Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка?

Ф.И. Атауллаханов[1, 2, 3, 4], Д.В. Борсакова[1, 3], Е.С. Протасов[1, 2, 3], Е.И. Синауридзе[1, 3], А.М. Зейналов[1]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2] ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва
[3] ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
[4] Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва

В статье представлен обзор данных о переносе кислорода в организме и роли эритроцитов в этом процессе. Описаны механизмы регуляции связывания гемоглобина с кислородом, а также влияние формы эритроцитов на реологию крови.
Ключевые слова: *гем, гемоглобин, кооперативность, связывания кислорода с гемоглобином, перенос кислорода, реология крови, фетальный гемоглобин, форма эритроцита, эритроцит.*

Контактная информация:
Атауллаханов Фазоил Иноятович, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией биофизики НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева; зав. лабораторией физиологии и биофизики клетки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, проф. физического факультета МГУ и МФТИ.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570, доб. 5510
E-mail: ataullakhanov.fazly@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-108-116

Erythrocyte: a bag with hemoglobin, or a living active cell?

F.I. Ataullakhanov[1, 2, 3, 4], D.V. Borsakova[1, 3], E.S. Protasov[1, 2, 3], E.I. Sinauridze[1, 3], A.M. Zeynalov[1]

[1] Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow
[2] Moscow State University, Moscow
[3] Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow
[4] Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow

The review concerns the oxygen transfer in the body and the role of erythrocytes in this process. The mechanisms of regulation of hemoglobin-oxygen binding are described, as well as the effect of erythrocytes shape on blood rheology.
Key words: *blood rheology, cooperativity, erythrocyte, shape of erythrocyte, fetal hemoglobin, heme, hemoglobin, oxygen binding with hemoglobin, oxygen transfer.*

Correspondence:
Fazoil I. Ataullakhanov, Corresponding Member of the RAS, Head of the Laboratory of Biophysics, Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation; Head of the Laboratory of Physiology and Biophysics of the Cell, Center of Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences; Professor of Physics Department, Moscow State University; Professor of Moscow Institute of Physics and Technology.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: ataullakhanov.fazly@gmail.com

Наш организм потребляет в сутки примерно 400–600 л кислорода [1]; такое же его количество содержится в 100 тоннах воды. Если бы наше сердце вместо крови перекачивало жидкость с таким же содержанием кислорода, то за каждое сокращение нужно было бы прокачивать 15 л этой жидкости. Представляете себе такой насос? Реальный сердечный выброс в 100 раз меньше. Такая фантастическая экономия возникает благодаря тому, что в нашей крови может раствориться в 100 раз больше кислорода, чем в воде. Для этой цели в организме имеются специальные клетки – эритроциты. В этом обзоре мы расскажем, как устроен эритроцит, обеспечивающий необыкновенно высокую эффективность транспорта кислорода.

Гемоглобин

Эритроциты занимают 40% объема нашей крови. Эти клетки в норме представляют собой двояковогнутые диски, на 98% заполненные красным белком – гемоглобином, связывающим кислород (*рис. 1*) [2]. Гемоглобин – относительно небольшой интенсивно окрашенный белок с молекулярной массой 66 000–68 000 Дальтон [2–5]. Гемоглобина в крови так много, что он определяет ее цвет. Молекула белка состоит из четырех похожих субъединиц, каждая из которых способна обратимо связывать кислород [2, 3]. Для этого связывания не требуется энергия. Таким обра-

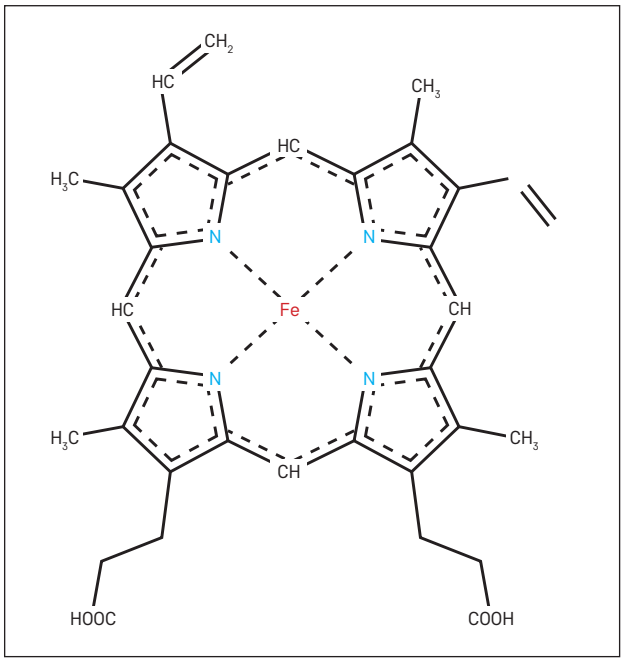
Рисунок 1
Электронная микрофотография эритроцитов [2]



зом, каждая молекула гемоглобина способна связать от одной до 4 молекул кислорода.

Связывание кислорода с гемоглобином происходит в активном центре – геме (*рис. 2*). Гем – это изящная химическая конструкция, состоящая из четырех пятичленных гетероциклов, лежащих в одной плоскости. Четыре атома азота в этой плоской конструкции образуют в центре зону, которая хорошо связывает атом железа – главный элемент гемоглобина, который в свою очередь непосредственно связывает кислород. Химические связи железа с атомами азота не ковалентные, а координационные – более слабые. Это нужно для того, чтобы железо могло связывать кислород обратимо [2]. Электроны железа не должны перейти на кислород, иначе произойдет окислительно-восстановительная реакция между железом и кислородом. В результате мы потеряем кислород: он превратится в один из сильнейших окислителей на Земле – супероксид-радикал, способный натворить много бед. Координационные связи в силу своей слабости достаточно хорошо удерживают кислород в геме, но не отдают ему свои электроны.

