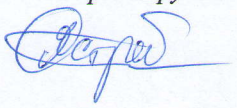
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ
ИМ. В.В. ВОЕВОДСКОГО
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
Мальцев В.П.

Новосибирск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 4
Глава 1. Обзор литературы 11
1.1. Общая характеристика эритроцитов 11
1.2. Анионный обмен и газотранспортная функция 14
1.3. Изотонический гемолиз эритроцитов 17
1.3.1. Первая стадия 21
1.3.2. Вторая стадия 25
1.3.3. Третья стадия 26
1.4. Современные методы изучения эритроцитов 27
1.5. Роль препаратов в медицине 32
1.5.1. Сульфат магния 34
1.5.2. Нифедипин 35
1.6. Результаты главы 37
Глава 2. Инструментальная основа технологии сканирующей проточной цитометрии 39
2.1. Сканирующий проточный цитометр 39
2.2. Определение оптической константы гемоглобина 41
2.3. Результаты главы 43
Глава 3. Обратные задачи светорассеяния и биокинетики 44
3.1. Параметризация формы эритроцита 44
3.2. Метод баз данных 46
3.3. Тестирование алгоритма обработки 48
3.4. Проверка метода на экспериментальных данных 51
3.5. Измерение анионных обменников 53
3.6. Результаты главы 3 56
Глава 4. Молекулярно-кинетические модели воздействия препаратов на анионный обмен в эритроцитах 57
4.1. Сульфат магния 57
4.2. Нифедипин 62
4.3. Результаты главы 70

Глава 5. Определение функциональных характеристик эритроцитов с использованием молекулярно-кинетических моделей 72
5.1. Пробоподготовка 72
5.2. Экспериментальная апробация модели сульфата магния 75
5.2.1. Результаты in situ 75
5.2.2. Результаты in vitro 79
5.3. Экспериментальная апробация модели нифедипина 81
5.4. Результаты главы 86
Глава 6. Морфо-функциональные свойства эритроцитов в норме и патологии 87
6.1. Референсные значения 87
6.1.1. Морфологические параметры 87
6.1.2. Функциональные параметры 90
6.2. Сравнительный анализ газотранспортной функции эритроцитов среди различных групп 92
6.3. Результаты главы 98
Результаты и выводы 99
Список используемых терминов и аббревиатур 101
Список литературы 102

Введение

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 [1,2]. 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 [3]. 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 [4,5]. 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 характеризации 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 характеризации газотранспортной функции [6]. 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 [7–9]. Каждый из них имеет обширный список клинических случаев для применения. Эти препараты используются при токолитической терапии, направленной на снижение риска преждевременных родов [10]. 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.

Цели и задачи диссертационной работы:

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 (p-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 характеризации 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 характеризации 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 22ºC составляет 0.0023 ± 0.00005 дл/г.
2. Ионы магния Mg^{2+} активируют AE1 эритроцитов за счет связывания с внутренней стороны клеточной мембраны. Константа равновесного связывания Mg^{2+} с AE1, согласно молекулярно-кинетической модели гемолиза эритроцитов в присутствии сульфата магния, составляет 0.07 мМ.
3. Механизм активации AE1 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 AE1. Константа скорости спонтанной деактивации AE1 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 и апробация результатов:

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.

Результаты исследований были представлены на следующих международных научных конференциях: на конгрессах международного общества по техническим инновация в лабораторной гематологии ISLH 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.

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.

Глава 1. Обзор литературы

В данном разделе приведены необходимые для понимания работы сведения о роли эритроцитов в регуляции кислородного обмена, методах воздействия на функционирование анионного обмена, а также информация о современных подходах к изучению свойств эритроцитов.

1.1. Общая характеристика эритроцитов

Для детальной харатеризации эритроцитов с помощью сканирующего проточного цитометра необходимо иметь точное представление об оптической модели изучаемого объекта (Рис. 1). С точки зрения физики и оптики эритроцит представляет собой двояковогнутый диск, заполненный гомогенным раствором гемоглобина, которым обуславливается показатель преломления клетки на определенной длине волны [11]. Пространственная конфигурация эритроцитов (дискоциты) обладает площадью поверхности большей по сравнению с клетками сферической формы такого же объема. Это способствует наиболее эффективному газообмену между клеткой и внеклеточной средой. Более того, соответствующая форма, а также особенности строения мембраны и цитоскелета обеспечивают пластичность эритроцитов при прохождении ими узких капилляров.

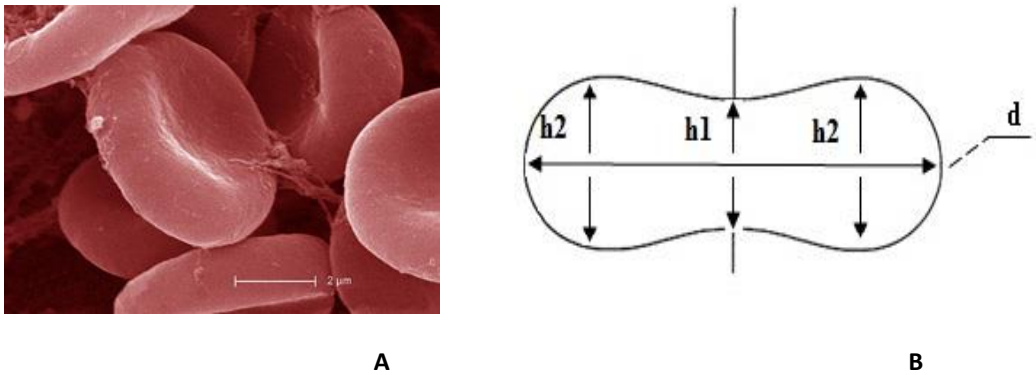


Рис. 1. Эритроциты (A) и определяющие их форму параметры (B).

Однако форма эритроцита может варьироваться в зависимости от времени циркуляции в организме (в среднем не более 120 дней) и от наличия патологий [12]. В норме в кровотоке присутствует не более 1% сферических эритроцитов, но при воздействие различных факторов данное значение может меняться. Важно уметь

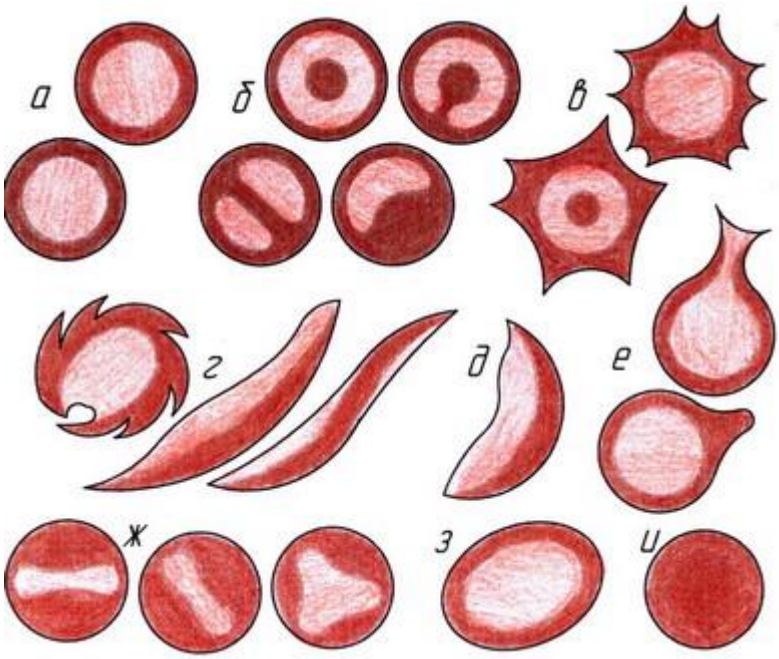


Рис. 2. Виды эритроцитов: а – дискоциты; б – платициты; в – акантоциты; г – дрепаноциты; д –менискоциты; е – шизоциты; ж –стоматоциты; з – эллиптоцит); и – сфероциты (В).

отслеживать и статистически достоверно определять долю клеток, максимально приближенных к сферическим, для своевременной регистрации патологии, способной привести к локальной или общей гипоксии организма.

Таблица 1. Диапазоны значений морфологических параметров эритроцитов.

Диаметр, мкм	Толщина, мкм	Объем, фл	Гемоглобин, г/дл
5.7÷10	1.5÷4.5	47÷168	25÷40

Диаметр эритроцита в среднем по популяции равен 6-7 мкм. Весь наблюдаемый физиологический диапазон значимых морфологических параметров представлен в таблице 1 [13,14]. Форма эритроцита служит поддержанию большей площади поверхности для эффективной регуляции газотранспортного обмена. Свойства мембраны клетки должны обеспечивать обратимую деформацию при прохождении узких капилляров. Схематическое представление основных структурных элементов мембраны эритроцита изображено на Рис. 3. Эритроцит обладает развитым мембранным комплексом и совершенным рецепторным аппаратом. Мембрана

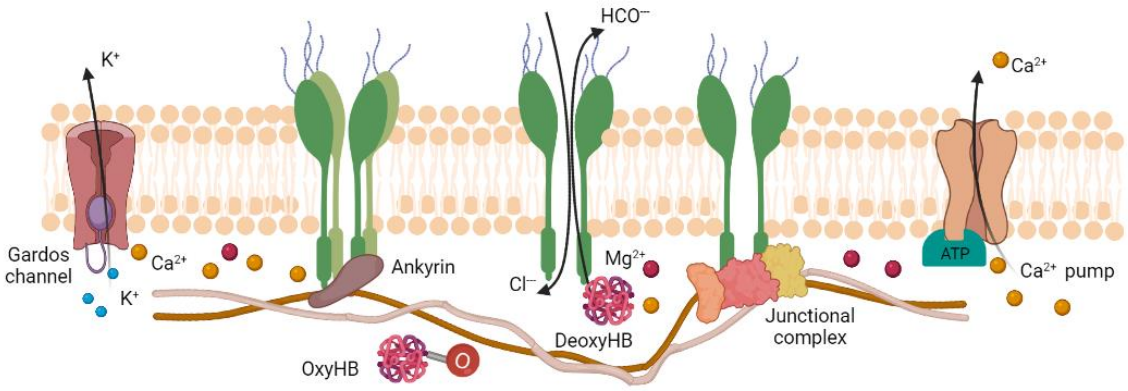


Рис. 3. Схематическое представление структуры мембраны эритроцита.

является проницаемым барьером с высокой степенью избирательности, обеспечивающей поддержание клеточного гомеостаза при различных значениях химического состава внутри- и внеклеточной среды [15]. Транспорт веществ через мембрану совершается различными способами в зависимости от их химических свойств и стереометрической формы: диффузией, путем проникновения через липидные участки либо взаимодействуя со встроенными в мембрану белками-переносчиками. Примерно 60% массы мембранных белков приходится на спектрин, гликофорин и белок полосы 3 [16,17].

Спектрин – периферический мембранный белок, представляющий собой длинную, тонкую, гибкую фибриллу и являющийся основным белком цитоскелета эритроцитов (Рис. 3). В результате взаимодействия спектрина со специфическими белками на цитоплазматической поверхности эритроцитов образуется гибкая сетевидная структура, которая обеспечивает прохождение клеток через узкие капилляры сосудов. Это способствует обратимой деформации эритроцитов в процессе циркуляции по различным капиллярам. Значение характерных наблюдаемых предельных растяжений мембраны составляет от 2 до 4% площади поверхности [18,19].

Мембрана эритроцита содержит в себе порядка 10^6 трансмембранных белков полосы 3, осуществляющих лимитирующую стадию CO_2/O_2 обмена в организме.

Концентрация красных кровяных телец в норме у здоровых людей варьируется от 3.9 до 5.5×10^{12} кл/л.

1.2. АНИОННЫЙ ОБМЕН И ГАЗОТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ

Углекислый газ внутри эритроцитов связывается с гемоглобином и образует карбогемоглобин [20], что снижает степень сродства гемоглобина к кислороду (эффект Бора). Наоборот, если в циркулирующей крови уровень диоксида углерода низкий, CO_2 высвобождается из связанной с гемоглобином формы, тем самым увеличивая сродство кислорода к гемоглобину. Превалирующая часть углекислого газа внутри эритроцита содержится в форме иона HCO_3^- [21], что определяет его выведение из клеток посредством HCO_3^-/Cl^- обмена через анионный обменник – белок полосы 3. Вследствие низкой скорости переноса иона HCO_3^- [22] через мембрану по сравнению с диффузией молекул CO_2 и O_2 с помощью аквапаринов этот процесс является лимитирующей стадией CO_2/O_2 обмена. Скорость переноса анионов через эритроцитарную мембрану соответствует скорости потребления кислорода организмом [23].

Посредством эритроцитов в организме осуществляется лимитирующая стадия кислородного обмена. Этот этап заключается в процессе выведения углекислого газа из эритроцита в виде иона HCO^-_3 через трансмембранный белок полосы 3 [6,24]. Работа данного белка регулировать транспорт анионов через мембрану эритроцита, поскольку именно в форме аниона HCO_3^- содержится углекислый газ внутри эритроцита (Рис. 4), претерпевший реакцию с карбоангидразой в условиях внутриклеточного pH в диапазоне 7÷8. На одном эритроците присутствует порядка 10^6 анионных обменников, и в совокупности они занимают четверть поверхности клетки. Механизм переноса ионов через белок полосы 3 описывается системой уравнений и кинетической схемой (1), которая носит название «пинг-понг» механизма:

$$\begin{cases} Cl_{in}^{-} + B_{in} \xleftrightarrow{K_{Cl}} Cl_{in}^{-}B_{in} \underset{k_{ex,Cl}}{\overset{k_{in,Cl}}{\rightleftarrows}} Cl_{ex}^{-}B_{ex} \xleftrightarrow{K_{Cl}} Cl_{ex}^{-} + B_{ex} \\ HCO_{3in}^{-} + B_{in} \xleftrightarrow{K_{HCO3}} HCO_{3in}^{-}B_{in} \underset{k_{ex,HCO3}}{\overset{k_{in,HCO3}}{\rightleftarrows}} HCO_{3ex}^{-}B_{ex} \xleftrightarrow{K_{HCO3}} HCO_{3ex}^{-} + B_{ex} \end{cases} \quad (1)$$

Cl_{in}^{-} и Cl_{ex}^{-} ионы хлора на внутренней и внешней стороне мембраны, соответственно; B_{in} и B_{ex} количество белков полосы 3 ориентированных внутрь и наружу, соответственно; K_{Cl} , K_{HCO3} $k_{in,Cl}$, $k_{ex,Cl}$, $k_{in,HCO3}$, $k_{ex,HCO3}$ соответствующие константы Михаэлиса-Ментен.

Функциональная роль белка полосы 3 не ограничивается переносом зарядов. Он принимает участие в регуляции таких процессов как гликолиз эритроцита [25] – путем взаимодействия с гликолитическими ферментами и гемоглобином [26]. Структура и функции данного белка хорошо изучены [8-9], однако гораздо менее известно о функциональной регуляции самого анионного обменника. Фосфорилирование тирозиновых остатков на цитоплазматическом домене белка играет важную роль в процессе гликолиза, поддержания формы эритроцита и анионном обмене [29]. Фософорилированное состояние белка полосы 3 обуславливается балансом между активностью тирозинкиназы p72syk и p53/56lyn (PTKs) и фосфотирозин фосфатазы PTP1B [11-12]. В исследованиях очищенных белков и «теней эритроцитов» методом *in vitro* было показано, что AE1 PTKs активируется ионом магния [32]. При фосфорилировании белка полосы 3 PTKs субстратом является комплекс Mg/ATP. Это приводит к тому, что при терапии магнезией и увеличении внутриклеточной концентрации иона магния растет число фосфорилированных цитоплазматических доменов AE1 и, как следствие, это приводит к возрастанию активности анионного обмена [33].

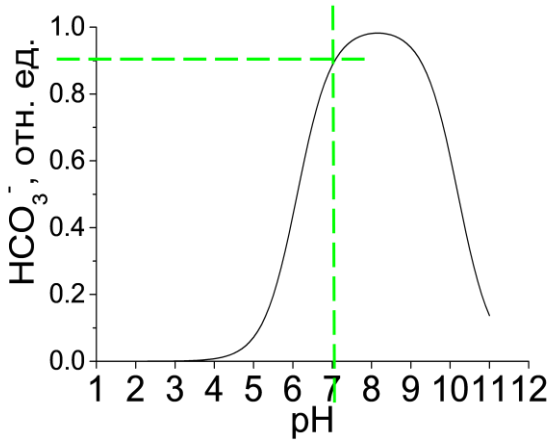


Рис. 4. Доля CO_2 в форме аниона HCO^-_3 в зависимости от величины pH.

Однако не только изменение концентрации иона магния внутри клетки способно влиять на скорость анионного транспорта, осуществляемого посредством белка полосы 3. Изучаемый нами белок служит док-станцией [34,35] для ферментов (т.е. фосфатаз и киназ), которые регулируют активность белка. Внутриклеточный рост Ca^{2+} вызывает диссоциацию фосфотирозинфосфатазы (PTP) на AE1, в результате чего освобождается активный центр для присоединения тирозинкиназы, активирующей AE1 [36]. С другой стороны, в нативных эритроцитах активационный эффект Ca^{2+} связан с модификацией [37] сайтов внутриклеточного связывания анионного обменника. Эксперименты с «призраками эритроцитов» (остатками мембран) [38] показали, что трансмембранный градиент Ca^{2+} необходим для поддержания конформации белка полосы 3 эритроцитов с более высокой анион-транспортной активностью.

На текущий момент существует мало количественной информации о влиянии ионов Ca^{2+} на активность анионного обменника эритроцитов. С одной стороны, реакция связывания Ca^{2+} с высокоаффинным сайтом AE1 далека от насыщения, поскольку его константа равновесия (8÷25) мкМ (соответственно обратная величина аффинности $(4\div13)\times10^4$ M^{-1} [39]) намного превышает концентрацию свободного внутриклеточного Ca^{2+} ~ 60 нМ. С другой стороны, ситуация осложняется существующей конкуренцией различных внутриклеточных компонентов (например, Mg^{2+} [39]) для рассматриваемого сайта связывания. До сих пор не разработана

всесторонняя количественная модель активации белка полосы 3 ионами Ca^{2+}, чтобы согласовать имеющиеся различия в экспериментальных данных в литературе [36–40]. Решению этого вопроса частично посвящена настоящая работа.

1.3. Изотонический гемолиз эритроцитов

Главным способом измерения функциональных свойств эритроцитов при исследовании их с помощью сканирующей проточной цитометрии является индуцированный гемолиз в растворе хлорида аммония. В процессе гемолиза происходит разрушение мембраны с последующим высвобождением внутриклеточного содержимого во внеклеточную среду. В роли инициаторов данного процесса могут выступать три ряда факторов: реакции со специфическими веществами (эфир, нитриты, некоторые органические кислоты), непосредственное воздействие на мембрану эритроцита, приводящее к ее повреждению, а также физиологический гемолиз вследствие естественного старения. Способность эритроцитов противостоять гемолитическим факторам носит название резистентности. Отмечается два основных типа резистентности в медицине: осмотическая (коррелирует с дефектами мембраны эритроцитов, нарушением синтеза гемоглобина) и кислотная (характеризует внутрисосудистый гемолиз, микросфероцитоз в кардиохирургии). В данной работе рассматривался изотонический гемолиз в водно-солевом растворе в присутствии хлорида аммония.

Важно понимать эффект индуцированного гемолиза в участках с повышенной потребностью кислорода. Такими участками оказываются атеросклеротические бляшки, которые формируются в патогенезе атеросклероза. Если свойства эритроцитов не обеспечивают необходимую для организма устойчивость к лизису, то это приводит к развитию патологии. Попадая в очаг воспаления атеромы, характеризующийся повышенной секрецией множества активных молекул, включая цитокины, антитела, кислородные и азотные радикалы и др., эритроциты подвергаются лизису, высвобождая холестерин и гемоглобин, которые провоцируют индукцию мессенджеров воспаления и запускают новые цепочки реакций, приводящих к разрастанию некротического ядра атеромы и повышающих риск ее

дестабилизации, а также гибель клеток и экспрессию матричных металлопротеиназ [41,42].

Как видно на Рис. 5, временной диапазон, в котором протекает процесс гемолиза, находится в интервале от 1 до 1000 секунд. Прежде всего, это подходящий временной диапазон для проведения кинетических экспериментов на сканирующем проточном цитометре. Кроме того, теоретическая модель гемолиза на данном временном отрезке становится наиболее простой, потому как кинетика процесса лимитируется скоростью трансмембранного анионного обмена.

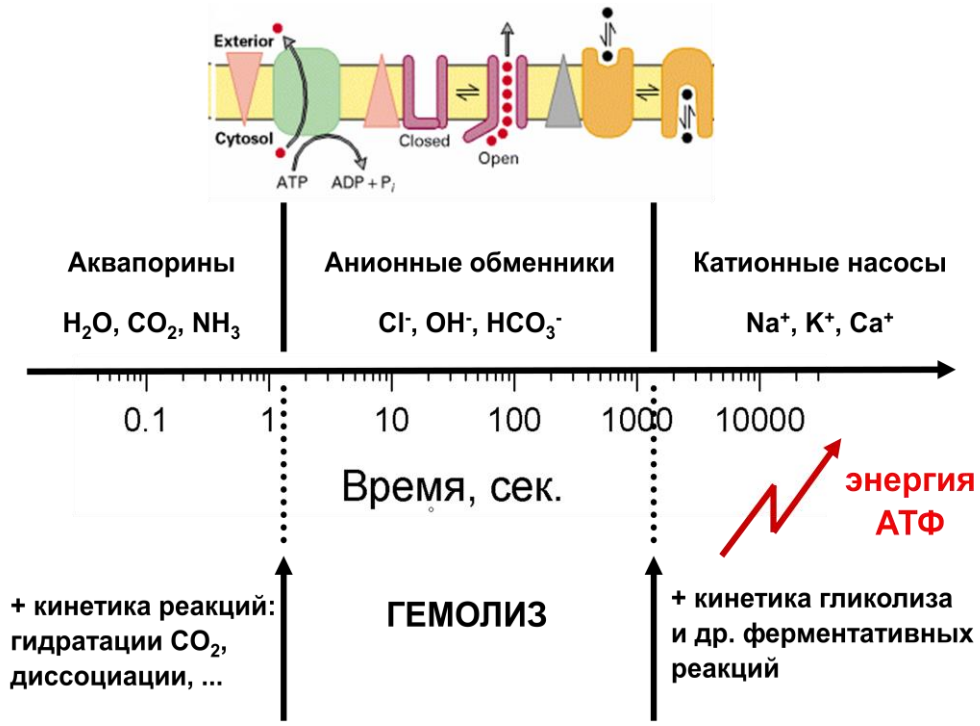


Рис. 5. Временная шкала реакций, протекающих в эритроците.

Транспорт важных в реакциях метаболизма ионов (катионов K^+ и Na^+) происходит медленнее, а проникновение малых незаряженных молекул (H_2O и CO_2) и установление равновесия процессов гидратирования-дегидратирования и ассоциации-диссоциации молекул осуществляются быстрее характерных времен работы анионных обменников.

Согласно реакционной схеме (Рис. 6, [43]) хлорид аммония в водном растворе диссоциирует на ионы NH_4^+ и Cl^-. Далее катионы NH_4^+ имеют способность частично диссоциировать на нейтральные молекулы NH_3 и ионы H^+ (константа равновесия K_1

этой реакции равна $10^{-9.25}$ М). После чего незаряженная молекула NH_3 способна проникать внутрь эритроцита через транспортер RhAG. Следовательно, равновесная концентрация NH_3 может быть получена при использовании следующей формулы:

$$[NH_3]_w = \frac{K_1[NH_4{}^+]_w}{[H^+]_w} = [NH_4{}^+]_w \cdot 10^{pH-9.25} \quad (2)$$

где нижний индекс w означает, что концентрация компонента, рассчитана относительно объема воды в клетке (т. к. осмотический баланс устанавливается молекулами воды, то есть определяется равенством химических потенциалов молекул воды по обе стороны мембраны), а не всего объема. Объем клетки подразделяют на осмотически активную и неактивную части.

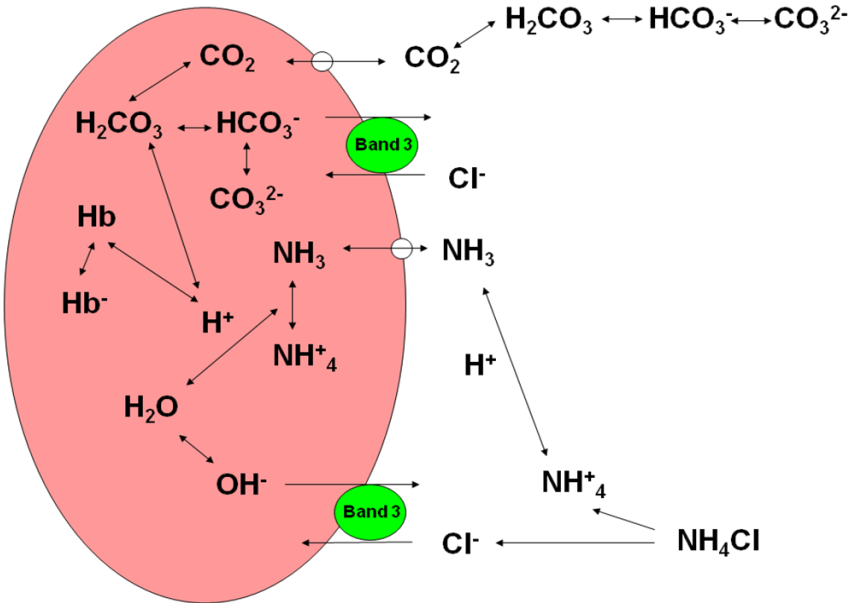


Рис. 6. Схема изотонического гемолиза эритроцита.

Первая из них определяется водой, и концентрации осмолитов приводятся в пересчете на ее объем. Осмотически неактивная часть в эритроците определяется в основном гемоглобином. Соотношение между концентрацией i внутриклеточного осмолита $[C(in)]_{iw}$ относительно воды и его концентрацией относительно полного объема $[C(in)]_{ic}$ клетки можно представить в следующем виде:

$$[C(in)]_{iw} = \frac{[C(in)]_{ic}}{1 - [Hb]_c v_{Hb}} \quad (3)$$

где v_{Hb}=48.3 л/моль – мольный объем гемоглобина.

