MODERN SCIENCE: INNOVATIONS AND PROSPECTS

Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference

Stockholm, Sweden

10-12 January 2022

Stockholm, Sweden

2022

UDC 001.1

The 4th International scientific and practical conference "Modern science: innovations and prospects" (January 10-12, 2022) SSPG Publish, Stockholm, Sweden. 2022. 856 p.

ISBN 978-91-87224-02-7

The recommended citation for this publication is:
Ivanov I. Analysis of the phaunistic composition of Ukraine // Modern science: innovations and prospects. Proceedings of the 4th International scientific and practical conference. SSPG Publish. Stockholm, Sweden. 2022. Pp. 21-27. URL: https://sci-conf.com.ua/iv-mezhdunarodnaya-nauchno-prakticheskaya-konferentsiya-modern-science-innovations-and-prospects-10-12-yanvarya-2022-goda-stokgolm-shvetsiya-arhiv/.

Editor
Komarytskyy M.L.
Ph.D. in Economics, Associate Professor

Collection of scientific articles published is the scientific and practical publication, which contains scientific articles of students, graduate students, Candidates and Doctors of Sciences, research workers and practitioners from Europe, Ukraine, Russia and from neighbouring coutries and beyond. The articles contain the study, reflecting the processes and changes in the structure of modern science. The collection of scientific articles is for students, postgraduate students, doctoral candidates, teachers, researchers, practitioners and people interested in the trends of modern science development.

e-mail: sweden@sci-conf.com.ua

homepage: *https://sci-conf.com.ua*

©2022 Scientific Publishing Center "Sci-conf.com.ua" ®
©2022 SSPG Publish ®
©2022 Authors of the articles

УДК 57.043: 612.111: 576.31

ФОРМА МОДИФИКАЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ АЛЬБУМИНОМ

Рамазанов Виктор Владимирович,
к.б.н., с.н.с.
Воловельская Елизавета Леонидовна,
к.б.н., с.н.с.
Руденко Сергей Витальевич,
к.б.н., с.н.с.
Институт проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины
г. Харьков, Украина

Введение. После криоконсервирования эритроцитов отмывание средой с альбумином обеспечивает восстановление их дискоидной формы [1, 2], которая необходима для эффективной поставки кислорода в ткани при трансфузии [2]. Молекула альбумина – глобулярный белок с гидрофобными радикалами, который несет 15 отрицательных зарядов, что не исключает как гидрофобные, так и электростатические эффекты при воздействии данного белка на форму эритроцитов. Действие альбумина может опосредоваться белком полосы 3 (AE1) [3], который является интегральным белком мембран эритроцитов и формирует анионный канал [4]. Согласно гипотезе о контроле галидами локального потенциала в межфазной области AE1 и липидного бислоя, исключение хлорида из среды вызывает увеличение заряда данной области [5]. Возможно, изменение параметров среды инкубации приведет к изменению характера действия альбумина на форму эритроцитов, которое может послужить основой для выявления причин нарушения формомодификации клеток после криоконсервирования.

Цель работы – исследовать изменение формы криоконсервированных эритроцитов при воздействии альбумина в условиях изменения параметров инкубационной среды.

Материалы и методы. В работе использовали: сывороточный альбумин человека (Sigma, США); Трис, NaCl, Na2SO4, сахароза (хч); 1,2-пропандиол (1,2-ПД, Amsoil, Финляндия). В экспериментах использовали хлоридную (150ммоль/л NaCl) и сульфатную (110 ммоль/л Na2SO4) среды с включением 10 ммоль/л трис-буфера (pH 7,4 и pH 5,0). Эритроциты получали из донорской крови, как описано в [1].

Клетки в модифицированном по составу криоконсерванте, содержащем 1,2-ПД (22%), сахарозу (10%) и NaCl (0,3%) с целью упрощения метода криоконсервирования, погружали в жидкий азот (-196°С) и хранили в течение недели, с последующим оттаиванием (40°С) и отмыванием физраствором при 37°С [1]. Форму эритроцитов исследовали при регистрации изменений интенсивности флуктуации оптической плотности (ОП) клеточной суспензии (~$3{,}0\times10^6$ кл./мл) при перемешивании в кювете спектрофотометра (СФ, λ=720 нм). Дискоидные клетки рассеивают свет анизотропно и производят максимальную флуктуацию ОП, сферические клетки проявляют изотропное светорассеяние – флуктуация ОП не выявляется, поэтому интенсивность флуктуации ОП определяется соотношением дискоцитов и сфероцитов [6].

Результаты и обсуждение. В хлоридной среде (pH7,4) отмечается флуктуация ОП суспензии эритроцитов, интенсивность которой меньше для криоконсервированных клеток. Внесение альбумина вызывает усиление флуктуации ОП (Рис., треки 1,5), что характерно для формонормализующего действия альбумина и плазмы, при котором основная масса клеток становится дискоцитами (нормоцитами) [7]. Показано, что действие альбумина на форму эритроцитов опосредуется цитоплазматическим доменом AE1 и белками цитоскелета – б-п-4.1 и спектрином [8]. При этом связывание альбумина определяется гидрофобным взаимодействием с липидным бислоем эритроцитов при повышении электроотрицательности мембран (превышение ξ-потенциала в 3 раза) [9]. Поэтому, вероятно, действие данного белка определяется изменением динамики белков цитоскелета в направлении связей фосфолипиды→AE1→цитоскелет, хотя нельзя исключить изменения

электростатической структуры поверхности мембран, которое также может стабилизировать дискоидную форму эритроцитов как цитоскелет.

