

На правах рукописи



Ястребова Екатерина Сергеевна

**ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ЭРИТРОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-
КИНЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ СТИМУЛИРОВАННОГО ГЕМОЛИЗА
И СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

1.5.2. Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), г. Новосибирск

Научный руководитель:

Мальцев Валерий Павлович, доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ревин Виктор Васильевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва» (МГУ им. Н.П. Огарёва), декан факультета биотехнологии и биологии, заведующий кафедрой биотехнологии и биохимии

Зырянов Виктор Яковлевич, доктор физико-математических наук, профессор, Институт физики им. Л.В.Киренского Сибирского отделения Российской академии наук (ИФ СО РАН) – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», руководитель научного направления, заведующий лабораторией молекулярной спектроскопии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита диссертации состоится «27» сентября 2022 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, Красноярск, Академгородок, д.50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики СО РАН и на сайте <http://www.ibp.ru>

Автореферат разослан «__» мая 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,



Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности:

Данная работа посвящена развитию метода сканирующей проточной цитометрии для исследования газотранспортной функции организма человека, определяемой эритроцитами в норме и патологии. Эритроциты являются основным элементом в цепи снабжения кислородом всех клеток организма. Возможность определять их параметры с диагностической целью представляется важной перспективой для своевременного обнаружения медицинских патологий, связанных с нарушением функционирования эритроцитов. К числу таких патологий относятся анемии, наследственный сфероцитоз, миелопролиферативные расстройства, а также гипоксические состояния организма. Наличие последнего нарушения обнаружить на ранних этапах достаточно сложно, хотя оно, в свою очередь, может привести к необратимым осложнениям. Например, локальная гипоксия вызывает процессы воспаления, разрастание и дестабилизацию атеросклеротических бляшек (АБ), в т.ч. неоваскуляризацию (Parma et al., 2017; Tziakas et al., 2010). Это приводит к возрастанию риска негативных последствий в патогенезе атеросклероза, таких как инфаркт и инсульт. Принимая во внимание прогресс в развитии клинических методов диагностирования атеросклероза, дифференцирование стабильных и нестабильных АБ до сих пор остается наиболее сложной диагностической задачей (Sannino et al., 2014). К сожалению, существующие методы определения нестабильности атером (такие как УЗИ, МСКТ, МРТ) недостаточно специфичны и чувствительны, т.к. на развитие нестабильной АБ оказывают влияние процессы, протекающие на клеточном и молекулярном уровнях, которые трудно оценить с использованием только неинвазивных физических методов диагностики. По этой причине исследование механизмов формирования нестабильных атером и поиск новых предикторов дестабилизации АБ являются весьма актуальными задачами (Naghavi et al., 2003; Selwaness et al., 2016). Для раскрытия механизмов дестабилизации атером существенный интерес представляет изучение роли системы крови, а именно: эритроцитов, которые будучи, одним из важнейших элементов микроциркуляции, в значительной мере определяют гемодинамический и метаболический гомеостаз тканей.

С одной стороны, эритроциты, тесно контактируя со всеми тканями и вступая с ними в морфо-функциональные взаимоотношения, могут изменять свои свойства при различных физиологических, пограничных и патологических состояниях, собственной качественной и количественной перестройкой отражая происходящие в организме изменения. С другой стороны, полифункциональная роль эритроцитов в механизмах адаптации и компенсации в

условиях гипоксии, газотранспортных процессах и осуществлении других жизненно важных функций объясняет высокую информативность результатов изучения функциональных изменений в этих клетках.

В рамках усовершенствования методов характеристики газотранспортной функции, осуществляемой эритроцитами, важным этапом является оптимизация метода решения обратной задачи светорассеяния с целью повышения точности определения морфологических характеристик эритроцитов. В свою очередь, разработка способа измерения анионного обмена эритроцитов, который является лимитирующей стадией кислородного обмена в организме, играет ключевую роль в характеристике газотранспортной функции (Hamasaki, 1999). Определение статуса анионного обмена в нативном и активированном состоянии организма открывает возможность для своевременной диагностики гипоксии. Однако на текущий момент не созданы подобные лабораторные системы.

Сульфат магния и нифедипин (блокатор кальциевых каналов) являются широко распространенными медицинскими препаратами (Fawcett and Nicolson, 1999; Lundy, 2009; Timsit-Berthier, 1994). Каждый из них имеет обширный список клинических случаев для применения. Эти препараты используются при токолитической терапии, направленной на снижение риска преждевременных родов (Nassar et al., 2011). В литературе мало изучен вопрос воздействия сульфата магния и нифедипина на анионный обмен эритроцитов, хотя он лимитирует CO_2/O_2 обмен в организме за счет осуществления трансмембранного обмена HCO_3^-/Cl^- . Нарушения в функционировании белка полосы 3 (анионного обменника, в нашей работе мы будем использовать аббревиатуру AE1) могут привести к возникновению гипоксии, которая, в свою очередь, является одной из причин развития риска преждевременных родов. Также нифедипин используют как гипотензивное средство при ряде сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе при атеросклерозе. Воздействие нифедипина на клетки гладкой мускулатуры достаточно хорошо изучено, в то время как вопрос о влиянии на анионный обмен эритроцитов остается открытым. В данной работе предполагается исследовать поведение морфо-функциональных параметров эритроцитов в присутствии сульфата магния и нифедипина для создания полной картины физиологического эффекта препаратов и на этой основе разработать молекулярно-кинетические модели реакции для расчета индивидуальных доз препаратов и количественной оценки наблюдаемых эффектов.

Описание работы газотранспортной функции эритроцитов предполагается в рамках следующих категорий параметров: морфологические (форма, объем, площадь, индекс сферичности), концентрационные (содержание и концентрация гемоглобина, концентрация

эритроцитов) и функциональные (предельная растяжимость мембраны, количество активно работающих анионных обменников в нативном и активированном состоянии), определяющиеся в процессе кинетических экспериментов.

Целью данной работы является разработка и применение молекулярно-кинетических моделей для количественного описания морфологических изменений эритроцитов в процессе стимулированного гемолиза.

В связи с этим решались следующие **задачи**:

1. Оптимизировать метод решения обратной задачи светорассеяния с целью повышения точности определения морфологических характеристик эритроцитов.
2. Разработать молекулярно-кинетическую модель воздействия сульфата магния на анионный обмен эритроцитов.
3. Разработать молекулярно-кинетическую модель реакции между анионным обменником – белком полосы 3 – и нифедипином в процессе индуцированного гемолиза.
4. Установить референсные интервалы для морфо-функциональных параметров популяции эритроцитов на основе экспериментальных данных, полученных на базе условно здоровых доноров.
5. Проверить гипотезу о роли нарушений газотранспортной функции эритроцитов в дестабилизации атером у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий.