Концентрация ионов NH_4^+ в изотоническом водном растворе хлорида аммония составляет 150 мМ. Применяя формулу (2) получаем, что при физиологически нормальной кислотности равной 7 концентрация NH_3 составляет 1.5 мМ. Учитывая, что нейтральные молекулы NH_3 быстрее положительно заряженных ионов NH_4^+ проникают через мембрану благодаря транспортеру RhAG (проницаемость равна 1.1×10^{-3} см/с в отсутствие перемешивания), а так же что трансмембранное равновесие для NH_3 устанавливается за время меньше 1 секунды, можно считать динамику проникновения NH_3 внутрь эритроцита нелимитирующим кинетическим фактором и предполагать сохранение условия трансмембранного равновесия по NH_3 (то есть равенства внутриклеточной (in) и внеклеточной (ex) концентраций NH_3) в процессе всего времени гемолиза:

$$[\mathrm{NH_3(ex)}]_\mathrm{w} = [\mathrm{NH_3(in)}]_\mathrm{w} \quad (4)$$

Далее молекулы NH_3 ассоциируют с H^+, образуя катионы NH_4^+ внутри эритроцита. Следовательно, катионы NH_4^+ быстро образуются во внутриклеточной среде в результате использования стадии проникновения нейтральной молекулы-посредника NH_3, что приводит к защелачиванию цитоплазмы эритроцита, при котором внутриклеточная концентрация анионов OH^- и HCO_3^- выше внеклеточной (наружной).

В свою очередь, анионы Cl^-, образованные вследствие диссоциации NH_4Cl, проникают через анионные каналы и обмениваются на внутриклеточные анионы (OH^- и HCO_3^-). Далее данные анионы OH^- и HCO_3^- достаточно быстро возвращаются в клетку (Рис. 6) за счет взаимодействия с молекулой-посредником CO_2 (благодаря высокой скорости диффузии этой молекулы, предположительно через аквапорины, проницаемость ~ 0.58 см/с [44]). И поэтому на всем протяжении гемолиза:

$$[CO_2(ex)]_w = [CO_2(in)]_w \quad (5)$$

В результате процесса трансмембранного проникновения обоих ионов NH_4^+ и Cl^- соли хлорида аммония возникает механизм некомпенсированной диффузии соли NH_4Cl внутрь клетки. Следовательно, данный процесс увеличивает количество внутриклеточных осмолитов и приводит к увеличению клеточного объема эритроцита до предельной сферической формы с дальнейшим растяжением и

разрушением мембраны (за счет повышения внутриклеточного осмотического давления).

Совокупность процессов, происходящих на протяжении гемолиза в изотоническом водном растворе NH_4Cl, можно разделить на три последовательные стадии: 1) установление равновесных концентраций NH_3 (менее 1 секунды) по обе стороны эритроцитарной мембраны (это равенство сохраняется на следующих стадиях гемолиза); 2) увеличение объема эритроцита до максимального сферического состояния, протекающее с относительно медленной скоростью; 3) пребывание эритроцита в сферическом состоянии до момента разрушения мембраны.

На всех теоретически детерминированных этапах гемолиза выполняются два основных закона сохранения:

1. *сохранение полного нулевого заряда клетки:*

$$\sum_i [C(in)]_{iw} z_i(pH) = 0 \tag{6}$$

где $[C(in)]_{iw}$ – концентрация i-го внутриклеточного осмолита, $z_i(pH)$ - удельный заряд i-го осмолита (обычно зависит от pH).

2. *баланс осмотического давления внутри и снаружи клетки*:

$$\sum_i [C(in)]_{iw} + \varphi_{Hb}[Hb]_w = \pi_{ex} \tag{7}$$

где π_{ex} – осмотичность снаружи клетки, $[Hb]_w$ – концентрация гемоглобина имеет осмотический коэффициент φ_{Hb}, чья зависимост от концентрации выглядит следующим образом [45]:

$$\varphi_{Hb} = 1 + 0.0645[Hb]_w + 0.0258[Hb]_w^2 \tag{8}$$

1.3.1. Первая стадия

Моделирование первой стадии гемолиза необходимо для расчета начальных концентраций реагентов, которые будут использоваться на стадии сферизации эритроцитов. Итак, в рассматриваемой модели следует учитывать растворение в воде двуокиси углерода из атмосферы с образованием угольной кислоты (9), и ее последующую двухступенчатую диссоциацию (11) и (14):

$$CO_2 + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \quad (9)$$

$$[H_2CO_3]_w = [CO_2]_w \cdot 10^{-2.60} \quad (10)$$

$$H_2CO_3 \longleftrightarrow H^+ + HCO_3^- \quad (11)$$

$$\frac{[H^+]\cdot[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = 2.5 \cdot 10^{-4}\ (\text{M}) = 10^{-3.60}\ (\text{M}) \quad (12)$$

$$[HCO_3^-]_w = [H_2CO_3]_w \cdot 10^{pH-3.6} = [CO_2]_w \cdot 10^{pH-6.11} \quad (13)$$

$$HCO_3^- \longleftrightarrow H^+ + CO_3^{2-} \quad (14)$$

$$\frac{[H^+]\cdot[CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]} = 5.61 \cdot 10^{-11}\ (\text{M}) = 10^{-10.25}\ (\text{M}) \quad (15)$$

$$[CO_3^{2-}]_w = [HCO_3^-]_w \cdot 10^{pH-10.25} = [CO_2]_w \cdot 10^{pH-16.31} \quad (16)$$

Полная концентрация участвующих в рассматриваемом процессе карбонатов равна растворимости углекислого газа в воде (при отсутствии иных добавленных источников HCO_3^-):

$$CO_2 + H_2CO_3 + HCO_3^- + CO_3^{2-} = \chi_{CO_2} \quad (17)$$

При нормальных условиях (1 атм, 25°C) растворимость углекислого газа в воде равняется χ_{CO_2}=1,45 кг/м³. Это позволяет рассчитать концентрацию электрического заряда всех карбонатов Q_c:

$$Q_c = -([HCO_3^-] + 2[CO_s^{2-}])V_w = z_c(pH)[CO_2(in)]V_w \quad (18)$$

$$z_c(pH) = 10^{pH-6.11} + 2 \cdot 10^{2pH-16.31} \quad (19)$$

Следовательно, закон сохранения полного заряда всей клетки (6) с учетом) и (5) на первой стадии процесса можно записать в следующем виде:

$$[NH_4{}^+(in)]_w V_w + z_c(pH_{in})[CO_2(in)]_w V_w - z_c(pH_{in0})[CO_2(in)]_{w0} V_{w0} + \\ + \sum_i \left(z_i(pH_{in}) - z_i(pH_{in0})\right) P_i = 0 \quad (20)$$

где индекс 0 является значением концентрации в нулевой момент времени (до начала первой стадии лизиса), $z_i(pH_{in})$ - удельный заряд i-го внутриклеточного осмолита (может зависеть от pH_{in}), отличного от карбонатов и NH_4^+, P_i – число молей

i-го внутриклеточного осмолита, которое не меняется на первой стадии (то есть всех, кроме карбонатов и NH_4^+):

$$P_i = [C(in)]_{iw0} V_{w0} = [C(in)]_{iw} V_w \tag{21}$$

Используя (4)-(5) и (20), для относительного изменения объёма клетки в зависимости от внутриклеточного pH_{in} получим

$$\frac{V_w}{V_{w0}} = \\ = -\frac{\sum_i \left(z_i(pH_{in}) - z_i(pH_{in0})\right) C_{iw0}}{[NH_4{}^+(ex)] \cdot 10^{pH_{ex} - pH_{in}} + z_c(pH_{in})[CO_2(ex)]_w - z_c(pH_{in0})[CO_2(in)]_{w0}} \tag{22}$$

А также из условия осмотического баланса на первой стадии получаем:

$$[NH_4{}^+(ex)] \cdot (10^{pH_{ex} - pH_{in}} + 10^{pH_{ex} - 9.25}) + \varphi_{Hb}[Hb]_w - \varphi_{Hb0}[Hb]_{w0} + \\ + c_w(in) - c_{w0}(in) \\ + \left(\frac{V_{w0}}{V_w} - 1\right)\left(2[NH_4{}^+(ex)] - \varphi_{Hb0}[Hb]_{w0} - c_{w0}(in)\right) = 0 \tag{23}$$

где суммирование ведется по всем осмолитам, кроме аммония, карбонатов и гемоглобина, а c_w – полная концентрация всех карбонатов:

$$c_w = [CO_2]_w \cdot (1 + 10^{-2.60} + 10^{pH - 6.11} + 10^{2pH - 16.31}) \tag{24}$$

Путем подстановки выражения для отношения объемов (22) в уравнение (23), можно с использованием полученной зависимости в разнице осмотических давлений внутри и снаружи клетки от pH_{in} рассчитать относительное изменение объема на первой стадии гемолиза (обозначим величину V_{w1}/V_{w0}). Затем необходимо учитывать лишь концентрации тех осмолитов, которые меняют свой удельный заряд с изменением pH. Типичный диапазон концентраций таких осмолитов и их удельный заряд приведен в таблице 2.

Таблица 2. Концентрации (относительно объема воды), удельный заряд и константы диссоциации для основных внутриклеточных осмолитов эритроцита (карбонаты не включены)[1].

Осмолит	Диапазон концентраций[2],мМ	pK_a	Заряд одной молекулы[3]
Hb	6.3 – 7.4	6.69; 7.89	$z_{Hb} = 15.6 - 23b_1/(1+b_1) - 4b_2/(1+b_2)$
DPG	5.4 – 10.7	7.56; 7.32	$z_{DPG} = -3 - b_1/(1+b_1) - b_2/(1+b_2)$
ATP	1.3 – 3.4	6.80	$z_{ATP} = -3 - b/(1+b)$
GSH	2.7 – 3.5	8.54; 9.42	$z_{DPG} = -1 - b_1/(1+b_1) - b_2/(1+b_2)$
Pi	0.4 – 1.4	6.87	$z_{Pi} = -1 - b/(1+b)$
Cl^-	61 – 73	-	$z_{Cl} = -1$

[1]Данные согласно [46]

[2]Концентрации относительно объема воды в соответствии с уравнением (3).

[3]Для соответствующего осмолита: $b = 10^{pH-pK_a}$ или $b_1 = 10^{pH-pK_{a1}}$ и $b_2 = 10^{pH-pK_{a2}}$.

DPG – дифосфоглицерат.

GSH – восстановленный глутатион.

Варьирование параметров в физиологически значимом диапазоне показало, что только изменение концентрации карбонатов (т.е. растворенного CO_2) и гемоглобина в диапазоне их типичных значений существенно меняет V_{w1}/V_{w0} и pH_{in1}. Данный факт упрощает математическую модель гемолиза (из всех внутриклеточных осмолитов нужно учитывать только гемоглобин и карбонаты). Результаты проведенных численных расчетов в диапазоне внутриклеточного $[Hb]_{w0}$ (от 5 до 8.5 мМ) и внеклеточного $[HCO_3^-(ex)]$ (от 1 до 8 мМ) можно аппроксимировать с хорошей точностью (ошибка менее 3%) следующими аналитическими выражениями:

$$\frac{V_{w1}}{V_{w0}} = 1.084 + 0.0238[HCO_3^-(\text{ex})] + 0.00719\ [Hb]_{w0} - \\ -0.0011[HCO_3^-(\text{ex})][Hb]_{w0} \tag{25}$$

$$pH_{in1} = 8.049 - 0.263\,[HCO_3^-(\text{ex})] - 0.0335\,[Hb]_{w0} + \\ +0.002[HCO_3^-(\text{ex})][Hb]_{w0} \quad (26)$$

В данных формулах концентрации берутся в мМ. Подставляя в формулу (25) характерные значения концентраций гемоглобина и HCO_3^- можно показать, что $V_{w1}/V_{w0}<2$. Это свидетельствует о незначительном увеличении объема на первой стадии лизиса.

1.3.2. Вторая стадия

На данной стадии происходит увеличение клеточного объема посредством обмена внеклеточного Cl^- на внутриклеточный HCO_3^- мембранным белком полосы 3. Скорость накопления анионов Cl^- в эритроците может быть рассчитана по модели «пинг-понг» работы анионного обменника – белка полосы 3 на мембране эритроцита (1).

Из работ [43,44], где подробно описан процесс изотонического гемолиза, известен поток анионов Cl^- через один анионный обменник по реакционной схеме (1) в диапазоне концентраций внеклеточного $[HCO_3^-(ex)]$ от 0.1 до 4 мМ, внутриклеточных $[Hb]_{w0}$ от 5 до 8 мМ и $[Cl^-(in)]_{w0}$ от 50 до 90 мМ, V_w/V_{w1} от 1 до 2:

$$j_{Cl}^{in} = [HCO_3^-(\text{ex})]G_1\left(1 + \frac{G_2}{V_w/V_{w1} + G_3}\right) \quad (27)$$

где G_1, G_2 и G_3 имеют следующий вид:

$$G_1 = -15.8(1 - 0.039[HCO_3^-(\text{ex})] + 0.0076[Hb]_{w0} - 0.0021[Cl^-(in)]_{w0}) \quad (28)$$

$$G_2 = -0.498(1 + 0.016[HCO_3^-(\text{ex})] - 0.032[Hb]_{w0} - 0.0016[Cl^-(in)]_{w0}) \quad (29)$$

$$G_3 = -0.88(1 - 0.0075[HCO_3^-(\text{ex})] - 0.0027[Hb]_{w0} - 0.00099[Cl^-(in)]_{w0}) \quad (30)$$

Вновь обращаясь к работе, раннее сделанной в нашей лаборатории, используя:

$$\frac{dN_{Cl}}{dt} = J_{Cl}^{in} \quad (31)$$

получим зависимость времени сферизации эритроцита t_2 от начальных концентраций гемоглобина, хлора, а также количества белка полосы 3 на эритроцитарной мембране показанную в уравнении (32).

$$t_2 = \frac{1}{G_1 G_4}\left(\frac{V_{w2}}{V_{w1}} - 1 - G_2\, ln\left(1 + \frac{\frac{V_{w2}}{V_{w1}} - 1}{1 + G_3 + G_2}\right)\right) \tag{32}$$

1.3.3. Третья стадия

На третьей стадии гемолиза возникает увеличение внутриклеточного осмотического давления, приводящее к растяжению и последующему разрыву мембраны эритроцита. В общем случае, динамика спонтанного разрушения клеток в популяции [47,48], имеющих одинаковую вероятность гибели, описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{d}{dt} n(t') = -\frac{n(t')}{\tau} \tag{33}$$

где $n(t')$ – число клеток в популяции как функция времени, $t' = t - t_2$ (т.е. время t' отсчитывается от начала третьей стадии лизиса), и τ – постоянная времени спонтанного разрушения клетки (т.е. постоянная времени жизни).

Используя, что напряжение в мембране зависит от степени ее растяжения следующим образом:

$$\sigma = K_S \frac{S - S_0}{S_0}, \tag{34}$$

можно теоретически рассчитать зависимость уже всего времени протекания лизиса от отношения упругости к эластичности эритроцитарной мембраны, а также от концентраций внешне- и внутриклеточных компонент (20).

$$t_\beta = \frac{6.02 \cdot 10^5 V_{w2} \sigma_\beta}{K_S B G_6} \tag{35}$$

$$G_5 = \frac{[Hb]_{w2}\left(\frac{23 \times 10^{pH_{in2}-6.69}}{(1+10^{pH_{in2}-6.69})^2} + \frac{4 \times 10^{pH_{in2}-7.89}}{(1+10^{pH_{in2}-7.89})^2}\right)}{[NH_4{}^+(in)]_w \times 10^{pH_{ex}-pH_{in}} - [CO_2]_w \times 10^{pH_{in2}-6.11}}$$

$$G_6 = \frac{(2-G_5)j_{Cl}^{in2}}{3(1+[Hb]_{w2}v_{Hb})[NH_4{}^+(ex)](1+G_5)} \quad (36)$$

Следовательно, на протяжении третьей стадии изотонического гемолиза динамика количества сферизованных эритроцитов регулируется двумя факторами: появлением сферических клеток (из второй стадии) и их разрушением (разрыв растянутой мембраны).

1.4. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

На сегодняшний день существует несколько распространенных подходов к исследованию свойств эритроцитов. Их можно разделить на две категории: одни обеспечивают анализ популяции эритроцитов за счет высокой скорости проведения измерений (проточные системы), вторые же могут обеспечивать более высокую точность, однако имеют низкую пропускную способность (например, оптическая дифракционная томография).

Эритроциты являются распространенным объектом исследования. Важными параметрами клеток считаются не только морфологические характеристики (объем, показатель преломления, площадь поверхности), но и динамические (упругость, жесткость, способность к обратимой деформации). Для анализа морфологических характеристик эритроцитов используются следующие физические методы:

Оптическая и электронная микроскопия;

кондуктометрический метод;

метод светорассеяния, проточная цитометрия;

спектофотометрический метод;

турбидиметрический метод.

Оптическая и электронная микроскопия позволяют получить снимки единичных эритроцитов с высоким разрешением. Подобный анализ красных клеток крови принес много информации об их внутреннем строении и расположении

белковых структур в мембране. А также с помощью оптического метода исследования можно составить общее представление о присутствии в популяции аномальных по форме и плотности эритроцитов. Конечно, основным недостатком данного метода является медленный набор статистически достоверной информации о популяции эритроцитов.

Принцип кондуктометрического метода заключается в измерении импеданса клетки при прохождении постоянного тока. Детектирование осуществляется за счет изменения постоянного тока при прохождении непроводящей частицы через отверстие малого диаметра в проводящей среде. Посредством подобного измерения можно определить объем исследуемой частицы, так как регистрируемый импульс напряжения пропорционален размеру непроводящей частицы, которая проходит через отверстие.

Метод проточной цитометрии основан на регистрации флюоресценции и светорассеяния от одиночных частиц. В данной технике необходимо создать поток жидкости, в котором будут с определенным углом ориентации перемещаться исследуемые объекты. Для этой цели применяют гидрофокусирующее устройство. Оно создает два коаксиальных сужающихся ламинарных потока. Наименьший из них в диаметре варьируется от 10 до 30 мкм и представляет собой пробу с измеряемыми клетками. Внешний поток диаметром 100-300 мкм состоит из отфильтрованной воды или солевого раствора. Далее за счет малого сечения внутренней струи при облучении сфокусированным лазерным светом кюветы с образцом в зоне измерения оказывается только одна частица, от которой и происходит регистрация сигналов светорассеяния и флуоресценции.

На проточном цитометре для характеризации клеток по светорассеянию используется стандартная конфигурация измерения рассеяния вперед (от 3 до 15 градусов полярного угла) и вбок (под 90 градусов), а также флуоресценция в нескольких спектральных диапазонах. Сигнал светорассеяния вперед коррелирует с «размером» клетки поскольку эффекты дифракции преобладают в малом угловом диапазоне, и картина рассеяния определяется площадью проекции клетки [49]. В

свою очередь, сигнал рассеяния вбок сильно зависит от внутренней структуры, «гранулярности» частицы [50].

Спектрофотометрический метод заключается в определении содержания гемоглобина в крови по экстинкции монохроматического света. Данную процедуру производят следующим образом: набирают образец крови в капиллярную пипетку и добавляют его в раствор, содержащий калий железосинеродистый (K3[Fe(CN)6]), цианистый калий (KCN) и бикарбонат натрия (NaHCO3), чтобы предварительно перевести в гемоглобин в стабильную форму. В результате химической реакции в данных растворах эритроциты разрушаются – и гемоглобин превращается в содержащий трехвалентное железо цианметгемоглобин HbCN, который способен сохраняться в течение нескольких недель. После чего определяют содержание гемоглобина непосредственно из степени поглощения раствором монохроматического света с длиной волны 546 нм (на которую приходится максимум поглощения).

В свою очередь *турбидиметрический метод* основан на прохождении света через дисперсную систему с последующим рассеянием на взвешенных частицах. Оптическая плотность взвеси зависит от размера, концентрации частиц, диспергированных в среде, длины волны используемого света и относительного показателя преломления частиц, который в свою очередь, находится в зависимости от физиологического состояния и химического состава частиц. Оптическая плотность взвеси эритроцитов определяется на трех длинах волн 635, 805 и 950 нм. На этих длинах волн отсутствует поглощение гемоглобина, и оптическая плотность системы обусловлена только эффектом рассеяния света [51].

Среди методов определения резистентности эритроцитов наибольшее значение в медицине приобрело определение осмотической и кислотной резистентности эритроцитов. Вне зависимости от способа лизиса, резистентностью называют отрицательную производную количества клеток от времени, отражающую число разрушенных эритроцитов в единицу времени на единицу изменения осмоса, времени или другой меняющейся величины. Для определения осмотической резистентности эритроцитов используют солевые растворы с разной тоничностью. Для этого

подготавливают ряд пробирок с убывающей на 0.05% концентрацией в каждой пробирке раствора хлористого натрия. В первой пробирке 0.85% раствор хлористого натрия, в последней – 0.1%. В каждую пробирку добавляют по 20 мкл гепаринизированной крови и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем центрифугируют смесь крови с растворами хлорида натрия при 2000 об/мин в течение 5 мин. Из каждой пробирки сливают супернатант и проводят анализ пробы на фотоэлектроколориметре при длине волны 500-560 нм. За 100% гемолиз принимают гемолиз в пробирке, содержащей 0.1% раствор хлорида натрия. Вычисляют процент гемолиза в каждой пробирке, сравнивая величины экстинкции надосадочной жидкости с экстинкцией, принятой за 100%. В норме начало гемолиза отмечают при концентрации хлорида натрия 0.50-0.45%, а полный гемолиз – при 0.40-0.35%.

Кислотная резистентность эритроцитов, характеризуемая скоростью гемолиза под влиянием воздействия растворов соляной кислоты, является частным случаем химической резистентности [52]. Изучение ее производится фотоэлектрическим методом, предложенным И.И. Гительзоном и И.А. Терсковым. Метод заключается в том, что в кювету с раствором соляной кислоты помещают исследуемую кровь, а затем через каждые 30 секунд определяют при помощи фотоколориметра количество остающихся в кювете эритроцитов. Результаты исследования представляют графически в виде так называемых кислотных эритрограмм. По оси абсцисс откладывают время, а по оси ординат выраженную в процентах долю эритроцитов, гемолизированных в течение 30 секунд, предшествовавших данному моменту времени.

Свойства эритроцитов были первыми среди количественных помощников для врачей, начиная с конца XIX века. Значительный прогресс в измерении индексов эритроцитов был достигнут, когда клеточные анализаторы начали использовать метод электрического импеданса (метод Култера) [53]. Этот метод заключается в измерении объема клеток в режиме потока частиц с высокой скоростью и обеспечивает статистически обоснованный анализ клеточных параметров. Помимо RBC (концентрации эритроцитов в крови) в клиническую практику во всем мире были включены показатели MCV (средний объем эритроцитов) и RDW (ширина

распределения эритроцитов по объему). В сочетании со спектроскопическим методом определения HGB (концентрации гемоглобина), индексы MCH (среднее содержание гемоглобина), HCT (объем эритроцитов к общему количеству клеток) и MCHC (средняя концентрация гемоглобина в единичном эритроците) сформировали основной набор параметров эритроцитов, который играет ведущую роль в характеризации свойств эритроцитов. Реализация системы проточной цитометрии в гематологических анализаторах позволила построить распределение по MCH и MCHC на основании измерения двух сигналов от интенсивностей рассеянного сферизованным эритроцитом излучения под разными пространственными углами [54]. Наконец, современные гематологические анализаторы измеряют восемь индексов эритроцитов, которые можно разделить на две категории: концентрационные (RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC) и морфологические (MCV, RDW-SD, RDW-CV). RDW-SD и RDW-CV – это ширина распределения по объему эритроцита, выраженная в единицах стандартного отклонения и коэффициента вариации, соответственно.

В литературе описано несколько подходов, которые могут стать основой нового гематологического анализатора для расширенной характеристики эритроцитов. В частности, цифровая голографическая микроскопия, основанная на рассеянии света отдельными эритроцитами, когда клетки не должны подвергаться нефизиологическому процессу сферизации с сохранением объема перед измерением. Реконструируя изображение клетки, дифракция дает неверные значения для амплитуды и фазы электромагнитных волн, рассеянных эритроцитами, поскольку отношение размера ячейки к длине волны не так уж далеко от 1. Более сложное инструментальное решение, называемое оптической дифракционной томографией, дает более разумный результат для восстановления полученных изображений, но также применяет Борновское или Рутовское приближение при моделировании рассеяния одиночного эритроцита [14,55].

Сфокусируем внимание на существующих способах измерения белка полосы 3 на эритроцитарной мембране, участвующего в CO_2/O_2 обмене, так как в рамках

данной работы стоит задача определить динамические характеристики эритроцитов методом светорассеяния на сканирующем проточном цитометре.

Большинство исследований эритроцитарного анионного обменника используют метод Вестерн-блоттинг для разделения белковых фракций на первом этапе с помощью электрофореза, а затем детектирование с использованием антител, специфичных к заданному белку [56]. Однако, подобные исследования несут информацию только о концентрационной составляющей ничего не сообщая о функциональной работе анионного обменника. Другой подход, имеющий схожие недостатки представлен в работе [57], где произведен анализ количества анионных обменников на эритроцитарной мембране. Эта величина была рассчитана путем регистрации сигналов флюоресценции на проточном цитометре, вызванной тепловой индукцией эозин-5-малеимида ковалентно связанного с белком полосы 3. Следует отметить, что данным подходом можно зарегистрировать только те белки, с которыми связывается флуоресцентный краситель. Следовательно, полученная величина не несет информации о количестве активных (участвующих в CO_2/O_2 обмене) белков на эритроците и скорости его работы, а результат напрямую зависит от аффинности используемого реагента. На фоне упомянутых работ определение функционального состояния анионных обменников в процессе изотонического гемолиза с применением сканирующего проточного цитометра выигрывает по получаемой информации о скорости работы белков и небольшой затрате реагентов (хлорид аммония, физиологический раствор, не требуются моноклональные антитела).

1.5. Роль препаратов в медицине

Магний является вторым самым распространенным катионом в эритроците и его концентрация составляет 2 mM, но содержание его в свободной (несвязанной фракции) составляет только 0.2 mM [[58], [59]]. Многие ферменты для запуска своей каталитической активности требуют присутствия иона Mg^{2+} [60]. Есть данные подтверждающие воздействия магния на ионный транспорт кальциевых, натриевых, а также калиевых каналов, а также о его влияние на липидное окисление мембран

эритроцитов [[61], [62], [63]]. В литературе показано модификация белка полосы на эритроците вследствие увеличения внутриклеточной концентрации магния [[64], [65]]. Скорость потока анионов SO_4^- , которые осуществляют свой транспорт непосредственно через анионные обменники, увеличивается на момент высокой концентрации внутриклеточного магния [66].

В свою очередь, сульфат магния $MgSO_4$, именуемый магнезией, имеет широкий спектр назначения в медицине [67], [68]. На первый план данный препарат выходит при лечении заболеваний, вызванных низким содержанием магния в организме [[69], [70]]. Магнезию применяли в качестве токолитического агента для снижения риска развития эклампсии и преждевременных родов [71]. Известно, что внутривенное введение сульфата магния, женщинам в период беременности, может приводить к уменьшению риска у новорожденных возникновения церебрального паралича и моторной дисфункции. Но эффект от введения магния варьируется в зависимости от дозы применения. Было отмечено, что при достижении высокой концентрации магнезии при токолитической терапии возникают нежелательные последствия [72]. К ряду таковых можно отнести увеличение риска кровоизлияния в мозг и как следствие низкие вес новорожденных и смерть плода [73]. Однако, применение низких доз сульфата магния для профилактики преждевременных родов оказывает нейропротективное воздействие большое число детей [74]. К сожалению, метод, способный определить необходимую индивидуальную дозу препарата для лечения, не разработан. Во многом это связано с отсутствием понимания механизма воздействия магния на эритроциты и его антигипоксического эффекта.