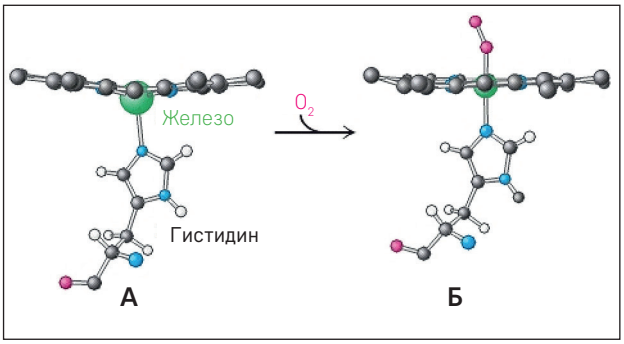
Рисунок 2
Структура молекулы гема; пунктиром показаны связи, образующие делокализованную систему электронов [2]



Еще одна важная особенность гема состоит в том, что одинарные и двойные связи в нем чередуются. В результате возникает система делокализованных электронов. Множество электронов, образующих химические связи между атомами гема, оказываются принадлежащими всему кольцу – это создает уникальную возможность легко менять электронные свойства всей молекулы в целом и в первую очередь атома железа за счет слабых влияний соседних химических групп [2]. Возможность управлять электронным состоянием железа позволяет изменять способность железа связываться с кислородом.

Атом железа может образовать 6 координационных связей; в геме четыре из них лежат в плоскости кольца и связывают железо с азотами; две другие перпендикулярны плоскости кольца (*рис. 3*). Одна из этих связей используется для связывания кислорода (*рис. 3 Б*), а противоположная ей – связь железа с азотом гистидина, занимающего 93-е положение в последовательности аминокислотных остатков глобина (так называется белковая часть молекулы гемоглобина), – как раз и позволяет управлять связыванием железа с кислородом [2, 4]. Поскольку гистидин 93 является частью глобина, конформационные изменения этой молекулы могут изменять положение гистидина относительно плоскости кольца гема. В отсутствие кислорода конформация глобина такова, что гистидин 93 несколько вытягивает железо из плоскости кольца на себя (*рис. 3 А*). В этом состоянии гем хуже связывает кислород, чем в ситуации, когда железо находится в плоскости кольца. Таким образом, конформация белковой молекулы влияет на силу связывания кислорода.

Рисунок 3
Положение железа, не связанного (**А**) и связанного (**Б**) с кислородом, в плоскости гема в гемоглобине [2]



Эта сила важна, так как организм может использовать только свободный, не связанный с гемоглобином кислород. Поэтому важно не только то, сколько кислорода есть в крови в целом и как гемоглобин его связывает, но и как он кислород отдает. Поскольку в легких растворимого кислорода больше всего, там доминирует связывание. По мере того, как кровь из легких поступает в другие органы и по капиллярам расходится по разным тканям, растворенный в крови кислород потребляется клетками, уходит из крови внутрь клеток, концентрация его уменьшается. Равновесие гемоглобина с кислородом сдвигается в сторону отдачи кислорода. Кислород освобождается и выходит в кровь [1, 6]. Молекулярная регуляция, определяющая конформацию гемоглобина и его способность связывать и отдавать кислород, позволяет более эффективно регулировать процесс переноса кислорода из легких в ткани.

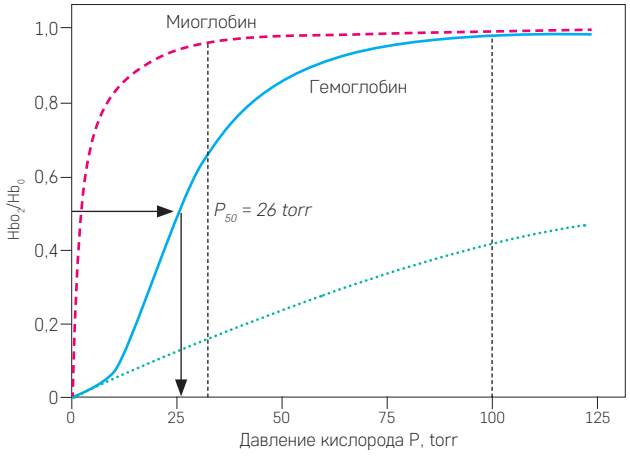
Рассмотрим, как это происходит (*рис. 4*). Кислород связывается с гемоглобином обратимо, поэтому доля гемоглобина, связанного с кислородом, зависит от давления кислорода в крови (его концентрации). Это давление в легких (100 мм рт. ст., или 100 torr) гораздо выше, чем аналогичное давление в тканях в покое (20–30 torr) [1, 2]. Организму нужен такой гемоглобин, который будет максимально связывать кислород в легких и отдавать большую его часть в тканях, ибо та часть гемоглобина, которая связала кислород и не отдала его в тканях, представляет собой балласт – мы зря гоняем груженые вагоны из легких в ткани и обратно. Закономерности этого обмена определяются двумя основными параметрами кривой связывания гемоглобина с кислородом. Эта кривая имеет S-образную форму и описана уравнением Хилла (1) [4, 7]:

$$HbO_2/Hb_0 = [P]^n/([P]^n+[P_{50}]^n) \quad (1),$$

где HbO_2 – концентрация гемоглобина, связанного с кислородом; Hb_0 – полная концентрация гемоглобина; P – давление кислорода в крови (величина, пропорциональная концентрации кислорода); P_{50} – давление кислорода, при котором гемоглобин насыщен кислородом наполовину; n – коэффициент в формуле Хилла (1).

Рисунок 4

Кривые связывания с кислородом гемоглобина (*сплошная кривая*), миоглобина (*пунктирная кривая*) и гипотетическая кривая связывания гемоглобина с кислородом при отсутствии эффекта кооперативности связывания его субъединиц с кислородом (*мелкий пунктир*), определяющие эффективность связывания кислорода в легких и отдачи его в тканях; правая и левая вертикальные штрихпунктирные линии – давление кислорода в легких и тканях соответственно



Главный параметр, определяющий форму кривой связывания, – P_{50}. Это значение давления кислорода в среде, при котором ровно половина гемов гемоглобина насыщена кислородом. На *рисунке 4* показано, как определяется эта величина.

