

ЭФФЕКТЫ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА В ЦИТОПЛАЗМЕ ЭРИТРОЦИТА

© 2025 г. О.В. Слатинская*, Е.Ю. Паршина*, А.И. Юсипович*, Н.А. Браже*,
А.Б. Рубин*, Г.В. Максимов*, **, #

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
Ленинский просп., 4/1, Москва, 119049, Россия

#E-mail: gmaksimov@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2024 г.

После доработки 16.10.2024 г.

Принята к публикации 06.11.2024 г.

С помощью методов спектроскопии комбинационного рассеяния, флуоресцентной спектроскопии и метода время-коррелированного счета фотонов установлено, что повышение температуры среды инкубации эритроцитов человека вызывает увеличение гомогенности распределения гемоглобина в цитоплазме эритроцитов и снижение плотности упаковки молекулы глобина, что, по всей видимости, является результатом влияния эффекта «макромолекулярного краудинга» клетки. Выявленные изменения конформации характерны только для гемоглобина в клетке и не зависят от изменений поверхностного потенциала плазматической мембранны. Предполагается наличие нескольких пуллов молекул гемоглобина, отличающихся между собой по структуре и динамике белковой глобулы, формирующих гетерогенное распределение гемоглобина внутри эритроцита за счет соединения молекул гемоглобина в кластеры. Обсуждается возможность участия данных эффектов в сигнально-регуляторной функции переноса и транспорта кислорода.

Ключевые слова: гемоглобин, эритроцит, комбинационное рассеяние, краудинг.

DOI: 10.31857/S0006302925020098, **EDN:** KZDUNE

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию явления «молекулярного краудинга» (недоступность внутриклеточного объема, занятого определенными макромолекулами (агентами краудинга) для других молекул), которое оказывает значительное влияние на распределение и работу белков внутри клетки. Этот процесс является причиной того, что ферментативные и метаболические процессы, конформационные изменения и процессы сворачивания белковой глобулы, агрегация молекул и их способность формировать комплексы в клетке могут существенно отличаться от этих процессов вне клетки [1, 2]. Особенную важную роль «молекулярный краудинг» может выполнять при функционировании эритроцитов млекопитающих, где содержание гемоглобина достигает 350 г/л и общее содержание белков в среднем выше, чем в других эукариотических клетках [1].

Сокращения: Гб – гемоглобин, КР – комбинационное рассеяние.

За последние годы представления о механизмах функционирования внутриклеточного гемоглобина (Гб) существенно расширились. Широко обсуждается роль мембраносвязанного гемоглобина и белков мембранны в процессах транспорта кислорода [3], особенности конформационных изменений молекулы гемоглобина в функционирующем эритроците [4, 5], влияние на регуляцию метаболизма и газотранспортные функции модификации сульфидильных групп гемоглобина [6].

Особый интерес представляет исследование влияния температуры окружающей среды на свойства эритроцитов, которая может варьировать, как при движении крови от центральных органов к периферии тела, так и при патологических состояниях (переохлаждении или гипертермии). Известно, что температура оказывает непосредственное влияние на способность эритроцитов проникать через капилляры, что связано, по-видимому, со взаимодействием между молекулами Гб, находящимися внутри клетки в высокой концентрации [7]. Коэффициент диф-

фузии Гб в эритроците существенно меньше, чем в разбавленном растворе, и зависимость этих величин от температуры различна [8, 9]. Увеличение температуры приводит к изменению динамики периферических цепей аминокислот в составе Гб и способствует формированию гидрофобной поверхности глобулы, способствующей агрегации молекул внутри клетки [9].

Таким образом, есть все основания предполагать, что изменение температуры оказывает существенное влияние на эффекты «молекулярного краудинга» эритроцитов. Изменения состояния цитоплазмы, кооперативные фазовые переходы белков, их олигомеризация в нативных условиях клетки и взаимодействие с мембраной и цитоскелетом являются основными факторами, обуславливающими адаптационные возможности эритроцитов млекопитающих [10, 11]. В связи с этим целью настоящей работы было исследование изменений конформации и распределения Гб в зависимости от температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение эритроцитов. В работе использовали суспензию эритроцитов, выделенную из венозной крови доноров (предоставлена НМИЦ кардиологии имени академика А.Е. Чазова).

Кровь хранили при 4°C в течение не более 6 ч, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Для выделения суспензии эритроцитов использовали фосфатный буфер Аллена (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 5 mM глюкозы, pH 7.4). К цельной крови добавляли буфер Аллена в соотношении 1 : 3, перемешивали и отмывали эритроциты от плазмы трехкратным центрифугированием при 1500 g в течении 5 мин при 4°C (центрифуга Laborfuge 400R, ThermoScientific, США). Полученную суспензию эритроцитов хранили при 4°C не более 3 ч.

Выделение гемоглобина. Для выделения гемоглобина суспензию эритроцитов разбавляли в соотношении 1 : 10 фосфатным буфером для гемолиза (10 mM PBS, pH 7.4), после чего раствор перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R) в течении 10 мин при 4°C и 6000 g для осаждения мембран эритроцитов.

