SCIENCE, INNOVATIONS AND EDUCATION: PROBLEMS AND PROSPECTS

Proceedings of XIV International Scientific and Practical Conference

Tokyo, Japan

25-27 August 2022

Tokyo, Japan

2022

UDC 001.1

The 14th International scientific and practical conference "Science, innovations and education: problems and prospects" (August 25-27, 2022) CPN Publishing Group, Tokyo, Japan. 2022. 487 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 14th International scientific and practical conference. CPN Publishing Group. Tokyo, Japan. 2022. Pp. 21-27. URL: https://sci-conf.com.ua/xiv-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-science-innovations-and-education-problems-and-prospects-25-27-08-2022-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

BIOLOGICAL SCIENCES

УДК 57.043: 612.111: 576.31

ИНДУЦИРОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФОРМЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ В СУЛЬФАТНОЙ СРЕДЕ

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

Аннотация: Статья посвещена разработке состава среды для стимуляции антиоксидантного потенциала эритроцитов перед криоконсервированием. Показано, что добавление ингибитора анионного канала DIDS в сульфатную среду перед внесением эритроцитов вызывает обратимую ретрансформацию клеток в направлении сферы→диски→сферы, которая проявляется в заторможенном состоянии для криоконсервированных эритроцитов. Предобработка эритроцитов в среде, содержащей субстраты для синтеза глутатиона перед замораживанием, приводит к частичному восстановлению DIDS-индуцированной ретрансформации криоконсервированных клеток. Полученные результаты указывают на возможность разработки среды инкубации, которая обеспечит стимуляцию антиоксидантного потенциала эритроцитов перед криоконсервированием. Это может способствовать сохранению деформационной эластичности клеток и механизма регуляции формы эритроцитов после криоконсервирования. Данная процедура, возможно, приведет к ограничению повреждающего действия нитроксидативного стресса на эритроциты при трансфузии, что обеспечит уменьшение степени гемолиза

клеток и предупредит развитие посттрансфузионного воспаления.

Ключевые слова: эритроциты, криоконсервирование, сульфат, ингибитор анионного канала DIDS, форма клеток.

Ранее мы установили, что в сульфатной среде ингибитор анионного канала DIDS инициирует обратимую ретрансформацию сферических эритроцитов в дискоидные формы. Данная ретрансформация, возможно, связана с модификацией локальной электростатической (ЭС) структуры участков мембран, прилегающих к каналу. Кроме того, ретрансформация эритроцитов заторможена при повышенной концентрации DIDS и подобным образом заторможена для криоконсервированных клеток. Мы предположили, что связывание заряженных молекул DIDS вне канала с другими сайтами мембраны при повышенной концентрации DIDS, а также процесс криоконсервирования вызывают нарушение ЭС структуры поверхности мембран, которое, в свою очередь, является причиной ингибирования ретрансформации эритроцитов [1, с. 50].

Массивная или частая трансфузия эритроцитов приводит к росту концентрации провоспалительных цитокинов в крови и вызывает развитие посттрансфузионного воспаления и сосудистых осложнений, связанных с нарушением микроциркуляции, тканевой перфузии и оксигенации тканей [2,с.27; 3, с. 284; 4, с. 2365]. Данные негативные последствия определяются повреждениями эритроцитов при гипотермическом хранении (ГТХ) вследствие понижения концентрации основных маркеров метаболизма (АТФ, 2,3-ДФГ, глутатион) и окислительной модификации мембранных белков и липидов, что приводит к нарушению морфологии и реологии эритроцитов с сопутствующим накоплением мембранных микровезикул [2, с. 27]. При трансфузии ГТХ-эритроцитов микровезикулы поглощают NO, что также стимулирует развитие воспаления и тромбоза. Экспозиция фосфатидилсерина (ФС) на внешней поверхности мембран эритроцитов при ГТХ является одной из причин адгезии эритроцитов к эндотелию, что вносит основной вклад в нарушение

микроциркуляции [2, с. 27]. Криоконсервирование эритроцитов обеспечивает сохранение маркеров метаболизма, активности NO-синтазы, степени фосфорилирования и уровня нитрования белков [5, с. 157; 6, с. 59], что указывает на сохранение метаболической функция эритроцитов. Необходимо отметить, что криоконсервирование эритроцитов в среде с глицерином не вызывает микровезикуляции мембран и изменения уровня экспозиции ФС [7,с.1658]. Вместе с тем, концентрация К+ в клетках снижается, Na+ увеличивается, клеточный объем эритроцитов повышается, отмечается рост осмотической хрупкости и нарушение деформируемости [6, с. 59], что также характерно для ГТХ-эритроцитов [2, с. 27]. Вероятно, повышение осмотической хрупкости, изменение формы и деформируемости клеток при ГТХ и криоконсервировании являются одними из основных причин высокой степени посттрансфузионного повреждения и гемолиза эритроцитов (~25% за сутки) [4,с. 2365].