Второй важный параметр этой кривой – коэффициент Хилла, или коэффициент кооперативности. Чем он определяется? Как уже было сказано, кривая связывания гемоглобина с кислородом имеет S-образный характер (сплошная линия на *рис. 4*) и не похожа на кривую обычного химического связывания (пунктир на *рис. 4*). Связывание, характерное для гемоглобина, называют кооперативным. При низких концентрациях кислорода кривая с увеличением его концентрации растет медленно – гемоглобин плохо связывает кислород. Постепенно, при увеличении концентраций кислорода, кривая становится все круче. В области концентраций кислорода, близких к P_{50}, гемоглобин значительно эффективнее (резче) связывает или отдает кислород по сравнению с некооперативным сорбентом. S-образность характеристики помогает гемоглобину сильнее связывать кислород в легких и больше отдавать его в тканях, чем это могло бы быть при отсутствии кооперативности. Если бы S-образность была более выраженной, эффективность переноса была бы еще больше. Неполная отдача кислорода, видимо, физиологически обоснована – это запас для быстрого увеличения его потребления. Увеличение физиологической нагрузки, сопряженное с увеличенным потреблением кислорода, снизит концентрацию кислорода в тканях, что позволит отнять у гемоглобина больше кислорода.

На молекулярном уровне S-образность кривой связывания гемоглобина с кислородом означает, что конформация молекулы гемоглобина меняется так, что при низких концентрациях кислорода гемоглобин плохо связывает кислород, а при больших – хорошо. Это происходит благодаря тому, что молекула гемоглобина состоит из 4 субъединиц, которые настолько тесно связаны между собой, что могут взаимно влиять на конформации друг друга. Наилучшей способностью связывать кислород обладают субъединицы, не связанные друг с другом.

При отсутствии кислорода субъединицы гемоглобина имеют конформацию, в которой гистидин 93 вытягивает железо из плоскости кольца. Такие субъединицы сильно связаны друг с другом, но хуже связывают кислород. Связывание первой молекулы кислорода с одним из гемов возвращает железо в плоскость кольца (*рис. 3*). Это приводит к ослаблению связи железа с гистидином 93: гистидин удаляется от плоскости кольца, вызывая изменение конформации молекулы. Это изменение заметно ослабляет связывание субъединиц. Оставшиеся субъединицы приобретают более свободную конформацию, лучше связывающую кислород, что и приводит к нужному изменению способности к связыванию. Чем больше кислорода, тем свободнее субъединицы и тем лучше связывание [4]. Таким образом, субъединицы гемоглобина кооперируют в связывании кислорода – это и называют эффектом кооперативности [8, 9].

S-образность кривой связывания теряется при отсутствии эффекта кооперативности (на *рис. 4* крупным пунктиром показана кривая связывания некооперативного белка миоглобина с кислородом). Миоглобин – мышечный белок, близкий родственник гемоглобина, который по структуре и способности связывать кислород очень похож на одну субъединицу гемоглобина [10]. Похожую зависимость имеет аналогичная кривая для мономеров гемоглобина. Гипотетическая кривая связывания гемоглобина с кислородом, рассчитанная при условии отсутствия эффекта кооперативности, показана мелким пунктиром на *рисунке 4*. Если можно было бы зафиксировать гемоглобин в этом состоянии, то кривая связывания с кислородом проходила бы очень полого.

Гемоглобин умеет связывать не только кислород, но и многие другие молекулы, похожие на кислород. С этим связаны некоторые медицинские эффекты радикального нарушения газотранспорта. Так, место кислорода может занимать молекула оксида углерода (CO), в быту она известна как угарный газ. Эта молекула очень похожа на кислород. Она связывается с гемоглобином сильнее кислорода и очень плохо диссоциирует из образовавшегося комплекса, освобождая гемоглобин [4]. Таким образом, если во вдыхаемом нами газе появляется угарный газ, то происходит отравление: CO вытесняет кислород из молекулы гемоглобина, который оказывается загружен прочно связанным балластом и не может выполнять свою функцию, несмотря на то, что он функционально совершенно нормален. Наступает удушье. Человек, надышавшийся угарным газом, задыхается, несмотря на то, что во вдыхаемом им воздухе достаточно много кислорода. Нужно срочно избавить организм от CO – вынести отравленного человека на свежий воздух, интенсивное дыхание выводит угарный газ из кровотока. Сходный эффект вызывает другая молекула – анион цианистой кислоты (CN^-). Самая знаменитая соль этой кислоты – цианистый калий. Механизм отравления цианистым калием тот же, что и угарным газом, – блокирование связи гемоглобина с кислородом.

Фенотипы гемоглобина

Существует много различных фенотипов гемоглобина (как нормального, так и патологического), в большинстве случаев они отличаются строением α- и β-глобинов (белков в субъединицах гемоглобина). Фенотипы гемоглобина изменяются в процессе развития организма человека [11]. Этот процесс регулируется изменением экспрессии соответствующих генов, кодирующих различные формы глобинов. В ходе эволюции млекопитающих гены α- и β-глобинов были разнесены в разные локусы – на хромосомы 16 и 11 соответственно (*рис. 5*).

Рисунок 5
Геномная структура кластеров α- и β-генов глобина на человеческих хромосомах 16 и 11: функциональные α-гены (*фиолетовый цвет*), псевдогены (*голубой цвет*), два из них (μ и θ1) кодируют малые количества РНК; функционально активные β-гены (*светло-зеленый цвет*). Показано примерное расположение важных контрольных элементов (HS-40 и LRC). Длина кластера α-гена – примерно 2/3 длины кластера β-гена. Внизу – различные виды гемоглобина, которые формируются с помощью этих генов, и стадии развития (эмбрион, плод, взрослый человек), на которых они представлены [12]