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Регистрацию спектров комбинационного рассеяния (КР) гемоглобина проводили с помощью конфокального микроскопа-спектрометра NTEGRASPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига 1000–3200 см⁻¹ с шагом измерения 1 см⁻¹, охлаждение CCD камеры – 60°C, объектив 5× (Olympus, NA = 0.15), мощность лазера на образце – менее 3 мВт, длина волн

ны возбуждения – 532 нм, время регистрации одного спектра – 15–30 с при трехкратном накоплении сигнала. Для регистрации сигнала, суспензию эритроцитов или раствор гемоглобина помещали в гематокритный капилляр, каждое измерение проводили не менее пяти раз.

Для анализа полученных КР-спектров использовали соотношение интенсивностей абсолютных величин пиков КР-спектра гемоглобина:

– I_{1580}/I_{1375} – изменение отношения вклада асимметричных колебаний метиновых мостиков в составе порфиринового цикла к вкладу симметричных колебаний пиррольных колец. Снижение величины параметра характеризует увеличение вероятности нахождения гема в куполообразной конформации [12];

– I_{2880}/I_{2930} – изменение отношения вклада несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот по отношению к симметричным колебаниям концевых метильных радикалов аминокислот. В ряде работ было показано, что увеличение температуры сопровождается уменьшением амплитуды полосы 2880 см⁻¹ и ростом амплитуды полосы 2930 см⁻¹ [13, 14]. Данный параметр использовали для оценки взаимодействия мембранных белков с липидным окружением [13], при этом увеличение интенсивности полосы 2930 интерпретировали как экспонирование гидрофобных участков белка в полярную среду. В связи с этим мы предполагаем, что отношение I_{2880}/I_{2930} может быть использовано для оценки упорядоченного пространственного расположения отдельных участков полипептидной цепи и пропорционально плотности упаковки белковой глобулы.

Определение поверхностного заряда. В качестве маркера изменения поверхностного заряда плазматической мембранны эритроцита использовали ζ -потенциал. Его рассчитывали из экспериментально определяемой подвижности эритроцитов, используя уравнение Смолуховского [15]. Изменения ζ -потенциала проводили в разбавленной суспензии эритроцитов (0.04% гематокрита) в капиллярной поликарбонатной U-образной кювете DTS1070 (Malvern, Великобритания) с золотыми электродами, помещенной в терmostатируемую ячейку анализатора размеров частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в комплекте с прибором Zetasizer Nano ZS, и MS Excel.

В рамках теории Гуи–Чепмена–Штерна принимается, что ζ -потенциал равен поверхностному потенциалу мембранны ϕ_S (на некотором расстоянии – так называемой плоскости скольжения) и связан формулой $\phi = \phi_S e^{-kx}$, где $1/k$ – дебаевская длина.

Плоскость скольжения эритроцита соответствует плоскости скольжения липидных мембран и составляет 2 \AA . Согласно теории Гуи–Чепмена–Штерна, поверхностный потенциал связан с поверхностным зарядом σ_s выражением

$$\sigma_s = -\sqrt{8\epsilon\epsilon_0 kT} sh\left(\frac{ze\Phi_0}{2kT}\right) (\epsilon, \epsilon_0, k, e – константы, c_0 – концентрация у поверхности, T – температура, z – заряд). Таким образом, можно считать, что ζ -потенциал является маркером поверхностного заряда на мембране.$$

Собственная флуоресценция гемоглобина. Регистрацию спектров флуоресценции проводили с использованием спектрометра Flame UV/VIS (Ocean Insight, США). Изменение состояния гемоглобина Гб оценивали по изменению положения максимума интенсивности триптофановой флуоресценции. Изменение однородности молекул Гб в цитоплазме эритроцита оценивали по изменению показателя полуширины пика на его полувысоте (показатель FWHM). Измерения проводили в разбавленной суспензии эритроцитов (0.04% гематокрита) в термостатируемой ячейке (при 20, 36 и 38°C), время регистрации сигнала — 100 с. Флуоресценцию образцов регистрировали в диапазоне 180–800 нм, возбуждая флуоресценцию триптофанов импульсным субнаносекундным УФ–светодиодом (EPLED 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм; Chroma, США).