Есть данные [75] указывающие на уменьшение количества белков полосы 3 у новорожденных перенесших асфиксию по сравнению с контрольной группой. Так же в работах in situ [76],[77] показано значительное увеличение в активности анионных обменников на эритроците вследствие терапии $MgSO_4$ у группы детей с такой же патологией. Увеличение транспортной активности по средством AE1, измеренной в экспериментах in vitro при повышении содержания внутриклеточного иона магния, описано в работе [66]. Однако, транспорт рассматривался в данном случае только для

иона SO_4^{2-}. В наших же экспериментах мы показали, что скорость HCO_3^-/Cl обмена увеличивается при добавлении сульфата магния во внеклеточную среду эритроцитов.

1.5.1. Сульфат магния

Магний является вторым по распространенности катионом в эритроците (его концентрация составляет 2 mM), но содержание его в свободной (несвязанной) фракции составляет только 0.2 mM [58], [59]. Многие ферменты для запуска своей каталитической активности требуют присутствия иона Mg^{2+} [60]. Есть литературные данные, подтверждающие воздействия магния на ионный транспорт кальциевых, натриевых, калиевых каналов, а также его влияние на липидное окисление мембран эритроцитов [61], [62], [63]. В литературе показано, что происходит модификация белка полосы 3 на эритроците вследствие увеличения внутриклеточной концентрации магния [[64], [65]]. Скорость потока анионов SO_4^- , транспорт которых осуществляется непосредственно через анионные обменники, увеличивается при повышении концентрации внутриклеточного магния [66].

В свою очередь, сульфат магния $MgSO_4$, именуемый магнезией, имеет широкий спектр использования в медицине [67], [68]. На первый план данный препарат выходит при лечении заболеваний, вызванных низким содержанием магния в организме [[69], [70]]. Магнезию применяли в качестве токолитического агента для снижения риска развития эклампсии и преждевременных родов [71]. Известно, что внутривенное введение сульфата магния женщинам в период беременности может приводить к уменьшению риска у новорожденных возникновения церебрального паралича и моторной дисфункции. Но эффект от введения магния варьируется в зависимости от дозы применения. Ранее было отмечено, что при достижении высокой концентрации магнезии при токолитической терапии возникают нежелательные последствия [72]. К ряду таковых можно отнести увеличение риска кровоизлияния в мозг и, как следствие, низкую массу тела новорожденных и смерть плода [73]. Однако, применение низких доз сульфата магния для профилактики преждевременных родов оказывает нейропротективное воздействие на большое число детей [74]. К сожалению, метод, способный определить необходимую

индивидуальную дозу препарата для лечения, не разработан. Во многом это связано с отсутствием понимания механизмов воздействия магния на эритроциты и антигипоксического эффекта этого препарата.

Имеются данные [75], указывающие на уменьшение количества белка полосы 3 у новорожденных, перенесших асфиксию, по сравнению с контрольной группой. Так же в работах *in situ* [76],[77] показано значительное увеличение активности анионных обменников на эритроците вследствие терапии $MgSO_4$ у группы детей с аналогичной патологией. Увеличение транспортной активности посредством белка полосы 3, измеренной в экспериментах *in vitro* при повышении содержания внутриклеточного иона магния, описано в работе [66]. Однако, транспорт рассматривался в данном случае только для иона SO_4^{2-}. В наших экспериментах показано, что скорость HCO_3^-/Cl^- обмена увеличивается при добавлении сульфата магния во внеклеточную среду эритроцитов.

1.5.2. Нифедипин

Изучение регуляции работы анионного обмена в ходе химических реакций с различными препаратами представляется интересной задачей для контроля газотранспортной функции в целом. В предыдущей работе мы исследовали влияние сульфата магния на работу белка полосы 3. Нам удалось установить молекулярно-кинетическую модель с помощью которой можно подбирать оптимальные концентрации препарата для активации анионного обмена [78]. Однако, в литературе не так много информации по этому вопросу. В связи с чем мы продолжили изучение механизмов действия препаратов, способных влиять на анионный обмен эритроцитов. Следующим препаратом для этой цели был выбран нифедипин, так как его применяли как пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями в целях снижения давления, так и пациентки с риском развития преждевременных родов. У первой группы пациентов мы исследовали газотранспортную функцию в рамках гипотезы о ее вкладе в дестабилизацию атером в результате локальной гипоксии, а со второй группой мы работали еще при изучении сульфата магния. Таким образом, замеченные особенности в газотранспортной функции между группами пациентов,

принимающих и не принимающих нифедипин побудил к исследованию механизма его действия на анионный обмена эритроцитов.

Нифедипин относится к подклассу дигидропиридинов (DHP), которые известны как ингибиторы транспорта Ca^{2+} через мембрану эритроцитов в двух направлениях: (1) блокирование притока Ca^{2+} через кальциевые каналы [79–81] и (2) ингибирование выведения через плазматическую мембрану посредством Ca^{2+} насосов (PMCA) [82,83]. Из работы [83] известно, что около 50% кальциевых насосов PMCA претерпевают ингибирование своей работы при концентрации внеклеточного нифедипина 300 мкМ. Интересно, что одна и та же внеклеточная концентрация 300 мкМ нифедипина, как сообщалось [84], вызывает меньшее (около 30%) ингибирование Ca^{2+} каналов, обеспечивающих приток катионов внутрь через мембрану эритроцитов. Более сильное ингибирование PMCA, чем каналов для входа кальция, приводит к накоплению внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах в присутствии внеклеточного нифедипина, что приводит к дополнительной (не всегда положительной) активации Ca^{2+}-зависимых внутриклеточных ферментов [40].

Было установлено [85], что нифедипин внедряется в мембрану и распределяется внутри бислойной клеточной мембраны случайным образом, возможно, в виде агрегатов. В целом, DHP взаимодействуют в основном с мембранным бислойным компонентом, но могут также связываться с нерецепторными белками, и их липидное бислойное распределение может происходить до связывания лекарственного средства с рецепторами [86]. Таким образом, имеет место быть механизм связывания DHPs-рецепторов [34,35], который включает в себя разделение лекарственного средства в бислое с последующей латеральной диффузией к его специфическому рецепторному сайту. Сообщаемая константа скорости связывания нифедипина с его рецепторами на клеточной мембране достаточно велика, ~ 10^6 $M^{-1}c^{-1}$ [87], чтобы поддержать идею «мембранного бислойного пути».

Применение нифедипина в водных растворах требует особого внимания. Поскольку растворимость нифедипина в чистой воде очень низкая, - только $5{,}1\times10^{-7}$ М (то есть $2{,}8\times10^{-5}$ моль/л, 9,7 мг/л) при 20 °C, - раствор этанол-вода нифедипина обычно применяют для исследований и в медицинских целях. Во-первых, используя

известную растворимость нифедипина в смеси этанол-вода [88], можно проверить, что на практике дополнительное разбавление водой не приводит к осаждению нерастворимого нифедипина. Во-вторых (но не в последнюю очередь), влияние этанола в образце должно быть принято во внимание. Как следует из химической термодинамики [89], растворимость и аффинность связывания растворенного вещества зависят от его химического потенциала в зависимости от коэффициента его активности в растворе. Таким образом, добавление этанола к водной среде увеличивает растворимость нифедипина [88], что приводит к увеличению константы равновесия (и соответствующему уменьшению аффинности связывания) комплекса нифедипин-рецептор. Эта зависимость может объяснить вариативность значений в опубликованных данных [84,87,89,90] по ингибирующему действию нифедипина, принимая во внимание тот факт, что исследователи использовали различные количества этанола в своих образцах. Другим источником наблюдаемого различия может служить полиморфизм нифедипина [91,92], поскольку существует значительная разница в растворимости в воде различных кристаллических форм нифедипина в диапазоне (при 300 К) от 35 мг/л (для аморфной формы) до 3 мг/л (для обезвоженной формы) [93]. Эти обстоятельства также применимы к текущему исследованию.

1.6. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЛАВЫ

Несмотря на то, что эритроциты являются распространенным с давних времен объектом исследования, механизмы управления их функциональной активностью остаются не до конца изучены. Более того их вклад в различные патологии, например, в процесс дестабилизации атером при негативном течении атеросклероза (что проявляется в инсультах и инфарктах), по сей день является предметом дискуссий. Такое текущее положение дел обуславливает практическую значимость получения новых параметров морфо-функциональных свойств эритроцитов для детальной характеризации состояния здоровья и предсказания риска возникновения гипоксических состояний в организме.

Из обзора литературы видно, что существующие на сегодняшний день методы измерения морфологических и функциональных характеристик эритроцитов имеют существенные ограничения. В основном имеет место противопоставление количества измеряемых клеток и качества (точности)/количества получаемых параметров. Однако, предлагаемый в работе подход измерения газотранспортной функции с применением сканирующей проточной цитометрии гармонично сочетает в себе и скорость анализа стандартной проточной цитометрии, а также превышает по количеству и точности получаемых параметров подход оптической дифракционной томографии. Это становится возможным благодаря широком угловому диапазону сбора сигналов светорассеяния и передовым подходам к решению обратной задачи. Кинетическое исследование скорости анионного обмена эритроцитов в изотоническом растворе хлорида аммония позволяет изучать механизмы регуляции работы белка полосы 3 безфлуоресцентным методом и использовать полученные знания для контроля над функциональным статусом газотранспортной функцией эритроцитов индивидуально для каждого донора.

Глава 2. Инструментальная основа технологии сканирующей проточной цитометрии

2.1. Сканирующий проточный цитометр

СПЦ может быть отнесен к следующему поколению проточных цитометров, поскольку любой анализ, предназначенный для обычного проточного цитометра, может быть выполнен с помощью СПЦ. Основное преимущество СПЦ заключается в измерении картин светорассеяния в противопоставлении измерения двух сигналов амплитуды рассеяния прямого и бокового света, измеренного обычным проточным цитометром. Анализ картин светорассеяния значительно улучшает идентификацию и характеризацию отдельных клеток. СПЦ был изготовлен ООО «Цитонова» (Новосибирск, Россия).

В текущей работе была произведена модернизация СПЦ для возможности одновременной записи индикатрис на двух длинах волн. Стандартная часть СПЦ, которую можно увидеть на Рис. 7, состоит из лазера (La1), объективов Obj1 и Obj2, дихроичных зеркал DM3 и DM4 и фотоумножителей PMT4-PMT6. Эта часть обеспечивает запись сигналов флуоресценции (PMT4 и PMT5) и сигналов светорассеяния вперед (PMT1) и в бок (PMT4). В настоящей работе стандартная часть прибора, которая есть в большинстве проточных цитометров, не использовалась. Основное преимущество СПЦ связано с возможностью измерять индикатрисы светорассеяния от одиночных частиц. Впервые каналы записи индикатрис на СПЦ были оснащены следующими лазерами: 40 мВт с длиной волны лазера 660 нм (LM-660-20-S), 120 мВт с длиной волны лазера 444 нм (LaserLand, https://laserland.com/), и 30 мВт с длиной волны лазера 405 нм (Radius, Coherent Inc., Санта-Клара, Калифорния) для одновременных измерений индикатрис от одиночных частиц на двух длинах волн.

Комбинация длин волн 660 и 444 нм использовалась для анализа сигналов, измеренных от эритроцитов и полистирольных сфер. Выбор значение длины волны равной 444 нм обуславливается несколькими причинами. Во-первых, это значение находится на другой границе видимого диапазона излучения от 660 нм и, во-вторых,

длина волны 444 нм находится за пределами полосы поглощения Соре для гемоглобина.

Дихроичное зеркало DM1 (Thorlabs DMLP 550) объединяет два лазерных пучка от La3 и La2, для облучения объекта исследования, в то время как дихроичное зерколо DM2 разделяет сигналы светорассеяния для регистрации на разных ФЭУ (PMT2 для 444 нм и PMT3 для 660 нм). Зеркало на пластине (PM) направляет сфокусированные лучи в оптическую ячейку (OC) для освещения частицы. Каждому положению частицы в зоне измерения соответствует конкретный угол рассеяния, при котором лучи отражаются от сферического зеркала параллельно потоку пробы (красный цилиндр Рис. 7). Этот угол непрерывно изменяется от 10˚ до 70˚ пока частица двигается в зоне измерения. Схематически изменения угла отражения от сферического зеркало показано в левом верхнем углу на Рис. 7. Аберрация сферической поверхности играет ключевую роль в реализации сканирующей функции оптической кюветы. Только те лучи, которые отразились от зеркала параллельно оси потока, фокусируются в отверстии 0.3 мм, находящимся перед PMT2 и PMT3.

Другие подробные технические характеристики СПЦ и эксплуатационная функция оптической ячейки были описаны ранее [94,95]. Рабочий угловой диапазон СПЦ был определен из анализа полистирольных микросфер, который составил 10˚–70˚ [96].

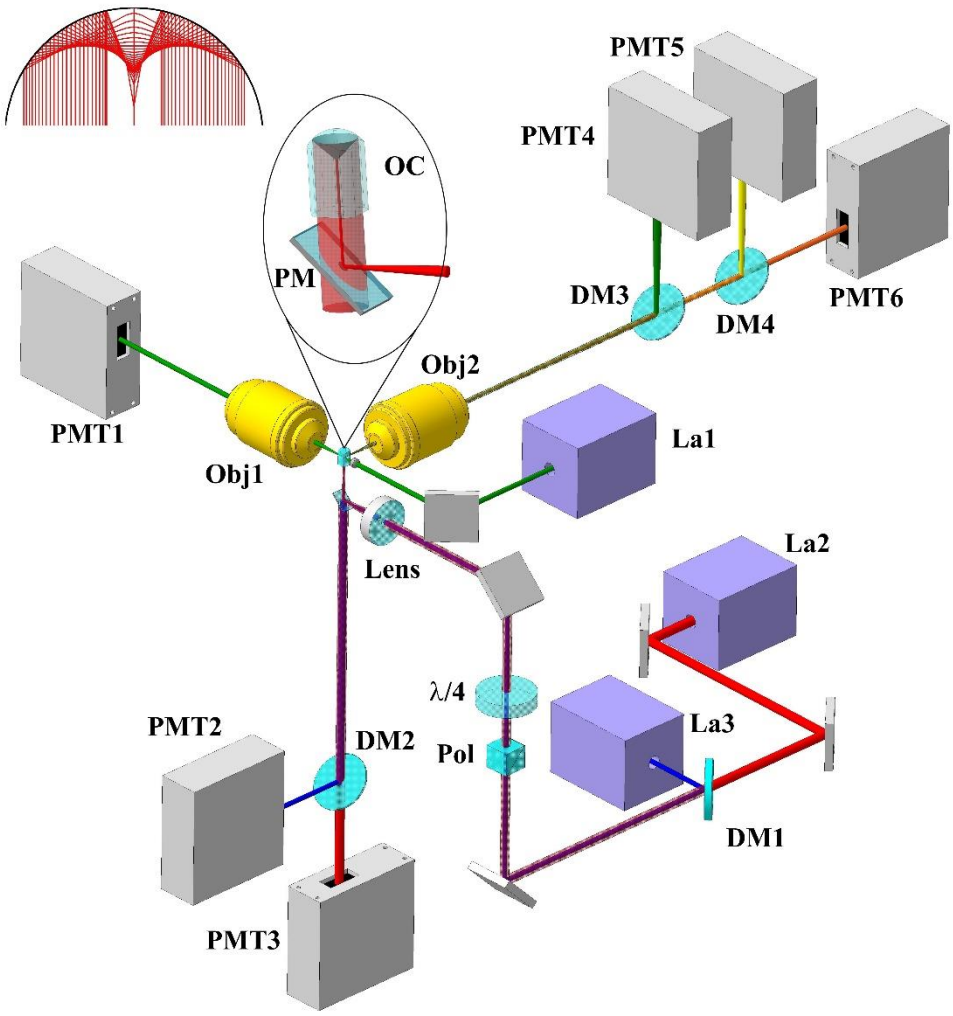


Рис. 7. Оптическая схема сканирующего проточного цитометра. LA – лазер, PMT – ФЭУ, Obj – объектив, DM- дихроичное зеркало, Pol – поляризатор, Lens – линза, OC – оптическая кювета, PM – зеркало на пластине.

2.2. Определение оптической константы гемоглобина

Эритроциты подвергались индуцированному гемолизу в хлориде аммония. Индикатрисы от клеток в процессе лизиса регистрировались на СПЦ. Согласно теории гемолиза в хлориде аммония [43], эритроциты перед разрушением мембраны достигают сферического состояния. Для того, чтобы выделить только сферы в процессе индуцированного гемолиза был применен алгоритм, разработанный в лаборатории для идентификации сфер с использованием спектрального метода [97]. Индикатрисы светорассеяния были измерены одновременно на двух длинах волн – 660 и 444 нм. Обработка данных производилась с помощью теории Ми для получения диаметра и двух реальных частей показателя преломления на 660 и 444 нм. Мнимая

часть показателя преломления на длине волны 444 нм слишком мала, чтобы повлиять на интенсивности индикатрисы. Индикатрисы типичного сферического эритроцита представлены на Рис. 8. Стоит отметить высокую точность получаемых параметров клетки. Ошибка в определении диаметра эритроцита составила 19 нм, а для показателя преломления 0.006 на длине волны 660 нм и 0.008 на длине волны 444 нм.

С помощью алгоритма детекции сферических частиц в измеренной пробы было выделено 236 частиц, которые были обработаны согласно теории Ми. Параметры полученных распределений по диаметру и показателю преломления представлены в таблице 3.

Анализ эритроцитов предполагает определение концентрации гемоглобина, которые играет важную роль в способности клеток выполнять газотранспортную функцию. Методы измерения концентрации гемоглобина, основанные на светорассеянии и поглощении, предполагают наличие оптических констант гемоглобина. Наиболее важная из них – удельная рефракция гемоглобина (SRI), она задает связь между концентрацией гемоглобина в растворе и показателем преломления. К сожалению, литературные значения SRI варьируются в широком диапазоне от 0.00193 до 0.00267 дл/г [98] для фиксированных длины волны и температуры.

Связь между концентрацией гемоглобином и показателем преломления выглядит следующим образом:

$$n - n_0 = Hb \times \alpha, \tag{37}$$

где n – показатель преломления эритроцита, n_0 – показатель преломления раствора, Hb – концентрация гемоглобина г/дл, α – удельная рефракция гемоглобина SRI. 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. Близкое значение недавно было получено другим коллективом автором, которые специализируются на данной теме [99]. Это значение было принято для расчета содержания и концентрации гемоглобина в нативных эритроцитах.

Таблица 3. Параметры (среднее значение ± ошибка) распределения сферических эритроцитов, полученных из обработки двухволновой индикатрисы светорассеяния. SD = стандартное отклонение.

Параметр	**Значение**
Количество частиц	236
Средний диаметр (SD), мкм	5.93±0.02 (0.37)
Средний RI, 660 нм (SD)	1.3966±0.0009 (0.0108)
Средний RI, 444 нм (SD)	1.4264±0.0007 (0.0106)
Ошибка среднего для диаметра, нм	16
Ошибка среднего для RI, 660 нм	0.004
Ошибка среднего для RI, 444 нм	0.006

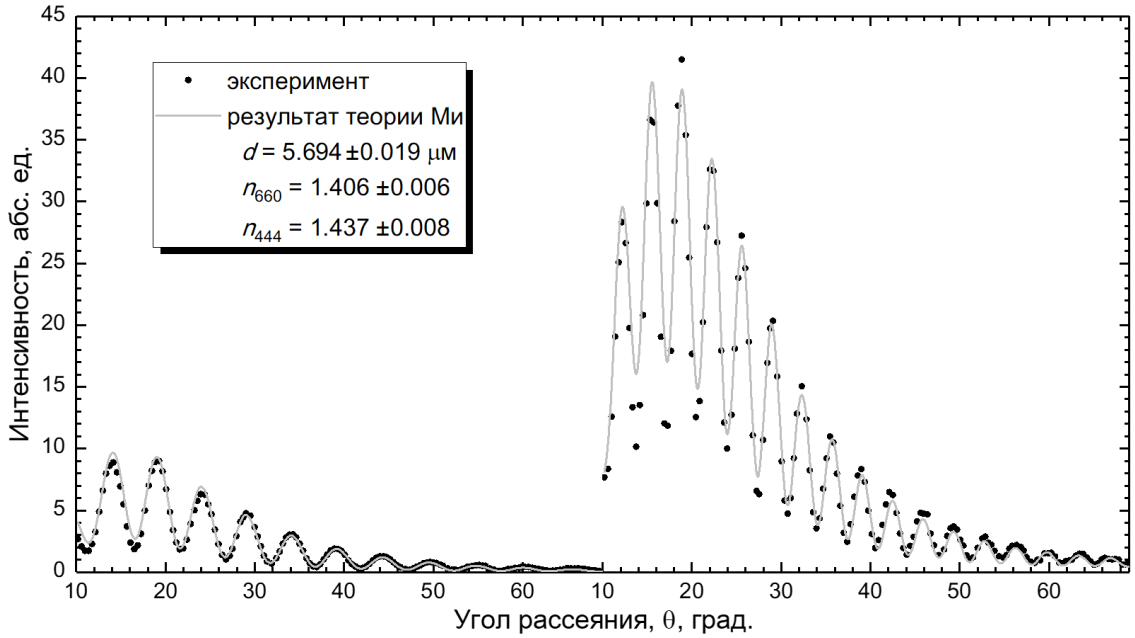


Рис. 8. Индикатрисы светорассеяния на длине волны 444 нм (слева) и 660 нм (справа) сферического эритроцита, обработанные по теории Ми.

2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЛАВЫ

В текущем исследовании была модернизирована инструментальная часть сканирующего проточного цитометра для одновременного измерения светорассеяния на двух длинах волн. На сигналах сферизованных эритроцитов с помощью двухволновой индикатрисы было получено значение для удельной рефракции гемоглобина – 0.0023 ± 0.00005 дл/г, которое необходимо для вычисления содержания и концентрации гемоглобина в эритроцитах.

ГЛАВА 3. ОБРАТНЫЕ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ И БИОКИНЕТИКИ

В данной главе речь пойдет об оптимизации решения обратной задачи светорассеяния для эритроцитов. Этот шаг необходим для получения морфологических параметров эритроцитов с высокой точностью, которая далее используется при вычислении функциональных параметров, таких как скорость анионного обмена и предельная растяжимость мембраны.

3.1. ПАРАМЕТРИЗАЦИЯ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТА

Для моделирования светорассеяния и последующего решения обратной задачи светорассеяния требуется иметь возможность описывать форму эритроцита с помощью нескольких параметров. Существует ряд простых эмпирических параметрических уравнений формы эритроцита, которые были использованы в оптических исследованиях красных кровяных телец [10,41,43-46]. Несмотря на то, что большинство этих уравнений согласуются с отдельными экспериментальными данными, они не могут надежно описывать все многообразие форм нативных эритроцитов в связи с тем, что данные модели основаны на рассмотрении ограниченного числа клеток [26,33]. Следовательно, применение модели, основанной на физических предположениях, является более предпочтительным.

С механической точки зрения эритроцит представляет собой наполненную гемоглобином эластичную оболочку, форма которой определяется минимумом свободной энергии мембраны [47]. Предполагается [44], что главный вклад в свободную энергию составляет энергия деформации поверхности мембраны. Данная идея была развита за счет включения спонтанной кривизны для учета асимметрии между двумя слоями мембраны [48]. Такого рода модель приводит к широкому многообразию форм эритроцитов (чашевидных и гантелевидных эритроцитов, стоматоцитов, дискоцитов) при вариации спонтанной кривизны и объема на фоне фиксированной площади клетки. В нашей работе рассматриваются только нормальные зрелые нативные эритроциты, для которых вклад мембранного цитоскелета в энергию мембраны не важен [30]. Форма эритроцита может быть получена минимизацией энергии деформации, в виде дискретного профиля, с

использованием численных методов [48,52,53], или в виде аппроксимационной формулы [44,46,54,55]. Для приложений, в которых предполагается множественное вычисление формы эритроцитов, например, при подгонке экспериментальных индикатрис к расчетным для решения обратной задачи светорассеяния, форма эритроцита должна быть одновременно физически реалистичной легко вычислимой и описываемой малым набором параметров. Важно, чтобы параметры модели имели ясный физический (или геометрический) смысл в противовес абстрактным эмпирическим моделям.

Основываясь на предположениях о том, что форма эритроцита определяется условием минимума энергии деформации поверхности, описанных в разделе 1.2, форма может быть определена численно. Энергия деформации поверхности записывается в виде функционала:

$$E(A, c_0) = \frac{k_c}{2} \oint_A (c_p + c_m - c_0)^2 dS \tag{38}$$

где c_p и c_m – главные кривизны поверхности мембраны, k_c – константа упругости, A – замкнутая поверхность. Спонтанная кривизна c_0 описывает кривизну свободной мембраны (незамкнутой части мембраны, «вырезанной» из клетки) и может быть отличной от нуля в связи с различиями состава и свойств внутреннего и внешнего слоёв мембраны. Минимизация функционала (38) при фиксированных объеме V и площади S приводит к искомой форме. При описании формы может также использоваться величина SI, объемный индекс сферичности, обозначающий отношение объема нативного эритроцита к объему эритроцита, сферизованного с сохранением площади поверхности S: $SI = 6\sqrt{\pi}\,V/S^{3/2}$. SI = 1 для шара и стремится к нулю при «сдувании» шара до плоской фигуры с сохранением площади. Таким образом, форму эритроцита можно рассматривать, как функцию от трех параметров: V, SI и c_0. Для упрощения последующего обсуждения вводится безразмерная спонтанная кривизну c_d:

$$c_d = c_0 \left(\frac{S}{4\pi}\right)^{1/2} = c_0 \left(\frac{3V}{4\pi \cdot SI}\right)^{1/3} \tag{39}$$

c_d нормирована на площадь, равна c_0при S = 4π и вместе с заданным SI однозначно определяет безразмерную форму эритроцита. Полное многообразие форм эритроцита получается из безразмерного многообразия равномерным растяжением.

Для расчета формы эритроцита был использован численный метод, основанный на моделировании осесимметричных двумерных профилей, предложенный Deuling & Helfrich [100]. В этом случае задача минимизации энергии поверхности преобразуется к уравнению Эйлера-Лагранжа.

Однако была обнаружена неоднозначность в решении обратной задачи при параметризации V, SI и c_0 . В связи с этим был осуществлен переход на параметризацию, где d, w, h – диаметр, минимальная толщина и максимальная толщина соответственно. Численный эксперимент со случайными наборами соответствующих параметров показали, что данная параметризация является однозначной [101]. Именно эти параметры были использованы для нахождения аппроксимационного уравнения поверхности эритроцита и для расчета базы данных теоретических сигналов.