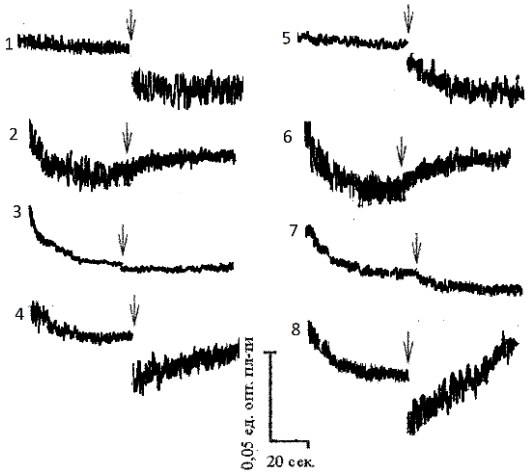


Рис. Влияние альбумина на интенсивность флуктуаций ОП суспензии интактных (1-4) и криоконсервированных (5-8) эритроцитов в средах, содержащих 150 ммоль/л NaCl (1,2,5,6) и 110 ммоль/л Na2SO4 (3,4,7,8) с включением 10 ммоль/л трис. 1,3,5,7 – pH 7,4; 2,4,6,8 – pH 5,0. ↓ – момент внесения альбумина (0,02%) в СФ-кювету.

Учитывая отрицательный заряд молекул альбумина при физиологическом значении pH ($pI_{альб.}$4.7) и его возможные электростатические эффекты, действие данного агента на форму эритроцитов тестировали при pH 5.0. Снижение pH внешней среды приводит к усилению флуктуации ОП, при этом интенсивность данного показателя для контрольных и криокосервированных эритроцитов становится одинаковой (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5). При снижении pH среды обычно отмечается развитие стоматоцитоза эритроцитов, которое в условиях перемешивания клеток приводит к повышению ОП [10], характерного для стоматоцитогенного агента хлорпромазина с устранением флуктуаций ОП [6]. При этом индекс формы стоматоцитов (~0,3) значительно ниже, чем у дискоцитов (~1,3) [10]. Поэтому полученные результаты, с учетом представленных данных литературы, указывают на ретрансформацию стоматоцитов в уплощенные формы, возможно в дискоциты (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5). Данная ретрансформация может определяться перемешиванием клеток и повышением поверхностного электрического потенциала мембран при

снижении pH среды. Действие альбумина устраняется и приобретает противоположную направленность (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5). Изменение эффекта альбумина при pH 5.0 может быть связано с нейтрализацией заряда данного белка и с повышением заряда мембраны. Исключение хлорида из среды может вызывать увеличение заряда в межфазной области AE1 и липидного бислоя [5], в связи с этим были произведены следующие эксперименты.

В сульфатной среде (pH7,4) отмечается снижение ОП суспензии эритроцитов в течение ~20 сек. Для суспензии интактных клеток флуктуация ОП не выявляется с проявлением незначительного уровня данного показателя для криоконсервированных клеток, в том и другом случае не отмечается эффекта альбумина, характерного для хлоридной среды (Рис., треки 3,7 по ср. с 1,5). В данной среде с кислым значением pH отмечается флуктуация ОП и проявляется подобие формонормализующего действия альбумина – усиление флуктуации ОП со снижением ОП, которая сразу повышается, что особенно выражено для криоконсервированных клеток (Рис., треки 4,8 по ср. с 1,5).

Белок AE1 у входа в анионный канал формирует гидратированную полость с положительно заряженными остатками аминокислот, которые связывают анионы Cl^- и отрицательными остатками, контролирующими активность анионов во входящей полости [4]. Можно предположить, что ассоциация-диссоциация Cl^- и Cl^-_{in}/Cl^-_{out} -самообмен, а также колебательные смещения отрицательных остатков приводят к динамическому экранированию положительных зарядов у входа в канал. Вероятно, данное экранирование вносит вклад в формирование электростатической (ЭС) структуры участков мембран, прилегающих к AE1, которые могут включаться в установление ЭС структуры поверхности мембран, характерной для нормальной дискоидной формы эритроцитов.