Кинетика затухания флуоресценции. Был использован метод времени-коррелированного счета фотонов (Time Correlated Single Photon Counting — TCSPC). Флуоресценцию возбуждали импульсным УФ–светодиодом (EPLED 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм; Chroma, США), выдающим импульсы длительностью 700 пс со средней мощностью 0.6 мкВт при частоте повторения 20 МГц. Регистрацию сигнала флуоресценции (в диапазоне 300–400 нм, с максимумом при 340 нм) осуществляли через коллимационную линзу спектрографа (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия), оснащенного детектором PML-16-C и решеткой 1200 штр/мм и имеющим разрешение 6.25 нм. Измерения проводили в режиме FIFO, регистрируя поток фотонов в программном обеспечении для измерений SPCM 9.82 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Регистрацию потока ~106 фотонов проводили в течение 10 с. В эксперименте использовали разбавленную суспензию эритроцитов (0.04% гематокрита) в термостатирующющей ячейке ($20, 36, 38^\circ\text{C}$). Изменения интенсивности, времени жизни и спектра флуоресценции обраба-

тывали с помощью пакета программ SPCImage 8.0 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Кривую затухания пикосекундной флуоресценции триптофана аппроксимировали суммой двух экспонент:

$$F(t) = A_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}}, \quad (1)$$

где A_i — амплитуды, τ_i — постоянное время [16]. Разложение считали удовлетворительным при построении аппроксимационной кривой при распределении $\chi^2 = [0.88–1.11]$, что соответствует величине p -критерия = [0.90–0.80].

Статистический анализ. Выявление статистической значимости наблюдаемых различий между результатами проводили с использованием теста Краскела–Уоллиса с апостериорным критерием Данна. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Все эксперименты проводили не менее шести раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние температуры на структуру гема и глобина гемоглобина эритроцитов было исследовано методом КР. Установлено, что увеличение температуры среды инкубации клеток от 20 до 38°C не влияет на вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации (величина соотношения интенсивностей полос КР-спектра I_{1580}/I_{1375} не меняется с увеличением температуры), но приводит к снижению плотности упаковки глобина Гб (снижение величины соотношения интенсивностей полос КР-спектра I_{2880}/I_{2930}) (рис. 1). Отметим, что у выделенного Гб изменения конформации не наблюдаются (рис. 1). Методом регистрации ζ -потенциала нами показано, что повышение температуры вызывает снижение потенциала с -15.3 ± 0.2 мВ (при 20°C) до -15.6 ± 0.2 мВ (при 38°C) на поверхности мембраны целых эритроцитов в суспензии.

Ранее мы показали, что десорбция ионов кальция с поверхности мембранны приводит к увеличению потенциала на поверхности эритроцитов, а блокирование Na^+/K^+ -АТФазы приводит к увеличению мембранного потенциала и содержания ионов натрия внутри клетки [17, 18]. В данной работе доказано, что увеличение температуры может вызывать некоторое увеличение отрицательного заряда на поверхности клеток, вероятно, в результате отщепления от отрицательно заряженных групп сиаловых кислот гликокаликса и отрицательно заряженных головок фосфолипидов различных органических и неорганических катионов, которые экранируют отрицательный заряд. Надо заметить, что этот эффект имеет небольшую амплитуду.

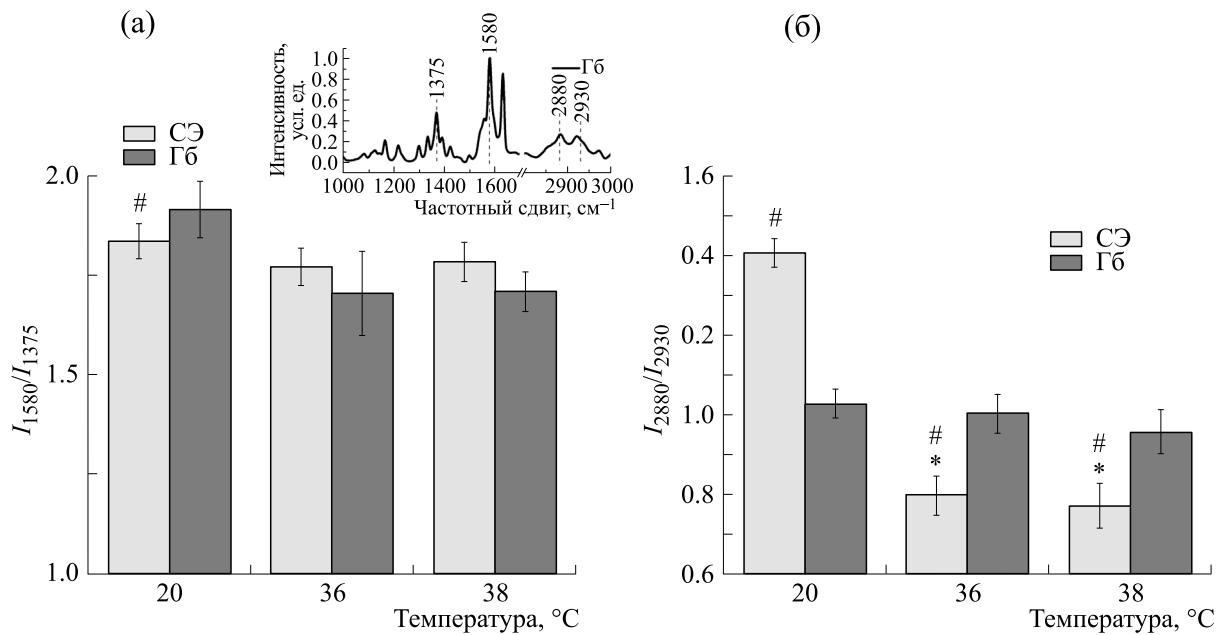


Рис. 1. Изменение соотношения интенсивностей пиков КР-спектра гема (а) и глобина (б) для Гб в клетке (сусpenзии эритроцитов) и выделенном Гб при температурах 20, 36 и 38°C: * – статистически значимые различия между пробами при заданной температуре от его значения при 20°C; # – статистически значимые различия проб, содержащих эритроциты, от проб, содержащих гемоглобин, при одинаковой температуре ($p \leq 0.05$). На врезке представлен спектр КР гемоглобина.

