SCIENCE, INNOVATIONS AND EDUCATION: PROBLEMS AND PROSPECTS

Proceedings of VI International Scientific and Practical Conference

Tokyo, Japan

13-15 January 2022

Tokyo, Japan

2022

UDC 001.1

The 6th International scientific and practical conference "Science, innovations and education: problems and prospects" (January 13-15, 2022) CPN Publishing Group, Tokyo, Japan. 2022. 705 p.

ISBN 978-4-9783419-3-8

The recommended citation for this publication is:
Ivanov I. Analysis of the phaunistic composition of Ukraine Science, innovations and education: problems and prospects. Proceedings of the 6th International scientific and practical conference. CPN Publishing Group. Tokyo, Japan. 2022. Pp. 21-27. URL: https://sci-conf.com.ua/vi-mezhdunarodnaya-nauchno-prakticheskaya-konferentsiya-science-innovations-and-education-problems-and-prospects-13-15-yanvarya-2022-goda-tokio-yaponiya-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: tokyo@sci-conf.com.ua

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

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

УДК 57.043: 612.111: 576.31

ФОРМОМОДИФИКАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ СТИЛЬБЕН-ДИСУЛЬФОНАТОМ

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
г. Харьков, Украины

Аннотация. Методом СФ-формометрии при перемешивании суспензии эритроцитов в СФ-кювете показано, что включение в суспензию ингибитора анионного канала DIDS вызывает устранение флуктуаций ОП с одновременным повышением ОП, что, вероятно, связано с образованием сферических форм клеток. При кислом значении pH среды (5,0) отмечается ретрансформация эритроцитов в дискоидные клетки, возможно, в дискоциты (нормациты). В суспензии интактных и криоконсервированных эритроцитов в сульфатной среде при кислом значении pH выявляется формомодификация DIDS на клетки, подобная формонормализующему действию альбумина. Данное действие, возможно, связано с модификацией электростатической (ЭС) структуры участков мембран, прилегающих к AE1 и установлением ЭС структуры, характерной для дискоидной формы эритроцитов в физиологических условиях среды. В сумме, полученные результаты указывают на то, что эритроциты, в потоке при перемешивании клеточной суспензии, выявляют характерный механизм формомодификации, свойственный им в физиологических условиях кровотока.

Ключевые слова. Эритроциты, криоконсервирование, форма клетки, DIDS, сульфат.

Введение. Один из представителей стильбен-дисульфонатов DIDS является ингибитором анионного канала и переносчика, сформированных основным интегральным белком мембран эритроцитов – белком полосы 3 (AE1) [1, с. 1507]. Кроме того, молекула данного реагента несет два отрицательных заряда и может произвести электростатический эффект при встраивании во входящую полость канала, которая включает положительные остатки аминокислот [2, с. 1]. При титровании суспензии эритроцитов к кислому значению pH (5,6) наступает стоматоцитоз клеток, который обратим при востановление pH до 7,4 [3, с. 274]. Обычно DIDS производит эхиноцитогенное действие, в то же время, при pH-титровании DIDS-меченых эхиноцитарных эритроцитов в цикле pH 7,4 ↔ 5,6 на 5-м этапе цикла титрования к pH 5,6 клетки в основном становятся дискоцитами [3, с. 274]. Это указывает на то, что DIDS преобразует стоматоцитогенный эффект кислого значения pH среды на формонормализующее действие. Возможно, изменение pH и анионного состава среды приведет к модификации характера действия DIDS на форму эритроцитов, которое может послужить основой для выявления причин нарушения формомодификации клеток после криоконсервирования.

Цель работы – исследовать изменение формы интактных и криоконсервированных эритроцитов при воздействии стильбен-дисульфоната в условиях изменения параметров инкубационной среды и перемешивания клеточной суспензии.

Материалы и методы. В работе использовали: 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS, Sigma, США); Трис, NaCl, Na2SO4, сахароза (хч); 1,2-пропандиол (1,2-ПД, Amsoil, Финляндия). В экспериментах использовали хлоридную (150 ммоль/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 [4, с. 188]. 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°C) и хранили в течение недели, с последующим

оттаиванием (40°С) и отмыванием физраствором при 37°С [4, с. 188]. Форму эритроцитов исследовали при регистрации изменений интенсивности флуктуаций оптической плотности (ОП) перемешиваемой клеточной суспензии (~$3{,}0\times10^6$ кл./мл) в кювете спектрофотометра (СФ, λ=720 нм). Дискоидные клетки рассеивает свет анизотропно и производят максимальную флуктуацию ОП, сферические клетки проявляют изотропное светорассеяние – флуктуаций ОП не выявляется, поэтому интенсивность флуктуации ОП определяется соотношением дискоцитов и сфероцитов [5, с. 1385].