Научная новизна:

Впервые разработаны молекулярно-кинетические модели воздействия препаратов на скорость анионного обмена эритроцитов за счет исследования их морфологических изменений в процессе индуцированного гемолиза с помощью технологии сканирующей проточной цитометрии. Обнаружен эффект активации анионного обмена эритроцитов в ответ на добавление сульфата магния и нифедипина, что позволило дополнить список параметров морфо-функциональных свойств эритроцитов еще одним компонентом – количеством активно работающих анионных обменников при конкретной дозе активатора.

Научная новизна задач, направленных на поиск новых факторов и подходов к оценке риска формирования нестабильных атером и развития последующих атеротромботических осложнений, была определена отсутствием удовлетворительных решений, совмещающих высокую предсказательную ценность и доступность. Выдвинута и проверена гипотеза о том, что нарушение газотранспортной функции эритроцитов является одним из факторов риска развития нестабильных атеросклеротических бляшек. Доказано, что повышенная устойчивость к индуцированному гемолизу эритроцитов (предельная растяжимость

мембраны) является статистически значимым фактором для проведения различия между группами со стабильной и нестабильной атеромой (р-критерий <0.05).

Теоретическая и практическая значимость работы:

Теоретическая ценность работы связана с развитием метода решения обратной задачи светорассеяния для эритроцитов по индикатрисе светорассеяния. Предложенные в работе способы усовершенствования процедуры нелинейной регрессии позволяют повысить точность характеристики частиц, достигая субдифракционного разрешения в измерении их пространственных характеристик.

Ценностью данной работы было создание молекулярно-кинетических моделей процесса активации анионного обмена эритроцитов сульфатом магния и нифедипином для модернизации метода диагностики риска развития гипоксии в организме. Разработанный подход к характеристике газотранспортной функции был применен для проверки гипотезы о связи между дестабилизацией атером (негативным последствием атеросклероза) и нарушением в работе кислородного обмена, осуществляющегося посредством эритроцитов. Практической ценностью работы являются впервые установленные референсные интервалы для морфо-функциональных параметров эритроцитов, получаемых на сканирующем проточном цитометре, и статистически достоверное обнаружение ранее неизвестных маркеров дестабилизации атером, таких как устойчивость к индуцированному гемолизу и нативное количество активно работающих анионных обменников.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Удельная рефракция гемоглобина на длине волны 660 нм и при температуре 22°C составляет 0.0023 ± 0.00005 дл/г.

2. Ионы магния Mg^{2+} активируют АЕ1 эритроцитов за счет связывания с внутренней стороны клеточной мембраны. Константа равновесного связывания Mg^{2+} с АЕ1, согласно молекулярно-кинетической модели гемолиза эритроцитов в присутствии сульфата магния, составляет 0.07 мМ.

3. Механизм активации АЕ1 эритроцитов в присутствии нифедипина обусловлен более выраженным ингибированием Ca^{2+} насосов, по сравнению с Ca^{2+} каналами клеточных мембран. Это сопровождается повышением концентрации внутриклеточного кальция, активирующего АЕ1. Константа скорости спонтанной деактивации АЕ1 эритроцитов, рассчитанная из экспериментальных данных с использованием созданной теоретической модели, составляет 10^{-3} мин⁻¹.

4. Устойчивость эритроцитов к индуцированному гемолизу (удельное гемолитическое сопротивление) является важным диагностическим фактором для

выявления статистически значимых различий в группах больных со стабильной и нестабильной атеромой (p -критерий = 0.029).

Методология и методы исследования:

Диссертационная работа выполнялась в лабораторных условиях: при проведении экспериментов применялись хорошо обоснованные биофизические методы получения информации об оптических и морфологических характеристиках эритроцитов. Основным методом исследования являлась технология сканирующей проточной цитометрии (СПЦ), основанная на измерении угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения (индикатрисы) для одиночных частиц. Данный подход, в комбинации с применением передовых методов решения прямой и обратной задачи светорассеяния, обеспечивает не только статистическую точность анализа благодаря высокой скорости измерений (порядка 300 частиц в секунду), но также позволяет детально характеризовать морфологию (размер, форму и показатель преломления) в силу большого объема измеряемой информации, содержащейся в каждой индикатрисе.

Для решения обратной задачи использовалась оптическая модель эритроцита и база данных индикатрис, насчитанная методом дискретных диполей (реализованного в программном пакете ADDA). При данном подходе решение обратной задачи сводится к интерполяции методом ближайших соседей по используемой базе данных теоретических индикатрис. В результате решения для каждого измеренного эритроцита определяется его форма и соответствующие характеристики, включая диаметр, максимальную и минимальную толщину, объем, площадь поверхности, индекс сферичности и спонтанную кривизну, а также показатель преломления, на основании которого оценивается содержание гемоглобина в каждом эритроците. Обработка и анализ получаемых экспериментальных данных осуществлялись с применением статистических методов, адекватных решаемым задачам.

Личный вклад автора: Представленные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии. Автор осуществлял работу на всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов, разработки моделей процесса гемолиза проведения расчетов с последующим анализом до обобщения и интерпретации результатов с подготовкой и оформлением публикаций.

Диссертация соответствует паспорту специальности **1.5.2. Биофизика**. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследований специальности – биофизика клетки.

Степень достоверности работы:

Высокая степень достоверности полученных в диссертационной работе результатов обеспечена корректностью сформулированных целей и задач исследования, что основывается на анализе предшествующего развития данного направления исследований; использованием физически обоснованных методов получения информации о морфологии клеток, таких как сканирующая проточная цитометрия. Кроме того, разработанные нами молекулярно-кинетические модели позволяют рассчитать константы реакций, некоторые из которых были измерены другими авторами альтернативным методом и количественно согласуются с нашими данными.

Апробация результатов:

Результаты исследований были представлены на следующих международных научных конференциях: на конгрессах международного общества по техническим инновациям в лабораторной гематологии ISLN в 2016 (Италия), в 2017 (США); на конгрессах международного общества развития цитометрии ISAC в 2015 (Великобритания), в 2017 (США), 2018 (Чехия); на конгрессе международного общества по вопросам тромбозов и гемостаза в 2019 (Австралия).

Основные положения диссертационного исследования отражены в 23 научных публикациях: из них 9 публикаций в международных журналах, рецензируемых системой WoS, остальные 14 публикаций представлены в тезисах конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, шести глав (первая из которых является обзором литературы), заключения, списка сокращений, списка использованных источников (142 наименования). Объем работы составляет 113 страниц текста с 20 рисунками и 13 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** представлены актуальность выбранной темы, степень ее разработанности, цели и задачи, объект и предмет исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, а также личный вклад автора.

