

УДК 577.112.7

DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-4-78-89

ВЛИЯНИЕ РН СРЕДЫ НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СПОСОБНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА

Бычкова Е. А., Кузьмина А. А., Громова Н. В., Кукина А. Н., Ревин В. В.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
им. Н. П. Огарёва», Саранск, Республика Мордовия, Россия
E-mail: bychkovazhenya21@yandex.ru*

Цель – выявить особенности кислородсвязывающей способности гемоглобина при разных значениях рН.

Материалы и методы – использовали донорскую кровь, выделяя эритроциты центрифугированием; исследование проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния.

Результаты – при ацидозе (рН 6,8) высвобождение лигандов увеличивается на 8,13 %, связывание снижается на 6,25 %, итоговое сродство к кислороду падает на 13,29 %. При алкалозе (рН 7,8) способность связывать лиганды возрастает на 7,08 %, сродство к кислороду – на 13,9 %, высвобождение лигандов снижается на 6,09 %.

Заключение – изменения рН вызывают конформационные перестройки гемового фрагмента, что влияет на кислородтранспортные функции гемоглобина.

Ключевые слова: эритроцит, гемоглобин, лиганды, рН.

ВВЕДЕНИЕ

Гемоглобин (Hb) – это жизненно важный белок, содержащийся в эритроцитах и выполняющий основную функцию транспорта кислорода от легких к тканям организма и углекислого газа в обратном направлении. Его кислородсвязывающая способность играет решающую роль в поддержании нормального функционирования всех органов и систем [1]. Одним из факторов, существенно влияющих на способность Hb связывать и отдавать кислород, является уровень кислотности среды, измеряемый в значениях рН. Даже незначительные изменения рН могут существенно изменить конформацию Hb и, как следствие, его аффинитет к молекуле кислорода [2, 3].

Кислотно-щелочной баланс (рН) среды играет ключевую роль в регуляции функциональных характеристик эритроцитов, влияя на структуру липидов мембранны, поддержание ионного равновесия и способность Hb переносить кислород [4, 5].

Одновременно изменения конформации гемоглобина, зависящие от рН, непосредственно определяют его способность связывать кислород. Ацидоз (рН < 7,4) снижает способность гемоглобина связывать O₂ и усиливает

высвобождение лигандов, что облегчает отдачу кислорода в тканях. Алкалоз ($\text{pH} > 7.4$), напротив, увеличивает связывание O_2 , оптимизируя оксигенацию в лёгких. Эти процессы коррелируют с изменениями конформации гема, подтверждаемыми сдвигами в спектрах комбинационного рассеяния [6].

Изучение влияния pH на свойства Hb связывать кислород имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Оно важно для понимания физиологических процессов, происходящих при адаптации к различным условиям внешней среды, например, в условиях гипоксии, гипервентиляции, или при заболеваниях, сопровождающихся изменением кислотно-щелочного баланса.

Таким образом, pH среды является ключевым фактором, модулирующим способность гемоглобина к связыванию и высвобождению кислорода. Понимание этого влияния позволяет более глубоко осознать сложные биохимические и физиологические процессы, лежащие в основе дыхательной функции крови, и подчеркивает значимость кислотно-щелочного равновесия для жизнедеятельности организма [7, 8].

Целью данного исследования являлось выяснение влияния уровня pH окружающей среды на способность Hb связывать кислород, с особым вниманием к механизмам, регулирующим изменение аффинности гемоглобина к кислороду при различных значениях кислотно-щелочного баланса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовались эритроциты человека, выделенные из цельной крови доноров, собранной на Республиканской станции переливания крови. Все эксперименты проводились в строгом соответствии с этическими нормами, установленными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki). Исходные образцы крови, полученные в условиях стационара, анализировались в течение одного часа после забора.

1. Получение эритроцитов из цельной крови

Кровь стабилизировали цитратом натрия в концентрации 130 мМ/л, pH (7,4). Соотношение цитрат: кровь 1:10. Выделяли эритроциты методом центрифугирования (центрифугирование проводилось при 1500г 10 мин, при комнатной температуре).

Из отцентрифужированных пробирок с цельной кровью отбирают супернатант и снимают верхний слой. Пипеткой Пастера отбирают эритроциты из середины слоя. Оставляют верхний и нижний слой эритроцитов. Отобранный осадок переносят в пробирки со средой промывания суспенсирования (12 мл буфера + 3 мл эритроцитов). Состав среды промывания и суспенсирования эритроцитов:

- 1) 10 mM KH_2PO_4
- 2) 3,5 mM KCl
- 3) 1,5 mM MgCl_2
- 4) 145 mM NaCl
- 5) mM glucose

Среда промывания и суспендирования должна быть холодной $t=4$ $^{\circ}\text{C}$. Перемешиваем и центрифугируем при 1500g 20 мин. Осадок эритроцитов снова отбираем из среднего слоя и переносим в свежие пробирки со средой промывания суспендирования. Перемешиваем и центрифугируем при 1500 g 20 мин. Затем снова осадок эритроцитов отбираем и центрифугируем еще раз при 1500g 20 мин [9].