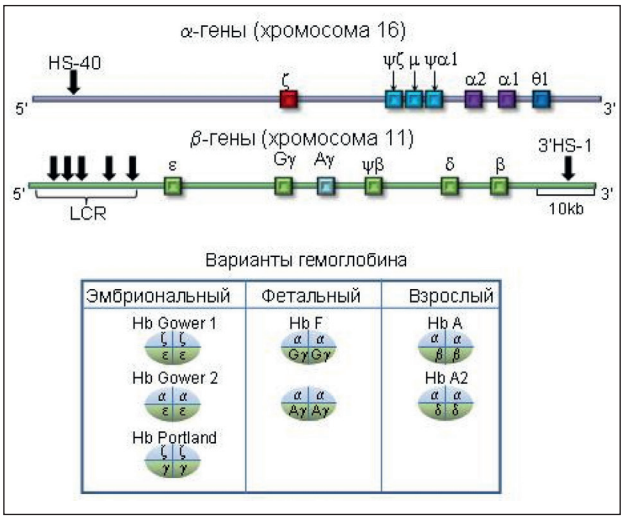
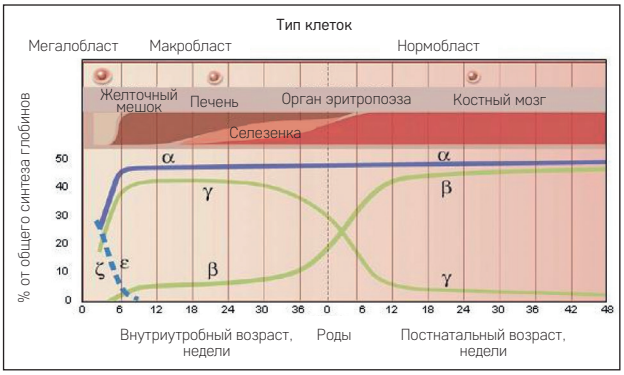


Рисунок 6
Изменения экспрессии генов α (*синяя кривая*), β и γ (*зеленые кривые*) и некоторых других генов глобинов человека (*пунктир*) в ходе развития плода, к моменту рождения и на первом году жизни человека. Показаны основные места эритропоэза и типы содержащих гемоглобин клеток для каждого из этих периодов [12]



Во время созревания плода, неонатального периода и дальнейшего взросления степень экспрессии разных генов меняется. У плода ζ- и ε-гены экспрессируются изначально в желточном мешке, регионе парааорты, а затем в печени, приводя к формированию гемоглобинов *Gower 1, Gower 2* и *Portland.* Постепенно экспрессия этих генов уменьшается, в то время как экспрессия α- и β-генов, наоборот, усиливается. В соответствии с этим присутствующий в первых фазах зародыша (первые 6–7 нед.) эмбриональный гемоглобин (гемоглобин P) начинает постепенно замещаться на плодный (фетальный) гемоглобин (гемоглобин F), который становится доминирующим начиная с 10–12-й нед. гестации и

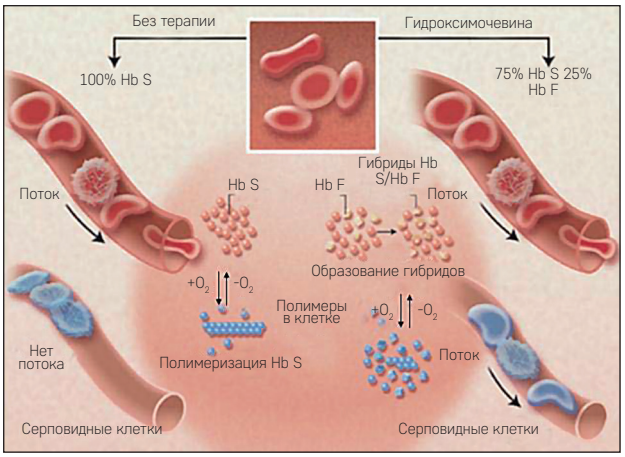
представляет собой основной фенотип гемоглобина плода в последних двух триместрах беременности (*рис. 6*) [11]. Этот гемоглобин имеет немного более высокое сродство к кислороду, чем взрослый гемоглобин, так как менее сильно связывается с 2,3-дифосфоглицератом, связывание с которым уменьшает это сродство [1, 2]. Он более устойчив в щелочной среде, стабилен в более узкой области pH и более подвержен окислению с образованием метгемоглобина [12]. Большее сродство к кислороду помогает HbF обеспечивать потребность плода в кислороде в условиях малого общего объема крови плода. К моменту рождения HbF составляет около 80–85% общего количества гемоглобина в крови. После рождения α-гены остаются активными, экспрессия γ-генов прекращается, а β-генов, наоборот, усиливается. Это приводит к тому, что к концу первого года жизни в клетках начинают преобладать «взрослые» гемоглобины A и A_2 (*рис. 5 и 6*). В эритроцитах взрослого человека присутствует примерно 97% гемоглобина A ($\alpha_2\beta_2$), 2% гемоглобина A_2 ($\alpha_2\delta_2$) и 1% фетального гемоглобина.

В последние 30 лет множество работ было посвящено изучению молекулярных механизмов этого так называемого «переключения» гемоглобина. Понимание этих механизмов помогло прийти к идее лечения серповидно-клеточной анемии путем индукции фетального гемоглобина.

Серповидноклеточная болезнь

Серповидно-клеточная анемия возникает у людей, если произошла единичная нуклеотидная замена аденина на тимин в гене β-глобина. В результате триплет ГАГ, кодирующий отрицательно заряженную при физиологических *pH* глутаминовую кислоту в 6 позиции β-цепи глобина, замещается на ГТГ, кодирующий электронейтральную аминокислоту валин. Образующийся при этом серповидно-клеточный гемоглобин (HbS) нейтрален по заряду, менее подвижен на электрофорезе и менее растворим. В капиллярах при отдаче кислорода (то есть в условиях частичной дезоксигенации) этот белок полимеризуется и выпадает в осадок в форме веретенообразных образований (тактоидов), которые растягивают оболочку эритроцита и ведут к его разрушению. Это нарушает поток эритроцитов в микроциркуляции и является основным патофизиологическим фактором при серповидно-клеточной анемии [13]. Популяционные исследования среди различных групп показали, что тяжесть проявления заболевания снижена при повышенном содержании фетального гемоглобина, причем она обратно пропорциональна уровню этого гемоглобина. Однако, чтобы эффект был однозначно благоприятным, уровень фетального гемоглобина должен быть высоким (более 25%) [14]. В то же