В **первой** главе представлен литературный обзор исследований в области характеристики эритроцитов и их роли в газотранспортной функции организма человека. Оценена степень развития и перспективности выбранного в диссертационном исследовании направления. Рассмотрены принцип работы и возможности сканирующей проточной цитометрии в области характеристики дисперсных систем. Детально рассмотрены физические аспекты и вопросы решения обратных задач светорассеяния с помощью комбинации методов дискретных диполей и теоретической базы данных сигналов эритроцитов.

Вторая глава посвящена экспериментальным основам, на которых базируется диссертационная работа. В разделе 2.1 приведено описание оптической схемы сканирующего проточного цитометра (СПЦ). С помощью данного прибора были проведены все измерения морфологии эритроцитов в нативном состоянии и в процессе воздействия изучаемых препаратов. Угловая зависимость сигнала светорассеяния (индикатриса) регистрируемый прибором, математически выражается следующим образом:

$$I_r(\theta) = \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \phi) + S_{14}(\theta, \phi)] d\phi \quad (1)$$

где S_{11} и S_{14} – это элементы матрицы Мюллера (описание взаимодействия электромагнитного излучения с рассеивающим объектом), θ и ϕ – полярный и азимутальный углы рассеяния. В отличие от классической проточной цитометрии, которая позволяет измерять светорассеяние только в два угла, СПЦ измеряет угловую зависимость в широком диапазоне значений, в данной работе в диапазоне от 10° до 70° , что позволяет решать обратную задачу светорассеяния с высокой точностью. В текущей работе была произведена модернизация СПЦ для возможности одновременной записи индикатрис на двух длинах волн. Впервые каналы записи индикатрис на СПЦ были оснащены следующими лазерами: 40 мВт с длиной волны лазера 660 нм (LM-660-20-S) и 120 мВт с

длиной волны лазера 444 нм (LaserLand, <https://laserland.com/>) для одновременных измерений индикатрис от одиночных частиц на двух длинах волн.

В разделе 2.2 настоящей работы приведено описание получения значения удельной рефракции гемоглобина (SRI). Данная величина используется для расчета концентрации и содержания гемоглобина в эритроците с использованием измеренного показателя преломления клетки. К сожалению, литературные значения SRI варьируются в широком диапазоне от 0.00193 до 0.00267 дл/г (Gienger et al., 2016) для фиксированных длины волны и температуры. Зависимость показателя преломления и удельной рефракции выражается следующим образом:

$$n - n_0 = Hb \times \alpha, \quad (2)$$

где n – показатель преломления эритроцита, n_0 – показатель преломления раствора, Hb – концентрация гемоглобина г/дл, α – удельная рефракция гемоглобина SRI. Для расчета α , согласно формуле (2), потребуются значения показателя преломления и гемоглобина. Двухволновая индикатриса светорассеяния от сферизованных эритроцитов позволила получить значение показателя преломления гемоглобина на длине волны 660 нм с высокой точностью – 1.3966 ± 0.0009 . Если принять среднее содержание гемоглобина в единичном эритроците равным 30 пг, можно рассчитать удельную рефракцию гемоглобина, которая оказывается равной 0.0023 ± 0.00005 дл/г. Это значение было принято для расчета содержания и концентрации гемоглобина в нативных эритроцитах.

Третья глава посвящена усовершенствованию решения обратной задачи светорассеяния для эритроцитов. Это позволило получать морфологические параметры эритроцитов с высокой точностью, которая необходима при вычислении функциональных параметров, таких как скорость анионного обмена и предельная растяжимость мембраны. В разделе 3.1 описан подход глобальной оптимизации методом баз данных для решения обратной задачи светорассеяния, которая состоит в определении параметров модели частицы по известной индикатрисе светорассеяния. Данный метод решения обратной задачи предполагает предварительный расчёт базы данных индикатрис для интерполяции обратного отображения с требуемой точностью. Ранее нашей командой были опубликованы работы, базирующиеся на методе баз данных насчитанной случайным генерированием совокупности параметров. В текущей работе была доказана несостоятельность перехода к регулярной базе данных с межузловой интерполяцией. Так как данный подход приводит к нивелированию особенностей индикатрисы в межузловой

области (сдвигу фаз между реальной и интерполированной индикатрисой). Для корректировки данного эффекта показано, что необходимо насчитывать базу данных с количеством элементов порядка десяти миллионов индикатрис, что приводит к значительному замедлению обработки сигналов. В результате была насчитана регулярная база данных размером 1.1 миллион индикатрис в диапазоне физиологических параметров, а именно диаметр эритроцита $d \in [4 \div 10]$ мкм, минимальная толщина эритроцита $w \in [0.01 \div 7]$ мкм, максимальная толщина $h \in [1.3 \div 7]$ мкм, показатель преломления клетки $RI \in [1.01 \div 1.2]$. Для расчета интенсивности картин светорассеяния так же необходимо учитывать угол ориентации частицы в потоке, он варьировался в диапазоне $\theta \in [62 \div 90]$. В результате был разработан алгоритм обработки индикатрис эритроцитов, основанный на комбинации двух баз данных (регулярной и случайной). Метод использует интерполяцию по показателю преломления, так как от этого параметра возможно получить аналитическую зависимость квадратичного вида в пределе мягких частиц:

$$I(n) = I(n_0) \cdot \left(\frac{n}{n_{cp}} - 1 \right)^2 / \left(\frac{n_0}{n_{cp}} - 1 \right)^2 \quad (3)$$

де $I(n)$ – интенсивность светорассеяния с интересующим значением показателя преломления (n), n_{cp} – показатель преломления среды, $I(n_0)$ – известная интенсивность светорассеяния в точке с заданным показателем преломления n_0 .

В разделе 3.3 проведено тестирование разработанного метода обработки на теоретических индикатрисах эритроцитов. Было обработано 1000 сигналов методом случайной базы данных (ранее используемым методом) и комбинированным методом, на основе случайной и регулярной базы данных с интерполяцией по показателю преломления. Средние значения разницы между диаметром теоретической индикатрисы и значения диаметра полученного в процессе обработке методом случайной базы данных составили 0.14 ± 0.008 мкм, а для предлагаемого в работе комбинированного метода это значение составило 0.09 ± 0.008 мкм. Для показателя преломления комбинированный метод тоже дал улучшение в точности определения параметра, средняя ошибка снизилась с $5.2 \pm 0.2\%$ до $3.8 \pm 0.12\%$. Эти результаты отражены на *Рис. 1*. Далее в разделе 3.4 отражен сравнительный анализ обработки двумя методами экспериментальных данных нативных эритроцитов. Точность предлагаемого в работе подхода по определению объема эритроцита повысилась в двое и достигла медианного значения по популяции 1.2 фл при среднем размере 100 фл.