2. Инкубация эритроцитов

Эритроцитарную массу инкубировали в растворах суспендирования с разными значениями pH (норма – 7,35–7,4; алкалоз – 7,8 и ацидоз – 6,8), при стабильной температуре $+37$ $^{\circ}\text{C}$. Воздействие pH смотрели в течение разного времени, через 15 мин., после начала инкубации, через 30 мин. и через 60 мин [10].

3. Выделение мембран

Осадок эритроцитов резким движением переносим в стакан с 5 мМ Na_2HPO_4 (б/в) (3 мл эритроцитов:60 мл раствора). Все манипуляции происходят на льду.

Смесь оставляли на 10–15 мин при 4 $^{\circ}\text{C}$. После этого центрифугировали при 18600g 40–50 мин (температура 4 $^{\circ}\text{C}$). Надосадочную жидкость отбрасывали. В пробирки с осадком добавляли раствор Na_2HPO_4 . Центрифугировали при 18600g 40–50 минут 3-кратно.

4. Изучение кислородсвязывающей способности эритроцитов методом спектроскопии комбинационного рассеяния

Мазок суспензии эритроцитов наносили на предметное стекло и подвергали анализу. Для регистрации полос спектра Hb образцы освещали лазером с длиной волны 532 нм, при этом фиксировались спектральные характеристики, связанные с колебательными модами порфиринового кольца. Для каждой исследуемой пробы выполняли три измерения, после чего вычисляли среднее значение полученных данных. Положение и интенсивность полос в рамановском спектре гемоглобина отражают особенности колебательных процессов в структуре порфирина, что позволяет судить о конформационном состоянии гематопорфирина и его влиянии на способность Hb связывать кислород [11, 12].

Изучение транспортных свойств гемоглобина в эритроцитах проводили с помощью рамановской спектроскопии. Оборудование включало короткофокусный монохроматор с фокусным расстоянием до 250 мм и лазер с длиной волны 532 нм и максимальной мощностью 100 мВт. Для увеличения применяли объектив 100х. Регистрация спектральных данных осуществлялась при помощи CCD-матрицы с разрешением 1024 на 256 пикселей, оборудованной системой охлаждения на основе эффекта Пельтье до температуры -70 $^{\circ}\text{C}$ и дифракционной решёткой с параметром 1800 линий на миллиметр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование влияния pH среды на кислородсвязывающую функцию гемоглобина эритроцитов

Спектры комбинационного рассеяния (КР) гемопорфирина в составе гемоглобина предоставляют информацию о степени окисления железа, его спиновом состоянии и присутствии лигандов, а также отражают структурные

изменения глубина, которые приводят к деформациям гемопорфирина и оказывают влияние на способность Hb связывать кислород [13, 14].

Для оценки конформационных изменений и кислородсвязывающей функции гемоглобина в нашем исследовании анализировали определённые полосы КР спектров эритроцитов, соответствующие максимумам на 1375, 1355, 1550, 1580 и 1172 см^{-1} (рис. 1) [11].