В качестве аппроксимационного уравнения для формы эритроцита использовалась расширенная формула Фанга пятого порядка (N=5):

$$z = \pm\sqrt{1-\left(\frac{2x}{d}\right)^2}\sum_{n}^{N-1} C_n\left(\frac{2x}{d}\right)^{2n} \tag{40}$$

где C_0 – C_{N-1} – свободные параметры и d – коэффициент растяжения. Это приближение дает точность определения формы эритроцита порядка 40 нм (при этом в пространстве индикатрис квадрат нормы не превышает 0.1%), что совпадает с температурными флуктуациями поверхности эритроцита [14] и является достаточным для рассматриваемых в работе задач.

3.2. Метод баз данных

Характеризация одиночных частиц с относительно простой формой по сигналам светорассеяния сводится к задаче оптимизации, т.е. подгонке теоретического сигнала к экспериментальному, например, с помощью метода наименьших квадратов. Осциллирующая форма индикатрис с сильной зависимостью

от параметров частиц требует использования устойчивых методов глобальной оптимизации. В частности, стохастические методы глобальной оптимизации [102,103] и метод DiRect [103,104] применяются для характеризации сферических частиц.

Однако при переходе к более сложным формам частиц, таким как эритроциты, методы оптимизации становятся вычислительно сложными и занимают много машинного времени, в связи с увеличением числа параметров модели и вычислительным усложнением решения прямой задачи (расчета индикатрисы). Способ решения обратной задачи должен определять характеристики клеток за разумное время (миллисекунды), для последующего анализа в клинической диагностике, базирующейся на данных тысяч частиц.

С целью решения обратной задачи светорассеяния и поиска параметров эритроцитов по измеряемым сигналам на сканирующем проточном цитометре, был выбран метод баз данных. В рамках данного подхода предполагается предварительно однократно подготовить набор теоретических индикатрис эритроцитов в широком диапазоне физиологических параметров для последующего сравнения экспериментального сигнала с набором сигналов базы данных.

Ранее в нашей лаборатории с моим участием была насчитана случайная база данных теоретических сигналов светорассеяния от эритроцитов в размере 600 тысяч, в диапазоне физиологических параметров: диаметр эритроцита $d \in [4 \div 10]$ мкм, минимальная толщина эритроцита $w \in [0.01 \div 7]$ мкм, максимальная толщина $h_2 \in [1.3 \div 7]$ мкм, показатель преломления клетки $RI \in [1.01 \div 1.2]$. Для расчета интенсивности картин светорассеяния также необходимо учитывать угол ориентации частицы в потоке – он варьировался в диапазоне $\theta \in [70 \div 90]$. Результаты обработки данных с помощью этого подхода представлены в работе [105], медианная точность определения диаметра составила 500 нм.

В данной работе была насчитана регулярная база данных размером 1.1 миллион индикатрис, которая включает в себя 25 узлов по диаметру, 15 узлов по минимальной толщине, 24 узла по максимальной толщине, 10 узлов по показателю преломления и 10 узлов по углу ориентации. 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:

$$I(n) = I(n_0) \cdot \left(\frac{n}{n_{\text{ср}}} - 1\right)^2 \Big/ \left(\frac{n_0}{n_{\text{ср}}} - 1\right)^2 \qquad (41)$$

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

Теоретические индикатрисы эритроцитов для базы данных были насчитаны методом дискретных диполей (МДД) с помощью программного обеспечения ADDA, разработанного в нашей лаборатории и находящегося в открытом доступе [106]. МДД основан на объемной дискретизации частицы, поэтому он применим к частицам произвольной формы и внутренней структуры. Детальное описание метода опубликовано в нескольких работах [107,108]. Основным ограничением МДД является его вычислительная сложность, которая увеличивается пропорционально числу объемных элементов дискретизации (диполей). Для корректного моделирования эритроцитов достаточно дискретизации ADDA, соответствующей 10-11 диполям на длину волны. Все расчеты были проведены на вычислительном кластере суперкомпьютерного центра Новосибирского Государственного Университета [109]. Типичное время расчёта одной индикатрисы среднего эритроцита составляет около 1 минуты на одном ядре процессора Intel X5355 (2.66 ГГц).

3.3. ТЕСТИРОВАНИЕ АЛГОРИТМА ОБРАБОТКИ

В данной работе было проведено тестирование разрабатываемого подхода, включающего в себя комбинацию регулярной и случайной базы данных с применением интерполяции по показателю преломления. Для сравнения результатов обработки между текущим вариантом и первоначальным, базирующимся на

случайной базе данных, использовались теоретические данные сигналов светорассеяния эритроцитов.

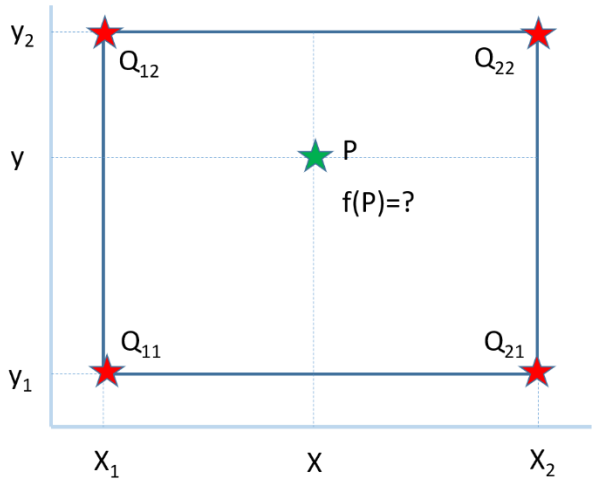


Рис. 9. Иллюстрация для объяснения работы алгоритма билинейной интерполяции в двумерном случае.

Изначально регулярная база данных в пространстве пяти параметров для эритроцитов была насчитана для реализации алгоритма билинейной интерполяции, которая реализовывалась согласно следующей формуле:

$$f(x,y) = \frac{1}{(x_2 - x_1)\cdot(y_2 - y_1)}[f(Q_{11})\cdot(x_2 - x)\cdot(y_2 - y) + f(Q_{21})\cdot \\ \cdot(x - x_1)\cdot(y_2 - y) + f(Q_{12})\cdot(x_2 - x)\cdot(y - y_1) + f(Q_{22})\cdot \\ \cdot(x - x_1)\cdot(y - y_1)] \quad (42)$$

где$f(Q_{ij})$ – углы базы данных с соответствующими значениями x_i и y_j, схематичное представление изображено на Рис. 9. Однако, полученные результаты показали, что при размере базы данных 1.1 млн записей, достигнуть необходимой точности определения параметров не удается. Наблюдение обуславливается сдвигом фазы в индикатрисе от узла к узлу по некоторым параметрам. Это приводит к тому, что в результате билинейной интерполяции приходится складывать значения индикатрис в узлах, которые для одного и того же угла рассеяния имеют разные экстремумы. Таким образом, интерполяция в пятимерном пространстве приводит к нивелированию

контраста индикатрисы и ошибкам при решении обратной задачи светорассеяния (Рис. 10).

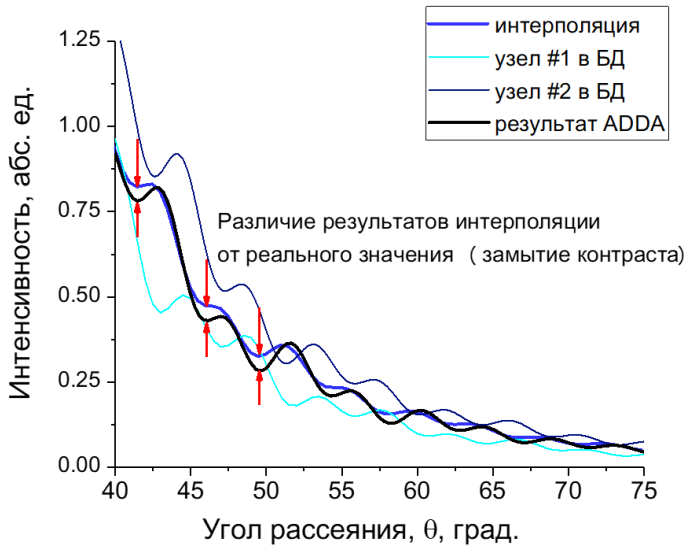


Рис. 10. На графике представлены четыре индикатрисы: синяя – индикатриса, полученная в результате алгоритма интерполяции между узлами базы данных #1 и #2, голубая и темно синяя – индикатрисы базы данных, и черная – реальный сигнал для частицы, полученной с помощью ADDA с параметрами d=7.2 мкм, w=2.2 мкм, h2=3.5 мкм, n=1.048, θ=85˚. Красным выделена область замытия контраста интерполированного сигнала по отношению к реальному.

Нами была обработана 1000 сигналов методом случайной базы данных (ранее используемым методом) и комбинированным методом (случайная плюс регулярная база данных) с интерполяцией по показателю преломления. Средние значения разницы между диаметром теоретической индикатрисы и значением диаметра, полученного в процессе обработки методом случайной базы данных, составили 0.14±0.008 мкм, а для предлагаемого в работе комбинированного метода это значение – 0.09±0.008 мкм. Для показателя преломления комбинированный метод тоже дал улучшение в точности определения параметра: средняя ошибка снизилась с 5.2±0.2% до 3.8±0.12%. Эти результаты отражены на Рис. 11.

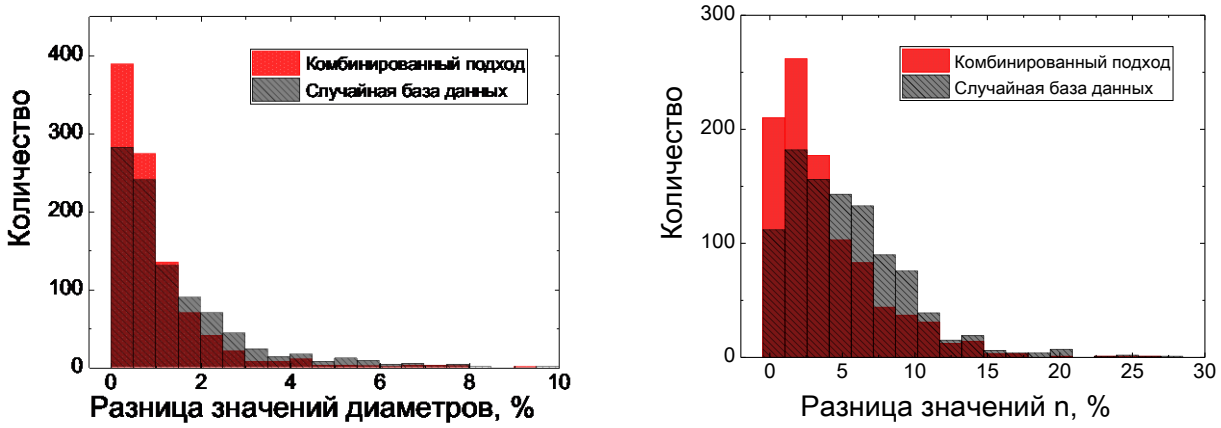


Рис. 11. Представлены гистограммы, отражающие процентное распределение разности между реальным значением теоретической индикатрисы и значением, полученным в процессе решения обратной задачи светорассеяния методом случайной базы данных или разработанным в работе комбинированным подходом (две базы данных и интерполяция по показателю преломления – n)

3.4. Проверка метода на экспериментальных данных

В настоящем разделе представлены результаты работы алгоритма на экспериментальных данных. Реализация методов расчета базы данных и обработки проб осуществлена в среде LabView [110]. Метод решения обратной задачи сводится к задаче глобальной оптимизации взвешенной суммы квадратов:

$$\Phi(\boldsymbol{\beta}) = \left\| I_{exp} - I_{th}(\boldsymbol{\beta}) \right\|^2 = \sum_{j=1}^{k} \left[w(\theta_j) \left(I_{exp}(\theta_j) - I_{th}\left(\theta_j, \boldsymbol{\beta}\right) \right) \right]^2 \quad (43)$$

где

$$w(\theta) = \frac{1}{\theta} \exp\left[-2ln^2 \left(\frac{\theta}{54} \right) \right] \quad (44)$$

весовая функция, снижающая воздействие шума на результаты подгонки из-за быстрого спина индикатрисы для больших улов рассеяния, β – вектор параметров модели, I_{th} и I_{exp} – расчётная и экспериментальная индикатриса соответственно, k – число точек индикатрисы (здесь в диапазоне θ 10°-70°).

Сравнивая экспериментальные индикатрисы со всем множеством теоретически рассчитанных индикатрис в базе данных, мы находим наиболее близкую по норме индикатрису и получаем приближенное описание всей поверхности Ф(β). Последнее свойство используется для вычисления плотности вероятности функции P(β) в пространстве параметров для данной индикатрисы с помощью байесовского подхода. P(β) далее используется для вычисления математического ожидания (ME) μ = β и стандартного отклонения (SD) параметров. Заметим, что данный метод позволяет определить все параметры модели с контролируемой точностью – в отличие от простого поиска по базе данных.

Для каждой измеренной индикатрисы под решением обратной задачи светорассеяния подразумевается вычисление параметров модели d, w, h2, n, Ψ (математического ожидания ME) и их погрешностей (стандартных отклонений SD). Остальные морфологические параметры эритроцитов: V, S, SI, c_0 (c_d), HC и содержание гемоглобина – являются производными, то есть вычисляются однозначно из пяти параметров оптической модели. Типичные измеренные индикатрисы нативных эритроцитов, наилучшие подгонки и оценки параметров показаны на Рис. 12. Качество подгонки и оценка погрешностей (стандартные отклонения) определяемых параметров может сильно отличаться у разных индикатрис, что определяется как ошибками модели (отличие реальной формы эритроцита от модели), так и инструментальными ошибками (например, смещением клетки относительно центра падающего излучения). Особенностью метода является способность контролировать погрешности индивидуальных измерений, вследствие чего частицы с большими погрешностями могут быть отброшены из рассмотрения.

Точность предлагаемого в работе подхода по определению объема эритроцита повысилась вдвое и достигла медианного значения по популяции 1.2 фл при среднем размере 100 фл.

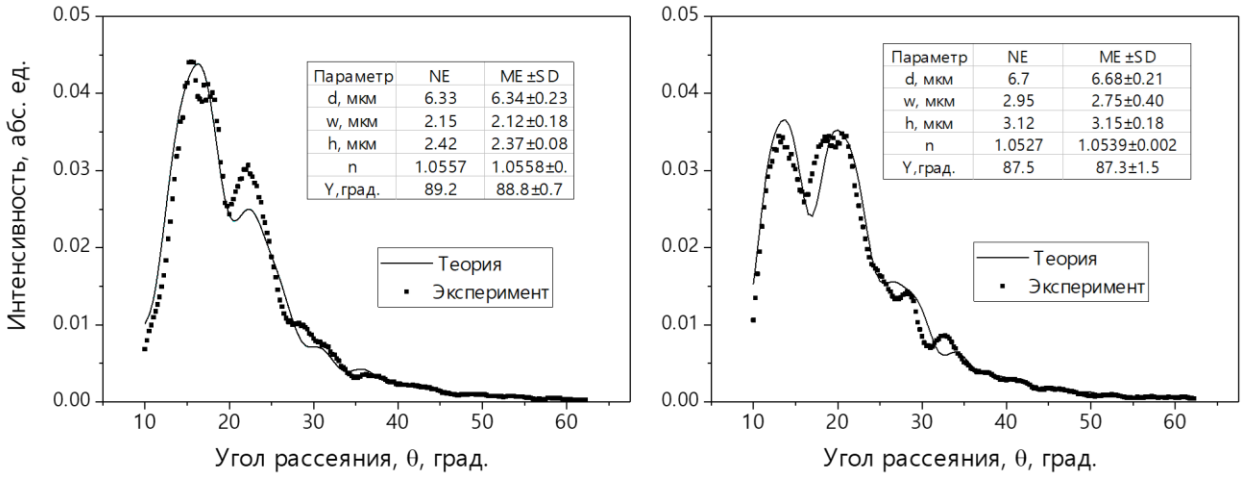


Рис. 12. На рисунке представлены две типовые индикатрисы, обработанные предлагаемым нами подходом, с полученными для них значениями средних величин и погрешностей.

3.5. Измерение анионных обменников

Для того чтобы оценить функциональные показатели эритроцитов, проводятся измерения морфологических изменений во время гемолиза, инициированного хлоридом аммония. Анализ сферизации и разрушения клеток во время гемолиза с помощью алгоритма, описанного ранее в нашей лаборатории [43], позволяет получить два функциональных показателя эритроцитов, а именно: скорость анионного обмена и предельное растяжение мембраны [111]. Анионная проницаемость связана с количеством активно работающих молекул белка полосы 3 и может быть определена по продолжительности стадии сферизации в ходе лизиса эритроцитов. Предельная растяжимость мембраны пропорциональна времени, которое необходимо эритроцитам для перехода из сферического состояния в состояние с разрушенной мембраной. Высокие значения этого показателя соответствуют повышенному значению устойчивости к индуцированному гемолизу.

Для оценки функциональных показателей эритроцитов мы измеряем морфологические изменения во время гемолиза, инициированного хлоридом аммония, как описано в разделе 1.3. Анализ кинетики сферизации с последующим разрушением клеток в процессе изотонического гемолиза осуществляется согласно алгоритму, описанному Чернышевым А.В. [22]. Алгоритм позволяет получить два

основных функциональных показателя популяции эритроцитов: скорость анионного

$$N(t) = exp\left[-\frac{t_\beta}{\tau_0}\left(\left(\frac{t-t_0}{t_\beta}\right)^{\frac{1}{2}} exp\left((t-t_0)/t_\beta\right) + Erfi\left(\left(\frac{t-t_0}{t_\beta}\right)^{\frac{1}{2}}\right)\right)\right] \quad (47)$$

обмена и устойчивость мембраны к изотонического гемолизу.

Зависимость между временем кинетики лизиса и относительной концентрацией числа эритроцитов к числу разрушенных клеток выводится из двух следующих уравнений: (45) – динамика спонтанного распада субпопуляции эритроцитов, которые имеют одинаковую вероятность разрыва, где n(t') – количество клеток как функция от времени; (46) – функция мембранного натяжения σ, где σ_β – характерные параметры популяции эритроцитов [47,48].

$$\frac{d}{dt}n(t') = -\frac{n(t')}{\tau} \quad (45)$$

$$\tau = \tau_0\left(\sigma_\beta/\sigma\right)^{1/2}\exp(-\sigma/\sigma_\beta) \quad (46)$$

В результате получается уравнение (47), которое применяется для аппроксимации зависимости количества клеток N(t) от времени в процессе изотонического гемолиза. В результате обработки эксперимента данной теоретической зависимостью получаем два параметра (времена t_0 и t_β для сферизации и разрыва мембраны соответственно). Здесь τ_0 – время спонтанного разрушения мембраны в популяции эритроцитов, а Erfi – мнимая функция ошибок [112].

Так же для связи времен, полученных из обработки экспериментальных данных по убыли частиц от времени, с функциональными характеристиками требуются уравнения модели лизиса. Они подробно описаны в предыдущих работах [43], поэтому здесь приведем лишь заключительные выражения для концентрации белков и предельной растяжимости мембраны. Эти параметры зависят от начального среднего объема популяции, содержания гемоглобина, индекса сферичности и pH раствора. Данная зависимость содержится в переменных G_i.

$$t_2 = \frac{1}{G_1 G_4}\left(\frac{V_{w2}}{V_{w1}} - 1 - G_2\, ln\left(1 + \frac{\frac{V_{w2}}{V_{w1}} - 1}{1 + G_3 + G_2}\right)\right) \quad (48)$$

$$t_\beta = \frac{6.02 \cdot 10^5 V_{w2} \sigma_\beta}{K_S B G_6} \quad (49)$$

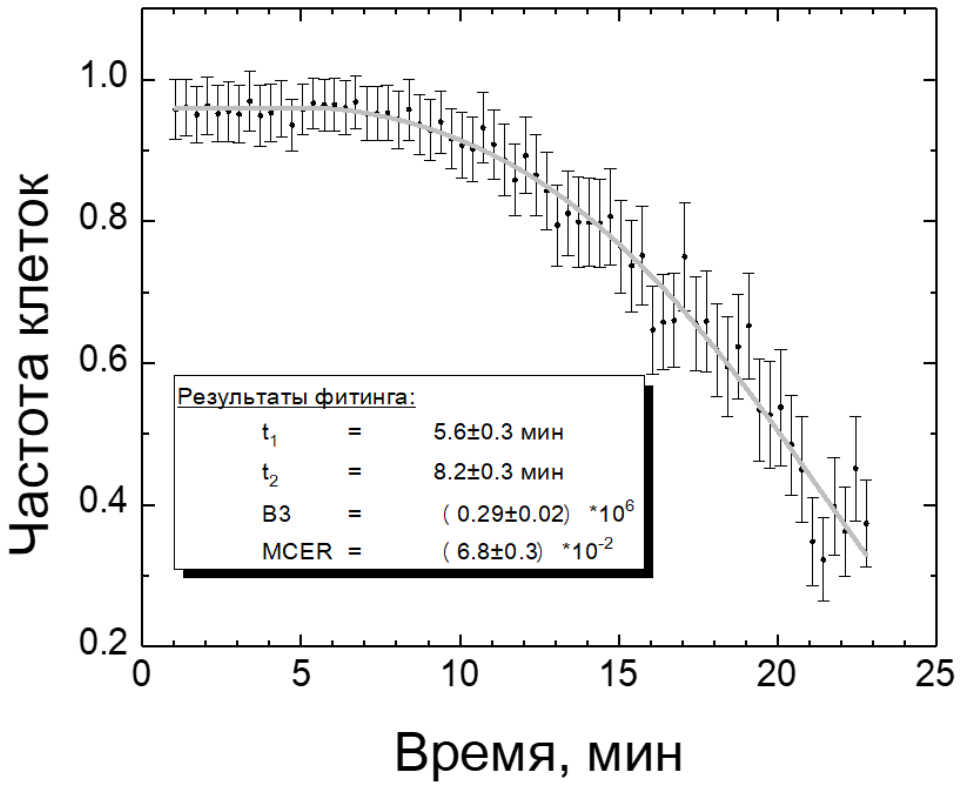


Рис. 13. Кинетика гемолиза эритроцитов. Точки с погрешностью относятся к относительному количеству клеток, измеренному за единицу времени.

Полученные значения количества анионных обменников используются при расчете их общей концентрации в крови и плотности на поверхности единичного эритроцита. Еще два показателя – это, во-первых, предельное растяжение мембраны и, во-вторых, эффективность работы анионного обмена в нативном состоянии эритроцитов (то есть отношение активного числа анионных обменников в нативном состоянии к конечному количеству активированному нифедипином). В итоге,

функциональная категория в характеристике эритроцитов содержит восемь показателей.

3.6. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЛАВЫ 3

Был усовершенствован метод решения обратной задачи светорассеяния для эритроцитов. С этой целью была насчитана регулярная база данных в широком диапазоне физиологических параметров: диаметр эритроцита $d \in [4 \div 10]$ мкм, минимальная толщина эритроцита $w \in [0.01 \div 7]$ мкм, максимальная толщина $h_2 \in [1.3 \div 7]$ мкм, показатель преломления клетки $RI \in [1.01 \div 1.2]$ и угол ориентации частицы в потоке, он варьировался в диапазоне $\theta \in [70 \div 90]$. В алгоритм поиска решения методом наименьших квадратов по теоретически насчитанной базе данных была добавлена весовая функция для коррекции доминирующего влияния малых углов и интерполяция по показателю преломления.

Это позволило получать морфологические параметры эритроцитов с высокой точностью (медианной ошибкой по диаметру 60 нм), которая необходима при вычислении функциональных параметров, таких как скорость анионного обмена и устойчивость эритроцитов к изотоническому гемолизу.

Нами был доработан метод измерения количества анионных обменников, который имеет в своей основе математическую модель сферизации и лизиса эритроцитов за счет изменения осмотичности клеток. Необходимые для модели кинетические времена теперь можно вычислить из относительной концентрации числа эритроцитов к числу разрушенных клеток, появляющихся в процессе гемолиза. В результате для получения функциональных параметров эритроцитов требуется измерение морфологических параметров нативной популяции (объема, индекса сферичности, концентрации гемоглобина) и времен сферизации и разрушения мембраны в процессе гемолиза. Таким образом, возникает исчерпывающий набор параметров для характеризации газотранспортной функции эритроцитов.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ НА АНИОННЫЙ ОБМЕН В ЭРИТРОЦИТАХ

4.1. СУЛЬФАТ МАГНИЯ

Для количественного анализа наших экспериментальных данных, полученных *in vitro*, мы предложили молекулярно-кинетическую модель активации белка полосы 3 сульфатом магния. Предложенная модель включает в себя следующие три этапа:

поток ионов магния Mg^{2+} во внутриклеточную среду эритроцита согласно кинетике Михаэлиса-Ментен [113], [114],

$$Mg_{out}^{2+} + M_{ch} \xleftrightarrow{K_m} Mg_{out}^{2+}M_{ch} \xrightarrow{k_m} Mg_{in}^{2+} + M_{ch} \tag{50}$$

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

количество свободных ионов магния определяется уравнением баланса полного количества внутриклеточного магния, который также может быть связан с различными клеточными компонентами [115], [58], [59], [116],

$$\begin{cases} Mg_{in}^{2+} + A_1 \xleftrightarrow{K_1} MgA_1 \\ Mg_{in}^{2+} + A_2 \xleftrightarrow{K_2} MgA_2 \\ \dots \\ Mg_{in}^{2+} + A_m \xleftrightarrow{K_m} MgA_m \end{cases} \tag{51}$$

где A_i (i=1,…, m) компоненты цитоплазмы взаимодействующие с магнием, а K_i соответствующие им константы равновесия;

Заключительная стадия представляет собой переход белка в активированное состояние в результате реакции со свободным внутриклеточным магнием Mg^{2+} [117], [26]

$$Mg_{in}^{2+} + B \xleftrightarrow{K_B} B_a \tag{52}$$

Где B и B_a неактивированная форма белка полосы 3 и активированная в результате воздействия иона магния соответственно; K_B – скорость реакции активации белка.

В рамках нашей модели предполагается, что константы реакций не зависят от физиологического состояния доноров (отсутствия и наличия признаков гипоксии), хотя концентрации метаболитов в реальности могут незначительно варьироваться.