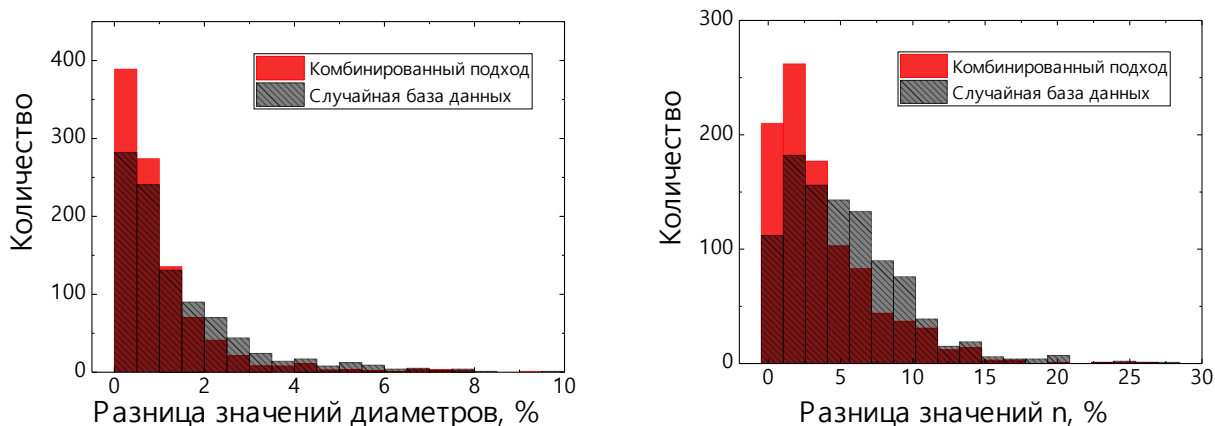


Рис. 1. Представлены гистограммы, отражающие процентное распределение разности между реальным значением теоретической индикатрисы и значением, полученным в процессе решения обратной задачи светорассеяния методом случайной базы данных или разработанным в работе комбинированным подходом.

Раздел 3.5 посвящен описанию процедуры извлечения функциональных параметров (такие как количество активно работающих анионных обменников и предельная растяжимость мембраны) эритроцитов из получаемых экспериментальных сигналов. Данные параметры вычисляются непосредственно из времен сферизации и лизиса популяции эритроцитов в изотоническом растворе 150 мМ хлорида аммония. Однозначная связь между временами лизиса и скоростью анионного обмена и разрушением клетки были опубликованы ранее [10]. В данной работе была получена функция, описывающая изменение числа эритроцитов в процессе индуцированного гемолиза:

$$N(t) = \exp \left[- \frac{t_{\beta}}{\tau_0} \left(\left(\frac{t-t_0}{t_{\beta}} \right)^{\frac{1}{2}} \exp((t-t_0)/t_{\beta}) + \operatorname{Erfi} \left(\left(\frac{t-t_0}{t_{\beta}} \right)^{\frac{1}{2}} \right) \right) \right] \quad (4)$$

здесь t_{β} - время от момента начала сферизации до полного разрушения популяции, t_0 - время начала сферизации эритроцитов, τ_0 - внутренняя характеристика популяции. Выражение получено с учетом спонтанного разрушения эритроцитов и функции мембранного натяжения.

В главе 4 представлена работа, направленная на построение молекулярно-кинетических моделей воздействия сульфата магния и нифедипина на морфо-функциональные свойства эритроцитов. Раздел 4.1 включает в себя теоретическое обоснование модели для сульфата магния.

Магний является вторым самым распространенным катионом в эритроците и его концентрация составляет 2 мМ, но содержание его в свободной (несвязанной фракции)

составляет только 0.2 mM (Grubbs, 2002a). Многие ферменты для запуска своей каталитической активности требуют присутствия иона Mg^{2+} (Beydemir et al., 2000a). Есть данные подтверждающие воздействия магния на ионный транспорт кальциевых, натриевых и калиевых каналов, а также о его влияние на липидное окисление мембран эритроцитов (Antonov and Johnson, 1999; Bara et al., 1993; Beydemir et al., 2000b). В литературе показано наличие модификации анионных обменников на эритроците вследствие увеличения внутриклеточной концентрации магния (Barbul et al., 1999; Guiet-Bara et al., 2003). Скорость потока анионов SO_4^- , которые осуществляют свой транспорт непосредственно через анионные обменники, увеличивается на момент высокой концентрации внутриклеточного магния (Teti et al., 2002). В связи с этим представляет интерес получить количественную оценку влияния сульфата магния на скорость анионного обмена эритроцитов, осуществляемого посредством белка полосы 3.

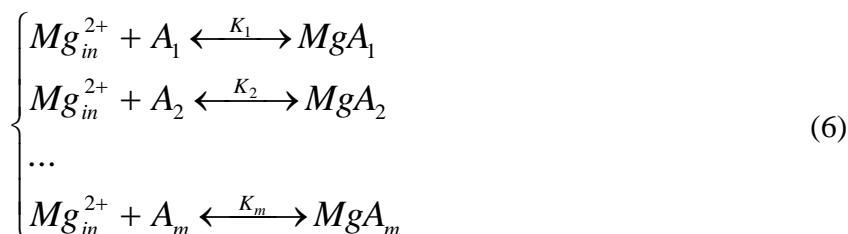
Модель включает в себя следующие три этапа:

- 1) Поток ионов магния Mg^{2+} во внутриклеточную среду эритроцита согласно кинетики Михаэлиса-Ментен (Chanson et al., 2005), (Flatman, 1991a),



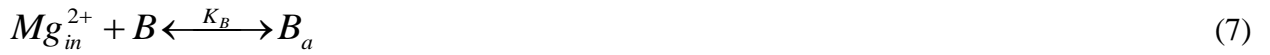
здесь M_{ch} является ионным каналом через которые диффундируют ионы магния; K_m и k_m соответствующие константы реакции Михаэлиса-Ментен и максимальная скорость реакции выражается следующим образом $V_{max}=k_m[M_{ch}]$;

- 2) Уравнение баланса полного количества внутриклеточного магния, который как распределен между различными клеточными компонентами, так и находится в свободном состоянии (Bock et al., 1991), (Grubbs, 2002b), (Günther, 2007), (Raftos et al., 1999),



где A_i ($i=1, \dots, m$) компоненты цитоплазмы связывающиеся с магнием, а K_i соответствующие им константы реакций;

- 3) Заключительная стадия представляет собой переход анионного обменника в активированное состояние в результате связывания/реакции со свободным внутриклеточным магнием Mg^{2+} (Weber and Voelter, 2004), (Weber et al., 2004)



где В и В_а неактивированная и активированная в результате воздействия иона магния форма анионного обменника, соответственно; К_В – скорость реакции активации белка.

