбор с уровня 9 см от дна. Подробности в тексте.

ми. Далее рассматриваются наиболее вероятные из них.

**Фактор 1. Влияние изменения наклона фона.** Из рис. 1б,в отчетливо видно, что спектры поглощения лизированных образцов эритроцитов, полученных из крови гуся и петуха, относительно исходных, имеют разный угол наклона фона (отношение величин оптической плотности на  $\lambda = 300$  нм и  $\lambda = 500$  нм). Следует заметить, что изменение наклонов в спектрах поглощения для лизированных относительно исходных образцов эритроцитов петуха и гуся разнонаправленны: угол наклона в спектре поглощения эритроцитов петуха уменьшается, а



**Рис. 3.** Концентрационные зависимости параметра  $\Omega$ . Образцы эритроцитов петуха (а), гуся (б) и морской свинки (в). Квадраты – исходные образцы эритроцитов, кружки – лизированные образцы эритроцитов.

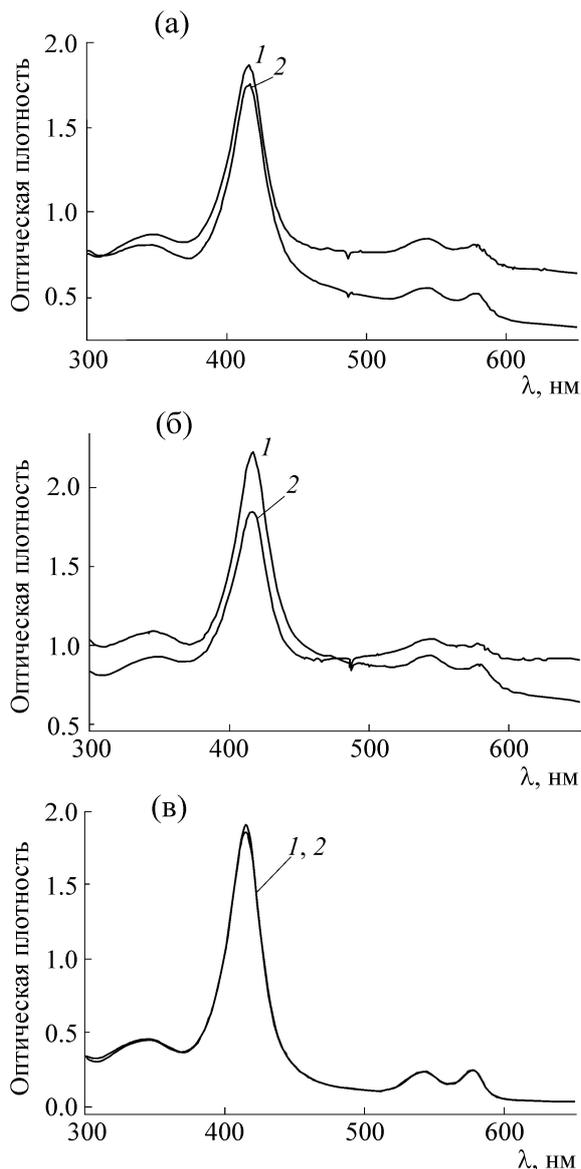
в спектре поглощения эритроцитов гуся угол наклона растет. Эти изменения угла наклона фона связаны с изменением интенсивности светорассеяния, которая определяется размером и концентрацией частиц, находящихся в образце. Очевидно, что уменьшение величины угла наклона фона для лизированных образцов эритроцитов петуха заведомо не может обуславливать наблюдаемый коротковолновый сдвиг полосы Сорэ, а может приводить только к длин-

новолновому сдвигу. Для спектров поглощения гуся наблюдается слабый рост угла наклона, что в принципе может приводить к коротковолновому сдвигу полосы поглощения. Для проверки этого предположения мы провели моделирование наблюдаемого спектра поглощения эритроцитов гуся при различных величинах угла наклона фона. В качестве модельного спектра использовали распределение Гаусса (полуширина 17 нм, положение максимума 515 нм), а в качестве фона использовали линейную функцию  $OD = a\lambda + OD_0$ ,  $a < 0$ ,  $OD_0 = 0,2$ . Результаты моделирования показали, что для получения коротковолнового сдвига на 1 нм тангенс угла наклона фона должен увеличиваться приблизительно в 15 раз относительно того, который экспериментально наблюдается. Дополнительными аргументами в пользу того, что коротковолновый сдвиг максимума полосы Сорэ при лизисе не определяется изменением угла наклона фона, являются следующие.