Как внутренний так и внешний поток ионов магния через мембрану эритроцитов подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен с приблизительно равными по значению константами K_m и V_{max}, то есть $K_m^{efflux} \approx K_m^{influx}$ and $v_{max}^{efflux} \approx v_{max}^{influx}$ [113]. В литературе указаны следующие значения для константы реакции $K_m \approx$ 1мМ и константы скорости $v_{max} \approx$ 35-500 мкМч$^{-1}$ для описания потока ионов магния во внеклеточную среду из эритроцита человека [114]. В результате, можно записать уравнение баланса ионов магния содержащихся внутри эритроцита, учитывая поток из внешней среды (50) и реакцию со всеми внутриклеточными метаболитами (51):

$$\frac{d}{dt}\left([Mg_{in}^{2+}] + \sum_{i=1}^{m} \frac{[A_i]_0[Mg_{in}^{2+}]}{[Mg_{in}^{2+}] + K_i}\right)V = \frac{k_m M_{ch}[Mg_{out}^{2+}]}{[Mg_{out}^{2+}] + K_m} \quad (53)$$

Где $[A_i]_0$ - полная концентрация, как связанного, так и в свободной форме вещества, абсорбирующего на себя ион магния. В данном выражении (53) первое слагаемое в скобках левой части уравнения отвечает за концентрацию свободных ионов магния внутри клетки, а второе слагаемое описывает концентрации связанных форм иона магния с внутриклеточными компонентам из уравнений (51). Правая же часть уравнения характеризует реакцию проникновения иона через мембрану согласно кинетике Михаэлиса-Ментен. Если же взять интеграл от обеих частей уравнения (53) и учесть определение $V_{max}=k_m[M_{ch}]$, а затем выделить отдельно слагаемое, описывающее количество активных анионных обменников на мембране эритроцита, то получим следующую формулу:

$$\left([Mg_{in}^{2+}] + [B_a] + \sum_{i=1}^{m-1} \frac{[A_i]_0[Mg_{in}^{2+}]}{[Mg_{in}^{2+}] + K_i}\right)V = N + \frac{V_{max}[Mg_{out}^{2+}]}{[Mg_{out}^{2+}] + K_m}t \quad (54)$$

где N – полное число свободных ионов Mg^{2+} в начальный момент времени (t=0).

Таблица 4. Внутриклеточные компоненты и соответствующие им константы равновесия для связывания с ионом магния.

Константы и реагенты	Значения	Ссылки
$[Mg_{in}^{2+}]$	~0.2 мМ	(Gunther, 2007)
[ATP]	~1.65 мМ	(Gunther, 2007)
[ADP]	~0.2 мМ	(Raftos et al., 1999)
[DPG]	~4.5 мМ	(Gunther, 2007)
[Hb]	~5 мМ	(Raftos et al., 1999)
K_m	1 мМ	(Chanson et al., 2005)
K_{ATP}	0.05 мМ	(Bock et al., 1991)
K_{ADP}	0.4 мМ	(Gunther, 2007)
K_{DPG}	1.2 мМ	(Bock et al., 1991)
K_{Hb}	~65-400 мМ	(Gunther, 2007)

Для упрощения анализа полученной формулы (54) можно использовать известные значения концентраций реагирующих с магнием веществ внутри клетки. В нашем случае все участники интересующих реакций указаны в таблице 4. Среднее значение концентрации несвязанного магния в эритроците человека не превышает 0.2 мМ; концентрация аденозиндифосфата [АДФ] ~1.65 мМ; 2, 3-дифосфоглицерата [ДФГ]~4.5 мМ; для гемоглобина [Hb]~5 мМ [115], что согласуется со следующими значениями констант K_{ATP}=0.05 mM, K_{ADP}=0.4 mM, K_{DPG}=1.2 mM, K_{Hb}~ 65-400 mM. Подставляя эти данные в исходное выражение (54), можно с вполне хорошей

точностью (относительная ошибка менее 10%) аппроксимировать левую часть уравнения более простой формулой:

$$[Mg_{in}^{2+}]V + \left[1 + \frac{[DPG]_0}{K_{DPG}}\right] + [ATP]_0 V = N + \frac{V_{max}[Mg_{out}^{2+}]}{[Mg_{out}^{2+}] + K_m} t \qquad (55)$$

В уравнении (55) отмечен существенный расход ионов магния на связывание с внутриклеточными компонентами такими как [АТФ] и [ДФГ]. Так же стоит отменить что значение величины K_{DPG} варьируется от автора к автору. Взятая нами величина для константы скорости была получена методом ЯМР-спектроскопии ^{25}Mg [115]. Выбранное значение согласуется с данными [58], полученными в 1978 году. Методы измерения, созданные после 1980 годов, способны с большей точностью описать количественно процесс диффузии ионов магния, поэтому на значениях, полученных в работе 1991 года мы и остановились для подстановки в молекуляно-кинетическую модель.

Из реакционной схемы (52) количество активных анионных обменников на одиночном эритроците можно представить как

$$B_a = \frac{B_0}{1 + \frac{K_B}{[Mg_{in}^{2+}]}} \qquad (56)$$

где B_0 – полное количество белков полосы три на мембране эритроцита. Теперь, подставляя выражение для Mg_{in}^{2+} из уравнения (55) в зависимость количества активных анионных обменников от их общего числа, получаем:

$$B_a = \frac{B_0}{1 + \frac{K_B}{[N] + \frac{V\mathrm{Mg}_{out_{max}}^{2+}}{([Mg_{out}^{2+}] + K_m)/V\left[1 + \frac{[DPG]_0}{K_{DPG}}\right]_0}}} \qquad (57)$$

Данное выражение отражает зависимость количества активированного белка полосы 3 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 которой

находятся эритроциты, можно узнать ее оптимальное значение для насыщения анионных обменников. Функция (57) не имеет экстремумов и при увеличении концентрации магния стремится к значению B_0. Для каждого отдельного донора распределение данного параметра (B_a) как и его средние значения будут отличаться. Следовательно, расчет индивидуальной дозы ионов Mg^{2+} для достижения определенной степени активации анионных обменников возможно произвести согласно разработанной молекулярно-кинетической модели.

В большинстве наших экспериментов мы использовали концентрации сульфата магния, при которых соответственно внеклеточная концентрация ионов [Mg_{out}^{2+}] » 1 мМ ≈ K_m. Это условие выполнялось, как непосредственно при экспериментах в пробирках, так и в in situ экспериментах с пациентами, находящимися на токолитической терапии (пациентам ежедневно вводили по 10 мМ сульфата магния). При таких концентрациях поток ионов внутрь клетки максимален и равен скорости потока, согласующейся с кинетикой Михаэлиса-Ментан V_{max}, а поток ионов из клетки гораздо ниже внутриклеточной концентрации магния $[Mg_{in}^{2+}]$ ≈0.2 mM << K_m . В результате, скоростью потока в обратном направлении от клетки можно пренебречь и считать поток ионов внутрь равным V_{max}. В таком случае уравнение (55) будет иметь упрощенный вид и зависимость от $[Mg_{out}^{2+}]$ пропадет (58).

$$[Mg_{in}^{2+}]\left(1+\frac{[DPG]_0}{K_{DPG}}\right)\ V+[ATP]_0\ V=N+v_{max} \qquad (58)$$

Таким же образом меняется и зависимость числа активных анионных обменников от числа их полного количества в мембране эритроцита. Поэтому выражение (57) можно записать в более удобном виде для анализа полученной зависимости:

$$B_a(t)=\frac{B_0}{1+\frac{1/\gamma-1}{t/\tau+1}} \qquad (59)$$

где γ – доля активных анионных обменников эритроцита на начало эксперимента ($B_a(0)= \gamma B_0$):

$$\gamma = \left[1 + \frac{K_B V}{N - [ATP]_0\ V}\left(1 + \frac{[DPG]_0}{K_{DPG}}\right)\right]^{-1} \quad (60)$$

а τ - характерное время активации белка полосы 3 в результате реакции с $MgSO_4$, содержащимся во внеклеточном окружении.

$$\tau = \frac{N - [ATP]_0\ V}{v_{max}} \quad (61)$$

Разработанная молекулярно-кинетическая модель, в частности уравнение (59), использовалось для аппроксимации временных зависимостей количества анионных обменников, полученных в ходе экспериментов in vitro. Сравнение экспериментальных данных с предложенной теорией позволяет получить для каждого измерения (отдельного эритроцита или их популяции) 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.

4.2. Нифедипин

Для количественного анализа экспериментальных данных in vitro была предложена молекулярно-кинетическая модель активации белка полосы 3 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 приближает (коэффициент Хилла ~ 1) кинетику основных кальциевых каналов [118] и насосов [119] в эритроцитах, и соответствующие константы реакции имеются в литературе [40,120]. Поэтому накопление внутриклеточного Ca^{2+} можно описать (при условии большего ингибирования нифедипином PMCA по сравнению с кальциевыми каналами) следующими реакциями:

$$I + P_a \xleftrightarrow{K_{IP}} P_i \quad (62)$$

$$Ca^{2+}_{in,free} + P_a \xleftrightarrow{K_P} Ca^{2+}P_a \xrightarrow{k_P} Ca^{2+}_{ex} \quad (63)$$

$$I + C_a \xleftrightarrow{K_{IC}} C_i \quad (64)$$

$$Ca^{2+}_{ex,free} + C_a \xleftrightarrow{K_C} Ca^{2+}C_a \xrightarrow{k_C} Ca^{2+}_{in} \quad (65)$$

где I - ингибитор (нифедипин); P_a и P_i - активный и неактивный кальциевый насос PMCA, соответственно; K_{IP} - константа равновесного связывания нифедипина с PMCA; $Ca^{2+}_{in,free}$ является внутриклеточным свободным Ca^{2+} ; Ca^{2+}_{ex} полная внеклеточная концентрация ; K_P и k_P являются константами в рамках кинетики Михаэлиса-Ментен для PMCA; 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 = 4 мкМ, и максимальная скорость выведения Ca^{2+} на единицу объема может варьироваться в популяции эритроцитов для одного донора в диапазоне [4÷60] мМ/(клетки·час) [40,121,122]. Кроме того, активность работы PMCA чрезвычайно чувствительна к температуре и отзывается 30-кратным снижением скорости транспорта на каждые 10°C [123]. Что касается кальциевых каналов, известно [40,120], что для эритроцитов человека K_C = 0.8÷1.3 мМ, а максимальная скорость поступления Ca^{2+} внутрь клетки на единицу объема $k_C C_a/V$ ~ 50 мМ/(клетки·час). Поскольку концентрация свободного Ca^{2+} в эритроцитах $\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]$ ~ 60 нМ << K_P, равновесие в реакции (63) 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 PMCA. Более сильное ингибирование PMCA, 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 [124], который используется для определения концентрации свободных ионов кальция в клетке:

$$\begin{cases} Ca^{2+}_{in,free} + A_1 \xleftrightarrow{K_1} CaA_1 \\ Ca^{2+}_{in,free} + A_2 \xleftrightarrow{K_2} CaA_2 \\ \dots \\ Ca^{2+}_{in,free} + A_m \xleftrightarrow{K_m} CaA_m \end{cases} \quad (66)$$

где (i=1, ..., 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 белка полосы 3 — это динамический процесс, который формально можно описывать реакциями Михаэлиса-Ментен (активация белка полосы 3 обусловлена его комплексообразованием, в то время как диссоциация комплекса приводит к дезактивации AE1), что согласуется с общим теоретическим соображением по активации киназ и фосфатаз внутри эритроцита:

$$Ca^{2+}_{in,free} + B_d \xleftrightarrow{K_{Bd}} CaB_d \xrightarrow{k_a} CaB_a \quad (67)$$

$$CaB_a \xleftrightarrow{K_{Ba}} Ca^{2+}_{in,free} + B_a \quad (68)$$

$$B_a \xrightarrow{k_d} B_d \quad (69)$$

где B_d и B_a деактивированые и активированые AE1 соответственно; CaB_d и CaB_a являются комплексами Ca^{2+}_{in} связанного 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).

Согласно реакциям (62) - (65) баланс концентрации ионов кальция в отсутствии нифедипина обеспечивается с одной стороны притоком ионов внутрь через входные каналы, а с другой стороны выведением Ca^{2+} посредством кальциевого насоса PMCA:

$$\frac{k_C\left[Ca^{2+}_{ex,free}\right]\ C_0}{\left[Ca^{2+}_{ex,free}\right]+K_C}=\frac{k_P\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]_0\ P_0}{\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]_0+K_P} \tag{70}$$

где нижний индекс «0» при концентрации кальция означает величину при нулевой концентрации ингибитора (нифедипина), P_0 и C_0 - общее количество насосов PMCA и входных каналов в мембране эритроцитов (которые все предполагаются активными в отсутствие нифедипина). В присутствии нифедипина P_a и C_a количество активных PMCA и входных каналов, соответственно, выражается уравнениями равновесия из-за быстрой реакции нифедипина с мембранными рецепторами:

$$P_a[I]=K_{IP}(P_0-P_a) \tag{71}$$

$$C_a[I]=K_{IC}(C_0-C_a) \tag{72}$$

Из уравнений (71) - (72) можно рассчитать количество активных PMCA и количество активных входных каналов в зависимости от концентрации ингибитора,

$$P_a=\frac{P_0K_{IP}}{K_{IP}+[I]} \tag{73}$$

$$C_a=\frac{C_0K_{IC}}{K_{IC}+[I]} \tag{74}$$

Тогда скорость накопления внутриклеточного содержания Ca^{2+} описывается следующим дифференциальным уравнением по времени t:

$$\frac{d}{dt}Ca^{2+}_{in}=\frac{k_C\left[Ca^{2+}_{ex,free}\right]\ C_a}{\left[Ca^{2+}_{ex,free}\right]+K_C}-\frac{k_P\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]\ P_a}{\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]+K_P} \tag{75}$$

Имея ввиду, что $\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]<<K_P$ [85,124], уравнение (75) может быть преобразовано (с относительной точностью порядка $\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]/K_P$ ~0.01, что составляет ~1% в процентом соотношении), в предположении что $\left[Ca^{2+}_{ex,free}\right]$ является постоянной величиной с учетом уравнениям (70):

$$\frac{d}{dt}Ca_{in}^{2+} = \frac{k_P}{K_P}\left(\frac{P_0}{C_0}C_a\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 - P_a\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]\right) \quad (76)$$

Подставляя уравнения (73) и (74) в уравнение (76) и принимая объем клетки V постоянным, получаем:

$$\frac{d}{dt}\left[Ca_{in}^{2+}\right] = \frac{k_P P_0}{K_P V}\left(\frac{K_{IC}}{K_{IC}+[I]}\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 - \frac{K_{IP}}{K_{IP}+[I]}\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]\right) \quad (77)$$

Уравнение (77) описывает кинетику увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция $\left[Ca_{in}^{2+}\right]$, обусловленную ингибированием кальциевых насосов. Согласно реакциям буферизации (66), часть ионов кальция связывается с различными внутриклеточными компонентами, что может быть описано следующим уравнением баланса:

$$\left[Ca_{in}^{2+}\right] = \left[Ca_{in,free}^{2+}\right] + \sum_{i=1}^{m}[CaA_i] = \left[Ca_{in,free}^{2+}\right] + \sum_{i=1}^{m}\frac{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right][A_i]_0}{K_i + \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]} \quad (78)$$

В диапазоне концентраций, соответствующих случаю эритроцитов человека, уравнение (78) может быть аппроксимировано следующим выражением с учетов двух главных буферных компонентов [124]:

$$\left[Ca_{in}^{2+}\right] = \frac{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right][A_2]_0}{K_1} + \frac{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right][A_2]_0}{K_2 + \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]} \quad (79)$$

где $[A_2]_0/K_1$=0.32÷0.37 (соответствует буферу с меньшей аффинностью, которую по большей части составляет гемоглобин); $[A_2]_0$ =20÷160 мкМ и K_2 =4÷50 мкМ (описывают буфер со средней степенью аффинности, сюда относятся кальмодулин и кальпромотин). Более того, в условиях физиологического равновесия $K_2 >> \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$ уравнение (79) приводит к неизменной величине отношения $\left[Ca_{in}^{2+}\right]/\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$:

$$\frac{\left[Ca_{in}^{2+}\right]}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]} = \frac{\left[Ca_{in}^{2+}\right]_0}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0} \quad (80)$$

Комбинация уравнений (77) и (80) приводит к

$$\frac{d}{dt}\left[Ca_{in,free}^{2+}\right] = \\ = \frac{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0}{\left[Ca_{in}^{2+}\right]_0}\frac{k_P P_0}{K_P V}\left(\frac{K_{IC}}{K_{IC}+[I]}\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 - \frac{K_{IP}}{K_{IP}+[I]}\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]\right) \quad (81)$$

Из уравнения (81) концентрация $\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$ может быть выражена следующим образом как функция от времени:

$$\left[Ca_{in,free}^{2+}\right] = \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 + \left(\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{0_{max}}\right)(1 - exp(-t/\tau)) \quad (82)$$

где

$$\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 \frac{1 + K_{IP}^{-1}[I]}{1 + K_{IC}^{-1}[I]_{max}} \quad (83)$$

$$\tau = \frac{K_P V}{k_P P_0}\frac{\left[Ca_{in}^{2+}\right]_0}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0}(1 + K_{IP}^{-1}[I]) \quad (84)$$

Взяв во внимание следующие средние значения величин из литературы для эритроцитов человека ($\left[Ca_{in}^{2+}\right]/\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$~40, $k_P P_0/V$ ~30 мМ/(л·клетка·час), K_P ~ 4 мкМ) [40,124] можно оценить среднее характеристическое время $\tau_{50\%}$ для состояния 50% заблокированных насосов (т.е. при $[I]=K_{IP}$) и согласно уравнению (84) это время оказывает равным $\tau_{50\%}$~0.3 мин. Данная величина значительно меньше типичных времен активации анионных обменников эритроцитов в экспериментах с нифедипином. Более того, кинетика активации анионных обменников, которая описывается через сумму активных форм белка полосы 3 $B_a' = B_a + CaB_a$. Количество активных белков является функцией от времени и лимитируется реакциями (67) - (69), которые появляются когда $\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$ достигает своего максимального значения $\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max}$ после ингибирования нифедипином, что приводит к следующему дифференциальному уравнению:

$$\frac{d}{dt}B_a^{'} = \frac{k_a B_0 K_{Bd}^{-1}}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max}^{-1} + K_{Bd}^{-1}} - \left(\frac{k_a K_{Bd}^{-1}}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max}^{-1} + K_{Bd}^{-1}} + \frac{k_d\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max}^{-1}}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max}^{-1} + K_{Ba}^{-1}}\right)B_a^{'} \quad (85)$$

где B_0 это полное количество анионных обменников на эритроците:

$$B_0 = B_a + CaB_a + B_d + CaB_d = B'_a + B'_d \tag{86}$$

В свою очередь, начальные условия процесса активации соответствуют следующему уравнению баланса:

$$0 = \frac{k_a B_0 K_{Bd}^{-1}}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0^{-1} + K_{Bd}^{-1}} - \left(\frac{k_a K_{Bd}^{-1}}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0^{-1} + K_{Bd}^{-1}} + \frac{k_d \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0^{-1}}{\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0^{-1} + K_{Ba}^{-1}} \right) B_{a0}^{'} \tag{87}$$

Константы равновесия K_{Ba} и K_{Bd} могут быть оценены как ~ (8÷25)·мкМ (так как это обратные величины для известной из литературы аффинности (4÷13)·10^4 M^{-1} [39]), что гораздо больше значений концентрации свободных ионов кальция $\left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$~60 нМ в эритроцитах. Таким образом, выполняется соотношение $K_{Ba} \sim K_{Bd} >> \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]$. Более того, уравнение (85) может быть разрешено следующим образом в условия пренебрежения малыми величинами $K_{Ba}^{-1} << \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0^{-1}$ в знаменателе:

$$B_a^{'} = B_{a\,0}^{'} + \left(B_{a\,max}^{'} - B_{a\,0}^{'}\right)(1 - exp(-kt)) \tag{88}$$

где

$$k = \frac{k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max}}{K_{Bd}} + k_d \tag{89}$$

$$B_{a\,max}^{'} = \frac{k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max} B_0}{k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_{max} + k_d K_{Bd}} \tag{90}$$

$$B_{a\,0}^{'} = \frac{k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 B_0}{k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 + k_d K_{Bd}} \tag{91}$$

Уравнения (85) и (87) не могут быть упрощены как уравнения (90) и (91) в условиях пренебрежения малой величиной в знаменателе, так как количество активированных анионных обменников не может быть намного меньше общего числа обменников на мембране эритроцита (тем самым $k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0 \sim k_d K_{Bd}$). Параметр, характеризующий данный случай удобно определить следующим образом:

$$\lambda = \frac{k_a \left[Ca_{in,free}^{2+}\right]_0}{k_d K_{Bd}} \tag{92}$$

Таким образом, уравнение (91) не может быть упрощенно пренебрежением в знаменателе малой величиной при условии λ ~1.

Активация анионных обменников математически эквивалентна ситуации увеличения числа B_e, то есть «эффективных» обменников, в смысле стандартных анионных обменников с измеренными в литературе константами Михаэлиса-Ментен [43]. Более того, можно ввести коэффициент ε, который будет отражать эффективность процесса активации:

$$B_e = \varepsilon B_a^{'} + B_d^{'} = (\varepsilon - 1)B_a^{'} + B_0 \tag{93}$$

Подставляя уравнение (88) в уравнение (93) можно получить:

$$B_e = B_{e_0} + B_{e_{add}}(1 - exp(-kt)) \tag{94}$$

где

$$B_{e_0} = (\varepsilon - 1)B_{a_0}^{'} + B_0 \tag{95}$$

$$B_{e_{add}} = (\varepsilon - 1)\left(B_{a\,max}^{'} - B_{a0}^{'}\right) \tag{96}$$

Комбинация уравнений (83), (89) - (92) и (95) - (96) дает:

$$B_{e_{add}} = \frac{\gamma[I]}{1 + \beta[I]} \tag{97}$$

$$k = \tilde{k} + \frac{\alpha[I]}{1 + K_{IC}^{-1}[I]} \tag{98}$$

$$B_{e_0} = \frac{\varepsilon\lambda + 1}{\lambda + 1} B_0 \tag{99}$$

$$\alpha = \lambda k_d (K_{IP}^{-1} - K_{IC}^{-1}) \tag{100}$$

$$\beta = \frac{\lambda K_{IP}^{-1} + K_{IC}^{-1}}{\lambda + 1} \tag{101}$$

$$\gamma = \frac{(\varepsilon - 1)\lambda B_0 (K_{IP}^{-1} - K_{IC}^{-1})}{(\lambda + 1)^2} \tag{102}$$

$$\tilde{k} = k_d(\lambda + 1) \tag{103}$$

Уравнения (97) и (98) приводят к следующему соотношению между $B_{e\,add}$ и k:

$$B_{e\,add} = \frac{(k - \tilde{k})\delta}{1 + (k - \tilde{k})\xi} \tag{104}$$

$$\delta = \frac{\gamma}{\alpha} \tag{105}$$

$$\xi = \frac{\beta - K_{IC}^{-1}}{\alpha} \tag{106}$$

Для низких концентраций нифедипина, при которых выполняется условие $K_{IC}^{-1}[I] << 1$, $\beta[I] << 1$, уравнения (98), (99) и (104) могут быть аппроксимированы линейной зависимостью от концентрации нифедипина $[I]$:

$$k \approx \tilde{k} + \alpha[I] \tag{107}$$

$$B_{e\,add} \approx \gamma[I] \tag{108}$$

$$B_{e\,add} \approx (k - \tilde{k})\delta \tag{109}$$

В результате уравнение (84) используется в данной работе для обработки экспериментальных данных с целью получения параметров $B_{e\,0}$, $B_{e\,add}$ и k, которые затем могут быть проанализированы в рамках линейного приближения (107) - (109) при низких концентрациях нифедипина $[I]$.

Математическое моделирование реакционной системы (62) - (69) при условии низких (по сравнению с концентрацией для ситуации 50% ингибирования) концентраций нифедипина в условиях наших экспериментов и известных литературных данных приводит к полученной упрощенной модели для аппроксимации экспериментальных данных.

4.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЛАВЫ

Разработаны молекулярно-кинетическая модели потенциально полезные в медицинских исследованиях роли функциональных свойств эритроцитов в CO_2/O_2 обмене организма. В области перинатальной медицины вопрос изучения анионного

обмена эритроцитов играет важную роль, так как информации об участия токолитического препарата - сульфата магния в регуляции гипоксических состояний очень мало и механизм регуляции его действия на эритроциты не до конца изучен.

С помощью молекулярно-кинетической модели взаимодействия ионов магния с анионными обменниками эритроцитов получены следующие характеристики популяции эритроцитов, которые несут значимую информацию для оценки проведения терапии сульфатом магния: 1) доля активных анионных обменников; 2) максимальное количество белков полосы 3, которую возможно активировать; 3) характерное время активации анионных обменников. Используя предложенную модель, разработан метод определения индивидуальной дозы сульфата магния, необходимой для увеличения числа активных белков до уровня полного насыщения для каждого пациента.

Изучен процесс активации анионного обмена эритроцитов в ответ на воздействие нифедипина. Разработана молекулярно-кинетическая модель реакции между белком полосы 3, нифедипином и внутриклеточными компонентами эритроцита. Установлен непрямой путь активации анионного обмена посредством нифедипина и ионов кальция.

Глава 5. Определение функциональных характеристик эритроцитов с использованием молекулярно-кинетических моделей

5.1. Пробоподготовка

Для установления референсных значений морфо-функциональных параметров эритроцитов и отработки предложенных в работе подходов был проведен анализ 40 образцов венозной крови от условно здоровых доноров. Для выявления отклонений в газотранспортной функции эритроцитов у пациентов с диагностированным атеросклерозом были измерены образцы крови, полученные от 58 пациентов. Все добровольцы участвовали в этом исследовании в соответствии с этическими стандартами, установленными Хельсинкской декларацией.

В экспериментах использовалась донорская венозная кровь. Для предотвращения свертываемости забор крови производился в стандартный пластиковый вакутейнер с антикоагулянтом в соотношении кровь/антикоагулянт 9:1. В качестве антикоагулянта использовалась EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), так как она является стандартом в подобных исследованиях.

После забора образцов крови все манипуляции проводились при комнатной температуре около 22℃ во временных границах порядка четырех часов после забора крови (в предположении, что характеристики клеток не претерпевают значительных изменений за данный временной промежуток) [125]. Далее по одной методике проводились исследования для подтверждения предложенной молекулярно-кинетической модели – и на основе этих знаний по стандартизированному методу осуществлялось исследование параметров пациентов и условно здоровых доноров.

В экспериментах, которые касаются обнаружения влияния сульфата магния на анионный обмен эритроцитов, донорами были женщины находящиеся на 30-36 неделе беременности и наблюдающиеся в Родильном доме ЦКБ СО РАН. В данную группу доноров входили как пациенты, имеющие связанные с плацентарной недостаточностью патологии (высокий риск гипоксии и преждевременных родов), так и здоровые доноры. Пациентки проходили лечение сульфатом магния в течение

нескольких дней согласно протоколу больницы (парентеральное введение 5 г $MgSO_4$ ежедневно в одно и тоже время, в 25% физиологическом растворе со скоростью 2 г/ч).

При измерениях *in situ* кровь у пациенток бралась раз в день, приблизительно около 8 часов утра перед началом проведения токолитической процедуры. Первая проба от каждого донора была получена до начала терапии. Каждый последующий образец от донора доставлялся спустя 24 часа после введения сульфата магния, и так на протяжении 3-4 дней.