Рисунок 7
Схема постулированных эффектов гидроксимочевины в ингибировании полимеризации гемоглобина S: гидроксимочевина увеличивает уровень гемоглобина F в каждом эритроците (показан уровень 25%), снижая таким образом степень микрососудистой закупорки при любом уровне кислорода. Защищающий эффект гемоглобина F наблюдается потому, что смешанный гибрид гемоглобина $\alpha_2\beta^S\gamma$, который образуется внутри эритроцита в присутствии HbF, не входит в фазу полимеризации [12]



время в разнообразных лабораторных исследованиях показан механизм, с помощью которого фетальный гемоглобин оказывал ингибирующее влияние на внутриклеточную полимеризацию Hb S (*рис. 7)* [12]. Позже было обнаружено несколько препаратов, которые повышают уровень фетального гемоглобина у приматов, наиболее эффективные из них – 5-азацитидин и гидроксимочевина [15, 16]. В 1998 году гидроксимочевина была одобрена FDA (США) для лечения серповидно-клеточной болезни [17]. Дальнейшие клинические исследования показали эффективность гидроксимочевины в лечении серповидно-клеточной анемии у взрослых и детей [18–21]. Исследование терапевтических эффектов гидроксимочевины [22] и поиск новых агентов, способных в одиночку или в комбинации с гидроксимочевиной повышать уровень фетального гемоглобина, продолжаются. Это связано с тем, что, несмотря на эффективность гидроксимочевины у ряда пациентов с серповидно-клеточной анемией, многие вообще не реагируют на этот препарат повышением фетального гемоглобина, а у некоторых пациентов этот уровень возрастает до 10–15%, но при этом не вызывает никаких клинических откликов. Кроме того, до сих пор не до конца доказана безопасность гидроксимочевины [23].

Эритроцит. Реология крови

Наличие гемоглобина в нашей крови позволяет практически в 100 раз уменьшить скорость циркуляции крови, это достигается благодаря его высокой концентрации – 2 мМ [1, 6]. Но почему гемоглобин нельзя просто растворить в крови, как альбумин? Зачем Природе создавать какие-то специальные клетки? Организмы, у которых гемоглобин растворен

в крови, – не редкость. Такую кровь имеют, например, моллюски. Однако у растворов белков высокой концентрации высокая вязкость, а вязкие растворы трудно качать. Спрятав гемоглобин в эритроциты, Природа резко уменьшила вязкость крови [1, 24, 25]. Это можно наблюдать, если взять пробирку с кровью и покачать ее. Мы увидим, что кровь – это жидкость, не намного более густая, чем вода. Если такую пробирку с кровью заморозить, а потом разморозить, эритроциты разрушатся, но общая концентрация гемоглобина в пробирке не изменится. Однако сильно изменится вязкость – теперь содержимое пробирки будет больше похоже на мед. Это и есть тот выигрыш в вязкости, который получает наш организм благодаря эритроцитам.

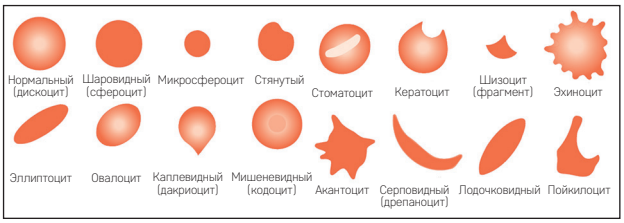
Итак, «упаковывание» гемоглобина в клетки значительно уменьшает вязкость: чем больше размер клеток, тем сильнее уменьшается вязкость [26]. Но размеры эритроцитов не могут расти до бесконечности. Чем они больше, тем больше времени займет диффузионный перенос кислорода из середины клетки наружу и обратно. При той скорости циркуляции крови, которая существует в нашем организме, оптимальный газообмен с тканями может происходить только в том случае, если размеры капилляров кровеносной сети равны примерно 2–3 мкм [27]. Примерно такую же толщину имеет эритроцит: в толстой части – 2 мкм, в середине центральной вмятины – 1 мкм [1, 24, 28]. Это решает проблему диффузионного транспорта газов, но эритроциты должны и свободно проходить по капиллярам. Если бы эритроциты были шариками с диаметром 2 мкм, они бы легко проходили по капиллярам, но их объем составлял бы при этом около 4 мкм^3, а объем эритроцита человека – 100 мкм^3, то есть из одного эритроцита пришлось бы сделать 25 шариков. При этом опять сильно увеличивается вязкость...

Как же удалось Природе создать такой большой эритроцит, который достаточно легко проходит через капилляры диаметром в 3–4 раза меньше его собственного диаметра? Единственный способ – сделать эритроцит достаточно легко деформируемым объектом [28–31]. При этом, когда эритроцит находится в большом сосуде, где кровь течет быстро, он должен иметь небольшое гидродинамическое сопротивление. Та форма, которую имеет покоящийся эритроцит (*рис. 1*), действительно дает очень небольшое гидродинамическое сопротивление. Но одновременно иметь и хорошую форму, подходящую для гемодинамики, и хорошую деформируемость, то есть способность легко принимать форму узких сосудов и протискиваться через них, – задача нетривиальная. Решить ее, создав некую пассивную оболочку – мешочек с гемоглобином, невозможно. Поэтому эритроцит – активно живущая клетка со множеством метаболических систем, устроенных специализированно и целесообразно для эффективного решения обеих задач, которые перед ним ставит физиология кровообращения.

Чем определяется форма эритроцита? Покоящийся эритроцит здорового человека имеет форму лепешки – двояковогнутого диска (*рис. 1*) [2, 32], однако при многих патологиях эта форма может быть другой. Например, при серповидноклеточной анемии эритроцит сильно вытянут и имеет форму полумесяца (*рис. 8*) [33]. Это одна из множества описанных в литературе анемий – заболеваний, при которых изменены эритроцитарные индексы и сильно снижено количество эритроцитов в крови [34], очевидное следствие этого – кислородная недостаточность.