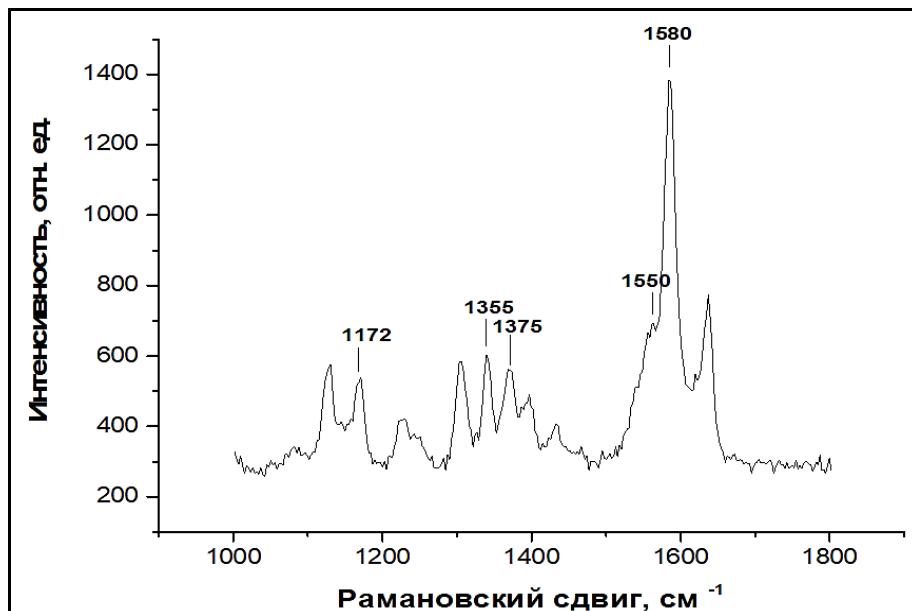


Рис. 1. Спектр контрольного эритроцита, зарегистрированный методом комбинационного рассеяния (КР) спектроскопии. По вертикальной оси отложена интенсивность КР в условных единицах, по горизонтальной – частотный сдвиг, см^{-1}

Были выполнены анализы спектров комбинационного рассеяния эритроцитов после их инкубации как при физиологических значениях pH, так и при различных уровнях кислотности и продолжительности экспозиции. Все выявленные изменения, произошедшие в эритроцитах в ходе экспериментов, представлены в таблице 1.

Анализ спектров комбинационного рассеяния эритроцитов человека выявил, что 15-минутное воздействие в условиях алкалоза и ацидоза приводит к незначительным изменениям общего содержания оксигемоглобина, выраженного через отношение интенсивностей $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$. В то же время остальные исследуемые параметры демонстрируют статистически значимые изменения. Относительная способность Hb к отдаче лигандов, оцененная по соотношению I_{1375}/I_{1580} , при pH 6,8 возрастает на 8,13 %, тогда как при pH 7,8 наблюдается снижение этого показателя на 6,09 %. Эти данные свидетельствуют о чувствительности конформационных и функциональных свойств гемоглобина к изменениям кислотно-щелочного баланса среды.

Таблица 1

Соотношение характерных полос спектра КР гемоглобина эритроцитов в норме и после воздействии разного значения рН (M±m) * – p≤0,05

Показатели рН среды	Отн. кол-во оHb в крови, $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	Отн. способ-ть Hb связывать лиганды (в том числе и O_2), I_{1355}/I_{1550}	Отн. способ-ть Hb сбрасывать лиганды, I_{1375}/I_{1580}	Средство Hb к лигандам, прежде всего к O_2 , $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$	Выражен- ность сим. и асим. колебаний пирроль. колец, I_{1375}/I_{1172}
15 мин.					
pH7,35	0,535±0,02	0,72±0,03	0,443±0,02	1,625±0,04	1,325±0,4
pH6,8	0,499±0,02*	0,675±0,03*	0,479±0,01*	1,409±0,05*	1,238±0,05*
pH7,8	0,57±0,03*	0,771±0,01*	0,416±0,01*	1,851±0,05*	1,419±0,05*
30мин.					
pH7,35	0,531±0,02	0,706±0,05	0,438±0,03	1,615±0,04	1,316±0,05
pH6,8	0,487±0,02*	0,642±0,02*	0,475±0,01*	1,351±0,04*	1,195±0,03*
pH7,8	0,573±0,03*	0,761±0,02*	0,404±0,01*	1,887±0,05*	1,432±0,04*
60мин.					
pH7,35	0,53±0,03	0,695±0,05	0,432±0,04	1,614±0,05	1,314±0,05
pH6,8	0,48±0,02*	0,629±0,01*	0,485±0,01*	1,298±0,04*	1,177±0,03*
pH7,8	0,581±0,02*	0,766±0,02*	0,391±0,01*	1,959±0,03*	1,457±0,05*

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p≤0,05).

При снижении рН относительная способность всего гемоглобина связывать лиганды, включая кислород (I_{1355}/I_{1550}), уменьшается на 6,25 %, а при повышении рН до 7,8 возрастает на 7,08 %.

Аналогичные изменения наблюдаются в показателе $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$, который отражает средство гемоглобина к лигандам, прежде всего к кислороду: при рН 6,8 он снижается на 13,29 %, а при рН 7,8 увеличивается на 13,9 %. Показатель выраженности симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец (I_{1375}/I_{1172}) изменяется схожим образом, снижаясь на 6,57 % при рН 6,8 и увеличиваясь на 7,09 % при рН 7,8. Результаты исследования представлены на рис. 2.