При исследованиях *in vitro* образцы крови были получены от пациенток, не находящихся на терапии $MgSO_4$, но имеющих показания к началу соответствующей терапии. Для воспроизведения в пробирке условий, схожих с теми, что испытывают эритроциты при введении магнезии внутривенно, были проведены следующие действия. Раствор 25% сульфата магния в объеме 0.01 мл добавляли к 2 мл цельной крови с достижением концентрации10 мМ $MgSO_4$) для наблюдения процесса активация белка полосы 3. Затем измерения проводились в нескольких временных точках на протяжении 90 минут для определения количества анионных обменников согласно описанной выше молекулярно-кинетической модели.

При исследованиях кинетики *in vitro* образец готовили следующим образом. Используемый препарат Adalat (Bayer, Германия) представлял собой раствор нифедипина (5 мг), этанола (7.5 г) и макрогола (7.5 г) в воде (35 г). Определенное количество этого раствора добавляли в цельную кровь, чтобы инициировать исследуемый процесс при заданной концентрации (приблизительно 100 мкМ) нифедипина в образце. Именно при таких концентрациях (около 100 мкМ) предложенная молекулярно-кинетическая модель может применяться для обработки полученных экспериментальных результатов. Затем в фиксированные моменты времени на протяжении 90 минут 5 мкл смеси каждый раз разбавлялись в 500 мкл физиологического раствора (0.9% NaCl), для того чтобы определить относительное изменение скорости трансмембранного анионного обмена AE1 эритроцитов.

Таким образом, в поставленных экспериментах было около 2% этанола в образцах с нифедипином. Приблизительно те же 2% этанола в образцах были

использованы в литературе для исследований путей движения Ca^{2+}: 1) приток через входные каналы [84] и 2) выведение посредством PMCA [83].

Процедура измерения, которая стала стандартом для определения всех параметров газотранспортной функции эритроцитов, состоит в следующем. Сначала 10 мкл цельной крови промывали в 100 мкл 0.9% раствора хлорида натрия (0.15 М). Затем 5 мкл предыдущей смеси разводили в 500 мкл 0.9% раствора хлорида натрия. Эти манипуляции производились непосредственно перед измерением образца. Для обеспечения гомогенности клеточной суспензии образец перемешивали пипеткой. Затем 100 мкл этого образца после пипетирования поступают в пробозаборник СПЦ. Целью разведений является достижение оптимальной для прибора концентрации клеток, которая составляет около 10^7 клеток/мл.

Гемолиз эритроцитов инициируется хлоридом аммония в дистиллированном дегазированном (кипяченом) водном растворе – концентрация хлорида аммония составляет 150 мМ. Далее следует разбавление 5 мкл свежей цельной крови в 500 мкл раствора NH_4Cl, чтобы инициировать изотонический гемолиз. Перед началом пипетирования образца устанавливается запись начала времени лизиса и после этого образец помещают в СПЦ. Для максимального упрощения системы с целью ее более корректного моделирования мы не использовали буферные растворы, которые вносили бы необязательные дополнительные и недостаточно точно контролируемые численные параметры в модель. Измерение кислотности растворов для гемолиза производилось pH-метром (Аквилон pH-420). Измерение кинетики гемолиза длится примерно 5 минут. Может быть зарегистрировано порядка 15 тысяч сигналов от одиночных эритроцитов на разных этапах лизиса.

Для определения количества активированных белков полосы 3 производится разбавление 300 мкл венозной крови в 75 мкл раствора Adalat 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 NH_4Cl, чтобы инициировать изотонический гемолиз на СПЦ.

Полистирольные микросферы со средним размером 4 мкм (Molecular Probes, США) присутствовали в образцах для инициализации СПЦ (процедура подробно описана в [126]).

5.2. Экспериментальная апробация модели сульфата магния

5.2.1. Результаты in situ

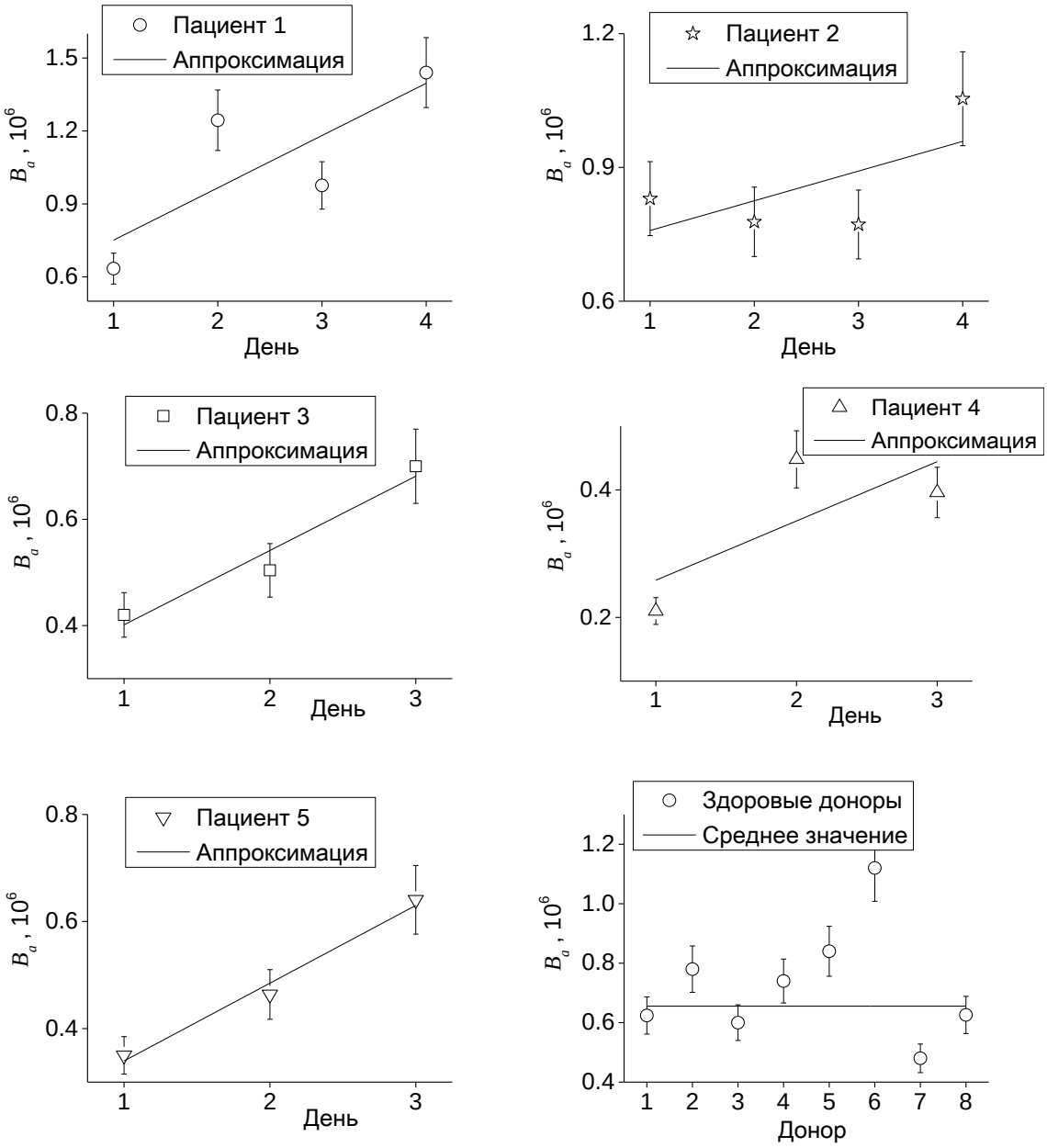


Рис. 14. Количество анионных обменников B_a в экспериментах in situ в каждый день на протяжении токолитической терапии.

Эксперименты *in situ* показали увеличение количества активных белков полосы 3 на

мембране эритроцита при воздействии магнезии. Эти результаты были измерены на пяти пациентах (с диагнозом плацентарная недостаточность), находящихся на лечении с применением сульфата магния.

Первый день измерений на графиках (Рис. 14) соответствует начальному уровню активированных белков, функционирующих в таком количестве до начала применения терапии. Для первого измерения цельная кровь была взята

Таблица 5. Средние значения и стандартные отклонения для величин B_a, C_a у различных по отношению к применению терапии групп пациентов.

	Средние B_a, 10^6	S.D. B_a, 10^6	Средние C_a, мкМ	S.D. C_a, мкМ
До применения терапии	0.73±0.07	0.20±0.05	4.9±0.4	1.2±0.3
После применения терапии	0.8±0.2	0.41±0.11	5.3±1.1	2.5±0.7
Здоровые доноры	0.73±0.07	0.20±0.05	4.9±0.4	1.2±0.3

непосредственно перед введением препарата.

Каждая последующая точка характеризует состояние анионных обменников на мембране эритроцитов через 24 часа после очередной инъекции сульфата магния. Так же для сравнения количества белков полосы 3 на шестом графике (Рис. 14) представлены значения искомой величины для условно здоровых доноров. Оказалось, что не только количество анионных обменников на единичном эритроците реагирует увеличением числа своей активной формы, но и концентрация белков в целом организме увеличивается (Рис. 14). В результате, концентрация белка полосы 3 C_a (концентрация эритроцитов, умноженная на среднее количество белков на мембране единичного эритроцита) растет быстрее нежели B_a. Как можно заметить из данных в таблице 5, величины C_a и B_a для пациентов, имеющих патологии заметно ниже (на 60% для пациентов 3-5) значений этих параметров для здоровых доноров.

Таблица 7. Начальные значения количества и концентрации белка полосы 3 до начала терапии, а также коэффициенты линейной аппроксимации эффекта терапии на количество анионных обменников.

Пациент	B_a, 10^6 До терапии	Коэффициент k аппроксимации B_a y=kx+b	C_a, мкМ До терапии	Коэффициент k аппроксимации B_a y=kx+b
1	0.63 ± 0.06	0.21 ± 0.12	0.36 ± 0.19	1.2 ± 0.8
2	0.83 ± 0.08	0.07 ± 0.06	5.2 ± 0.3	0.7 ± 0.3
3	0.42 ± 0.04	0.14 ± 0.03	2.28 ± 0.12	0.8 ± 0.2
4	0.21 ± 0.02	0.09 ± 0.08	1.36 ± 0.06	0.6 ± 0.4
5	0.35 ± 0.04	0.15 ± 0.02	2.48 ± 0.12	0.80 ± 0.12

Вследствие применяемой терапии к пациентам – внутривенного введения $MgSO_4$ – данные величины растут, приближаясь к диапазону здоровых доноров.

Таблица 6. Значения B_a и C_a полученные в результате экспериментов со здоровыми донорами.

Донор	B_a, 10^6		C_a 10^6
1	0.62 ± 0.06		4.1 ± 0.4
2	0.78 ± 0.08		5.6 ± 0.6
3	0.60 ± 0.06		3.8 ± 0.4
4	0.74 ± 0.07		5.1 ± 0.5
5	0.84 ± 0.08		6.0 ± 0.6
6	1.12 ± 0.11		6.9 ± 0.7
7	0.48 ± 0.05		3.3 ± 0.3
8	0.63 ± 0.06		4.7 ± 0.5

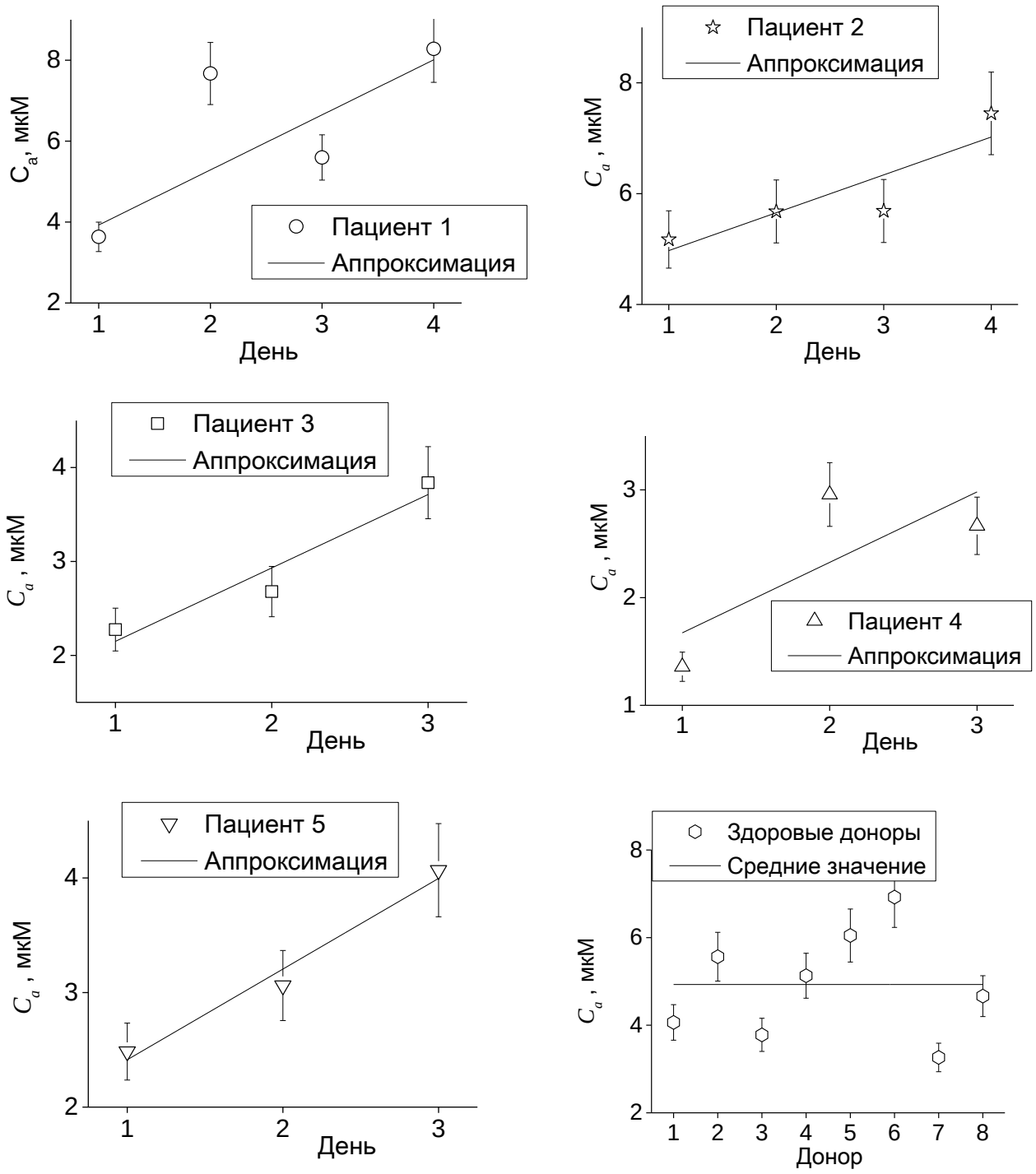


Рис. 15. Концентрация анионных обменников в экспериментах in situ на протяжении токолитической терапии.

5.2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ IN VITRO

Кинетические кривые экспериментальных данных для четырех пациентов, полученные в ходе исследований in vitro активации анионной работы белка полосы 3, представлены в результатах данной работы. Аппроксимация измеренных временных зависимостей осуществлялась с помощью уравнения (59). Проводился фитинг при использовании алгоритма Левенберга – Марквардта. Лучший результат отражен на Рис. 16 и соответствующие экспериментальным зависимостям параметры γ, τ и B_0 приведены в таблице 8.

Таблица 8. Параметры, рассчитанные на основе разработанной молекулярно-кинетической модели для экспериментальных данных in vitro.

Донор	γ	τ, мин	B_0, 10^6
1	0.51±0.07	20±8	1.20±0.16
2	0.36±0.13	70±20	1.8±0.4
3	0.66±0.10	40±15	0.84±0.12
4	0.58±0.06	30±10	0.96±0.10

Как видно из уравнения (61), относительный разброс по параметру τ (отвечает за скорость потока ионов магния внутрь клетки) для различных доноров выражен значительнее по сравнению с подобной вариацией для параметра γ (обуславливается внутриклеточной концентрацией Mg^{2+}, ATP, DPG). Этот факт не противоречит известным из литературы вариациям среди доноров по данным характеристикам. Величины, описывающие поведение потока ионов магния, имеют гораздо больший физиологически обусловленный разброс, чем значения концентраций внутриклеточных компонентов.

Согласно модели, мы предполагали, что 4 параметра эритроцитов (V_{max}, B_0, [ATP], [DPG]) значительно не изменяются в процессе измерения. Данное утверждение может оказать влияние на различие, получаемое в параметрах B_0, τ, γ между здоровыми донорами и имеющими патологии пациентами. Соответствие, выявленное между теоретическими и экспериментальными зависимостями, служит подтверждением выдвинутой в работе молекулярно-кинетической модели.

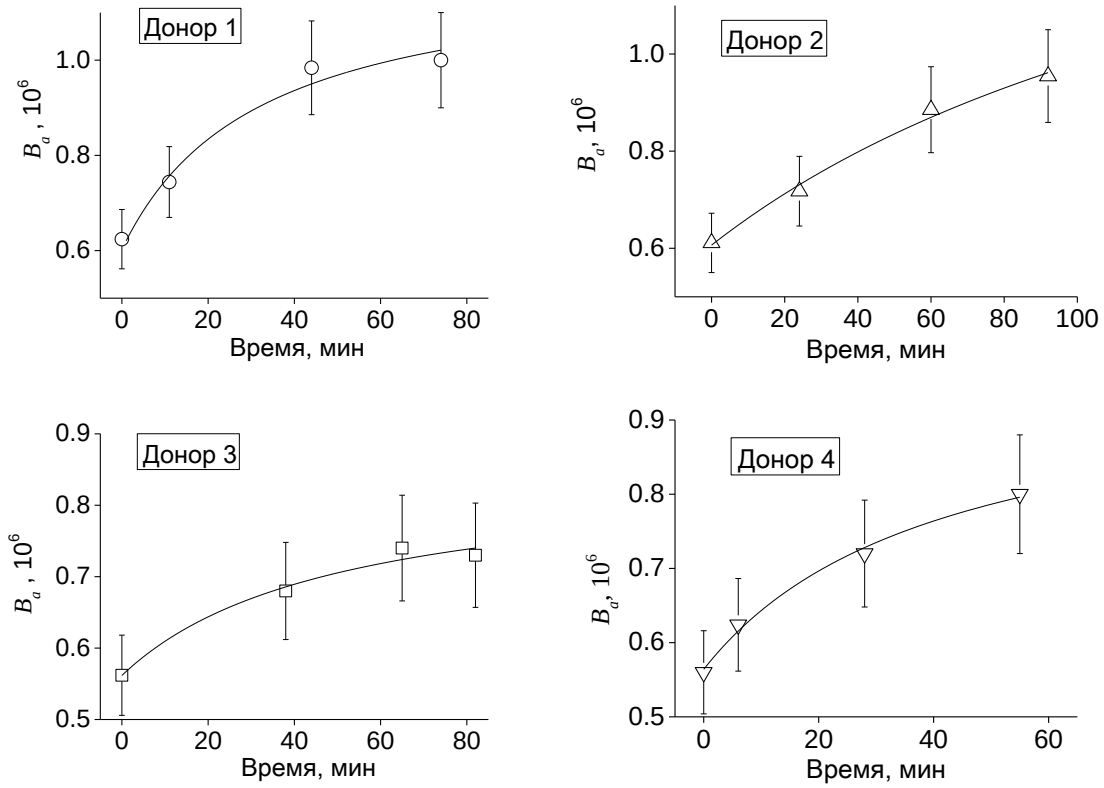


Рис. 16. Временные кинетики изменения количества анионных обменников в экспериментах in vitro в растворе сульфата магния.

Если взять для расчета стандартные литературные значения для следующих величин [ATP]~165 мМ, [DPG]~4.5 мМ, K_{DPG}=1.2 мМ, N/V~2 мМ (концентрация ионов магния присутствующая при равновесном состоянии), а так же средние значения для параметров γ~0.5 и τ~40 мин$^{-1}$ из таблицы 7 можно оценить (используя уравнения (60) и (61)) значения константы связывания иона магния с цитоплазматическим доменом белка полосы K_B ~ 0.07 мМ и скорость потока $MgSO_4$ V_{max}~0.01мМ/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 [114]. 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.

5.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ МОДЕЛИ НИФЕДИПИНА

Начнем обзор результатов, полученных в рамках данной работы, с молекулярно-кинетической модели активации анионного обмена нифедипином, на основе которой была дополнена и исследована категория функциональных параметров эритроцитов на сканирующем проточном цитометре.

Экспериментальные кинетические кривые *in vitro* активации AE1, полученные на двух донорах, представлены на Рис. 17 и Рис. 18. Характерное время наблюдаемого процесса намного больше, чем полученная теоретическая оценка $\tau_{50\%абл} \sim 0.3$ мин для мембранного транспорта Ca^{2+}. Подгонка осуществлялась с использованием стандартного алгоритма наименьших квадратов Левенберга – Марквардта [127], реализованного в программном обеспечении Origin, разработанном OriginLab Corporation. Экспериментальные кинетические кривые были обработаны с использованием уравнения (94) для получения значений B_{e0}, B_{eadd} и k при различных концентрациях [I] нифедипина. Данные были обработаны при условии B_{e0}=const, поскольку B_{e0} не должен зависеть от концентрации нифедипина. Полученные значения параметров $\tilde{k}$, α, γ и B_{e0} для доноров представлены в таблице 9.

Таблица 9. Значения параметров модели, полученные в результате подгонки экспериментальных данных, представленных на Рис. 17 и Рис. 18.

Параметр	Донор 1	Донор 2
$\tilde{k}$, мин$^{-1}$	0.016 ± 0.008	0.008 ± 0.004
α, 10^{-4}, мкМ$^{-1}$мин$^{-1}$	3.9 ± 0.8	3.1 ± 0.5
γ, 10^{-2} ($\times 10^6$), мкМ$^{-1}$	0.56 ± 0.05	1.05 ± 0.06
B_{e0} ($\times 10^6$)	0.333 ± 0.006	0.512 ± 0.009

Используя известные из литературы значения констант (независящие от донора) K_{IP}~300 мкМ [83], K_{IC}~600 мкМ [84] and K_{Bd}~20 мкМ [39] и величины $\tilde{k}$, α, γ и B_{e_0} из таблицы 8, можно произвести оценку параметров для эритроцитов $k_a\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]_0$, λ, β, B_0 и ε используемые в уравнениях молекулярно-кинетической модели для расчета количества активных анионных обменников при активации нифедипином. Результаты представлены в таблице 10.

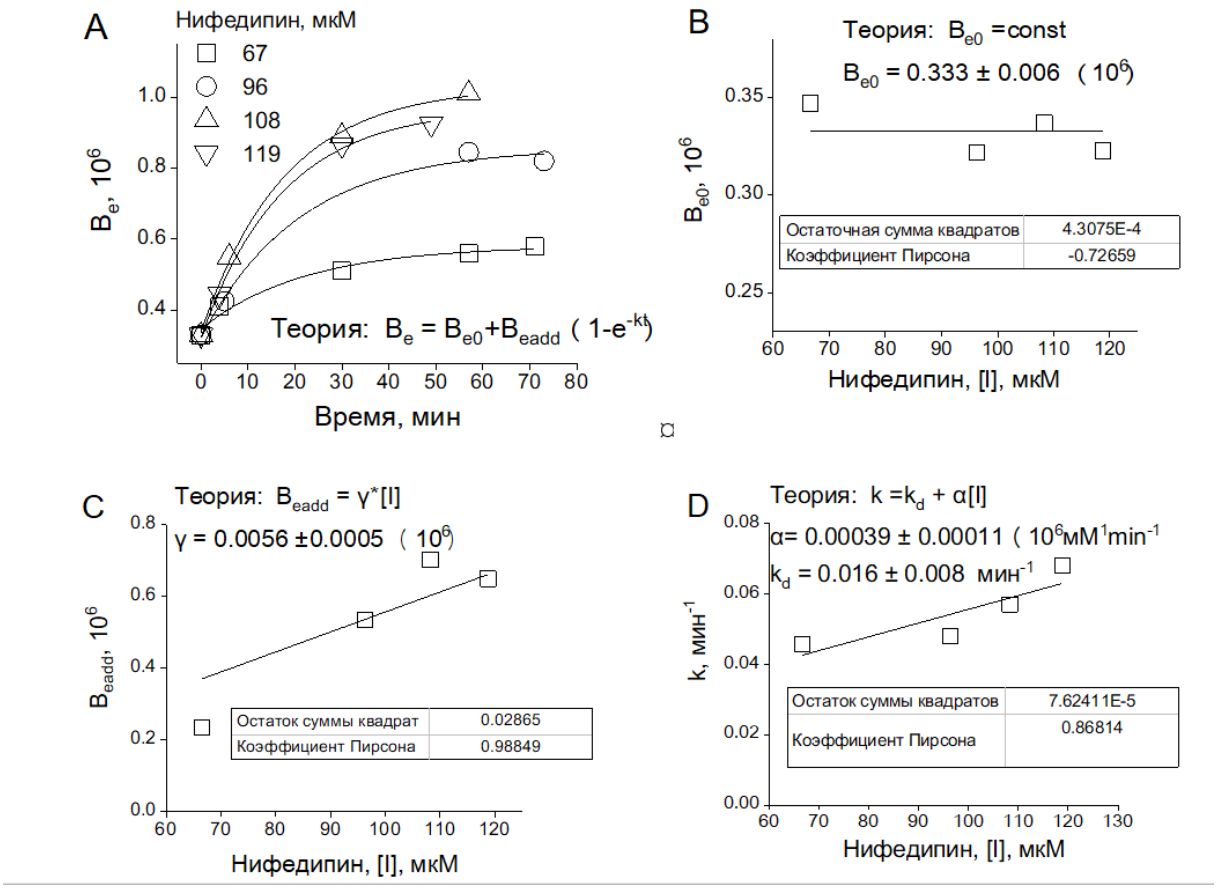


Рис. 17. Обработка экспериментальных данных для донора 1 (символы - эксперимент, линии - теория): A) подгонка по уравнению (94), B) аппроксимация константой, C) подгонка по уравнению (108), D) подгонка по уравнению (107).

Из таблиц 9 и 10 можно выделить четыре внутренних параметра (то есть подходящих для описания функционирования одного анионного обменника): k_d (скорость спонтанной деактивации), $k_a\left[Ca^{2+}_{in,free}\right]_0$ (скорость стимулированной активации), ε (эффективность активации), B_0 (количество стандартных обменников)

и все другие параметры могут быть рассчитаны из них с использованием приведенных в работе молекулярно-кинетических уравнений.