При разных анемиях наблюдается большое разнообразие форм эритроцитов (*рис. 8*). Все эти формы обусловлены генетическими дефектами гемоглобина или других белков эритроцитов. Интересно, что в подавляющем числе случаев мутации в гемоглобине вызывают не нарушение способности гемоглобина к транспорту кислорода, а ухудшают способность клетки нормально циркулировать в кровотоке [32].

Рисунок 8
Морфологические формы эритроцитов [33]

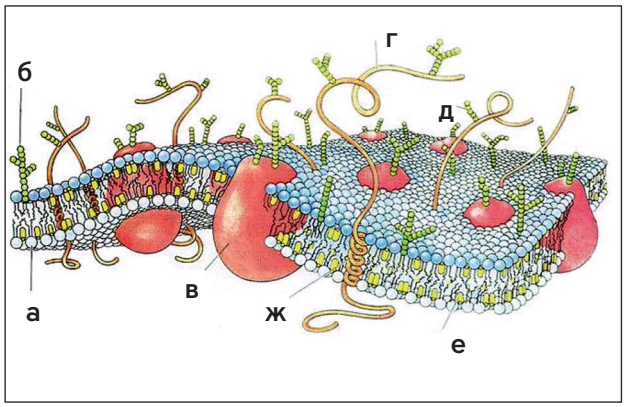


Форма эритроцита как двояковогнутого диска кажется наилучшей с точки зрения реологии крови по ряду причин [31, 35–37]. То, что эта форма лучше, чем серповидноклеточная или какие-нибудь формы со многими выступами, более или менее понятно. Но такие диски имеют и ряд преимуществ по сравнению с довольно гладкими формами, такими как сферические или овальные клетки. Во-первых, они могут более компактно укладываться и компактно заполнять пространство внутри кровотока. Во-вторых, в тонком диске диффузия быстрее обменивает кислород по всему объему клетки. В-третьих, эритроциты имеют хорошую гидродинамическую форму – они хорошо обтекаемы. В-четвертых, эти диски могут катиться по капилляру. Известно, что эритроциты умеют складываться в стопки – их называют «монетными столбиками». Если взять кровь и аккуратно поместить ее под микроскоп, то мы увидим, что эритроциты не просто случайным образом ориентированы, многие из них образуют довольно длинные «монетные столбики» – это компактно и улучшает реологию [24, 25, 38].

Чтобы понять, как мутации в отдельных белках влияют на реологию клетки, рассмотрим, как устроены системы эритроцита, определяющие форму клетки.

Свойства клеточной мембраны эритроцита. Мембрана эритроцита, как и большинства животных клеток, представляет собой фосфолипидный бислой, в который вкраплены разнообразные молекулы – белки и полисахариды (*рис. 9*) [36, 39–42]. С точки зрения реологии крови, в первую очередь, важны механические свойства мембраны. В механике свойства материала характеризуют в зависимости от того, как небольшой кусочек этого материала отвечает на различные деформации. Если мы возьмем небольшой прямоугольник фосфолипидной мембраны, то увидим, что мембрана имеет постоянную, очень небольшую толщину, которую невозможно изменить. Более того, если мы попытаемся равномерно растянуть эту мембрану во все стороны, то сделать это тоже практически не удастся. В отличие от воздушного шарика, мембрана клетки нерастяжима [24, 35, 43], зато она легко меняет свою форму. Если мы потянем квадратик мембраны в одном направлении, этот квадратик легко удлинится в этом направлении, но сожмется в перпендикулярном.

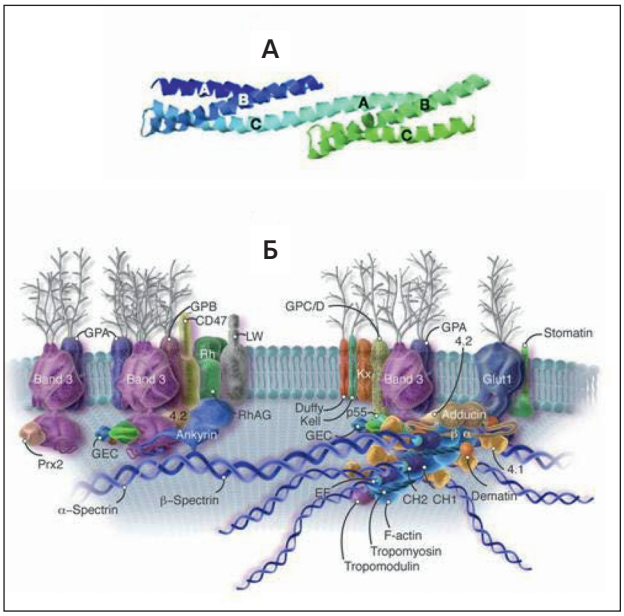
Рисунок 9
Строение мембраны эритроцита: **а** – фосфолипид; **б** – гликолипид; **в** – глобулярный белок; **г** – α-спиральный белок; **д** – боковая цепь олигосахарида; **е** – холестерин; **ж** – гидрофобный сегмент α-спирального белка [36]



Форма квадратика изменится, но площадь останется неизменной. Это связано с тем, что молекулы фосфолипидов, образующие мембрану, не фиксированы на своих местах, а свободно перемещаются вдоль поверхности мембраны, как молекулы жидкости, и при этом занимают строго определенный объем. Их практически невозможно ни сблизить, ни раздвинуть [1, 43]. В жидкости движение возможно во всех направлениях, а в мембране – только в двух, в плоскости мембраны, так как молекула не может выскочить из бислоя. Фосфолипидный бислой легко изогнуть, но в отсутствие действующих на него сил он приобретает плоскую форму [44, 45].