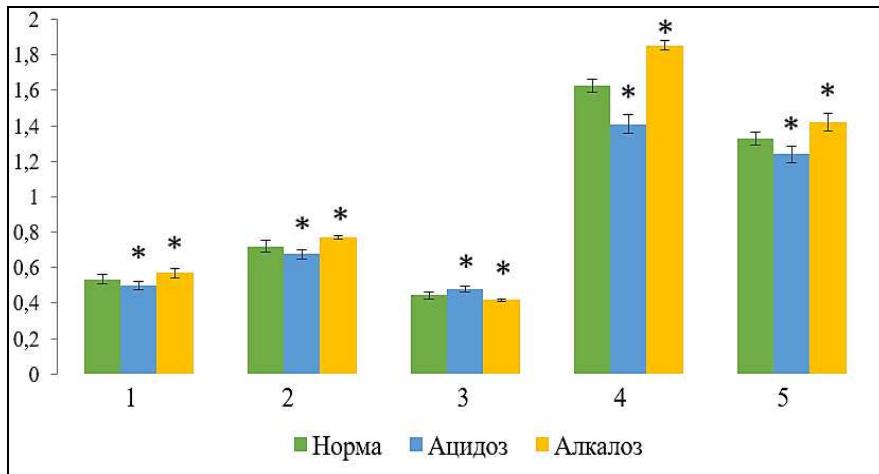


Рис. 2. Конформационные изменения гемопорфирина гемоглобина после 15-минутной инкубации при нефизиологических значениях pH представлены следующими показателями: 1 – $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$, 2 – I_{1355}/I_{1550} , 3 – I_{1375}/I_{1580} , 4 – $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$, 5 – I_{1375}/I_{1172} ; * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Тридцатиминутная инкубация приводит к дальнейшему снижению всех контрольных показателей, при этом сохраняются те же тенденции изменений параметров, что и при пятнадцатиминутной инкубации. Общее количество оксигемоглобина, выраженное соотношением $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$, уменьшается на 8,29 % при pH 6,8 и увеличивается на 7,91 % при pH 7,8. В условиях алкалоза наблюдается рост практически всех соотношений интенсивностей: I_{1355}/I_{1550} увеличивается на 7,79 %, $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ – на 16,84 %, I_{1375}/I_{1172} – на 8,33 %.

Способность гемоглобина отдавать лиганды при этом уменьшается на 7,76 % по сравнению с контролем. В условиях ацидоза наблюдается снижение почти всех соотношений интенсивностей: отношение I_{1355}/I_{1550} сокращается на 9,07 %, $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ – на 16,35 %, а I_{1375}/I_{1172} – на 9,19 %, при этом способность гемоглобина освобождать лиганды увеличивается на 8,45 %. Результаты данного исследования представлены на рисунке 3.

На рисунке 4 показано, как изменяются все исследуемые показатели после 60 минут инкубации эритроцитов в условиях алкалоза и ацидоза. При инкубации в среде с pH 7,8 наблюдается увеличение ряда соотношений: $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ возрастает на 9,62 %, I_{1355}/I_{1550} – на 10,22 %, $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ – на 21,38 %, I_{1375}/I_{1172} – на 10,88 %, при этом показатель I_{1375}/I_{1580} снижается на 9,49 %.

В свою очередь, инкубация при pH 6,8 приводит к снижению практически всех этих значений: $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ уменьшается на 9,43 %, I_{1355}/I_{1550} – на 9,5 %, $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ – на 19,58 %, I_{1375}/I_{1172} – на 10,43 %, а способность гемоглобина к отдаче лигандов увеличивается на 12,27 %.

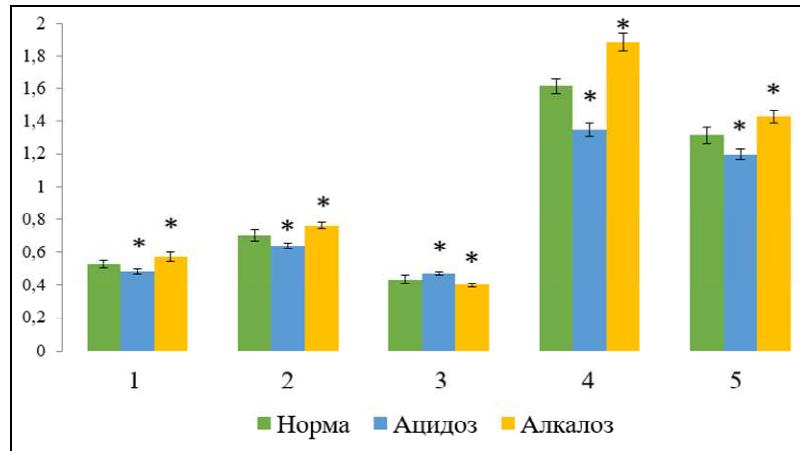


Рис. 3. Конформационные изменения гемопорфирина гемоглобина после 30-минутной инкубации при нефизиологических значениях рН представлены следующими показателями: 1 – $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$, 2 – I_{1355}/I_{1550} , 3 – индекс I_{1375}/I_{1580} , 4 – $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$, 5 – I_{1375}/I_{1172} ; * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