1. Результаты по наблюдению положения максимума полосы Сорэ в зависимости от концентрации раствора для эритроцитов петуха показали, что при разбавлении исходного раствора эритроцитов более чем в 50 раз, несмотря на уменьшение величины исходного фона (практически до полного его исчезновения), положение максимума полосы Сорэ в пределах погрешности измерения (0,2 нм) не изменяется.

2. Специальные эксперименты по наблюдению спектров поглощения одних и тех же эритроцитов в разных средах (растворах NaCl и буфер трис-HCl), но имеющих разный фон (рис. 4), показали, что положение максимумов спектров полос Сорэ поглощения в пределах экспериментальной погрешности не зависит от наклона фона. Таким образом, изменением угла наклона фона как одним из возможных факторов коротковолнового сдвига положения максимума полосы Сорэ при лизисе эритроцитов петуха и гуся можно пренебречь.

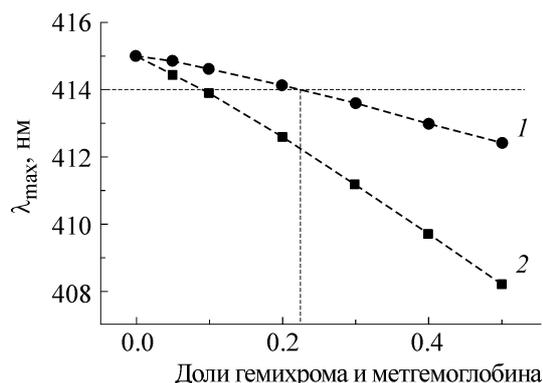
*Фактор 2. Влияние ядра.* Как уже указывалось во введении, изменение положения максимума полосы поглощения чувствительно к изменению величины межмолекулярного взаимодействия гема с окружением. Таким образом, из полученных данных по изменению положения максимума полосы Сорэ при лизисе клеток, имеющих ядро (эритроциты гуся и петуха), казалось бы, можно сделать заключение, что окружение гема изменяется в результате уменьшения взаимодействия молекулы HbO<sub>2</sub> с ядром. Напротив, при лизисе эритроцитов морской свинки, которые не имеют ядра, окружение гема не претерпевает изменений. Однако в работе [6] было показано, что при лизисе эритроцитов из крови крыс (ядро в клетке отсут-



**Рис. 4.** Спектры поглощения образцов эритроцитов из крови петуха (а), гуся (б) и морской свинки (в) в физиологическом растворе NaCl (1) и в трис-HCl-буфере (2).

стует) полоса Сорре также претерпевает сдвиг в коротковолновую часть спектра. Это означает, что наличие ядра в клетке не является причиной коротковолнового сдвига полосы Сорре при лизисе.

**Фактор 3 (химический).** При лизисе эритроцитов в молекуле оксигемоглобина может иметь место окисление иона  $Fe^{2+}$  до иона  $Fe^{3+}$ . В результате этой реакции образуется молекула метгемоглобина [1,4,16]. Максимум полосы Сорре для этой молекулы находится в более коротковолновой области [18], и, соответственно, образование метгемоглобина при лизисе должно сопровождаться сдвигом положения макси-