В рамках нашей модели предполагается, что константы реакций не зависят от физиологического состояния доноров (отсутствие и наличие признаков гипоксии), хотя концентрации метаболитов вполне могут в реальности незначительно варьироваться. Из реакционной схемы (7)(7) количество активных анионных обменников на одиночном эритроците можно представить как

$$B_a = \frac{B_0}{1 + \frac{K_B}{[Mg_{in}^{2+}]}} \quad (8)$$

где В₀ – полное количество анионных обменников на мембране эритроцита. С учетом используемых концентрационных приближений, получаем следующую зависимость:

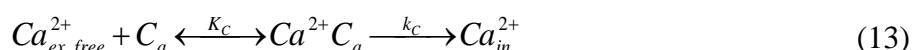
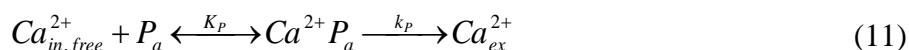
$$B_a = \frac{B_0}{1 + \frac{K_B}{[N] + \frac{V_{max} [Mg_{out}^{2+}]}{([Mg_{out}^{2+}] + K_m) / V} t - \left[1 + \frac{[DPG]_0}{K_{DPG}} \right] / V + [ATP]_0}} \quad (9)$$

Данное выражение отражает зависимость количества активированных анионных обменников от внеклеточной концентрации ионов магния, а также от времени нахождения эритроцита в среде с соответствующим содержанием магнезии. Отсюда видно, что регулируя внеклеточную концентрацию магния в растворе, в котором находятся эритроциты, можно узнать ее оптимально значение для насыщения анионных обменников. Функция (9) не имеет экстремумов и на бесконечности стремится к значению В₀. Для каждого отдельного донора распределение данного параметра (В_а) как и его средние значения будут отличаться. Следовательно, расчет индивидуальной дозы ионов Mg²⁺ для достижения определенной степени активации анионных обменников возможно произвести согласно разработанной молекулярно-кинетической модели.

В разделе 4.2 для количественного анализа экспериментальных данных *in vitro* была предложена модель активации АЕ1 нифедипином, которая состоит из следующих трех частей (скобки в уравнениях ниже указывают концентрацию вещества, в противном случае подразумевается общее количество вещества):

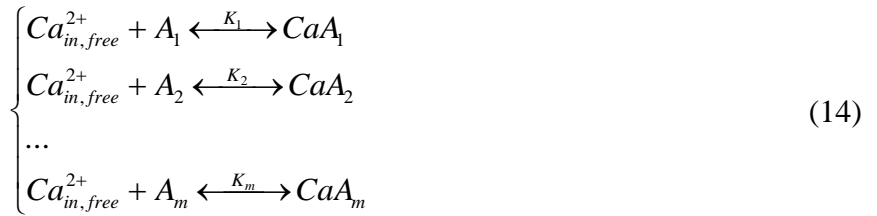
(1) Известно, что схема реакции Михаэлиса-Ментен хорошо описывает (коэффициент Хилла ~ 1) кинетику основных кальциевых каналов (Corry et al., 2001) и насосов

(Kubitscheck et al., 1995) в эритроцитах, и соответствующие константы реакции имеются в литературе (Bogdanova et al., 2013; Tiffert et al., 1988). Поэтому накопление внутриклеточного Ca^{2+} можно описать (при условии большего ингибирования нифедипином РМСА по сравнению с кальциевыми каналами) следующими реакциями:



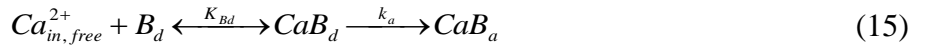
где I - ингибитор (нифедипин); P_a и P_i - активный и неактивный кальциевый насос РМСА, соответственно; K_{IP} - константа равновесного связывания нифедипина с РМСА; $Ca_{in,free}^{2+}$ является внутриклеточным свободным Ca^{2+} ; Ca_{ex}^{2+} - полная внеклеточная концентрация; K_P и k_P являются константами в рамках кинетики Михаэлиса-Ментен для РМСА; C_a и C_i - активный и ингибированный кальциевый канал; K_{IC} - константа равновесного связывания нифедипина с кальциевым каналом; K_C и k_C являются константами Михаэлиса-Ментен для кальциевого канала. Сообщалось, что для эритроцитов человека $K_P = 4$ мкМ, и максимальная скорость выведения Ca^{2+} на единицу объема может варьироваться в популяции эритроцитов для одного донора в диапазоне $[4 \div 60]$ мМ/(клетки·час) (Bogdanova et al., 2013; Schatzmann, 1973; Tiffert and Lew, 2011). Поскольку концентрация свободного Ca^{2+} в эритроцитах $[Ca_{in,free}^{2+}] \sim 60$ нМ $\ll K_P$, равновесие в реакции (11) далеко от насыщения. В отсутствие нифедипина внутриклеточная концентрация Ca^{2+} поддерживается в эритроцитах благодаря балансу между внутренним притоком через каналы и выведением за счет работы насоса РМСА. Более сильное ингибирование РМСА, чем кальциевых каналов (нифедипином), приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

(2) Общее внутриклеточное содержание Ca^{2+} распределяется между свободной и связанной формами (буферизация кальция), что соответствует набору равновесных реакций (Tiffert et al., 2003), который используется для определения концентрации свободных ионов кальция в клетке:



где ($i=1, \dots, m$) – внутриклеточные компоненты, вступающие в реакцию с кальцием (белки, фосфолипиды и неорганические фосфаты); K_1, K_2 и K_m - соответствующие равновесные константы реакции;

(3) Активация и деактивация АЕ1 — это динамический процесс, который формально можно описывать реакциями Михаэлиса-Ментен (активация обусловлена комплексообразованием АЕ1 с ионом Ca^{2+} , в то время как диссоциация комплекса приводит к деактивации АЕ1), что согласуется с общим теоретическим соображением по активации киназ и фосфатаз внутри эритроцита:



где B_d и B_a деактивированные и активированные АЕ1 соответственно; CaB_d и CaB_a являются комплексами связанными Ca^{2+}_{in} с B_d и B_a , соответственно; K_{Bd} и K_{Ba} являются константами равновесия для соответствующих комплексов; k_a и k_d являются константами скорости активации и деактивации (относящимися к действию фосфатаз и киназ, значения которых могут варьироваться в зависимости от конкретного эритроцита, но предполагаются неизменными во времени).