Вышеописанные изменения при криоконсервировании эритроцитов указывают на повреждение клеточных мембран и нарушение их барьерной функции для катионов. При хранении эритроцитов показано, что включение в среду субстратов синтеза глутатиона (глутамин, глицин и N-ацетил-цистеин) способствует увеличению в клетках концентрации глутатиона, уменьшению степени окисления гемоглобина и снижению потерь мембранных белков (белки полос: 3, 4.1, 4.2; глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; антиген Duffy), это связано с предотвращением везикуляции мембран [8, с. 867]. Вместе с тем, включение в среду одного N-ацетил-цистеина может оказаться достаточным для улучшения деформируемости и предупреждения микровезикуляции клеточных мембран, как это показано для эритроцитов из крови больных серповидно-клеточной анемией [9, с. 551441]. Представленные данные указывают на возможность разработки среды прединкубации эритроцитов перед замораживанием, которая, возможно, повысит устойчивость клеточных мембран к повреждающим факторам криоконсервирования и предупредит значительное нарушение гидрофобного и ЭС баланса мембран. Это может в

определенной степени способствовать сохранению деформационной эластичности эритроцитов и механизма регуляции клеточной формы после криоконсервирования.

Цель работы – исследовать влияние стимуляции синтеза глутатиона в эритроцитах на DIDS-индуцированное изменение формы криоконсервированных клеток в сульфатной среде.

Материалы и методы. В работе использовали ингибитор анионного канала и модификатор формы эритроцитов 4,4'-Diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonate (DIDS, Sigma, США). Использованные реактивы для приготовления сред и растворов квалифицировались как хч и чда. Капиллярную кровь получали от добровольцев (сотрудников института) техникой взятия крови из безымянного пальца непосредственно в стакан с физраствором, с последующим осаждением и отмыванием эритроцитов физраствором (430g, 5 мин). Эритроциты из донорской крови (2-3 суток хранения при 4°C) осаждали и отмывали средой, содержащей 0,9% NaCl и 0,1% глюкозу (среда отмывания). Отмытые эритроциты взвешивали в среде отмывания, содержащей (2,5 ммоль/л): аденина, N-ацетилцистеина, глицина, глутамина, а также 10 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7.4) (гематокрит 17-18%) и инкубировали при 37°C, 60 мин, с последующим осаждением. Полученный осадок комбинировали со средой (1:1), содержащей глицерин (38%), сорбитол (2,9%) и NaCl (0,63%), и криоконсервировали при погружении в жидкий азот (-196°C). Замороженные образцы клеток (1 мл) отогревали при 40°C, 2 мин с последующим отмыванием клеток растворами 6% NaCl и 0,9% NaCl+0,1% глюкоза по методу, описанному в [5, с. 157]. Изменение формы эритроцитов исследовали при регистрации интенсивности флуктуации оптической плотности (ОП, λ=720 нм) перемешиваемой клеточной суспензии (~$3{,}0\times10^6$ кл./мл) в кювете спектрофотометра (СФ) при температуре 20-22°C. Дискоидные клетки рассеивают свет анизотропно и производят максимальную флуктуацию ОП, сферические клетки проявляют изотропное светорассеяние – флуктуаций ОП не выявляется. Поэтому интенсивность флуктуаций ОП определяется

соотношением дискоидных и сферических форм клеток [10, с. 1385].

Результаты и обсуждение. При внесении эритроцитов в сульфатную среду отмечается снижение ОП клеточной суспензии в течение ~20 сек и далее отмечается устойчивый уровень ОП на протяжение ~5 мин, что указывает на образование сферических форм клеток (Рис., трек 1). В тоже время, включение в среду DIDS перед внесением эритроцитов вызывает обратимую ретрансформацию клеток от сфер до дискоидов и обратно – снижение ОП с параллельным ростом интенсивности флуктуации ОП в течение ~2,5 мин, с последующим ростом ОП и параллельным ослаблением флуктуации ОП к ~5-й мин (Рис., трек 2). При внесении криоконсервированных эритроцитов в сульфатную среду динамика записи ОП незначительно отличается от таковой для интактных клеток (Рис., трек 3). В присутствии DIDS в среде отмечается развитие флуктуации ОП только к ~5 мин (Рис., трек 4), подобное по интенсивности развития для интактных клеток к ~2,5 мин (Рис., трек 2). Очевидно, криоконсервирование эритроцитов приводит к торможению ретрансформации клеток. Как было отмечено ранее, ингибирование ретрансформации криоконсервированных эритроцитов может быть связано с нарушением ЭС структуры поверхности мембран [1, с. 50]. Есть данные, что при криоконсервировании эритроцитов в среде с глицерином или 1,2-пропандиолом отмечается снижение поверхностного электрического потенциала из-за нарушения ЭС структуры клеточных мембран [11, с. 221]. Инкубация эритроцитов перед криоконсервированием в среде с субстратами синтеза глутатиона приводит к незначительному повышению сохранности клеток после оттаивания и деглицеролизации от 83±2% до 85±1,5%. Тем не менее, данная стимуляция синтеза глутатиона способствует некоторому ускорению ретрансформации, трек которой становится несколько подобным треку для интактных эритроцитов, но востановление не является выраженным (Рис., трек 6 в сравнении с треком 2). То есть, данная среда прединкубации эритроцитов перед криоконсервированием не обеспечивает выраженного повышения сохранности эритроцитов после отмывания клеток от