Известно, что изменение флуоресценции триптофанов в составе глобина может служить индикатором формирования новых конформационных состояний в белковой глобуле. Так, остатки триптофана (Trp) в гидрофобном окружении имеют максимум флуоресценции в области 320–335 нм, а в гидрофильном окружении или будучи экспонированными во внешнюю среду – 340–360 нм [24]. Тетramer гемоглобина содержит шесть остатков Trp, причем остаток в β-субъединице ($\beta\text{Trp}37$), расположенный на поверхности контакта α- и β-субъединиц ($\alpha_1\beta_2$), считается основным аминокислотным остатком, вносящим вклад в собственную флуоресценцию Гб (рис. 2) [19, 20]. В соответствии с данными ра-

боты [21] можно предположить, что $\beta\text{Trp}37$ по сумме расстояний является наиболее близко расположенным к гемам. Расположение $\beta\text{Trp}37$ на поверхности ($\alpha_1\beta_2$) указывает на то, что он участвует в гидрофобном взаимодействии между субъединицами Гб [22, 23].

В данной работе мы обнаружили, что при увеличении температуры от 20 до 38°C наблюдается смещение положений максимумов спектров триптофановой флуоресценции внутриклеточного Гб с 337.3 ± 1.6 нм до 335.1 ± 1.4 нм (рис. 3), а также снижение величины полуширины пика флуоресценции на его полувысоте (FWHM) (табл. 1, рис. 3). Кроме того, доказано, что при

Таблица 1. Параметры спектров флуоресценции триптофанов гемоглобина озина

| t, °C | Сусpenзия эритроцитов | | | | | Выделенный гемоглобин | | | | |
|----------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| | λ_{\max} , нм | FWHM, нм | τ_{fl} , пс | τ_1 , пс | τ_2 , пс | λ_{\max} , нм | FWHM, нм | τ_{fl} , пс | τ_1 , пс | τ_2 , пс |
| 20 | 337.3 ± 1.6 | 49.97 ± 0.8 | 129.2 ± 23.5 | 44.9 ± 15.9 | 358.0 ± 142.8 | 339.8 ± 0.4 | 50.2 ± 0.8 | 307.9 ± 1.9 | 81.8 ± 27.7 | 674.4 ± 255.0 |
| 36 | 336.1 ± 1.6 | $45.62 \pm 0.9^*$ | $226.4 \pm 5.0^*$ | $92.5 \pm 3.5^*$ | 771.9 ± 2.8 | 340.1 ± 2.7 | 51.08 ± 1.3 | 301.8 ± 1.4 | 111.0 ± 1.3 | 840.4 ± 21.8 |
| 38 | $335.1 \pm 1.6^*$ | $45.63 \pm 0.4^*$ | $225.2 \pm 1.6^*$ | $86.5 \pm 1.0^*$ | 723.1 ± 6.2 | 340.3 ± 1.6 | 50.6 ± 0.9 | 263.8 ± 17.2 | 106.5 ± 1.8 | 706.1 ± 67.8 |

Примечание. λ_{\max} – положение максимума пика, FWHM – полуширина пика на полувысоте, τ_{fl} – среднее время жизни триптофановой флуоресценции τ_1 , τ_2 – характерные времена быстрой и медленной компонент затухания флуоресценции; * – отличия от значений при 20°C, $p \leq 0.05$.