Математическое моделирование реакционной системы (10) - (17) при условии низких (по сравнению с концентрацией для ситуации 50% ингибирования) концентраций нифедипина в условиях наших экспериментов и известных литературных данных приводит к следующим итоговым уравнениям:

$$B_e = B_{e0} + B_{eadd}(1 - \exp(-k t)) \quad (18)$$

$$k \approx \tilde{k} + \alpha[I] \quad (19)$$

$$B_{eadd} \approx \gamma[I] \quad (20)$$

$$\lambda = \frac{k_a [Ca_{in,free}^{2+}]_0}{k_d K_{Bd}} \quad (21)$$

$$\alpha = \lambda k_d (K_{IP}^{-1} - K_{IC}^{-1}) \quad (22)$$

$$B_e = \varepsilon B'_a + B'_d = (\varepsilon - 1)B'_a + B_0 \quad (23)$$

$$\gamma = \frac{(\varepsilon - 1)\lambda B_0 (K_{IP}^{-1} - K_{IC}^{-1})}{(\lambda + 1)^2} \quad (24)$$

где B_e – регистрируемое количество анионных обменников (полученное в наших экспериментах), то есть «стандартных» (Chernyshev et al., 2008) обменников с определенными значениями их констант Михаэлиса-Ментена, связанных с определенным уровнем активности АЕ1; $[I]$ концентрация нифедипина; B_{e0} , α и γ также параметры эритроцитов, которые не зависят от времени (во время экспериментов) и от концентрации нифедипина (в пределах выбранного диапазона). Уравнение (22) использовалось в этой работе для обработки экспериментальных данных с целью получения параметров, которые затем были проанализированы с использованием линейных уравнений (23) - (24) (при условии низкой концентрации нифедипина).

В **Главе 5** идет повествование об экспериментальном подтверждении предложенных в главе 4 молекулярно-кинетических моделей. В разделе 5.1 данной работы приведено подробное описание пробоподготовки для кинетических экспериментов, в которых изучаемыми препаратами являлись сульфат магния и нифедипин. Для определения количества активированных анионных обменников в 300 мкл венозной крови добавляется 75 мкл раствора Adalat [Bayer, Германия; нифедипин (5 мг), этанол (7,5 г) и макрогол (7,5 г) в воде (35 г и после чего пробу выдерживают в течение часа до достижения конечной стадии активации кинетики. После этого 5 мкл активированной смеси добавляли к 500 мкл раствора NH₄Cl, чтобы инициировать изотонический гемолиз на СПЦ. Полистирольные микросферы со средним размером 4 мкм (Molecular Probes, США) присутствовали в образцах для инициализации СПЦ.

В разделе 5.2 представлена экспериментальная апробация молекулярно-кинетической модели, разработанная для описания воздействия сульфата магния на морфо-функциональные свойства эритроцитов. В разделе 5.2.2 представлена экспериментальная работа по изучению изменения морфологии эритроцитов от различного времени нахождения в растворах с разной концентрацией сульфата магния. Разработанная молекулярно-кинетическая модель, в частности уравнение (8) была использована для

аппроксимации временных зависимостей количества анионных обменников, полученных в ходе экспериментов *in vitro*. Сравнение экспериментальных данных с предложенной теорией позволяет получить для каждого измерения популяции эритроцитов следующие параметры: максимальное число анионных обменников на эритроцитарной мембране, текущая доля активных белков-транспортеров у пациента, а также необходимое время для активации анионной работы при добавлении магнезии. Если взять для расчета стандартные литературные значения для следующих величин [АТФ]~165 мМ, [DPG]~4.5 мМ, $K_{DPG}=1.2$ мМ, $N/V\sim 2$ мМ (концентрация ионов магния присутствующая при равновесном состоянии), а так же средние значения для параметров $\gamma\sim 0.5$ и $\tau\sim 40$ мин⁻¹, полученные из обработки экспериментальных данных, можно оценить (используя уравнение (9)) значения константы связывания иона магния с цитоплазматическим доменом белка полосы $K_B \sim 0.07$ мМ и константу скорости потока $MgSO_4$ $V_{max}\sim 0.01$ мМ/мин. Данная оценка позволяет получить значение параметра V_{max} для эритроцитов человека, лежащие в описываемом литературой диапазоне в зависимости от исследуемого донора – 35 -500 мкМ/час (Flatman, 1991b). В свою очередь для параметра K_B в литературе нет данных по прямому измерению данной величины, хотя значения константы диссоциации иона Mg^{2+} (в диапазоне от 0.01 до 0.1 мМ) согласуются с приведенными выше оценками.

Раздел 5.3 посвящен экспериментальной апробации молекулярно-кинетической модели воздействия нифедипина на белок АЕ1. На Рис. 2 показана подгонка экспериментальных данных предложенной моделью. По определенным с известной точностью параметрам в рамках модели можно получить значения для следующих величин: λ , k_d (скорость спонтанной деактивации), $k_a[Ca_{in,free}^{2+}]_0$ (скорость стимулированной активации), ε (эффективность активации), B_0 (количество стандартных обменников). Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1. ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ, РАССЧИТАННЫЕ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ Рис. 2 и КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИЙ, ИЗВЕСТНЫХ ИЗ ЛИТЕРАТУРЫ.

Параметр	Донор 1	Донор 2
λ	14 ± 7	23 ± 15
$k_d, 10^{-3}$ мин ⁻¹	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.2
$k_a[Ca_{in,free}^{2+}]_0, \text{ мин}^{-1}$	0.30 ± 0.15	0.15 ± 0.10
ε	36 ± 18	30 ± 20
$B_0 (\times 10^6)$	0.010 ± 0.005	0.019 ± 0.010