Результаты и обсуждение. В хлоридной среде (pH 7,4) отмечается флуктуация ОП суспензии эритроцитов, интенсивность которой меньше для криоконсервированных клеток. Внесение DIDS в суспензию эритроцитов вызывает устранение флуктуаций ОП с одновременным повышением ОП (Рис., треки 1,5), что характерно при действии сфероцитирующих агентов [6, с. 565]. Есть данные, что DIDS при концентрации 7,5 мкмоль/л вызывал развитие эхиноцитоза, которое являлось обратимым после отмывания эритроцитов от агента на 60-й сек воздействия. Отмечалась зависимая от концентрации DIDS стимуляция деформируемости эритроцитов при развитии эхиноцитоза. Авторы работы сделали заключение о том, что DIDS при взаимодействии с AE1 вызывает модификации в цитоскелете, которые приводят к изменениям морфологии и деформируемости клеток [7, с. 91]. Поскольку DIDS не проникает в клетки, то, возможно, его эффект определяется изменением динамики белков цитоскелета в направлении связей: AE1→анкирин→цитоскелет→липидный бислой мембраны. В тоже время, DIDS в концентрации 2,0 мкмоль/л в течение 1-2 сек после воздействия на эритроциты вызывал незначительное увеличение площади поверхности (6-8%) с востановлением на 10-й сек и не приводил к развитию эхиноцитоза [7, с. 91]. Вероятно, полученное в нашей работе формомодифицирующее действие DIDS при концентрации 2 мкмоль/л в 1-е секунды (Рис., треки 1,5) происходит вследствие обратимого связывания агента в канале AE1 и не связано с образованием эхиноцитов, но связано с образованием сферических форм

клеток. В таком случае, эффект DIDS может инициироваться в направлении связей: AE1→липидный бислой мембраны, исключая при этом ведущую роль цитоскелета.

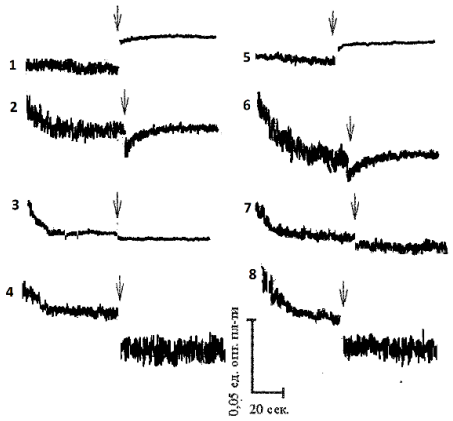


Рис. Влияние DIDS на интенсивность ФОП суспензии интактных (1-4) и криоконсервированных (5-8) эритроцитов в средах, содержащих 150 ммоль/л NaCl (1,2,5,6) и 110 ммоль/л Na2SO4 (3,4,7,8) с включением 10 ммоль/л трис: 1,3,5,7 – pH 7,4; 2,4,6,8 – pH 5,0. ↓ – момент внесения DIDS (2 мкмоль/л) в СФ-кювету.

В среде с кислым значением pH отмечается усиление флуктуаций ОП, при этом эффект DIDS модифицируется и ослабляется по сравнению с его действием при нормальном значении pH (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5). При снижении pH среды обычно отмечается развитие стоматоцитоза эритроцитов [3, с. 247], которое в условиях перемешивания клеток приводит к повышению ОП [8, с. 1767], характерного для стоматоцитогенного агента хлорпромазина с одновременным устранением флуктуаций ОП [5, с. 1385]. При этом индекс формы стоматоцитов (~0,3) значительно ниже, чем у дискоцитов (~1,3) [8, с. 1767]. Полученные результаты усиления интенсивности флуктуаций ОП (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5), с учетом представленных данных литературы, указывают на возможную ретрансформацию стоматоцитов в дискоциты, которая вызвана перемешиванием клеток. В данном случае нельзя исключить вклад повышения поверхностного электрического потенциала мембран при снижении pH среды. В связи с этим были проведены следующие эксперименты.