При кислом значении pH среды повышение поверхностного электрического потенциала клеточных мембран может приводить к модификации обсуждаемого экранирования положительных зарядов. Данная

модификация, возможно, вносит вклад в эффект перемешивания клеток на усиление флуктуаций ОП, который связан с ретрансформацией эритроцитов в дискоидные формы (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5). В сульфатной среде при pH 7,4 устранение действия альбумина (Рис., трек 3,7 по ср. с 1,5) указывает на то, что для эффекта альбумина его заряда недостаточно, а необходима хлоридная среда. Очевидно, что замена анионов Cl^- на SO_4^{2-} вызывает модификацию характера экранирования положительных зарядов во входящей полости анионного канала и модификацию ЭС структуры поверхности мембран. При кислом значении pH сульфатной среды и нейтрализации заряда молекул альбумина, его формомодифицирующее неустойчивое действие (Рис., треки 4,8 по ср. с 1,5), вероятно, определяется гидрофобным связыванием с липидным бислоем. Полученные результаты, во-первых, указывает на нарушенную способность криоконсервированных клеток поддерживать свою дискоидную форму при действии альбумина. Во-вторых, формонормализующее действие альбумина, с учетом данных литературы, определяется гидрофобным взаимодействием с параллельным электростатическим эффектом, который способствует установлению и стабилизации ЭС структуры поверхности мембран, характерной для дискоцитов. Можно предположить, что стабилизация дискоидной формы эритроцитов в физиологических изменяющихся условиях кровотока и уменьшении примембранной активности хлорида определяться связыванием альбумина в межфазной области белка AE1 и липидного бислоя мембраны.

Выводы.

1. Установлено, что при кислом значении pH физраствора воздействие условий перемешивания на интактные и криоконсервированные эритроциты приводит к уплощению клеток, что, возможно, связано с ретрансформацией стоматоцитов в дискоциты.

2. Показано, что в сульфатной среде отмечается слабая интенсивность флуктуаций ОП суспензии интактных и криоконсервированных эритроцитов. В том и другом случае не выявляется формонормализующее действие альбумина

по сравнению с физраствором, вероятно, из-за изменения электростатической структуры клеточной поверхности в указанной среде.

3. Выявлено заторможенное формонормализующее действие альбумина на криоконсервированные эритроциты при физиологических условиях среды, а также более неустойчивый эффект альбумина в сульфатной среде при pH 5,0 по сравнению с интактными клетками. Указанные изменения, вероятно, определяются повреждениями клеточных мембран и нарушением их электростатического баланса в ходе замораживания-оттаивания-отмывания клеток. Поэтому необходима доработка использованного в работе способа криоконсервирования, которая может обеспечить предупреждение структурных повреждений клеточных мембран в ходе замораживания эритроцитов.

4. Формонормализующее действие альбумина на эритроциты в физрастворе (pH 7,4), с учетом данных литературы, определяется модификацией взаимодействия белков цитоскелета по направлению связей: липидный бислой→AE1→цитоскелет. В сульфатной среде при кислом значении pH (5,0) неустойчивое формомодифицирующее действие связано с исключением электростатического эффекта альбумина ($pI_{альб}$.4.8), который необходим в установлении и стабилизации электростатической структуры мембран, характерной для дискоидной формы эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Рамазанов В.В, Воловельская Е.Л., Нипот Е.Е. 2018. Свойства эритроцитов, отмытых после быстрого замораживания-оттаивания в среде с сахарозой и 1,2-пропандиолом. Актуальні проблеми сучасної медицини. V. 18. № 1. С.188.

2. Reinhart W.H., Piety N.Z., Deuel J.W. 2015. Washing stored red blood cells in an albumin solution improves their morphologic and hemorheologic properties. Transfusion. V. 55. № 8. P. 1872. doi: 10.1111/trf.13052.

3. Mehta N.G. 1983. Role of membrane integral proteins in the modulation of red cell shape by albumin, dinitrophenol and the glass effect. Biochim Biophys

Acta. V. 762. № 1. P. 9. doi: 10.1016/0167-4889(83)90110-6.

4. Zhekova H.R., Pushkin A., Kayık G. 2021. Identification of multiple substrate binding sites in SLC4 transporters in the outward-facing conformation: Insights into the transport mechanism. J Biol Chem. V. 296. 100724. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100724.

5. Wieth J.O., Bjerrum P.J. 1982. Titration of transport and modifier sites in the red cell anion transport system. J Gen Physiol. V. 79. № 2. P. 253. doi: 10.1085/jgp.79.2.253

6. Rudenko S.V., Crowe J.H., Tablin F. 1998. Determination of time-dependent shape changes in red blood cells. Biochemistry (Mosc). V. 63. № 12. P. 1385.

7. Hoffman JF. 1987. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells. Blood Cells. V. 12. № 3. P. 565.

8. Pestonjamasp K.N., Mehta N.G. 1995. Effect of antibodies to membrane skeletal proteins on the shape of erythrocytes and their ability to respond to shape-modulating agents. Important role of 4.1 protein in the determination/maintenance of the discoid shape of erythrocytes. Exp Cell Res. V. 219. № 1. P. 74. doi: 10.1006/excr.1995.1206.

9. Wall J., Ayoub F., O'Shea P. 1995. Interactions of macromolecules with the mammalian cell surface. J Cell Sci. V. 108. Pt 7. P. 2673.

10. Rudenko S.V. 2010. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. Biochim Biophys Acta. V. 1798. № 9. P. 1767. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.05.010.