Таблица 10. Значения параметров, рассчитанные на основе данных в таблице 9 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
$k_a[Ca^{2+}_{in,free}]_0$, 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

Следует отметить, что реакции (67) - (69) согласуются с известными теоретическими соображениями [36] о роли Ca^{2+} в регуляции активности белка полосы 3 с помощью соответствующих киназ и фосфатаз. Активация ферментов (киназ и фосфатаз) с помощью Ca^{2+} моделируется в нашей работе реакцией Михаэлиса-Ментен (67), которая формально описывает стимулированную активацию AE1. Мы добавили реакцию (69) самопроизвольной дезактивации AE1, поскольку наши экспериментальные данные стабильно показывали ненулевое пересечение оси ординат с теоретической линейной зависимости скорости активации от концентрации ингибитора (нифедипина). Реакция связывание Ca^{2+} с белком полосы 3 рассматривается как равновесная (68), из-за ее высокой скорости протекания, согласно известным литературным данным [39]. Схема реакции (66) необходима для объединения транспортной схемы (62)-(65) со схемой активации (67)-(69).

Для применимости модели воздействия нифедипина через изменение внутриклеточной концентрации кальция, она должна быть много больше концентрации кальция в эритроците. В вакутейнере 2 мМ EDTA, константа аффинности связывания Ca^{2+} с EDTA равна 4.5×10^{10} M^{-1} [128]. Так как концентрация EDTA меньше концентрации кальциевого буфера в крови (т.е. концентрации мест

связывания Ca^{2+} на белках крови), а афинность Ca^{2+} к буферам достаточно мала (много меньше обратной константы Михаэлиса сродства Ca^{2+} к его каналам на мембране), то EDTA не должно существенно влиять. Буферная емкость белков крови (в основном альбумина) много больше емкости EDTA. Но альбумин имеет (как EDTA) много мест связывания Ca^{2+}. При малых добавках порядка 5 мМ EDTA – концентрация кальция Ca^{2+} уменьшиться несущественно для изменения скорости его потока в клетку (так как остается больше константы Михаэлиса-Ментен сродства к кальциевы м каналам). Для удаления всего кальция нужно порядка 1 М (то есть сравнимое значение с буферной емкостью альбумина).

Есть два основных аргумента в поддержку нашего вывода о том, что скорость транспорта Ca^{2+} через мембрану не ограничивает скорость активации белков полосы 3 в присутствии нифедипина: 1) экспериментально полученная скорость активации намного ниже теоретически оцененной скорости транспорта Ca^{2+}; и 2) скорость транспорта Ca^{2+} уменьшается с увеличением концентрации ингибитора (нифедипина), в то время как наблюдаемая в эксперименте скорость активации белков полосы 3 демонстрирует противоположное поведение - скорость активации увеличивается с увеличением нифедипина (см. Рис. 17 и Рис. 18**).** Таким образом, наши экспериментальные результаты могут быть объяснены в предположении, что скорость активации AE1 ограничена только реакциями (67)-(69). Тем не менее, хотя реакции (62)-(65) не ограничивают динамику активации AE1, они необходимы для получения зависимости максимальной концентрации свободных ионов кальция как функции концентрации ингибитора (нифедипина).

Наши результаты показывают, что скорость обмена HCO^-_3/Cl^- через AE1 увеличивается во времени в присутствии внеклеточного нифедипина (блокатора кальциевых каналов) в крови. Было установлено, что скорость активации AE1 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 тем,

что скорость активации анионных обменников увеличивается с увеличением концентрации нифедипина.

После разработки и проверки молекулярно-кинетической модели, следующим шагом было измерение всех функциональных характеристик и установление

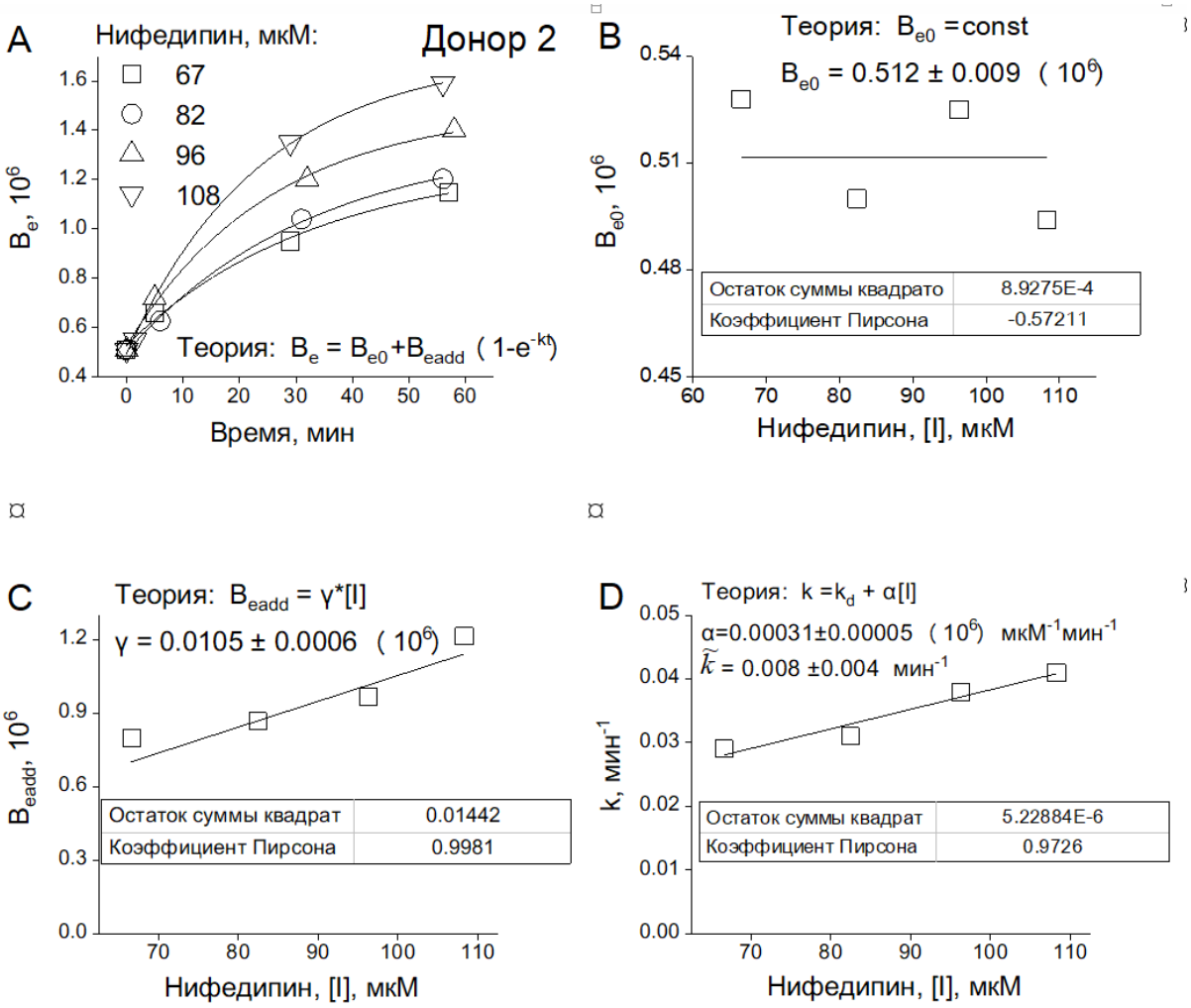


Рис. 18. Обработка экспериментальных данных для донора 2 (символы - эксперимент, линии - теория): A) подгонка по уравнению (94), B) подгонка по постоянной величине, C) подгонка по уравнению(108), D) подгонка по уравнению(107).

референсных значений на основании измеренных образцов 40 условно здоровых доноров. Определение функциональных показателей требует только использования простых расходных материалов, таких как хлорид аммония и нифедипин.

5.4. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЛАВЫ

Экспериментальная проверка показала хорошее согласие между предсказанными моделью скоростью и степенью активации анионных обменников в присутствии $MgSO_4$ и измеренными данными на СПЦ. В результате были рассчитаны константы реакции связывания иона магния с белком полосы 3 на внутренней поверхности мембран эритроцитов.

Использование сканирующей проточной цитометрии позволило количественно уточнить молекулярно-кинетический механизм действия нифедипина на эритроциты человека. В частности, численные результаты по эффективности (~30) и скорости активации (~0,3 мин$^{-1}$) и дезактивации (~10^{-3} мин$^{-1}$) белка полосы 3 в эритроцитах.

Используя полученные уравнения на базе предложенной модели, был расширен набор функциональных параметров эритроцитов для детальной характеризации газотранспортной функции. Впервые описаны параметры «количество активированных анионных обменников», а также доля активных обменников в нативном состоянии.

Глава 6. Морфо-функциональные свойства эритроцитов в норме и патологии

В данной главе пойдет речь о результатах, полученных в ходе исследования образцов крови условно здоровых доноров и пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий. Представлены впервые полученные референсные значения для параметров газотранспортной функции эритроцитов, а также раскрыта роль некоторых из них в дестабилизации атеросклеротических бляшек.

6.1. Референсные значения

6.1.1. Морфологические параметры

Формируя группу доноров, состоящую из 40 человек, предполагалось определить референсные интервалы для новых параметров эритроцитов, представленных в настоящем исследовании. Если измерены 39 показателей независимых лиц, то максимальные и минимальные значения параметра образуют референсный интервал в соответствии с Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам [129].

Морфологические характеристики одиночных эритроцитов были определены с помощью алгоритма, при решении обратной задачи светорассеяния, описанного в третьей главе диссертации. Следующие морфологические характеристики были определены на основе решения обратной задачи светорассеяния с помощью СПЦ: диаметр, толщина, толщина талии, объем, площадь поверхности, спонтанная кривизна, безразмерная спонтанная кривизна, индекс сферичности. Построены распределения по морфологическим параметрам для 40 доноров. В эту категорию были добавлены еще два показателя: степень соответствия между идеальной физической формой зрелого нативного эритроцита и экспериментально измеренным сигналом и хорошо известный в лабораторной диагностике индекс RDW-CV, который характеризует вариацию в величине объема эритроцитов донора.

Наконец, донорские эритроциты были охарактеризованы по двадцати шести показателям, относящимся к их морфологии.

Средние значения и референсные интервалы для 26 морфологических параметров можно найти в таблице 11. В таблице также представлены стандартные отклонения (SD) и симметрия полученных распределений. Интересно, что

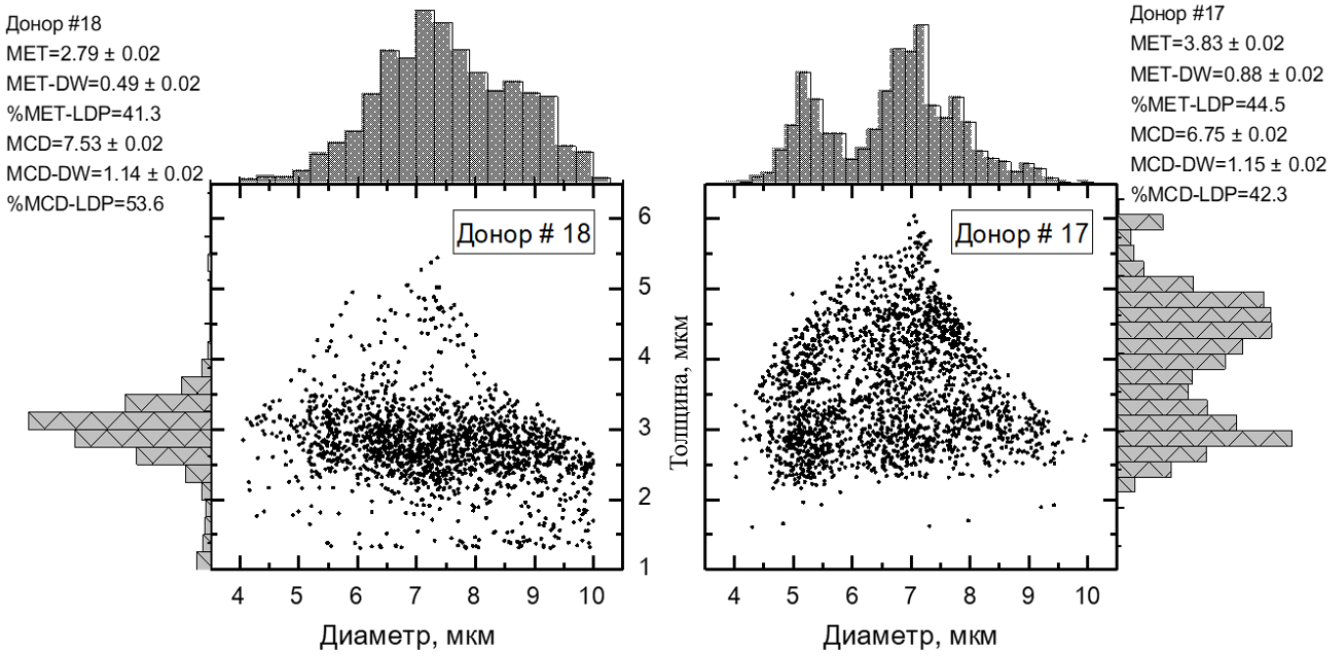


РИС. 19. Карта и распределение диаметра эритроцитов и толщины перетяжки для двух доноров, с наличием бимодальности распределении (Донор№17) и равномерным распределением (Донор№18).

отклонение в распределении основных параметров от логнормального можно оценить численно по значению параметра симметрии. Например, эта информация может служить индикатором бимодальных распределений для определенных индексов, как показано на Рис. 19.

Таблица 11. Референсные интервалы морфологических параметров эритроцитов, измеренных на СПЦ.

№	Параметр		Аббревиатура	Средние значение (SD)	Референсный интервал
1	Диаметр, мкм	среднее	MCD	7.11	6.13-7.89
2		SD	DD-SD	1.34	0.92-1.75
3		симметрия, %	DD - SYM	40 (20)	10-73
4	Максимальная толщина, мкм	среднее	MCT	3.08	2.61-3.74
5		SD	TD-SD	0.75	0.34-1.23
6		симметрия, %	TD-SYM	37 (15)	12-78
7	Минимальная толщина, мкм	среднее	MCWT	1.58	0.99-2.38
8		SD	WTD-SD	1.31	1.00-1.72
9		симметрия, %	WTD-SYM	30 (14)	14-64
10	Объем, фл	среднее	**MCV**	96.2 (14.9)	67.3-126.0 **82-98**
11		SD	**RDW-SD**	39.1 (9.7)	21.0-54.8 **37-49**
13		симметрия, %	RD- SYM	33 (13)	8-60
14	Площадь, мкм^2	среднее	MCS	123 (14)	94-146
15		SD	SD-SD	37 (8)	22-50
16		симметрия, %	SD-SYM	38 (15)	14-71
17	Индекс сферичности	среднее	MCSp	0.755 (0.042)	0.671-0.851
18		SD	SpD-SD	0.129	0.100-0.171
19		симметрия, %	SpD-SYM	51 (20)	17-88
20	Спонтанная кривизна мембраны, мкм$^{-1}$	среднее	MCC	-0.26 (0.17)	(-0.65)-(0.04)
21		SD	CD-SD	0.63	0.34-1.38
22		симметрия, %	CD-SYM	55 (22)	18-86
23	Безразмерная спонтанная кривизна	среднее	MCDc	-0.71	(-1.85)-0.17
24		SD	DcD-SD	1.81	0.97-4.02
25		симметрия, %	DcD-SYM	55 (22)	20-86
26	Степень согласия		SN	0.202	0.128-0.315

6.1.2. Функциональные параметры

Проницаемость мембраны эритроцитов для анионов регулируется активностью белков полосы 3 и может быть вычислена из времени сферизации в процессе индуцированного гемолиза. Предельная растяжимость мембраны или удельное гемолитическое сопротивление пропорционально времени, которое необходимо клетки чтобы дойти до состояния разрыва мембраны после достижения сферического состояния в процессе гемолиза.

$$\frac{\sigma}{K_s} = \frac{S - S_0}{S_0} \tag{110}$$

Высокие значения данного параметра соответствуют более устойчивому состоянию мембраны к гемолизу (110) и длительному времени между сферизацией и разрывом мембраны. В выражении (110) K_s – коэффициент упругости мембраны на растяжение.

Принимая во внимание наши экспериментальные результаты с повышением анионной проницаемости мембраны эритроцита сульфатом магния [78] и нифедипином [130], мы ввели дополнительный параметр для газотранспортной функции эритроцитов, который определили как максимальное эффективное количество анионных обменников при активации нифедипином. Эффективное количество белков использовалось при расчете общей концентрации анионных обменников в крови и их плотности на поверхности эритроцитов. Был введен еще один параметр: эффективность анионной проницаемости эритроцитов, как отношение активных анионных обменников в нативном состоянии к конечному активированному нифедипином количеству обменников. В результате функциональная категория в газотранспортной функции эритроцитов содержит восемь параметров, которые можно посмотреть в таблице 12.

Таблица 12. Средние значения и референсные интервалы для функциональных параметров эритроцитов, измеряемых на сканирующем проточном цитометре.

N	Параметр	Аббревиатура	Среднее (SD)	Референсный интервал
1	Количество активно работающих анионных обменников, 10^6	B3	0.74 (0.46)	0.11-2.88
2	Количество активно работающих анионных обменников на единицу поверхности мембраны, 10^3 мкм$^{-2}$	B3S	5.9 (3.4)	1.1-20.8
3	Концентрация активно работающих анионных обменников, мкМ	MCB3	5.9 (3.5)	0.9-21.5
4	Предельная растяжимость мембраны, 10^{-2}	MCER	5.6 (3.2)	1.0-12.7
5	Активированное нифедипином количество активно работающих анионных обменников, 10^6	B3-AC	1.16 (0.85)	0.18-4.17
6	Активированное нифедипином количество активно работающих анионных обменников на единицу поверхности мембраны, 10^3/ мкм^2	B3-ACS	9.3 (6.5)	1.8-33.0
7	Активированная нифедипином концентрация активно работающих анионных обменников, мкмМ	MCB3-AC	9.1 (6.1)	1.5-29.1
8	Эффективность активации анионных обменников нифедипином	B3A	70 (22)	23-99

6.2. Сравнительный анализ газотранспортной функции эритроцитов среди различных групп

Одно из направлений работы это исследование роли эритроцитов в патогенезе атеросклероза и развития его осложнений. В частности, задача состояла в тестировании 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.

Для раскрытия механизмов дестабилизации атером на тканевом и клеточном уровне существенный интерес представляет изучение форменных элементов крови, а именно эритроцитов, которые будучи одним из важнейших элементов микроциркуляции, в значительной мере определяют гемодинамический и метаболический гомеостаз тканей.

Поиск предикторов дестабилизации атером среди функциональных параметров эритроцитов, объясняется тем, что эти клетки тесно контактируют со всеми тканями организма и вступая с ними в морфофункциональные 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.

На сегодняшний день в литературе накоплен большой объем данных, указывающих большую роль, которую играют эритроциты при развитии самых различных патологий [131,132], в том числе и при развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [133–135], и в частности, имеются предположения о роли эритроцитов в формировании и развитии нестабильных атером [2].

На основании информации, опубликованной по данной теме, была выстроена предполагаемая цепь биохимических процессов, происходящих в организме, начиная от нарушений функционирования эритроцитов до дестабилизации АБ.

Множество факторов снижают эффективность эритроцитов к транспорту кислорода. К данным факторам можно отнести повышенное содержание гликированного гемоглобина, затруднение диффузии кислорода через заблокированную холестерином мембрану эритроцитов [136], изменение формы клеток и снижение их деформируемости. В свою очередь, подобные изменения в организме могут быть вызваны одними из основных фактов риска развития атеросклероза - нарушениями липидного и углеводного обмена в организме [137]. 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 [1]. Попадая в очаг воспаления атеромы, характеризующийся повышенной секрецией множества активных молекул, (включая цитокины, антитела, кислородные и азотные радикалы и др.) эритроциты подвергаются лизису, высвобождая холестерин и гемоглобин, которые запускают воспаления и новые цепочки процессов, приводящих к разрастанию атеромы и повышающих риск ее дестабилизации [41,42]. Также, имеются исследования, утверждающие, что выработка эритроцитарных микровезикул при различных неблагоприятных условиях и в процессе старения клеток активирует адгезию на стенках сосудов холестерина и последующих структурных единиц [138].

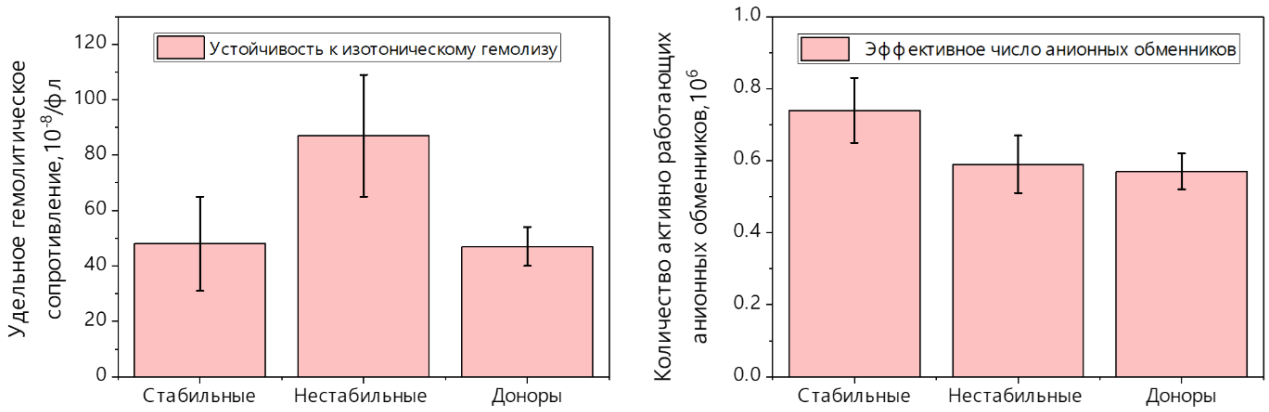


Рис. 20. На левом графике для исследуемых групп представлены значения параметра эритроцитов, характеризующего гемолитическое сопротивление (устойчивость к гемолизу), на правом графике - количество активно работающих анионных обменников.

Рассматривая вопрос о прогностической ценности измерения характеристик эритроцитов в диагностике атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, следует отметить растущее количество публикаций, в которых было показано, что увеличение ширины распределения эритроцитов по объему может рассматриваться в качестве независимого фактора риска и предиктора смертности у пациентов с данными патологиями [139–142]. Обусловленный более широкой вариабельностью форм клеток, предположительно в силу их морфологических изменений при данных заболеваниях, параметр, отвечающий за ширину распределения по объему, весьма грубо отражает отклонения морфологии эритроцитов от нормы. В то время как непосредственный анализ и измерение морфофункциональных характеристик эритроцитов с помощью методов, обладающих высоким пространственным разрешением и адаптированных для сканирующего проточного цитометра, позволяет получить детальную характеризацию изменения свойств эритроцитов в процессе дестабилизации атером.

В ходе работы было проведено клиническое обследование 58 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 среди исследуемых групп насчитывается 40 условно здоровых доноров и 58 пациентов с атеросклерозом, из которых у 18 выделена стабильная атерома и, соответственно, у 40 пациентов были выявлены нестабильные атеросклеротические бляшки.

Таблица 13. Некоторые параметры газотранспортной функции эритроцитов, для сравнения исследуемых групп доноров и пациентов. Для каждого параметра представлены среднее значение и ошибка среднего. В последнем столбце указан достигаемый P-уровень значимости согласно критерию Манна-Уитни между группами пациентов с нестабильной и стабильной атеромой. Статистически достоверным принято значение $P < 0.05$.

Параметр	Нестабильная атерома (40)	Стабильная атерома (18)	Условно здоровые доноры (40)	P-уровень значимости
Объем, фл (MCV)	102±3	101±5	99±2	0.882
Индекс сферичности (MCSp)	0.778±0.013	0.754±0.014	0.764±0.007	0.249
Спонтанная кривизна мембраны	-0.42±0.08	-0.26±0.08	-0.30±0.03	0.183
Количество активно работающих анионных обменников, 10^6 (B3)	0.57±0.07	0.75±0.09	0.57±0.05	0.104
Удельное гемолитическое сопротивление, 10^{-2} (MCER)	**92±20**	**48±17**	**47±7**	**0.029**
Эффективность активации анионных обменников нифедипином (B3A)	72±5	84±7	70±4	0.240

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. За критерий для тестирования различия исследуемых выборок был выбран критерий Манна-Уитни. Это статистический критерий, используемый для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно. Такой подход позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Статистически достоверным условием для различения выборок в рамках данного подхода считается достижения критерия Манна-Уитни при Р-уровне значимости менее 5%. Если полученное значение меньше 5% или равно ему, то признается наличие существенного различия между уровнем признака в рассматриваемых выборках (принимается альтернативная гипотеза). Если же полученное значение больше, то принимается нулевая гипотеза. Достоверность различий тем выше, чем меньше значение.

Наибольшее различие, среди параметров формы клеток, проявило себя в спонтанной кривизне мембраны, отвечающей за асимметрию между двумя слоями эритроцитарной мембраны. Данная величина оказалась выше у группы со стабильной атеромой по сравнению с нестабильной, результаты представлены в таблице 13. Так же оказалось, что у группы условно здоровых доноров средние значения спонтанной кривизны совпадают в пределах определяемых погрешностей со значениями для группы пациентов со стабильной атеромой. Чем ниже значение кривизны, тем более выражена разница между толщинами эритроцита на кроях и в центре. Возможно, наблюдаемых эффект объясняется встраиванием в мембрану дополнительных липидов, концентрация которых повышается у пациентов с диагностированным атеросклерозом. Однако, в случае с нестабильной атеромой изменение липидного спектра пациента приводит к искажениям нативной формы эритроцитов. Критерий Манна-Уитни по данному параметру выдает Р-уровень значимости равный 0.183, что недостаточно для того, чтобы считать выборки пациентов со стабильной и нестабильной атеромой статистически различимыми по параметру спонтанной кривизны мембраны.

Рассмотрение функциональных характеристик эритроцитов привело к следующим заключениям. Среднее значение количества активно работающих анионных обменников в группе пациентов со стабильной атеромой на 26% выше по сравнению с пациентами, у которых выявлена нестабильная атерома. Это показывает, что газотранспортная функция эритроцитов у пациентов со стабильной атеромой проявляет себя активнее, перекачивая большее число анионов через мембрану в единицу времени, по сравнению с другими исследованными группами, включая условно здоровых доноров. Соответствующее этой ситуации с учетом имеющихся погрешностей значение Р-уровня значимости составляет 0.104, что выше уровня принятого за статистически достоверной уровень отличия выборок между группами пациентов с различными типами атером.

Удельное гемолитическое сопротивление, характеризующее степень устойчивости к изотоническому гемолизу, выше на 48% у пациентов со стабильной атеромой, чем у обладателей нестабильной бляшки и группы условно здоровых доноров. Именно данный параметр позволяет проводить статистически значимое отличие между двумя выборками пациентов с величиной Р-уровня значимости 0.029 и является диагностическим предиктором дестабилизации атером. Скорее всего данный эффект компенсирует повышенный гемолиз эритроцитов внутри атеросклеротических бляшек и способствует снижению количества разрушенных эритроцитов и уменьшению последствий локальной гипоксии. Такие результаты информируют нас о сниженной работе анионного обмена эритроцитов и как результат и всей газотранспортной функции.