Если из такого материала сделать замкнутую оболочку, она будет легко деформируемой, если этому не будет препятствовать содержимое. А содержимое клетки – жидкость, она тоже легко деформируется под небольшими воздействиями, но несжимаема. Если замкнутую фосфолипидную оболочку заполнить жидкостью по максимуму, то такая оболочка примет форму сферы. И это будет жесткая конструкция, которую практически невозможно деформировать, не разорвав оболочку, несмотря на то, что все ее составляющие – и оболочка, и содержимое – деформируются легко. Поэтому, чтобы эритроцит мог легко менять свою форму при прохождении через узкие капилляры, его объем должен быть заметно меньше максимального. И действительно, объем нормального эритроцита в 1,5–2 раза меньше максимального объема, который может вместиться в оболочку эритроцита [28, 29].

Рисунок 10
Примембранный цитоскелет эритроцита на основе спектрина: **А** – молекула димера спектрина; каждый мономер спектрина состоит из трех спиралей (A, B и C); **Б** – связь нитей спектрина с мембраной эритроцита через комплексы интегральных белков [48]



Эритроцит, оболочка которого достаточно легко изгибается, а площадь вдвое превосходит минимальную для данного объема этой клетки, может принимать массу разных форм. Как сделать так, чтобы эритроцит в покое всегда принимал нужную форму? Создать внутренний каркас, пронизывающий всю клетку, – цитоскелет – нельзя. Цитоскелет перестраивается очень медленно – десятки минут, а эритроцит, попадая в узкий капилляр, успевает принять его форму за доли секунды. Теоретические расчеты показали, как эластичность мембраны эритроцита влияет на его форму и, соответственно, деформируемость [42, 46]. Они также показали, что для того, чтобы

эритроцит имел наиболее энергетически и физиологически выгодную двояковогнутую форму, достаточно, чтобы мембрана эритроцита сопротивлялась изгибу примерно в 10 раз сильнее, чем фосфолипидный бислой [35, 43]. Тогда клетка будет стараться принять такую форму, при которой суммарный изгиб всех частей клеточной мембраны минимален, – а это как раз двояковогнутый диск. Таким образом, проблема решается при увеличениеи жесткости мембраны, то есть при наличии примембранного цитоскелета. Действительно, с внутренней стороны мембраны эритроцита находится белковая сеть. Главный белок этой сети – спектрин (*рис. 10 А*). Это большой фибриллярный белок, состоящий из двух субъединиц, образующих димер длиной в 100 нм. В клетке эти димеры объединяются в 200 нм тетрамеры. Спектрин связывается с мембраной клетки не прямо, а через комплексы интегральных белков мембраны *(рис. 10 Б*) [47, 48]. Спектриновая сеть достаточно плотно подстилает бислойную мембрану, сильно увеличивая ее изгибную упругость. Мутации в разных цепях спектрина приводят к анемии, при которой наблюдается эллипсоцитоз: эритроциты теряют свою дисковидную форму и превращаются в овалоциты или сфероциты [49], подтверждая тем самым описанный выше механизм, обеспечивающий эритроциту нужную форму.

Таким образом, при создании системы для переноса кислорода в организме Природа использовала не только специфический белок (гемоглобин), связывание которого с кислородом регулируется рядом специальных механизмов, позволяющих ему эффективно связывать кислород в легких и отдавать в тканях, но также специализированные клетки – эритроциты. Эти клетки несут гемоглобин внутри, что позволяет сильно снизить вязкость крови по сравнению с той, какую имел бы соответствующий по содержанию гемоглобина раствор. Кроме того, эритроциты имеют избыточную площадь мембраны относительно объема их содержимого, что позволяет им легко деформироваться и проходить даже через самые узкие капилляры в системе микроциркуляции.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 16-14-00224.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ
Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID
Ф.И. Атауллаханов http://orcid.org/0000-0003-3403-181X
Д.В. Борсакова http://orcid.org/0000-0003-4669-977X
Е.С. Протасов http://orcid.org/0000-0001-5808-0785
Е.И. Синауридзе http://orcid.org/0000-0002-5948-3444
А.М. Зейналов http://orcid.org/0000-0002-8935-9698

Литература

1. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии, т. 3, (гл. 31: Гемоглобин и химия дыхания; гл. 32: Метаболизм эритроцита и железа). – М. Мир, 1981, 1218–1266, 1267–1301.
2. Berg J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J. Jr., Stryer L. Chapter 7: Hemoglobin: Portrait of a Protein in Action, in: Biochemistry, 8th edition. New York: W H Freeman and Co, 2015, p. 191–214.
3. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин. Соросовский образовательный журнал 1998; 4: 33–8. http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/9804_033.pdf
4. Pittman R.N. Chapter 4: Oxygen Transport. In: Regulation of Tissue Oxygenation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54103/
5. Perutz M.F. Structure and mechanism of haemoglobin. Br Med Bull 1976; 32 (3): 195-208. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071363
6. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin and Their Reactions with Ligands. Frontiers in Biology 1971; vol. 21, Amsterdam: North-Holland Pub. Co, 436 p.
7. Kilmartin J.V. Interaction of haemoglobin with protons, CO_2 and 2,3-diphosphoglycerate. Br Med Bull 1976; 32 (3): 209–12.
8. Eaton W.A., Henry E.R., Hofrichter J., Bettati S., Viappiani C., Mozzarelli A. Evolution of allosteric models of hemoglobin. IUBMB Life 2007; 59 (8–9): 586–99.
9. Lukin J.A., Ho C. The structure-function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. Chem Rev 2004; 104 (3): 1219–30.
10. Ordway G.A., Garry D.J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. J Exp Biol 2004; 207 (Pt 20): 3441–6. http://jeb.biologists.org/content/jexbio/207/20/3441.full.pdf.
11. Sankaran V.G., Orkin S.H. The switch from fetal to adult hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med 2013 Jan; 3 (1): a011643. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530042/pdf/cshperspectmed-HMG-a011643.pdf
12. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood 2008; 112 (10): 3927–38. https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188
13. Schechter A.N., Noguchi C.T., Rodgers G.P. Sickle cell anemia. In: The Molecular Basis of Blood Diseases (Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A.W., Leder P., Majerus P.W., eds.). Philadelphia: WB Saunders; 1987: 179–218.
14. Noguchi C.T., Rodgers G.P., Serjeant G., Schechter A.N. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. N Engl J Med 1988; 318 (2): 96–9.
15. DeSimone J., Heller P., Hall L., Zwiers D. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. Proc Natl Acad Sci USA 1982;