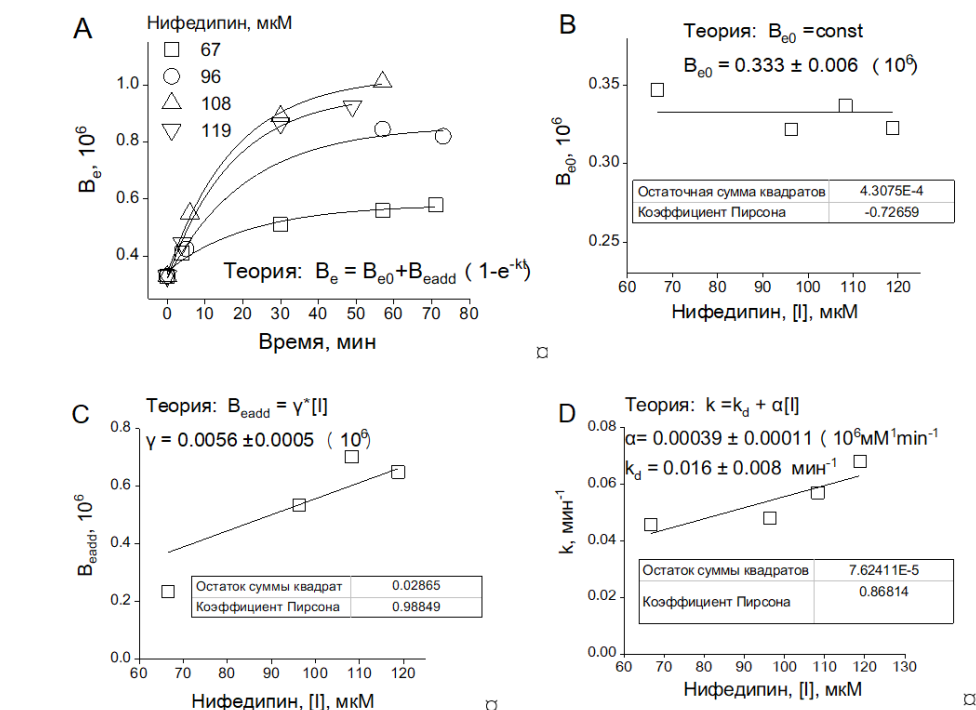


Рис. 2. Обработка экспериментальных данных для донора 1 (символы – эксперимент, линии – теория): А) подгонка по уравнению (18), В) подгонка по постоянной, С) подгонка по уравнению (20), D) подгонка по уравнению (19).

Полученные результаты показывают, что скорость обмена $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ через АЕ1 увеличивается во времени в присутствии внеклеточного нифедипина (блокатора кальциевых каналов) в крови. Было установлено, что скорость активации АЕ1 намного ниже, чем известные в литературе: 1) скорость связывания нифедипина и 2) скорость мембранного транспорта Ca^{2+} , и, следовательно, эти процессы не ограничивают наблюдаемую динамику активации. Такой вывод подтверждается также наблюдаемыми доказательствами того, что скорость активации АЕ1 увеличивается с увеличением концентрации нифедипина.

Глава 6 посвящена определению референсных интервалов для предлагаемых параметров эритроцитов и проверке гипотезы, согласно которой нарушение газотранспортной функции эритроцитов, вследствие изменения морфологических и функциональных характеристик клеток, является одним из факторов риска дестабилизации атером и развития атеротромботических осложнений.

Следующие морфологические характеристики были определены на основе решения обратной задачи светорассеяния с помощью СПЦ: диаметр, минимальная и максимальная толщины эритроцита, объем, площадь поверхности, спонтанная кривизна, индекс

сферичности. Построены распределения по морфологическим параметрам для 40 доноров. Для каждого параметра были получены средние значения, стандартное отклонение и асимметрия распределения. В эту категорию параметров был добавлен показатель: степень соответствия между идеальной физической формой зрелого нативного эритроцита и экспериментально измеренным сигналом. Наконец, донорские эритроциты были охарактеризованы по двадцати шести показателям, относящимся к их морфологии. В результате мы проанализировали образцы 40 доноров и определили 9, 26, и 8 показателей эритроцитов по концентрации/содержанию гемоглобина, морфологии и функциональным категориям соответственно.

Множество факторов, которые могут быть названы факторами риска развития атеросклероза - нарушениями липидного и углеводного обмена в организме (Unruh et al., 2015) - снижают способность эритроцитов к транспорту кислорода. К ним относятся повышенное содержание гликированного гемоглобина, затруднение диффузии кислорода через заблокированную холестерином мембрану эритроцитов (da Silva Garrote-Filho et al., 2017), изменение формы клеток, снижение их деформируемости. Это приводит к риску возникновения гипоксического состояния в местах с повышенной кислородной потребностью, к которым относятся атеросклеротические бляшки. Локальная гипоксия вызывает ряд негативных факторов, запускающих процесс воспаления и провоцирующих разрастание и дестабилизацию АБ, в т.ч. неоваскуляризацию (Parma et al., 2017). Попадая в очаг воспаления атеромы, характеризующийся повышенной секрецией множества активных молекул, эритроциты подвергаются лизису, высвобождая холестерин и гемоглобин, которые провоцируют мессенджеры воспаления и запускают новые цепочки процессов, приводящих к разрастанию атеромы и повышающих риск ее дестабилизации, включая гибель клеток и разрастание некротического ядра АБ и экспрессию матричных металлопротеиназ (Buttari et al., 2015; Jeney et al., 2014).

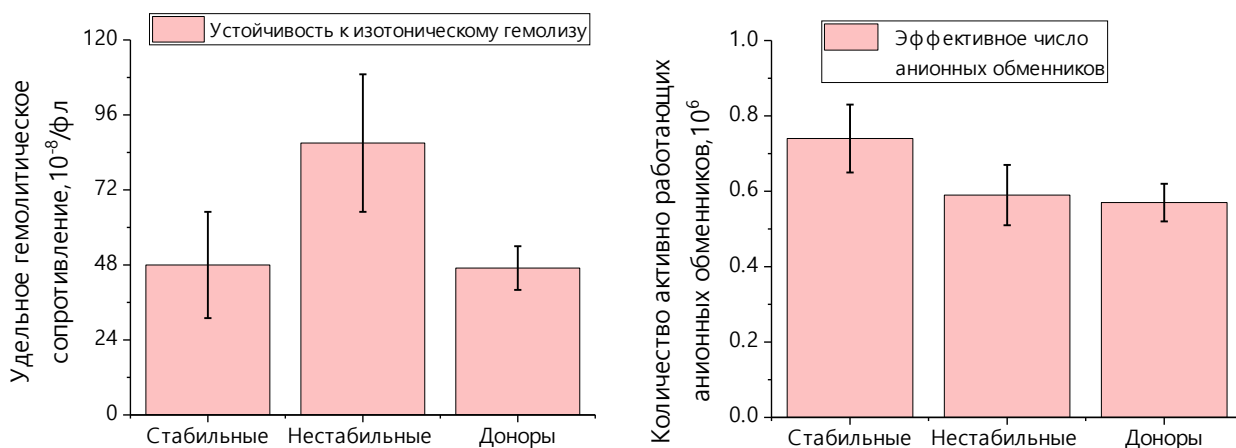


Рис. 3. На левом графике для исследуемых групп представлены средние значения параметра эритроцитов, характеризующего гемолитическое сопротивление (устойчивость к гемолизу), на правом графике - количество активно работающих анионных обменников.