Обнаруженное поведение устойчивости мембраны к индуцированному гемолизу в рамках анализа газотранспортной функции эритроцитов может быть потенциально использовано с целью предсказания риска дестабилизации атеромы, однако, перед этим этапом необходимо рекомендуется расширить выборку пациентов.

6.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЛАВЫ

На основе разработанного подхода к описанию газотранспортной функции эритроцитов (48 параметров по категориям: концентрационные, морфологические, функциональные, возрастные) были измерены образцы для 40 условно здоровых доноров и сформированы референсные значения для измеряемых параметров. Эти данные позволили протестировать гипотезу о влиянии снижения газотранспортной функции эритроцитов на дестабилизацию атером. Для этого было проведено исследование 40 пациентов с нестабильной атеромой и 18 пациентов со стабильной атеромой. Наблюдаемые различия в параметрах эритроцитов свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что у пациентов с усиленной работой газотранспортной функции (по совокупности параметров) имеются стабильные атером. Так как повышенный спрос на кислород в атеросклеротических бляшках, который необходимо удовлетворять для поддержания стабильности уже сформированной атеромы, должен компенсируется увеличением работы анионного транспорта, или же в противном случае вырастает риск дестабилизации атеромы.

Результаты данной работы позволяют детектировать патологические отклонения в газотранспортной функции эритроцитов. По результатам исследования удалось выделить параметры, обладающие высокой прогностической ценностью (удельное гемолитическое сопротивление и количество анионных обменников), что дает возможность их выявления на более ранних стадиях развития патологии.

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 22ºC).

3. Экспериментально показано увеличение количества активных белков AE1 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 характеризации эритроцитов: 1) доля активных белков AE1; 2) максимальное количество AE1, которое возможно активировать; 3) характерное время активации AE1. 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 активации (~30 %), скорости активации (~0.3 мин$^{-1}$) и деактивации (~10^{-3} мин$^{-1}$) AE1 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 p-уровнем значимости = 0.029), что позволяет использовать этот параметр для выбора метода лечения пациентов, страдающих атеросклерозом.

Список используемых терминов и аббревиатур

- AE1 – белок полосы 3, анионной обменник эритроцитов
- «тени эритроцитов» - мембраны эритроцитов, остающиеся после гемолиза.
- СПЦ – сканирующий проточный цитометр
- АБ – атеросклеротическая бляшка
- МДД – метод дискретных диполей
- ADDA – программа для расчёта рассеяния и поглощения электромагнитных волн частицами произвольной формы и состава с использованием метода дискретных диполей
- PTK – тирозинкиназа
- PMCA – кальциевый насос
- SRI – удельная рефракция гемоглобина
- EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота
- RhAG – основной аммонийный транспортер в мембране эритроцита

Список литературы

1. Parma L. et al. Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis // Eur. J. Pharmacol. 2017. Vol. 816. P. 107–115.
2. Tziakas D.N. et al. The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque // Int. J. Cardiol. 2010. Vol. 142, № 1. P. 2–7.
3. Sannino A. et al. Non-invasive vulnerable plaque imaging: how do we know that treatment works? // European Heart Journal - Cardiovascular Imaging. 2014. Vol. 15, № 11. P. 1194–1202.
4. Naghavi M. et al. From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I // Circulation. 2003. Vol. 108, № 14. P. 1664–1672.
5. Selwaness M. et al. Determinants of carotid atherosclerotic plaque burden in a stroke-free population // Atherosclerosis. 2016. Vol. 255. P. 186–192.
6. Hamasaki N. The role of band 3 protein in oxygen delivery by red blood cells // Indian J Clin Biochem. 1999. Vol. 14, № 1. P. 49–58.
7. Fawcett A.J., Nicolson R.I. Performance of Dyslexic Children on Cerebellar and Cognitive Tests // Journal of Motor Behavior. 1999. Vol. 31, № 1. P. 68–78.
8. Lundy A.-L. Review of nifedipine GITS in the treatment of high risk patients with coronary artery disease and hypertension // VHRM. 2009. P. 429.
9. Timsit-Berthier M. [McLean’s theory. Which brain model for which psychiatric practice?] // Acta Psychiatr Belg. 1994. Vol. 94, № 4–6. P. 213–224.
10. Nassar A., Aoun J., Usta I. Calcium Channel Blockers for the Management of Preterm Birth: A Review // Amer J Perinatol. 2011. Vol. 28, № 01. P. 057–066.
11. Kim Y., Kim K., Park Y. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances // Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology. IntechOpen, 2012.
12. Higgins J.M. Red blood cell population dynamics // Clin. Lab. Med. 2015. Vol. 35, № 1. P. 43–57.
13. Fung Y.C., Tsang W.C., Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells // Biorheology. 1981. Vol. 18, № 3–6. P. 369–385.

14. Kim Y. et al. Profiling individual human red blood cells using common-path diffraction optical tomography // Sci Rep. 2014. Vol. 4.
15. Тевс Г., Шмидт Р. Физиология человека. Мир, 2005. Vol. 2. 314 p.
16. Козлов М.М., Маркин В.С. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель. Биологические мембраны. 1986. Vol. 3. 110 p.
17. Альбертс Б., Брей Д, Льюис Дж. Молекулярная биология клетки. Мир, 1994. 517 p.
18. Kuzman D. et al. Elastic properties of the red blood cell membrane that determine echinocyte deformability // Eur Biophys J. 2004. Vol. 33, № 1. P. 1–15.
19. Sha'afi R.I., Gary-Bobo C.M. Water and nonelectrolytes permeability in mammalian red cell membranes // Progress in Biophysics and Molecular Biology. 1973. Vol. 26. P. 103–146.
20. Guyton A.C., Hall J.E. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. 1116 p.
21. Swietach P. et al. Hydrogen ion dynamics in human red blood cells // J. Physiol. (Lond.). 2010. Vol. 588, № Pt 24. P. 4995–5014.
22. Chernyshev A.V. et al. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: theoretical modeling and experimental verification // J. Theor. Biol. 2008. Vol. 251, № 1. P. 93–107.
23. Loer S.A., Scheeren T.W., Tarnow J. How much oxygen does the human lung consume? // Anesthesiology. 1997. Vol. 86, № 3. P. 532–537.
24. Poole J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A // Blood Rev. 2000. Vol. 14, № 1. P. 31–43.
25. von Rückmann B., Schubert D. The complex of band 3 protein of the human erythrocyte membrane and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: stoichiometry and competition by aldolase // Biochim. Biophys. Acta. 2002. Vol. 1559, № 1. P. 43–55.
26. Weber R.E. et al. Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. Vol. 287, № 2. P. R454-464.

27. The structure of biological membranes. 3rd ed / ed. Yeagle P. Boca Raton: CRC Press, 2012. 386 p.
28. Zhang D. et al. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 // Blood. 2000. Vol. 96, № 9. P. 2925–2933.
29. Ferru E. et al. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3 // Blood. 2011. Vol. 117, № 22. P. 5998–6006.
30. Merciris P. et al. Involvement of deoxygenation-induced increase in tyrosine kinase activity in sickle cell dehydration // Pflugers Arch. 1998. Vol. 436, № 3. P. 315–322.
31. Minetti G., Ciana A., Balduini C. Differential sorting of tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases acting on band 3 during vesiculation of human erythrocytes // Biochemical Journal. 2004. Vol. 377, № 2. P. 489–497.
32. Vasseur C., Piau J.P., Bursaux E. Cation dependence of the phosphorylation of specific residues in red cell membrane protein band 3 // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 899, № 1. P. 1–8.
33. Abad C. et al. Effect of magnesium sulfate on the calcium-stimulated adenosine triphosphatase activity and lipid peroxidation of red blood cell membranes from preeclamptic women // Biochem. Pharmacol. 2005. Vol. 70, № 11. P. 1634–1641.
34. Campanella M.E., Chu H., Low P.S. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. Vol. 102, № 7. P. 2402–2407.
35. Chu H., Low P.S. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3 // Biochem. J. 2006. Vol. 400, № 1. P. 143–151.
36. Zipser Y. et al. Ca2+ promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3. // Biochem J. 2002. Vol. 368, № Pt 1. P. 137–144.
37. Green J. et al. Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Regulation of anion exchange by intracellular pH and Ca2+ ions // J. Gen. Physiol. 1990. Vol. 95, № 1. P. 121–145.
38. Tu Y.P. et al. Transmembrane Ca2+ gradient is essential for high anion transport activity of human erythrocytes // Biosci. Rep. 1996. Vol. 16, № 4. P. 299–311.

39. Passing R., Schubert D. The binding of Ca2+ to solubilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1983. Vol. 364, № 7. P. 873–878.
40. Bogdanova A. et al. Calcium in red blood cells-a perilous balance // Int J Mol Sci. 2013. Vol. 14, № 5. P. 9848–9872.
41. Jeney V., Balla G., Balla J. Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis // Front Physiol. 2014. Vol. 5. P. 379.
42. Buttari B., Profumo E., Riganò R. Crosstalk between red blood cells and the immune system and its impact on atherosclerosis // Biomed Res Int. 2015. Vol. 2015. P. 616834.
43. Chernyshev A.V. et al. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: theoretical modeling and experimental verification // J. Theor. Biol. 2008. Vol. 251, № 1. P. 93–107.
44. Klocke R.A. Velocity of CO_2 Exchange in Blood // Annu. Rev. Physiol. 1988. Vol. 50, № 1. P. 625–637.
45. Freedman J.C., Hoffman J.F. Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells treated with nystatin. // Journal of General Physiology. 1979. Vol. 74, № 2. P. 157–185.
46. Raftos J.E., Bulliman B.T., Kuchel P.W. Evaluation of an electrochemical model of erythrocyte pH buffering using 31P nuclear magnetic resonance data. // Journal of General Physiology. 1990. Vol. 95, № 6. P. 1183–1204.
47. Evans E. et al. Dynamic Tension Spectroscopy and Strength of Biomembranes // Biophysical Journal. 2003. Vol. 85, № 4. P. 2342–2350.
48. Hategan A. et al. Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing // Biophysical Journal. 2003. Vol. 85, № 4. P. 2746–2759.
49. Burger D.E., Jett J.H., Mullaney P.F. Extraction of morphological features from biological models and cells by fourier analysis of static light scatter measurements // Cytometry. 2005. Vol. 2, № 5. P. 327–336.
50. Salzman G.C. Light Scattering Analysis of Single Cells // Cell Analysis / ed. Catsimpoolas N. Boston, MA: Springer US, 1982. P. 111–143.
51. Киричук В.Ф., Кулапина О.И. Проницаемость мембран эритроцитов у больных с инфекционной патологией. Критические Технологии Мембраны, 2005.

52. Stuart W.I. Interaction of erythrocytes and hexavalent uranium compounds: an autoanalytical study. Lucas Heights: Australian Atomic Energy Commission, Research Establishment, 1980.
53. Brecher G., Schneiderman M., Williams G.Z. Evaluation of electronic red blood cell counter // Am. J. Clin. Pathol. 1956. Vol. 26, № 12. P. 1439–1449.
54. Tycko D.H. et al. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // Appl Opt. 1985. Vol. 24, № 9. P. 1355.
55. Wolf E. Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data // Optics Communications. 1969. Vol. 1, № 4. P. 153–156.
56. Pantaleo A. et al. Band 3 Erythrocyte Membrane Protein Acts as Redox Stress Sensor Leading to Its Phosphorylation by p ^{72} Syk // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016. Vol. 2016. P. 1–11.
57. Stoya G. et al. Flow cytometric analysis of band 3 protein of human erythrocytes // Acta Histochemica. 1997. Vol. 99, № 1. P. 29–36.
58. Grubbs R.D. Intracellular magnesium and magnesium buffering // Biometals. 2002. Vol. 15, № 3. P. 251–259.
59. Günther T. Total and free Mg2+ contents in erythrocytes: a simple but still undisclosed cell model // Magnes Res. 2007. Vol. 20, № 3. P. 161–167.
60. Beydemir S. et al. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo // Pharmacol. Res. 2000. Vol. 42, № 2. P. 187–191.
61. Bara M., Guiet-Bara A., Durlach J. Regulation of sodium and potassium pathways by magnesium in cell membranes // Magnes Res. 1993. Vol. 6, № 2. P. 167–177.
62. Antonov S.M., Johnson J.W. Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by Mg2+ // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999. Vol. 96, № 25. P. 14571–14576.
63. Michelet-Habchi C. et al. Elemental maps in human allantochorial placental vessels cells: 2. MgCl2 and MgSO4 effects // Magnes Res. 2003. Vol. 16, № 3. P. 171–175.

64. Barbul A. et al. Deoxygenation and elevation of intracellular magnesium induce tyrosine phosphorylation of band 3 in human erythrocytes // FEBS Lett. 1999. Vol. 455, № 1–2. P. 87–91.
65. Gulczynska E. et al. Prenatal MgSO4 treatment modifies the erythrocyte band 3 in preterm neonates // Pharmacological Research. 2006. Vol. 53, № 4. P. 347–352.
66. Teti D. et al. Anion transport in normal erythrocytes, sickle red cells, and ghosts in relation to hemoglobins and magnesium // Arch. Biochem. Biophys. 2002. Vol. 403, № 2. P. 149–154.
67. Fawcett W.J., Haxby E.J., Male D.A. Magnesium: physiology and pharmacology // Br J Anaesth. 1999. Vol. 83, № 2. P. 302–320.
68. McLean R.M. Magnesium and its therapeutic uses: a review // Am. J. Med. 1994. Vol. 96, № 1. P. 63–76.
69. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders // Clin Biochem Rev. 2003. Vol. 24, № 2. P. 47–66.
70. Ulger Z. et al. Intra-erythrocyte magnesium levels and their clinical implications in geriatric outpatients // J Nutr Health Aging. 2010. Vol. 14, № 10. P. 810–814.
71. Doyle L.W. et al. Antenatal magnesium sulfate and neurologic outcome in preterm infants: a systematic review // Obstet Gynecol. 2009. Vol. 113, № 6. P. 1327–1333.
72. Mittendorf R., Roizen N.J., Pryde P.G. The Risks of Extending the Controversial Use of Tocolytic Magnesium Sulfate for the Purpose of Neuroprotection in Preterm Labor // Journal of Perinatology. 2004. Vol. 24, № 7. P. 465–466.
73. Murata Y. et al. Possible antenatal and perinatal related factors in development of cystic periventricular leukomalacia // Brain Dev. 2005. Vol. 27, № 1. P. 17–21.
74. Deering S.H. et al. Antenatal magnesium treatment and neonatal illness severity as measured by the Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP) // J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. 2005. Vol. 17, № 2. P. 151–155.
75. Zylinska L. et al. Protein kinases activities in erythrocyte membranes of asphyxiated newborns // Clinical Biochemistry. 2002. Vol. 35, № 2. P. 93–98.
76. Gulczynska E. et al. Prenatal MgSO4 treatment modifies the erythrocyte band 3 in preterm neonates // Pharmacol. Res. 2006. Vol. 53, № 4. P. 347–352.

77. Szemraj J. et al. Magnesium sulfate effect on erythrocyte membranes of asphyxiated newborns // Clin. Biochem. 2005. Vol. 38, № 5. P. 457–464.
78. Chernyshova E.S., Zaikina Y.S., Tsvetovskaya G.A., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Serebrennikova E.S., Volkov L., Maltsev V.P., and Chernyshev A.V. Influence of magnesium sulfate on HCO3/Cl transmembrane exchange rate in human erythrocytes // Journal of Theoretical Biology. 2016. Vol. 393. P. 194–202.
79. Nayler W.G., Poole-Wilson P. Calcium antagonists: definition and mode of action // Basic Res. Cardiol. 1981. Vol. 76, № 1. P. 1–15.
80. Braunwald E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents // N. Engl. J. Med. 1982. Vol. 307, № 26. P. 1618–1627.
81. Carboni E., Wojcik W.J. Dihydropyridine binding sites regulate calcium influx through specific voltage-sensitive calcium channels in cerebellar granule cells // J. Neurochem. 1988. Vol. 50, № 4. P. 1279–1286.
82. Lamers J.M., Cysouw K.J., Verdouw P.D. Slow calcium channel blockers and calmodulin. Effect of felodipine, nifedipine, prenylamine and bepridil on cardiac sarcolemmal calcium pumping ATPase // Biochem. Pharmacol. 1985. Vol. 34, № 21. P. 3837–3843.
83. Olorunsogo O.O. et al. Inhibition of erythrocyte membrane Ca(2+)-pumping ATPase of hypertensive humans by nifedipine, a calcium entry blocker // Afr J Med Med Sci. 1991. Vol. 20, № 1. P. 61–65.
84. Lucaciu C.M. et al. Manganese transport through human erythrocyte membranes. An EPR study // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1328, № 2. P. 90–98.
85. Boffi F. et al. A structural and kinetic study by energy dispersion X-ray diffraction: interaction between 1,4-dihydropyridines and biological membranes // Chemical Physics Letters. 1998. Vol. 286, № 5. P. 473–478.
86. Herbette L.G., Vant Erve Y.M., Rhodes D.G. Interaction of 1,4 dihydropyridine calcium channel antagonists with biological membranes: lipid bilayer partitioning could occur before drug binding to receptors // J. Mol. Cell. Cardiol. 1989. Vol. 21, № 2. P. 187–201.

87. Méry P.F. et al. Binding constants determined from Ca2+ current responses to rapid applications and washouts of nifedipine in frog cardiac myocytes. // J Physiol. 1996. Vol. 494, № Pt 1. P. 105–120.
88. Sardari F., Jouyban A. Solubility of Nifedipine in Ethanol + Water and Propylene Glycol + Water Mixtures at 293.2 to 313.2 K // Ind. Eng. Chem. Res. American Chemical Society, 2013. Vol. 52, № 40. P. 14353–14358.
89. Ott J.B., Boerio-Goates J. Chemical Thermodynamics: Principles and Applications: Principles and Applications. 1 edition. London, UK ; San Diego: Academic Press, 2000. 664 p.
90. Engelmann B., Duhm J. Distinction of two components of passive Ca2+ transport into human erythrocytes by Ca2+ entry blockers // Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 981, № 1. P. 36–42.
91. Burger A., Koller K.T. Polymorphism and Pseudopolymorphism on Nifedipine // SCIENTIA PHARMACEUTICA. 1996. Vol. 64, № 3//4. P. 293–302.
92. Grooff D., Liebenberg W., De Villiers M.M. Preparation and transformation of true nifedipine polymorphs: investigated with differential scanning calorimetry and X-Ray diffraction pattern fitting methods // J Pharm Sci. 2011. Vol. 100, № 5. P. 1944–1957.
93. Caira M.R. et al. Structural characterization, physicochemical properties, and thermal stability of three crystal forms of nifedipine // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003. Vol. 92, № 12. P. 2519–2533.
94. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // Review of Scientific Instruments. American Institute of Physics, 1999. Vol. 71, № 1. P. 243–255.
95. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry // Cytometry A. 2011. Vol. 79, № 7. P. 570–579.
96. Konokhova A.I. et al. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles // J Biomed Opt. 2012. Vol. 17, № 5. P. 057006.
97. Yastrebova E.S. Dolgikh I., Gilev K.V., Vakhrusheva I.V., Liz E., Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Maltsev V.P. Spectral approach to

recognize spherical particles among non-spherical ones by angle-resolved light scattering // Optics & Laser Technology. 2021. Vol. 135. P. 106700.

98. Gienger J. et al. Determining the refractive index of human hemoglobin solutions by Kramers–Kronig relations with an improved absorption model // Appl. Opt. 2016. Vol. 55, № 31. P. 8951.
99. Gienger J. et al. Refractive index of human red blood cells between 290 nm and 1100 nm determined by optical extinction measurements // Sci Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 4623.
100. Deuling H.J., Helfrich W. The curvature elasticity of fluid membranes : A catalogue of vesicle shapes // J. Phys. France. 1976. Vol. 37, № 11. P. 1335–1345.
101. Гилев К.В. РАЗВИТИЕ МЕТОДА ЧИСЛЕННОГО РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИХ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ. 2017.
102. Zakovic S., Ulanowski Z., Bartholomew-Biggs M.C. Application of global optimization to particle identification using light scattering // Inverse Problems. 1998. Vol. 14, № 4. P. 1053–1067.
103. Bartholomew-Biggs M.C., Ulanowski Z.J., Zakovic S. Using Global Optimization for a Microparticle Identification Problem with Noisy Data // J Glob Optim. 2005. Vol. 32, № 3. P. 325–347.
104. Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant // J Optim Theory Appl. 1993. Vol. 79, № 1. P. 157–181.
105.. Gilev K.V, Yastrebova E.S., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Karmadonova N.A., Chernyshev A.V., Lomivorotov V.V., Maltsev V.P.. Advanced consumable-free morphological analysis of intact red blood cells by a compact scanning flow cytometer // Cytometry Part A. 2017. Vol. 91, № 9. P. 867–873.
106. ADDA - light scattering simulator using the discrete dipole approximation.
107. Draine B.T., Flatau P.J. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations // J. Opt. Soc. Am. A. 1994. Vol. 11, № 4. P. 1491.

108. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete dipole approximation: An overview and recent developments // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2007. Vol. 106, № 1–3. P. 558–589.
109. Supercomputing center of the Novosibirsk State University.
110. https://www.ni.com/ru-ru/shop/labview.html.
111. Lin C.-M. et al. Membrane properties of swollen vesicles: growth, rupture, and fusion // Soft Matter. The Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 8, № 22. P. 6139–6150.
112. NIST handbook of mathematical functions / ed. Olver F.W.J., National Institute of Standards and Technology (U.S.). Cambridge ; New York: Cambridge University Press : NIST, 2010. 951 p.
113. Chanson A. et al. Evaluation of magnesium fluxes in rat erythrocytes using a stable isotope of magnesium // Front. Biosci. 2005. Vol. 10. P. 1720–1726.
114. Flatman P.W. Mechanisms of magnesium transport // Annu. Rev. Physiol. 1991. Vol. 53. P. 259–271.
115. Bock J.L. et al. 25Mg NMR Studies of magnesium binding to erythrocyte constituents // Journal of Inorganic Biochemistry. 1991. Vol. 44, № 2. P. 79–87.
116. Raftos J.E., Lew V.L., Flatman P.W. Refinement and evaluation of a model of Mg2+ buffering in human red cells // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 263, № 3. P. 635–645.
117. Weber R.E., Voelter W. “Novel” factors that regulate oxygen binding in vertebrate hemoglobins // Micron. 2004. Vol. 35, № 1–2. P. 45–46.
118. Corry B. et al. Mechanisms of permeation and selectivity in calcium channels. // Biophys J. 2001. Vol. 80, № 1. P. 195–214.
119. Kubitscheck U. et al. Calcium pump kinetics determined in single erythrocyte ghosts by microphotolysis and confocal imaging // Biophys. J. 1995. Vol. 69, № 1. P. 30–41.
120. Tiffert T., Spivak J.L., Lew V.L. Magnitude of calcium influx required to induce dehydration of normal human red cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 1988. Vol. 943, № 2. P. 157–165.
121. Schatzmann H.J. Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells // J. Physiol. (Lond.). 1973. Vol. 235, № 2. P. 551–569.

122. Tiffert T., Lew V.L. Elevated intracellular Ca2+ reveals a functional membrane nucleotide pool in intact human red blood cells // J. Gen. Physiol. 2011. Vol. 138, № 4. P. 381–391.
123. Sarkadi B. et al. Transport parameters and stoichiometry of active calcium ion extrusion in intact human red cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 1977. Vol. 464, № 1. P. 93–107.
124. Tiffert T., Bookchin R.M., Lew V.L. Calcium Homeostasis in Normal and Abnormal Human Red Cells // Red Cell Membrane Transport in Health and Disease / ed. Bernhardt I., Ellory J.C. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003. P. 373–405.
125. Zini G. Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications // International Journal of Laboratory Hematology. 2014. Vol. 36, № 2. P. 111–113.
126. Soini J.T. et al. A new design of the flow cuvette and optical set-up for the scanning flow cytometer // Cytometry. 1998. Vol. 31, № 2. P. 78–84.
127. Gill P.E., Murray W. Algorithms for the Solution of the Nonlinear Least-Squares Problem // SIAM Journal on Numerical Analysis. Society for Industrial and Applied Mathematics, 1978. Vol. 15, № 5. P. 977–992.
128. Harris D.C., Lucy C.A. Quantitative chemical analysis. Ninth edition. New York: W.H. Freeman & Company, 2016. 1 p.
129. NCCLS. C28-A How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Approved Guideline—Second Edition, 2000.
130. Yastrebova E.S., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Maltsev V.P., Chernyshev A.V. Proposed Dynamics of CDB3 Activation in Human Erythrocytes by Nifedipine Studied with Scanning Flow Cytometry // Cytometry. 2019. Vol. 95, № 12. P. 1275–1284.
131. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics // Biomicrofluidics. 2014. Vol. 8, № 5. P. 051501.
132. Kim J., Lee H., Shin S. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. 2015.

133. Mozos I. Mechanisms Linking Red Blood Cell Disorders and Cardiovascular Diseases [Electronic resource]: Review Article // BioMed Research International. Hindawi, 2015. Vol. 2015. P. e682054. URL: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/682054/ (accessed: 13.05.2020).
134. Hatamian H., Saberi A., Pourghasem M. The relationship between stroke mortality and red blood cell parameters // Iran J Neurol. 2014. Vol. 13, № 4. P. 237–240.
135. Agrawal R. et al. Red blood cells in retinal vascular disorders // Blood Cells Mol. Dis. 2016. Vol. 56, № 1. P. 53–61.
136. da Silva Garrote-Filho M., Bernardino-Neto M., Penha-Silva N. Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis // Curr Atheroscler Rep. 2017. Vol. 19, № 4. P. 17.
137. Unruh D. et al. Red Blood Cell Dysfunction Induced by High-Fat Diet: Potential Implications for Obesity-Related Atherosclerosis // Circulation. 2015. Vol. 132, № 20. P. 1898–1908.
138. Blum A. The possible role of red blood cell microvesicles in atherosclerosis // Eur. J. Intern. Med. 2009. Vol. 20, № 2. P. 101–105.
139. Tonelli M. et al. Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease // Circulation. 2008. Vol. 117, № 2. P. 163–168.
140. Patel K.V. et al. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults // Arch. Intern. Med. 2009. Vol. 169, № 5. P. 515–523.
141. Perlstein T.S. et al. Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort: NHANES III // Arch Intern Med. 2009. Vol. 169, № 6. P. 588–594.
142. Wen Y. High red blood cell distribution width is closely associated with risk of carotid artery atherosclerosis in patients with hypertension // Exp Clin Cardiol. 2010. Vol. 15, № 3. P. 37–40.