79 (15): 4428–31.
16. Letvin N.L., Linch D.C., Beardsley G.P., McIntyre K.W., Nathan D.G. Augmentation of fetal-hemoglobin production in anemic monkeys by hydroxyurea. N Engl J Med 1984; 310 (14): 869–73.
17. Lanzkron S., Strouse J.J., Wilson R., Beach M.C., Haywood C., Park H., Witkop C., et al. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. Ann Intern Med 2008;148 (12): 939–55.
18. Rigano P., De Franceschi L., Sainati L., Piga A., Piel F.B., Cappellini M.D., Fidone C., et al. Italian Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia Investigators. Real-life experience with hydroxyurea in sickle cell disease: A multicenter study in a cohort of patients with heterogeneous descent. Blood Cells Mol Dis 2017 Oct 9. pii: S1079–9796 (17): 30322–4.
19. Estepp J.H., Smeltzer M.P., Kang G., Li C., Wang W.C., Abrams C., Aygun B., et al. A clinically meaningful fetal hemoglobin threshold for children with sickle cell anemia during hydroxyurea therapy. Am J Hematol 2017; 92 (12): 1333–9.
20. Lemonne N., Möckesch B., Charlot K., Garnier Y., Waltz X., Lamarre Y., Antoine-Jonville S., et al. Effects of hydroxyurea on blood rheology in sickle cell anemia: A two-years follow-up study. Clin Hemorheol Microcirc 2017 Jul 25.
21. Nevitt S.J., Jones A.P., Howard J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. Cochrane Database Syst Rev 2017 Apr 20; 4:CD002202.
22. Fitzhugh C.D., Hsieh M.M., Allen D., Coles W.A., Seamon C., Ring M., Zhao X., et al. 6th. Hydroxyurea-increased fetal hemoglobin is sssociated with less organ damage and longer survival in adults with sickle cell anemia. PLoS One 2015 Nov 17; 10 (11): e0141706.
23. Platt O.S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. N Engl J Med 2008; 358 (13): 1362–9.
24. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. – М.: Мир, 1982, 302 с.
25. Zhang J., Johnson P.C., Popel A.S. Effects of erythrocyte deformability and aggregation on the cell free layer and apparent viscosity of microscopic blood flows. Microvasc Res 2009; 77 (3): 265–72. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2917820/pdf/nihms212189.pdf.
26. Евдокимов И.Н., Елисеев Н.Ю. Молекулярные механизмы вязкости жидкости и газа. Часть 1. Основные понятия (под редакцией Нагаева В.Б.). – М.: РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина, 2005, 59 с. http://eee.gubkin.ru/PUBLICAT_RUS_files/viscosity1.pdf.
27. Гистология, цитология и эмбриология (Под ред. Ю.И. Афанасьева, С.Л. Кузнецова, Н.А. Юриной), Изд. 6-е. – М.: Медицина, 2004, 768 с.
28. Kim J., Lee H., Shin S. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. J Cell Biotechnol 2015; 1 (1): 63–79.
29. Maeda N. Erythrocyte rheology in microcirculation. Jpn J Physiol 1996; 46 (1): 1–14.
30. Svelc T., Svetina S. Stress-free state of the red blood cell membrane and the deformation of its skeleton. Cell Mol Biol Lett 2012; 17 (2): 217–27.
31. Svetina S. Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. Cell Mol Biol Lett 2012; 17 (2): 171–81.
32. Clarke G.M., Higgins T.N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clin Chem 2000; 46 (8): 1284–90.
33. Medical Laboratory and Biomedical Science. Blood Cell Morphology Guide [cited 2017 Nov 1]. Available from: http://clinical-laboratory.blogspot.ru/2013/03/clinical-laboratory-blood-cell_9.html
34. Broadway-Duren J.B., Klaassen H. Anemias. Crit Care Nurs Clin North Am 2013; 25 (4): 411–26.
35. Markin V.S. Lateral organization of membranes and cell shapes. Biophys J 1981; 36 (1): 1–19.
36. Волькенштейн М.В. Биофизика. Изд. 2-е. – М.: Наука, 1988, 592 с.
37. Diez-Silva M., Dao M., Han J., Lim C.-T., Suresh S. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. MRS Bull 2010; 35 (5): 382–88.
38. Derganc J., Bozic B., Svetina S., Zeks B. Equilibrium shapes of erythrocytes in rouleau formation. Biophys J 2003; 84 (3): 1486–92.
39. Mohandas N., Gallagher P.G. Red cell membrane: past, present, and future. Blood 2008; 112 (10): 3939–58.
40. An X., Mohandas N. Disorders of red cell membrane. Br J Haematol 2008; 141 (3): 367–75.
41. Mohandas N., Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1994; 23: 787–818.
42. Svetina S., Kuzman D., Waugh R.E., Ziherl P., Zeks B. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. Bioelectrochemistry 2004; 62 (2): 107–13.
43. Калягина Н.В. Математическая модель осморегуляции объема эритроцита с учетом механических характеристик мембран. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физ.-мат. наук. – М.: Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 2015, 151 с.
44. Рубин А.Б. Биофизика. – М.: Изд-во МГУ, 2004, 944 стр.
45. Svetina S. Curvature-dependent protein-lipid bilayer interaction and cell mechanosensitivity. Eur Biophys J 2015; 44 (7): 513–9.
46. Kuzman D., Svetina S., Waugh R.E., Zeks B. Elastic properties of the red blood cell membrane that determine echinocyte deformability. Eur Biophys J 2004; 33 (1): 1–15.
47. Patel V.P., Fairbanks G. Spectrin phosphorylation and shape change of human erythrocyte ghosts. J Cell Biol 1981; 88 (2): 430–40.
48. Lux S.E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. Blood 2016; 127 (2): 187–99.
49. Delaunay J. Genetic disorders of the red cell membranes. FEBS Letters 1995; 369 (1): 34–7.