В ходе работы было проведено клиническое обследование 60 пациентов с диагностированным атеросклерозом брахиоцефальных артерий, включая сбор результатов общего (клинического) анализа крови и результаты оценки доли гликированного гемоглобина. Помимо клинического обследования проводилось патоморфологическое исследование атероматозных масс, удаленных во время каротидной эндартерэктомии из бифуркации сонной артерии у данных пациентов, с целью оценки стабильности удаленных атером. В результате для проведения сравнительного анализа за весь период работы насчитывается 40 условно здоровых доноров и 60 пациентов с атеросклерозом, из которых у 22 выделена стабильная атерома и, соответственно, 38 пациентов имели нестабильные атеросклеротические бляшки.

На основе имеющихся данных был проведен анализ морфологических характеристик популяции эритроцитов между условно здоровыми донорами и пациентами, а также внутри групп со стабильной и нестабильной атеромой.

Рассмотрение функциональных характеристик эритроцитов привело к следующим заключениям. Удельное гемолитическое сопротивление мембраны оказалось выше у пациентов с диагностированной нестабильной атеромой *Рис. 3*. Медианные по данному параметру получились следующие: пациенты с нестабильной атеромой $6.7 \times 10^{-8}/\text{фл}$, пациенты со стабильной атеромой $2.5 \times 10^{-8}/\text{фл}$ и условно здоровые доноры $3.6 \times 10^{-8}/\text{фл}$. В результате, по параметру удельного гемолитического сопротивления, который отражает устойчивость эритроцитов к индуцированному гемолизу, можно достоверно ($P=0.029$) различить выборки пациентов с различными типами атером согласно критерию Манна –

Уитни. Данное наблюдение, возможно, связано с модификацией состава мембраны эритроцитов, приводящей к изменению ее структурно-функциональных свойств. Это подтверждает исследуемую гипотезу о корреляции между нарушениями параметрами газотранспортной функцией эритроцитов и риском дестабилизации атером.

Основные результаты и выводы

1. Оптимизирован метод решения обратной задачи светорассеяния для эритроцитов. Комбинированная базы данных (с применением интерполяции по показателю преломления) позволила достигнуть медианного значения ошибки по объему для популяции 1.2 фл (увеличение точности на 65%).

2. Модернизирована оптическая часть СПЦ для одновременного измерения сигналов светорассеяния одиночных частиц на двух длинах волн. На основе зарегистрированных сигналов двухволновой индикатрисы от сферизованных эритроцитов получено значение для удельной рефракции гемоглобина – 0.0023 ± 0.00005 дл/г (на длине волны 660 нм и при температуре 22°C).

3. Экспериментально показано увеличение количества активных белков АЕ1 у пациенток в процессе терапии сульфатом магния с целью снижения риска развития преждевременных родов.

4. Разработана молекулярно-кинетическая модель взаимодействия ионов магния с анионными обменниками эритроцитов. Предложены следующие параметры для характеристики эритроцитов: 1) доля активных белков АЕ1; 2) максимальное количество АЕ1, которое возможно активировать; 3) характерное время активации АЕ1. Предложенные параметры представляют минимально возможный набор параметров для качественного объяснения и количественного описания полученных экспериментальных данных по кинетике изменения скорости работы анионного обменника.

5. Проведена экспериментальная верификация разработанной молекулярно-кинетической модели воздействия нифедипина на ионный обмен. Установлен непрямой путь активации анионного обмена посредством нифедипина и ионов кальция. Получены численные результаты по эффективности (~30 %) и скорости активации (~0.3 мин⁻¹), а также деактивации (~10⁻³ мин⁻¹) АЕ1 в эритроцитах.

6. Впервые установлены референсные значения для предложенных в работе морфо-функциональных параметров эритроцитов на 40 условно здоровых донорах.

7. Проверена гипотеза о роли нарушений газотранспортной функции эритроцитов в дестабилизации атером у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий и впервые обнаружено статистически достоверное повышение устойчивости мембраны эритроцитов

к индуцированному гемолизу в группе пациентов с нестабильной атеромой (с р-уровнем значимости = 0.029), что позволяет использовать этот параметр для выбора метода лечения пациентов, страдающих атеросклерозом.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, RSCI, Scopus и РИНЦ.

1. Gilev K.V., Yurkin M.A., **Chernyshova E.S.**, et al. Mature red blood cells: from optical model to inverse light-scattering problem, *Biomed. Opt. Express* 7, 1305–1310 (2016). 10.1364/BOE.7.001305. [IF = 3.337 Q1 (JCR 2016)].
2. **Chernyshova E.S.**, et al. Influence of magnesium sulfate on HCO₃/Cl transmembrane exchange rate in human erythrocytes, *J. Theor. Biol.* 393, 194–202 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.12.023>. [IF = 2.113 Q1 (JCR 2016)].
3. Gilev K.V., **Yastrebova E.S.**, et al. Advanced consumable-free morphological analysis of intact red blood cells by a compact scanning flow cytometer, *Cytometry A* 91, 867–873 (2017). DOI: 10.1002/cyto.a.23141. [IF = 3.222 Q2 (JCR 2016)].
4. Romanov A.V., Konokhova A.I., **Yastrebova E.S.**, et al. Spectral solution of the inverse Mie problem. *J Quant Spectrosc Radiat Transfer* 200:280–94 (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jqsrt.2017.04.034>. [IF = 2.42 (JCR 2017)].
5. Konokhova A.I., **Yastrebova E.S.**, et al. Ultimate peculiarity in angular spectrum enhances the parametric solution of the inverse Mie problem // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 235, 204-208 (2019) DOI: 10.1016/j.jqsrt.2019.06.034 IF - 2.955 Q1 (JCR 2018).
6. **Yastrebova E.S.**, et al. Proposed Dynamics of CDB3 Activation in Human Erythrocytes by Nifedipine Studied with Scanning Flow Cytometry // *Cytometry Part A* (2019) DOI: 10.1002/cyto.a.23918 IF - 3.43 Q2 (JCR 2018).
7. Romanov A.V., Konokhova A.I., **Yastrebova E.S.**, et al. Sensitive detection and estimation of particle non-sphericity from the complex Fourier spectrum of its light-scattering profile // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2019. V. 235. P. 317–331. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2019.07.001. Q1. IF=2.955.
8. **Yastrebova E.S.**, et al. Spectral approach to recognize spherical particles among non-spherical ones by angle-resolved light scattering. *Optics and Laser Technology* 135, 106700 (2021) DOI: 10.1016/j.optlastec.2020.106700 IF= 3.233 Q1 (JCR 2019).
9. **Yastrebova E.S.**, et al. Dual-wavelength angle-resolved light scattering in analysis of particles by scanning flow cytometry. *Journal of Optics* (2021) DOI: 10.1088/2040-8986/ac1b7b IF= 2.516 Q2 (JCR 2020).