**Рис. 5.** Рассчитанные зависимости положения максимумов полосы Сорре от доли гемихрома (1) и метгемоглобина (2).

мума этой полосы поглощения в коротковолновую область. Однако прямым спектроскопическим свидетельством в пользу того, что сдвиг полосы Сорре не может объясняться появлением метгемоглобина при лизисе, является сохранение формы контура спектра поглощения на  $\lambda \sim 545$  нм и на  $\lambda \sim 580$  нм, которая должна была исказиться при появлении заметных количеств метгемоглобина, в спектре поглощения которого эти полосы отсутствуют [18]. Как следствие этого положения, а также аргументом в пользу отсутствия вклада химического фактора в сдвиг полосы Сорре при лизисе эритроцитов является различие в величинах  $\Omega$  (рис. 3) для  $HbO_2$  и метгемоглобина. Действительно, значения  $\Omega$  для образцов лизированных эритроцитов гуся и петуха около 10, а величина  $\Omega$  для спектра поглощения метгемоглобина по данным [18] составляет примерно 25, т.е. значительно выше. Наконец, прямое моделирование экспериментального спектра поглощения полосы Сорре с известными спектральными параметрами молекулы метгемоглобина также подтверждает положение о том, что сдвиг полосы Сорре не может быть объяснен с помощью образования метгемоглобина (рис. 5б). Как следует из рис. 5б, для наблюдения сдвига полосы Сорре даже на 1 нм доля метгемоглобина в эритроците относительно доли оксигемоглобина должна составлять около 0,1. Эта величина значительно выше стандартных значений *in vivo*, которые не превышают 0,01 [19], а сведения о доли метгемоглобина *in vitro* в настоящее время отсутствуют.

Другим химическим фактором, который мог бы обуславливать коротковолновой сдвиг полосы Сорре при лизисе, является образование молекулы гемихрома (стабильное производное гемоглобина), который мог бы образоваться в результате лизиса эритроцитов [20]. Спектр по-

глошения полосы *Soret* этой молекулы имеет максимум в более коротковолновой области, и качественно образование этой новой компоненты должно приводить к коротковолновому сдвигу спектра поглощения. Однако количественная оценка возможного влияния образования гемихрома показала, что оно практически отсутствует: так, для коротковолнового сдвига в 1 нм доля гемихрома должна превышать величину 0,2 (см. рис. 5а), что практически не реально [10,11]. Наконец, прямым спектроскопическим свидетельством в пользу того, что при лизисе сдвига полосы *Soret* не может объясняться образованием метгемоглобина, является сохранение формы дублета на  $\lambda \sim 545$  нм и на  $\lambda \sim 580$  нм. Форма контура полосы поглощения должна искажаться при появлении заметных количеств гемихрома, у которого этот дублет отсутствует [20].

*Фактор 4. Изменение диэлектрической проницаемости.* Как уже указывалось ранее, величины диэлектрической проницаемости внутри и снаружи эритроцита различаются (в плазме крови величина  $\epsilon = 65$ , а в эритроците  $\epsilon = 47$  [16]). Для полос поглощения, обусловленных переходом  $\pi \rightarrow \pi^*$ , при увеличении полярности среды имеет место длинноволновый сдвиг [12, 15]. В связи с этим, поскольку при лизисе происходит выход молекулы  $\text{HbO}_2$  из клетки в плазму (т.е. переход в более полярную среду), то для полосы *Soret* должен наблюдаться длинноволновый сдвиг. Однако при лизировании образцов эритроцитов экспериментально наблюдается коротковолновый сдвиг полосы *Soret* (для эритроцитов гуся и петуха) и постоянство положения максимума для эритроцитов морской свинки. Эти результаты означают, что наличие длинноволнового сдвига полосы *Soret* не определяется возрастанием величины  $\epsilon$  при лизисе клеток.