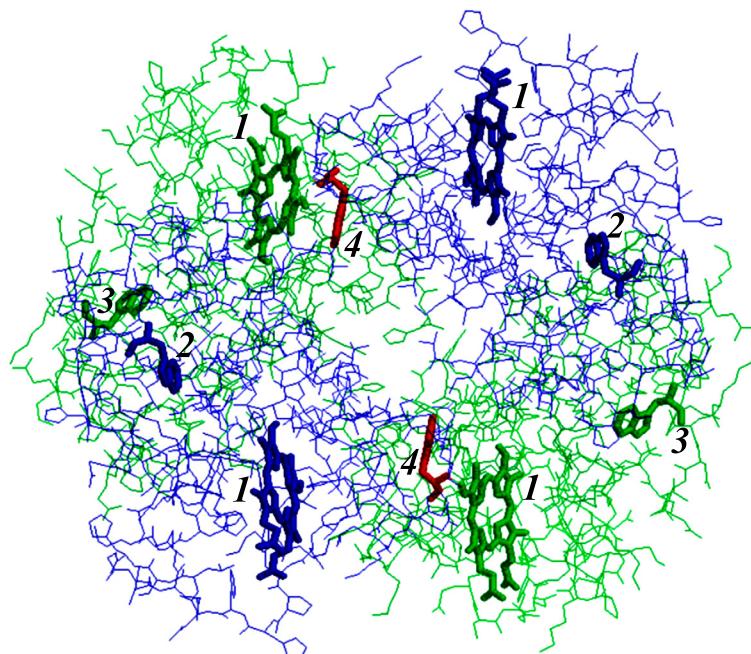


Рис. 2. Схема строения гемоглобина человека. На рисунке α -субъединицы гемоглобина показаны синим цветом и β -субъединицы — зеленым; 1 — гем, 2 — α Trp14, 3 — β Trp15, 4 — β Trp37. Для построения рисунка использовалась pdb-структура из работы [25], изображение создано при помощи программы Rasmol 2.7.5.

увеличении температуры уменьшается дополнительное плечо пика в области 350–360 нм (рис. 3). Полученные результаты позволяют предположить, что микроокружение β Trp37 в случае выделенного Гб более гидрофильно (максимум флуоресценции смешен вправо), чем у Гб в клетке, ввиду различной конформации молекул Гб. При повышении температуры наблюдается смещение максимума флуоресценции Гб эритроцитов в область коротких длин волн (рис. 3), что можно интерпретировать как увеличение гидрофобности микроокружения β Trp37. Важно отметить, что в случае выделенного Гб подобные изменения при повышении температуры не наблюдаются, что свидетельствует о влиянии окружения гемоглобина в цитоплазме клетки на его изменения при повышении температуры. Вероятно, смещение максимума в спектре флуоресценции β Trp37 влево свидетельствует о наличии эффекта макромолекулярного краудинга, при котором соседние молекулы в клетке находятся на близком расстоянии и оказывают непосредственное влияние друг на друга. Отметим, что при исследовании выделенного Гб эти эффекты не обнаружены. Увеличение температуры вызывает увеличение подвижности молекул в цитоплазме и вероятности их взаимодействия за счет эффекта краудинга.

Анализ кинетики затухания триптофановой флуоресценции гемоглобина свидетельствует о том, что при всех исследованных температурах

среднее время жизни флуоресценции τ_{fl} Гб в составе эритроцитов меньше, чем для Гб в растворе (табл. 1). Этот факт можно объяснить тушением флуоресценции триптофановых остатков молекулы Гб как за счет изменения микроокружения (например, остатками тирозина), так и гемами той же молекулы Гб или соседних: в цитоплазме клетки взаимодействие между молекулами Гб, сопровождающееся тушением флуоресценции триптофановых остатков, является более вероятным, чем в разбавленном растворе. Увеличение времени жизни флуоресценции при увеличении температуры свидетельствует об уменьшении тушения флуоресценции. Кинетика затухания флуоресценции оптимально аппроксимируется двумя экспонентами с характерными временами τ_1 и τ_2 (табл. 1), что свидетельствует о двух различных процессах тушения флуоресценции и, следовательно, о наличии двух пулов остатков триптофана с различным окружением, которые характерны для эритроцита в нормальных условиях.

Исходя из данных о расстояниях остатков триптофана до гемов в молекуле Гб [21] можно предположить, что быстро затухающая флуоресценция соответствует β Trp37, а более медленная компонента — остаткам α Trp14 и β Trp15, которые суммарно находятся на большем расстоянии от гемов гемоглобина. Однако известно, что вклад α Trp14 и β Trp15 в флуоресценцию гемоглобина существенно меньше, поэтому более вероятно существование двух популяций молекул Гб,