Исключение хлорида из среды может вызвать увеличение заряда в

межфазной области AE1 и липидного бислоя мембраны [9, с. 253]. В сульфатной среде (pH 7,4) отмечается снижение ОП в течение ~20 сек, при этом флуктуаций ОП для интактных клеток не выявляется, а для криоконсервированных клеток отмечается невысокая интенсивность данного показателя. В том и другом случае не проявляется эффект DIDS, характерный для хлоридной среды (Рис., треки 3,7 по ср. с 1,5). В сульфатной среде с кислым значением pH отмечается флуктуация ОП и преобразование формомодифицирующего действия DIDS на противоположный эффект – выраженное усиление флуктуаций ОП с одновременным снижением ОП (Рис., треки 4,8 по ср. с 1,5). Данный эффект подобен формонормализующему действию альбумина и плазмы, при котором основная масса клеток становится дискоцитами (нормоцитами) [6].

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 [2, с. 1]. Можно предположить, что ассоциация-диссоциация анионов на зарядах 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 блокировании Cl^-_{in}/Cl^-_{out} - самообмена DIDS, молекула которой имеет две сульфонатные группы, может происходить нарушение указанного экранирования и модификация заряда участков, прилегающих к AE1. Вероятно, данный ЭС эффект DIDS определяет его формомодифицирующее действие (Рис., треки 1,5). С другой стороны, при кислом значении pH среды повышение поверхностного электрического потенциала мембраны может также приводить к нарушению обсуждаемого экранирования и к модификации заряда указанных участков. Данная

модификация может вносить вклад в усиление флуктуаций ОП, связанной с уплощением клеток и возможной ретрансформацией стоматоцитов в дискоциты, которые инициируются перемешиванием клеток (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5). Кроме того, кислое значение pH среды вызывает изменение эффекта DIDS (Рис., треки 2,6 по ср. с 1,5), которое, вероятно, связано с модификацией ЭС структуры мембран в данных условиях. Наконец в сульфатной среде при pH 7,4 отмечается полное устранение формомодифицирующего действия DIDS (Рис., треки 3,7 по ср. с 1,5), а при pH 5,0 – преобразование на противоположное действие (Рис., треки 4,8 по ср. с 1,5), подобное формонормализующему действию альбумина и плазмы [6, с. 565]. В сульфатной среде с двухзарядными SO_4^{2-} – анионами при кислом значении pH нарушение обсуждаемого экранирования положительных зарядов во входящей полости канала может являться основой для преобразования эффекта DIDS (Рис., треки 4,8 по ср. с 1,5). Возможно, при включении DIDS во входящую полость канала и блокировании Cl^-_i/SO_4^{2-} - обмена модифицированная ЭС структура участков, прилегающих к AE1, изменяется таким образом, что становится подобной ЭС структуре, характерной для дискоидной формы эритроцитов в физиологических условиях среды.

Выводы.

1. Выявлено характерное формомодифицирующее действие DIDS в условиях перемешивания клеточной суспензии в физрастворе (pH 7,4) – устранение флуктуаций ОП с одновременным повышением ОП, что определяется образованием сферических форм эритроцитов. Данное действие менее выражено для криоконсервированных эритроцитов, что, вероятно, связано с нарушением электростатического баланса клеточных мембран в ходе замораживания-оттаивания эритроцитов.

2. Установлено, что при перемешивании эритроцитарной суспензии в физрастворе при кислом значении pH (pH 5,0), отмечается уплощение клеток и, возможно, ретрансформация их в дискоциты, что также характерно для криоконсервированных эритроцитов.

3. Показано устранение формомодифицирующего действия DIDS в сульфатной среде для интактных и криоконсервированных эритроцитов которое, вероятно, связано с изменением электростатической структуры клеточной поверхности в данной среде.

4. Формомодифицирующий эффект DIDS на эритроциты при физиологических условиях среды с образованием сферических форм клеток, возможно, определяется изменением электростатической структуры участков, прилегающих к AE1, и модификацией взаимодействия AE1 с липидным бислоем мембраны, исключая ведущую роль цитоскелета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reithmeier R.A., Casey J.R., Kalli A.C., Sansom M.S., Alguel Y., Iwata S. 2016. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. Biochim Biophys Acta. V. 1858. (7 Pt A). P. 1507. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.03.030.

2. Zhekova H.R., Pushkin A., Kayık G., Kao L., Azimov R., Abuladze N., Kurtz D. 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 (Published online). doi: 10.1016/j.jbc.2021.100724.

3. Gimsa J, C Ried 1995. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? Mol Membr Biol. V. 12. № 3. P. 247. doi: 10.3109/09687689509072424.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. Hoefner D.M., Blank M.E., Davis B.M., Diedrich D.F. 1994. Band 3 antagonists, p-azidobenzylphlorizin and DIDS, mediate erythrocyte shape and flexibility changes as characterized by digital image morphometry and microfiltration. J Membr Biol. V. 141. № 1. P. 91. doi: 10.1007/BF00232877.

8. 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.

9. 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