*Фактор 5 (структурный).* Гипотеза, с помощью которой можно попытаться объяснить коротковолновые сдвиги полосы *Soret* при лизисе эритроцитов, может состоять в том, что они обусловлены уменьшением количества мембранно-связанного оксигемоглобина. Как уже указывалось во введении, приблизительно до 10% гемоглобина эритроцитов может быть связано с мембраной [8–11], т.е. имеет место комплекс « $\text{HbO}_2$  – внутренняя поверхность». В зависимости от места взаимодействия константы связывания могут различаться в 100 раз. При лизисе молекулы мембранно-связанного гемоглобина могут стать свободными, поскольку комплекс « $\text{HbO}_2$  – внутренняя поверхность мембраны» в зависимости от величины константы связывания частично (или полностью) распадается. Диссоциация комплекса может приводить

к деформации полипептидного скелета гемоглобина. Соответственно, эта деформация может способствовать изменению структуры гидрофобного кармана и изменению взаимодействия «гем – белок», что, в свою очередь, непосредственно будет влиять на параметры спектров поглощения молекулы  $\text{HbO}_2$ . Таким образом, величина сдвига полосы *Soret* при лизисе будет зависеть от изменения величины конкретного взаимодействия « $\text{HbO}_2$  – внутренняя поверхность мембраны» и, соответственно, от начальной доли оксигемоглобина в примембранных областях. Как уже указывалось ранее, доля закомплексованных (мембранно-связанных) молекул оксигемоглобина составляет около 10%. Поскольку полосы *Soret* порфириноподобных молекул при образовании комплексов с белками претерпевают длинноволновый сдвиг до 20 нм, то соответственно при разрушении комплексов, в состав которых входит 10% молекул гемоглобина, можно ожидать коротковолновый сдвиг полосы *Soret* до 2 нм. Приблизительно такая величина сдвига полосы *Soret* наблюдается экспериментально. Таким образом, количественная оценка величины сдвига положения максимума полосы *Soret* не противоречит структурной гипотезе.

В рамках структурной гипотезы наибольший сдвиг максимума полосы *Soret* в спектре поглощения эритроцитов гуся при лизисе может означать наибольшее взаимодействие молекул оксигемоглобина с белками мембраны (максимальная константа образования комплекса). Отсутствие изменений спектральных параметров ( $\Delta\lambda_{\text{max}}$ ,  $\Delta OD$ ,  $\Omega$ ) в спектре поглощения  $\text{HbO}_2$  при гемолизе эритроцитов морской свинки может означать, что взаимодействие молекул оксигемоглобина с белками мембраны минимально. В связи с этим структурные изменения молекул  $\text{HbO}_2$  при лизисе не происходят. В результате при лизисе структура гидрофобного кармана и положение гема относительно белковой части не меняются и поэтому заметные изменения в параметрах спектра отсутствуют. Таким образом, в рамках предлагаемой гипотезы суть различия сдвигов полос *Soret* при лизисе эритроцитов для разных животных заключается в различии эффективности взаимодействия молекулы  $\text{HbO}_2$  с внутренней поверхностью мембраны. Эта эффективность зависит от вида внутриповерхностных сайтов цитоскелета, с которыми может связываться молекула оксигемоглобина, что представляется естественным, поскольку эритроциты разных животных имеют различный цитоскелет, молекулы которого могут образовывать комплекс « $\text{HbO}_2$  – внутренняя поверхность мембраны».

Также аргументом в пользу структурной гипотезы является факт изменения величины  $\Omega$  в спектрах лизированных образцов эритроцитов. Действительно, при изменении энергии связи «железо (в геме) – азот (в белке)» при лизисе возможно изменение состояния электронных орбиталей, что может обуславливать различное изменение вероятностей перехода в полосе  $Sore$  (415 нм) и в  $\beta$ -полосе поглощения (545 нм). Это различие, соответственно, должно приводить к изменению величины  $\Omega$ , что наблюдается экспериментально.

Параметры спектра полосы  $Sore$  определяются электронными переходами  $\pi$ – $\pi^*$  между орбиталями молекулы порфирина [2,3]. Соответственно, для интерпретации коротковолнового сдвига полосы  $Sore$  при лизисе необходима количественная информация о зависимости изменения энергии электронных уровней, обуславливающих спектр поглощения, от изменения энергии связи «гем – белок» и от изменения энергии связи « $HbO_2$  – внутренняя поверхность мембраны». В настоящее время эти данные отсутствуют. В связи с этим мы ограничиваемся только общим качественным заключением о том, что при лизисе эритроцитов имеет место изменение состояния электронных термов молекул  $HbO_2$ .