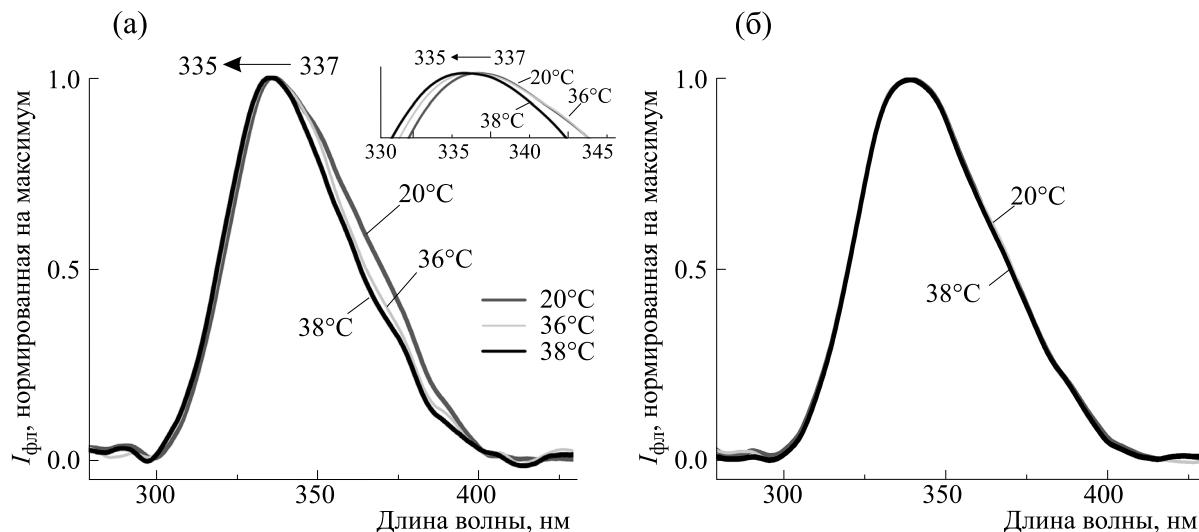


Рис. 3. Спектр флуоресценции триптофановых остатков в суспензии эритроцитов (а) и выделенном Гб (б).

в которых скорость затухания флуоресценции отличается для $\beta\text{TГr}37$ из-за изменения его микроокружения. Такое возможно, если часть молекул Гб находится в неких упорядоченных кластерах, где взаимодействие между молекулами более плотное и вероятность тушения флуоресценции выше. Однако для обоих компонент флуоресценции – быстрой (τ_1) и медленной (τ_2) – характерно увеличение характерного времени при увеличении температуры, следовательно, уменьшение взаимодействия и расстояния между молекулами характерно для обеих популяций молекул гемоглобина.

Изменения температуры являются существенным фактором регуляции функционирования эритроцитов человека, поскольку температура разных органов человека может отличаться на несколько градусов, снижаясь в периферических сосудах, увеличиваясь при воспалении и гипертермии, снижаясь при переохлаждении. Все это может влиять на гемодинамику эритроцитов и перенос газов Гб. Вязкость плазматической мембранны и плотность цитоплазмы могут влиять на реологию клеток и их прохождение через мелкие капилляры [26], а состояние белковой части Гб и его гемовой группы – непосредственно влиять на сродство к кислороду и способность доставлять его в ткани организма. По-видимому, изменения температуры в теле человека могут модифицировать не только непосредственно конформацию Гб, но и распределение Гб в клетке (эффект молекулярного краудинга). Мы исследовали конформацию Гб как в клетке, так и выделенного Гб в разбавленном растворе, для которого эффектом молекулярного краудинга можно пренебречь.

Повышение температуры в диапазоне 20–38°C не вызывало существенных изменений вероятно-

сти существования гема в куполообразной конформации, следовательно, не оказывало непосредственного влияния на сродство к кислороду. Однако при этом снижалась плотность упаковки глобина гемоглобина эритроцитов. Этот факт, вероятно, свидетельствует о снижении эффективности взаимодействия Гб с соседними молекулами Гб и формирование более гомогенной среды внутри клетки. О том же свидетельствует и увеличение времени жизни триптофановой флуоресценции Гб эритроцитов при повышении температуры, что связано с уменьшением эффекта тушения от соседних молекул Гб. Также тушение флуоресценции триптофана возможно вследствие более «тесных» взаимодействий ТГr с микроокружением в молекулах Гб эритроцитов в условия наличия структуры молекулярного краудинга (например, образование комплексов из молекул Гб) [27]. В то же время смещение максимума триптофановой флуоресценции в сторону коротких длин волн может свидетельствовать о формировании более гидрофильного микроокружения остатка триптофана в области контакта субъединиц $\alpha_1\beta_2$. Возможно, увеличение температуры в этом случае сопровождается увеличением вероятности столкновения молекул, их деформаций и локального изменения конформации.

Наличие смещения максимума флуоресценции ТГr в Гб цитоплазмы в коротковолновую область (рис. 3, табл. 1) также может быть обусловлено тем, что при снижении взаимодействия ТГr с микроокружением в белке снижается доля энергии, которая тратится на тепловую диссипацию перед актом испускания кванта флуоресценции [28]. При этом тушение флуоресценции какой-либо ротамерной формы ТГr и связанный с этим многокомпонентный характер кинетики затуха-