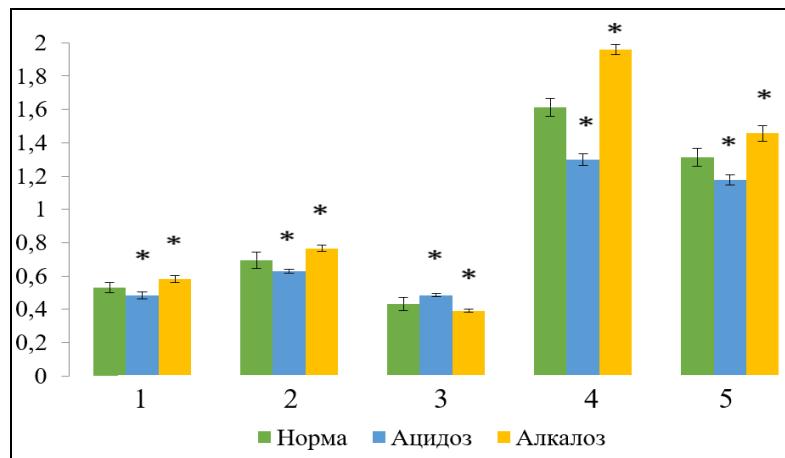


Рис. 4. Конформационные изменения гемопорфирина гемоглобина после 60-минутной инкубации при нефизиологических значениях рН представлены следующими показателями: 1 – $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$, 2 – I_{1355}/I_{1550} , 3 – I_{1375}/I_{1580} , 4 – $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$, 5 – I_{1375}/I_{1172} ; * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Интенсивность спектральных полос на 1355 и 1375 см^{-1} объясняется симметричными колебательными движениями пиррольных колец, которые присутствуют в молекулах дезоксигемоглобина и гемоглобина, связанном с лигандами, соответственно. При этом пиковая полоса на 1375 см^{-1} в основном служит

индикатором содержания оксигемоглобина, так как концентрация кислорода в крови значительно превосходит концентрации других лигандов, таких как NO_2 и CO [15, 16]

Отношение интенсивностей $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ служит пропорциональным показателем относительного количества оксигемоглобина в крови. Спектральные линии в диапазоне 1550 и 1580 см^{-1} отражают различия в спиновом состоянии иона железа, соответствующая дезоксигемоглобину и оксигемоглобину соответственно. Благодаря этому, указанные полосы служат ценными индикаторами для анализа молекулярных особенностей железа внутри гемовой группы гемоглобина [17].

Анализируя отношения интенсивностей I_{1355}/I_{1550} и I_{1375}/I_{1580} , можно судить о способности гемоглобина в эритроцитах связывать и отдавать кислород, учитывая их внутреннее состояние. Дополнительно, вычисление отношения $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ предоставляет показатель, отражающий сродство гемоглобина к кислороду в нативных эритроцитах. Кроме того, соотношение I_{1375}/I_{1172} характеризует баланс между симметричными и асимметричными колебаниями пиррольных колец, и его изменения могут указывать на конформационные перестройки в структуре пирролов [18, 19].

В работе проведён детальный анализ влияния изменения рН среды на способность гемоглобина связывать и высвобождать кислород, выявлены количественные показатели, при ацидозе (рН 6,8) увеличивается высвобождение лигандов на 8,13 %, при этом способность связывать лиганд уменьшается на 6,25 %, что в итоге снижает общую аффинность гемоглобина к кислороду на 13,29 %, в то время как при алкалозе (рН 7,8) наблюдается обратный эффект.

Использование спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman spectroscopy) позволило выявить конформационные перестройки гемоглобина, связанные с изменением рН, выражющиеся через изменение симметричного индекса пиррольных колец (снижение на 6,57 % при рН 6,8 и увеличение на 7,09 % при рН 7,8). Это даёт молекулярное подтверждение функциональных изменений и является отличительным признаком данного исследования [20].

Практическое значение результатов работы – понимание точных механизмов влияния рН на гемоглобин позволяет лучше интерпретировать нарушения его функции при патологических состояниях (например, ацидозе, алкалозе, гипоксии и сосудистых заболеваниях). Это может способствовать разработке новых диагностических и терапевтических подходов, направленных на коррекцию кислородной транспортной функции крови.