Дополнительным осложняющим фактором реальной оценки сдвига полосы  $Sore$  благодаря изменению величины взаимодействия « $HbO_2$  – внутренняя поверхность мембраны» являются затруднения, связанные с корректным учетом влияния изменения диэлектрической проницаемости микроокружения молекулы оксигемоглобина на положение полосы  $Sore$ . Как указывалось в разделе «Фактор 4. Изменение диэлектрической проницаемости», рост величины  $\epsilon$  должен сопровождаться длинноволновым сдвигом полосы  $Sore$ , что, соответственно, должно уменьшать наблюдаемый коротковолновый сдвиг. В связи с этим следует особо заметить, что экспериментально наблюдается суперпозиция как минимум двух процессов, которые разнонаправленно влияют на положение максимумов полосы  $Sore$ .

**Зависимость положения максимума полосы  $Sore$  от вида животного.** В рамках структурной гипотезы непротиворечиво объясняется наблюдаемое несовпадение положения максимумов полос поглощения молекул  $HbO_2$  в эритроцитах, выделенных из крови разных животных. Объяснение заключается в том, что для разных животных имеет место различие констант связывания « $HbO_2$  – внутренняя поверхность мембраны». Различие констант связывания обуславливает разную локальную конфигурацию гидрофобного кармана, где расположен гем. Раз-

личие в локальных конфигурациях белковых карманов для разных животных будет способствовать различию энергии взаимодействия «гем – белок», что в конечном счете может привести к разным положениям полос поглощения. Таким образом, если принять, что положение максимума полосы  $Sore$  частично определяется эффективностью связывания (взаимодействия)  $HbO_2$  с внутренней поверхностью мембраны эритроцитов, то оно может служить мерой этого взаимодействия. Как уже указывалось ранее, природа полос имеет природу перехода  $\pi \rightarrow \pi^*$  и, следовательно, большее взаимодействие будет способствовать более длинноволновому сдвигу [12]. Основываясь на этом положении можно сделать вывод, что наибольшее взаимодействие с внутренней поверхностью мембраны эритроцита претерпевают молекулы оксигемоглобина в эритроцитах гуся (наибольшая длина волны), а наименьшее в эритроцитах морской свинки (наименьшая длина волны). Аналогичный вывод об относительной эффективности взаимодействия « $HbO_2$  – внутренняя поверхность мембраны» в эритроцитах для разных животных был сделан ранее из анализа сдвига полосы  $Sore$  при лизисе эритроцитов. Таким образом, в рамках единого представления о наличии комплексообразования «молекула  $HbO_2$  – внутренняя поверхность мембраны» можно объяснить как различие в коротковолновых сдвигах максимума полосы  $Sore$  при лизисе эритроцитов, так и различие в абсолютных величинах положения максимумов полосы  $Sore$ .

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментально установлено, что положения максимумов полос  $Sore$  для лизированных образцов из крови петуха и гуся относительно исходных смещаются в коротковолновую область спектра. Сдвиг максимума полосы  $Sore$  для эритроцитов морской свинки не наблюдается.

2. При интерпретации коротковолнового сдвига полосы  $Sore$  при лизисе эритроцитов рассмотрено несколько факторов, которые могли бы обуславливать этот эффект: наличие фона в спектре поглощения и изменение его угла наклона, наличие ядра в эритроците, возможность образования метгемоглобина и гемихрома. Показано, что все эти факторы малы и их можно не учитывать при интерпретации сдвигов полосы  $Sore$ .