ния флуоресценции Trp в белках обычно связывают с дополнительной возможностью дезактивации возбужденного состояния Trp – переносом электрона с возбужденного индольного кольца на амидные группы Trp, либо на электрон-акцепторные боковые связи белка. Изменение τ_{fl} Trp может быть связано с переносом протона с ближайших аминокислот, например, с тирозина на индольное кольцо [27]. Отсутствие изменений в спектрах триптофановой флуоресценции выделенного Гб (рис. 3), может быть связано с более низкой вероятностью взаимодействия макромолекул ввиду большего расстояния между макромолекулами в Гб растворе.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании различных структур, объединяющих молекулы Гб в цитоплазме. Так, помимо пула примембранных гемоглобина (молекулы Гб, связанные в примембранный области с цитоплазматическими доменами белка полосы 3) [5] возможно существование структур молекулярного краудинга. Увеличение температуры в среде инкубации эритроцита модифицирует данную структуру, что, вероятно, связано не с изменением поверхностного заряда плазматической мембранны, а именно с перераспределением цитоплазматического Гб. Аналогичные эффекты, оказывающие влияние на собственную флуоресценцию, изменение спектров поглощения, образование агрегатов молекул Гб и другие, были показаны ранее в работе при инкубации Гб в растворе декстрана, вызывающем эффект макромолекулярного краудинга [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что при увеличении температуры происходит увеличение гомогенности распределения Гб в цитоплазме эритроцита человека и снижение плотности упаковки молекулы глобина, что, по всей видимости, является результатом молекулярного краудинга. Доказано, что выявленные изменения конформации характерны только для Гб в клетке. Предполагается наличие нескольких пулов молекул гемоглобина, отличающихся между собой по структуре и динамике белковой глобулы, формирующих гетерогенное распределение гемоглобина внутри эритроцита за счет соединения молекул Гб в кластеры. Обнаруженные эффекты могут вносить вклад в функционирование эритроцита за счет кластеризации Гб в цитоплазме клетки, что повышает эффективность сигнально-регуляторной функции переноса и транспорта кислорода.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-44-00015 для Б.Н.А. и С.О.В.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с кровью человека проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова». Исследование также одобрено независимым этическим комитетом клинических исследований НМИЦК имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, № 283 от 31.10.2022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ellis R. J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11** (1), 114–119 (2001). DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00172-X
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., and Uversky V. N. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int. J. Mol. Sci.*, **15** (12), 23090–23140 (2014). DOI: 10.3390/ijms151223090
- Luneva O. G., Sidorenko S. V., Ponomarchuk O. O., Tverskoy A. M., Cherkashin A. A., Rodnenkov O. V., Alekseeva N. V., Deev L. I., Maksimov G. V., Grygorczyk R., and Orlov S. N. Deoxygenation affects composition of membrane-bound proteins in human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.*, **39** (1), 81–88 (2016). DOI: 10.1159/000445607
- Dybas J., Bokamper M. J., Marzec K. M., and Mak P. J. Probing the structure-function relationship of hemoglobin in living human red blood cells. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **239**, 118530 (2020). DOI: 10.1016/j.saa.2020.118530
- Nikelshparg E. I., Baizhuanov A. A., Bochkova Z. V., Novikov S. M., Yakubovsky D. I., Arsenin A. V., and Brazhe N. A. Detection of hypertension-induced changes in erythrocytes by SERS nanosensors. *Biosensors*, **12** (1), 32 (2022). DOI: 10.3390/bios12010032
- Kuleshova I. D., Zaripov P. I., Poluektov Y. M., Anashkina A. A., Kaluzhny D. N., Parshina E. Y., Maksimov G. V., Mitkevich V. A., Makarov A. A., and Petrushanko I. Y. Changes in hemoglobin properties in complex with glutathione and after glutathionylation. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (17), 13557 (2023). DOI: 10.3390/ijms241713557
- Artmann G. M., Kelemen C., Porst D., Büldt G., and Chien S. Temperature transitions of protein properties in human red blood cells. *Biophys. J.*, **75** (6), 3179–3183 (1998). DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77759-8