Таким образом, ключевая новизна – комплексное сочетание количественной оценки изменений кислородной аффинности гемоглобина с детализированным молекулярным анализом его конформационных изменений под влиянием рН с использованием современной спектроскопии. Это отличает данную работу от предыдущих и раскрывает практическое значение в медицинской биохимии и патофизиологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе инкубации эритроцитов в условиях сдвига рН в сторону алкалоза и ацидоза выявляются значительные изменения в их способности связывать и

транспортировать кислород. При повышении рН (алкалоз) наблюдается усиление аффинности гемоглобина к кислороду и рост его лиганд-связывающей активности, однако процесс отдачи лигандов замедляется [11]. Данные преобразования возникают вследствие усиления как симметричных, так и асимметричных вибраций пиррольных колец, что связано с изменениями динамики колебаний метиновых мостиков, соединяющих эти кольца. В итоге конфигурация гематопорфирина приобретает более компактную и стабильную форму, способствующую улучшенному связыванию и удержанию молекул кислорода.

В противоположность этому, при снижении рН (ацидоз) происходит уменьшение сродства гемоглобина к O_2 и снижение его способности к связыванию лигандов, тогда как отдача последних, наоборот, усиливается. Кроме того, возможно окисление ионов железа с Fe^{2+} до Fe^{3+} , что негативно сказывается на эффективности кислородного транспорта к тканям организма.

Рамановская спектроскопия (КРС) выявила морфологические изменения: контрольные образцы сохраняли дисковидную форму, а инкубация в экстремальных условиях вызывала появление эхиноцитов, стоматоцитов и сферацитов. Эхиноциты и стоматоциты обратимы при нормализации условий, хотя и снижают деформируемость клеток.

Сферациты же необратимы, прегемолизны и критично нарушают прохождение через капилляры. При ацидозе преобладают стоматоциты и сферациты, при алкалозе – эхиноциты со спикулами [12].

Основная причина морфологических сдвигов – нарушение работы ионных насосов (Na^+/K^+ -АТФазы, Mg -АТФазы), регулирующих клеточный объем и осмотический баланс, что вызывает сжатие или набухание клеток.

Список литературы

1. Revin V. Effect of hypoxia on the composition and state of lipids and oxygen-transport properties of erythrocyte haemoglobin / V. Revin, I. Grunyushkin, N. Gromova // Biotechnology & Biotechnological Equipment (ТВЕО). – 2017. – Vol. 31, No. 1. – P. 128–137.
2. Голуб И. Е. Нарушения кислотно-основного состояния и водно-электролитного обмена : учебное пособие / И. Е. Голуб, Е. С. Нетёсин. – Иркутск : ИГМУ, 2015. – 43 с.
3. Revin V. V. Study of the Structure, Oxygen-Transporting Functions, and Ionic Composition of Erythrocytes at Vascular Diseases / V. V. Revin, N. V. Gromova, L. A. Balykova // Biomed Res Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–7.
4. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии / Е. М. Васильева // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 118–126.
5. Максимов Г. В. Исследование изменений конформации порфирина гемоглобина при первичной гипертензии / Г. В. Максимов, Н. В. Максимова // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 3. – С. 365–370.
6. Oknińska M. New potential treatment for cardiovascular disease through modulation of hemoglobin oxygen binding curve: Myo inositol trispyrophosphate (ITPP) / M. Oknińska, U. Mackiewicz, K. Zajda [et al.] // Biomed Pharmacother. – 2022. – Vol. 154.
7. Ушакова А. А. Изменение содержания гемоглобина в эритроцитах и его кислородсвязывающей способности при инфаркте миокарда / А. А. Ушакова, Н. А. Мельникова, Н. В. Громова // Чебоксары : ЦНС «Интерактив плюс». – 2016. – Т. 2, № 7. – С. 18–19.
8. Revin V. V. Role of Membrane Lipids in the Regulation of Erythrocytic Oxygen-Transport Function in Cardiovascular Diseases / V. V. Revin, N. V. Gromova, E. S. Revina [et al.] // Biomed Res Int. – 2016. – Vol. 2016. – P. 9.