3. Для объяснения коротковолнового сдвига полосы  $Sore$  при гемолизе эритроцитов предложена гипотеза, согласно которой сдвиг обусловлен образованием свободных молекул

HbO<sub>2</sub> при диссоциации комплекса «HbO<sub>2</sub> – внутренняя поверхность мембраны». В рамках этой гипотезы с единых позиций непротиворечиво объясняются как различие в коротковолновых сдвигах при лизисе эритроцитов, так и различие в положении максимумов полосы Соре для разных животных. Обращается внимание на то, что коротковолновые сдвиги при лизисе имеют место даже при возрастании величины диэлектрической постоянной, которое должно способствовать длинноволновому сдвигу полосы Соре.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Блюменфельд, Соросовский образоват. журн., № 4, 33 (1998).
2. К. Н. Соловьев, Л. Л. Гладков, А. С. Старухин и др. *Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния* (Наука и техника, Минск, 1985).
3. *Порфирины: спектроскопия, электрохимия, применение*, под ред. Т. Н. Сергеевой (Наука, М., 1987).
4. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984).
5. Э. В. Шпольский, Успехи физ. наук **29** (3–4), 221 (1946).
6. Н. Л. Векшин, М. С. Фролова, В. И. Ковалев и др., *Биофизика* **60** (1), 129 (2015).
7. Г. А. Алексеев и Г. Б. Берлинер, *Гемоглобинури* (Медицина, М., 1972).
8. N. Shaklai, J. Yguerabide, and H. M. Ranney, *Biochemistry* **16** (25), 5593 (1977).
9. J. A. Walder, R. Chatterjee, T. L. Steck, et al., *J. Biol. Chem.* **259** (16), 10238 (1984).
10. K. Schluter and D. Drenckhahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6137 (1986).
11. P. Datta, S. Chakrabarty, A. Chakrabarty, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1 (2008).
12. С. Паркер, *Фотолуминесценция растворов* (Мир, М., 1972).
13. R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, and J. J. Villafranca, *Biochemistry* **22** (10), 2406 (1983).
14. Г. В. Головина, Автореферат дис. ... канд. хим. наук (Москва, 2014).
15. J. R. Lakovicz, *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer, 2006).
16. Т. А. Шаталова, А. В. Адельянов, О. А. Горобченко и др., *Физика живого* **20** (1), 50 (2012).
17. В. Н. Никитин, *Атлас клеток крови сельскохозяйственных и лабораторных животных* (Гос. изд-во с.-х. лит-ры, М., 1949).
18. Г. М. Андреюк и М. А. Кисель, *Биоорганическая химия* **23** (4), 290 (1997).
19. Я. Кольман и К.-Г. Рём, *Наглядная биохимия* (Бином. Лаборатория знаний, М., 2011), 4-е издание.
20. *Методические рекомендации. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализов крови* (утв. Минздрав. соц. развития РФ 21.03.2007 N 2050-ПХ).

## The Effect of Erythrocyte Lysis in Some Animals on the Absorption Spectra of Oxyhemoglobin

N.L. Lavrik\* and T.N. Il'icheva\*\*

\*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Novosibirsk, 630090 Russia

\*\*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

The absorption spectra of lysed and nonlysed erythrocytes isolated from rooster, goose and guinea pig were studied. It has been established that the position of the Soret band maximum for the lysed red blood cells from rooster and goose in comparison with that for nonlysed erythrocytes shifted to the short-wave region of the spectrum. As to red blood cells from guinea pigs, the band shift was not observed. When interpreting short-wavelength shift of the Soret band, the following factors that may lead to this effect have been considered: a physical factor (variation in the angle of the spectral slope of absorption background, the presence of a nucleus in the red blood cell, the change in dielectric constant) and a chemical factor (the possibility of methemoglobin and hemichrome formation). It has been shown that the contribution of these factors to the short wavelength shift is small and, therefore, it is possible to ignore these factors when interpreting the Soret band shift. To explain the observed effect, we have developed the hypothesis according to which short-wavelength shift occurs due to the formation of free molecules of oxyhemoglobin in the dissociation of the "oxyhemoglobin – the inner surface of the erythrocyte membrane" complex. Using this hypothesis, differences in the positions of Soret band maxima for different animals are explained consistently.

*Keywords: red blood cells from rooster, goose, guinea pig blood, oxyhemoglobin, lysis, absorption spectra*