8. Doster W. and Longeville S. Microscopic diffusion and hydrodynamic interactions of hemoglobin in red blood cells. *Biophys. J.*, **93** (4), 1360–1368 (2007). DOI: 10.1529/biophysj.106.097956
9. Stadler A. M., Digel I., Artmann G. M., Embs J. P., Zanca, G., and Büldt G. Hemoglobin dynamics in red blood cells: correlation to body temperature. *Biophys. J.*, **95** (11), 5449–5461 (2008). DOI: 10.1529/biophysj.108.138040
10. Minton A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J. Biol. Chem.*, **276** (14), 10577–10580 (2001). DOI: 10.1074/jbc.R100005200
11. Parshina E. Y., Yusipovich A. I., Platonova A. A., Grygorczyk R., Maksimov G. V., and Orlov S. N. Thermal inactivation of volume-sensitive K^+ , Cl^- cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes. *Pflüg. Arch. – Eur. J. Physiol.*, **465**, 977–983 (2013). DOI: 10.1007/s00424-013-1221-4
12. Vlasov A. V., Maliar N. L., Bazhenov S. V., Nikelshparg E. I., Brazhe N. A., Vlasova A. D., and Gordeliy V. I. Raman scattering: from structural biology to medical applications. *Crystals*, **10** (1), 38 (2020). DOI: 10.3390/crys10010038
13. Li-Chan E., Nakai S., and Hirotsuka M. Raman spectroscopy as a probe of protein structure in food systems In: *Protein structure-function relationships in foods*, Ed. by R. Y. Yada, R. L. Jackman, and J. L. Smith (Springer, Boston, USA, 1994), pp. 163–197. DOI: 10.1007/978-1-4615-2670-4_8
14. Wallach D. F., Verma S. P., and Fookson, J. Application of laser Raman and infrared spectroscopy to the analysis of membrane structure. *Rev. Biomembr.*, **559** (2–3), 153–208 (1979). DOI: 10.1016/0304-4157(79)90001-7
15. Wilson W. W., Wade M. M., Holman S. C., and Champlin F. R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Methods*, **43** (3), 153–164 (2001). DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00224-4
16. Gryzunov Y. A., Syrejshchikova T. I., Komarova M. N., Misionzhnik E. Y., Uzbekov M. G., Molodetskikh A. V., Dobretsov G. E., and Yakimenko M. N. Serum albumin binding sites properties in donors and in schizophrenia patients: the study of fluorescence decay of the probe K-35 using S-60 synchrotron pulse excitation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.*, **448** (1–2), 478–482 (2000). DOI: 10.1016/S0168-9002(99)00720-2
17. Slatinskaya O. V., Zaripov P. I., Brazhe N. A., Petrushanko I. Y., and Maksimov G. V. Changes in the conformation and distribution of hemoglobin in the erythrocyte upon inhibition of Na^+/K^+ -ATPase activity. *Biophysics*, **67** (5), 726–733 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922050189
18. Slatinskaya O. V., Brazhe N. A., Orlov S. N., and Maksimov G. V. The role of extracellular Ca^{2+} in regulating the distribution and conformation of hemoglobin in erythrocytes. *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*, **15** (3), 230–238 (2021). DOI: 10.1134/S1990747821030090
19. Cheng Y., Lin H., Xue D., Li R., and Wang K. Lanthanide ions induce hydrolysis of hemoglobin-bound 2, 3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG), conformational changes of globin and bidirectional changes of 2, 3-DPG-hemoglobin's oxygen affinity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1535** (2), 200–216 (2001). DOI: 10.1016/S0925-4439(00)00100-9
20. Quds R., Hashmi M. A., Iqbal Z., and Mahmood R. Interaction of mancozeb with human hemoglobin: Spectroscopic, molecular docking and molecular dynamic simulation studies. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **280**, 121503 (2022). DOI: 10.1016/j.saa.2022.121503
21. Gryczynski Z., Tenenholz T., and Bucci E. Rates of energy transfer between tryptophans and hemes in hemoglobin, assuming that the heme is a planar oscillator, *Biophys. J.*, **63** (3), 648–653 (1992). DOI: 0006-3495/92/09/648/06
22. He W., Dou H., Li Z., Wang X., Wang L., Wang R., and Chang J. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **123**, 176–186 (2014). DOI: 10.1016/j.saa.2013.12.059
23. Makarska-Bialokoz M. (2017). Analysis of the binding interaction in uric acid–Human hemoglobin system by spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **178**, 47–54 (2017). DOI: 10.1016/j.saa.2017.01.063
24. Sreerama N. and Woody R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **287** (2), 252–260 (2000). DOI: 10.1006/abio.2000.4880
25. Fa H., Wang B., Zhang Y., Zhu Y., Song B., Xu H., Zhai Yu., Qiao M., and Sun F. A cryo-electron microscopy support film formed by 2D crystals of hydrophobin HFBI. *Nature Commun.*, **12** (1), 7257 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-27596-8
26. Mohandas N. and Gallagher P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, **112** (10), 3939–3948. (2008). DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166
27. Paschenko V. Z., Gorokhov V. V., Korvatovsky B. N., Knox P. P., Grishanova N. P., and Goryachev S. N. A study of the temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime in the range of –170 to +20°C in various solvents. *Biophysics*, **66** (3), 385–394 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921030143
28. Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Slutskaya E. A., Stepanov A. V., Argentova-Stevens A. M., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Klementiev K. E., Slatinskaya O. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Paschenko V. Z., and Rubin A. B. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components. *Sci. Rep.*, **7** (1), 15548 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-15520-4
29. Hasan S. and Naeem A. Consequence of macromolecular crowding on aggregation propensity and structural stability of haemoglobin under glycation conditions. *Int. J. Biol. Macromol.*, **162**, 1044–1053 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.127

Effects of Macromolecular Crowding in Erythrocyte Cytoplasm

**O.V. Slatinskaya*, E.Yu. Parshina*, A.I. Yusipovich*, N.A. Brazhe*,
A.B. Rubin*, and G.V. Maksimov*, ****

*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**University of Science and Technology MISIS, Leninskiy prosp. 4/1, Moscow, 119049 Russia

Using Raman spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and time-correlated single-photon counting, it was shown that increasing the incubation temperature of human erythrocytes enhances the homogeneity of hemoglobin distribution in the cytoplasm and reduces globin molecule packing density. This likely results from the cellular “macromolecular crowding” effect. Observed conformational changes are specific to intracellular Hb and independent of the plasma membrane surface potential. Multiple pools of hemoglobin with varying structure and dynamics are proposed, they form clusters, creating heterogeneous hemoglobin distribution. The role of these effects in oxygen transport and regulatory signaling is discussed.

Keywords: *hemoglobin, erythrocytes, Raman scattering, crowding*