9. Revin V. V. Study of Erythrocyte Indices, Erythrocyte Morphometric Indicators, and Oxygen-Binding Properties of Hemoglobin Hematoporphyrin Patients with Cardiovascular Diseases / V. V. Revin, A. A. Ushakova, N. V. Gromova // Adv Hematol. – 2017. – Vol. 2017. – P. 8.
10. Артюхов В. Г. Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов / В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 10. – С. 113–115.
11. Revin V. V. Physical and Chemical Processes and the Morphofunctional Characteristics of Human Erythrocytes in Hyperglycaemia / V. V. Revin, N. A. Klenova, N. V. Gromova // Front Physiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 1–12.
12. Мухина И. В. Влияние кислотно-щелочного состояния на оксигенацию гемоглобина в условиях нормо- и гипоксии / И. В. Мухина, А. В. Козлов, А. Л. Шестаков // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2022. – Т. 66, № 2. – С. 31–36.
13. Зайцева М. Г. Эффект Бора: молекулярные механизмы и клиническое значение / М. Г. Зайцева, Е. П. Орлова // Терапевтический архив. – 2021. – Т. 93, № 8. – С. 1050–1056.
14. Чупахина Н. В. Роль pH в регуляции транспортной функции крови у пациентов с метаболическим ацидозом / Н. В. Чупахина, Т. С. Логинова, К. Р. Абдуллаев // Вестник интенсивной терапии. – 2020. – Т. 18, № 3. – С. 45–52.
15. Kassa T. Impact of cold storage on the oxygenation and oxidation reactions of red blood cells / T. Kassa, S. Jana, J. H. Baek [et al.] // Front Physiol. – 2024. – Vol. 15. – P. 14.
16. Böning D. The oxygen dissociation curve of blood in COVID 19—An update / D. Böning, W. M. Kuebler, D. Vogel [et al.] // Front Med (Lausanne). – 2023. – Vol. 10. – P. 9.
17. Woyke S. Changes in Hemoglobin Oxygen Affinity by the Micronutrient 5 Hydroxymethylfurfural and α Ketoglutaric Acid / S. Woyke, N. Mair, A. Ortner // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, No. 10. – P. 3448.
18. Chu Z. Resveratrol, a New Allosteric Effector of Hemoglobin, Enhances Oxygen Supply Efficiency and Improves Adaption to Acute Severe Hypoxia / Z. Chu, W. Li, G. You // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – № 5. – P. 16.
19. Koj S. Modulation of the Oxygenation State and Intracellular pH of Erythrocytes by Inositol Trispyrophosphate Investigated / S. Koj, T. Niedziela, J. Rossowska // J Cell Mol Med. – 2025. – Vol. 29, № 2. – P. 13.
20. Ungerstedt J. The magnitude of the Bohr effect profoundly influences the shape of the O₂ equilibrium curve / J. Ungerstedt, A. Fago // Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. – 2020. – Vol. 250. – P. 8.

INFLUENCE OF THE PH OF THE MEDIUM ON THE OXYGEN-BINDING PROPERTIES OF HEMOGLOBIN

Bychkova E. A., Kuzmina A. A., Gromova N. V., Kukina A. N., Revin V. V.

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Ogarev Mordovia State University», Saransk, Russia
E-mail: bychkovazhenya21@yandex.ru*

Introduction – a large number of studies are currently being conducted to understand the oxygen-binding and oxygen-transporting ability of red blood cells (RBCs). These abilities are influenced by many factors, including the critical role of pH changes. The pH of the environment affects the structure and function of hemoglobin (Hb), the key protein responsible for oxygen transport. Alterations in pH can lead to changes in the conformation of the heme group, which directly modulates ligand binding and release. The study of these structural and functional changes is vital for understanding the physiological adaptations and pathological conditions related to oxygen delivery.

Variations in pH within tissues can influence hemoglobin's efficiency, impacting cellular metabolism and overall organismal health.

The aim of this study was to investigate how varying the pH of the medium influences the oxygen-binding properties of hemoglobin. Understanding these changes can shed light on physiological and pathological mechanisms affecting oxygen delivery in the body. Precise characterization of hemoglobin's response to pH variations can inform clinical diagnostics and therapeutic interventions for diseases involving impaired oxygen transport, such as anemia, chronic obstructive pulmonary disease, and ischemic conditions.

Materials and methods. Donor blood was used to isolate erythrocytes by centrifugation. The oxygen-binding capacity of RBCs was analyzed using Raman spectroscopy, a highly sensitive technique for probing molecular conformation and ligand interactions in hemoglobin. This method allows detailed insight into structural rearrangements occurring during oxygen binding and release under different pH conditions.

Results demonstrated that acidosis (pH 6.8) leads to increased ligand release by 8.13 % but reduces binding capacity by 6.25 %, resulting in a 13.29 % decrease in overall oxygen affinity. Conversely, alkalosis (pH 7.8) enhances ligand binding by 7.08 % and oxygen affinity by 13.9 %, despite a 6.09 % decrease in ligand release. These functional changes correlate with conformational shifts in the heme fragment, confirmed by a 6.57 % decrease in pyrrole ring symmetry at low pH and a 7.09 % increase at high pH.

In conclusion – In conclusion, changes in pH significantly affect hemoglobin's ligand-binding properties and conformation, impacting its oxygen transport function. These findings contribute to a deeper understanding of hemoglobin biochemistry under varying physiological conditions. The integration of advanced spectroscopic techniques with functional assays provides a powerful approach to elucidate the biochemical underpinnings of oxygen transport and its modulation by the biochemical milieu.

Keywords: erythrocyte, hemoglobin, ligands, pH.

References

1. Revin V., Grunyushkin I., Gromova N. The effect of hypoxia on the composition and state of lipids and oxygen transport properties of erythrocyte hemoglobin, *Biotechnol. Biotech. Eq.*, **31**, 128 (2017).
2. Golub I. E., Netesin E. S. *Violation of the acid-base state and water-electrolyte metabolism*, (IGMU, Irkutsk, 2015).
3. Revin V. V., Gromova N. V., Balykova L. A. Study of the structure, oxygen-transporting functions and ionic composition of erythrocytes in vascular diseases, *Biomed Res. Int.*, **2015**, 261725 (2015).
4. Vasilyeva E. M. Biochemical features of an erythrocyte. The influence of pathology, *Biomed. Chem.*, **51**, 118 (2015).
5. Maksimov G. V., Maksimova N. V. Investigation of changes in hemoglobin porphyrin conformation in primary hypertension, *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 365 (2001).
6. Okninska M., Mackiewicz U., Zaida K., Kieda C., Maczewski M. A new potential treatment for cardiovascular disease through modulation of hemoglobin oxygen binding curve: Myo-inositol trispyrophosphate (ITPP), *Biomed. Pharmacother.*, **154**, 113544 (2022).
7. Ushakova A. A., Melnikova N. A., Gromova N. V. *Changes in the hemoglobin content in erythrocytes and its oxygen-binding capacity in myocardial infarction*, (CNS Interactive Plus, Cheboksary, 2016).

8. Revin V. V., Gromova N. V., Revina E. S., Martynova M. I. The role of membrane lipids in the regulation of oxygen transport function of erythrocytes in cardiovascular diseases, *Biomed Res. Int.*, **2016**, 9 (2016).
9. Revin V. V., Ushakova A. A., Gromova N. V. Study of erythrocyte indices, morphometric parameters of erythrocytes and oxygen-binding properties of hemoporphyrin hemoglobin in patients with cardiovascular diseases, *Adv. Hematol.*, **2017**, 8 (2017).
10. Artyukhov V. G., Putintseva O. V. Human hemoglobin under the influence of various physico-chemical agents, *Int. J. Exp. Educ.*, **10**, 113 (2013).
11. Revin V. V., Klenova N. A., Gromova N. V. Physical and chemical processes and morphofunctional characteristics of human erythrocytes in hyperglycemia, *Front. Physiol.*, **8**, 1 (2017).
12. Mukhina I. V., Kozlov A. V., Shestakov A. L. Influence of acid-base state on hemoglobin oxygenation in conditions of normo- and hypoxia, *Patol. Fiziol. Eks. Ter.*, **66**, 31 (2022).
13. Zaitseva M. G., Orlova E. P. Bohr effect: molecular mechanisms and clinical significance, *Ter. Arkh.*, **93**, 1050 (2021).
14. Chupakhina N. V., Loginova T. S., Abdullaev K. R. The role of pH in the regulation of blood transport function in patients with metabolic acidosis, *Vestn. Intensiv. Ter.*, **18**, 45 (2020).
15. Kassa T., Jana S., Baek J. H., Alayash A. I. Impact of cold storage on the oxygenation and oxidation reactions of red blood cells, *Front. Physiol.*, **15**, 1427094 (2024).
16. Böning D., Kuebler W. M., Vogel D., Bloch W. The oxygen dissociation curve of blood in COVID-19 – An update, *Front. Med.*, **10**, 1098547 (2023).
17. Woyke S., Mair N., Ortner A. Changes in hemoglobin oxygen affinity by the micronutrient 5-hydroxymethylfurfural and α -ketoglutaric acid, *Nutrients*, **13**, 3448 (2021).
18. Chu Z., Li W., You G. Resveratrol, a new allosteric effector of hemoglobin, enhances oxygen supply efficiency and improves adaption to acute severe hypoxia, *Molecules*, **28**, 5, 16 (2023).
19. Koj S., Niedziela T., Rossowska J. Modulation of the oxygenation state and intracellular pH of erythrocytes by inositol trispyrophosphate investigated, *J. Cell. Mol. Med.*, **29**, 2, 13 (2025).
20. Ungerstedt J., Fago A. The magnitude of the Bohr effect profoundly influences the shape of the O_2 equilibrium curve, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **250**, 8 (2020).