криоконсерванта и полного восстановления DIDS-индуцированной ретрансформации.

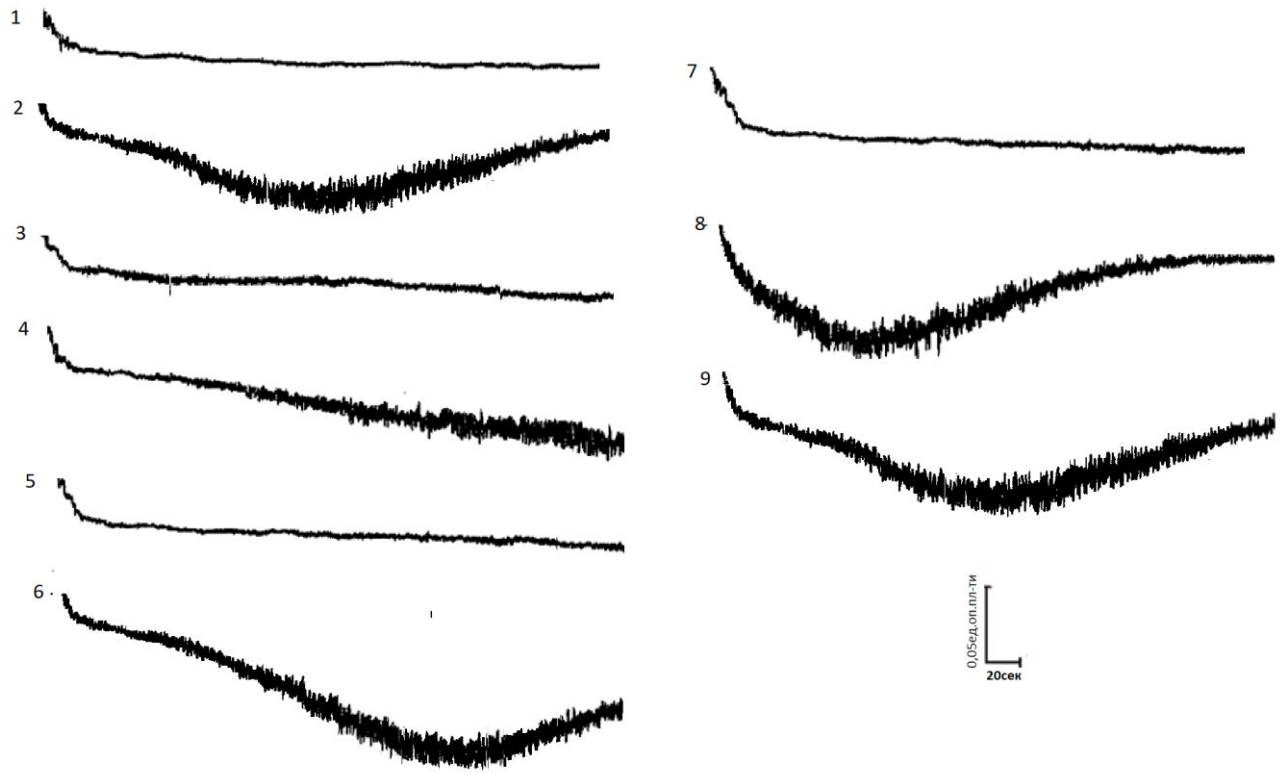


Рис. Изменение интенсивности флуктуаций ОП суспензии эритроцитов, полученных из донорской крови (1-6) и эритроцитов, полученных из капиллярной крови безымянного пальца добровольцев (7-9). Экспериментальная среда содержит 110 ммоль/л Na_2SO_4, 10 ммоль/л Трис-буфер (pH7,4). 3-6 – криоконсервированные клетки, 5,6 – клетки, обработанные перед криоконсервированием в среде отмывания с аденином и субстратами синтеза глутатиона (см. методы). 2,4,6,8,9 – в среду перед внесением клеток добавлен DIDS (2 мкмоль/л). 1,3, 5,7 – контроль.

Это, возможно, связано с тем, что осмотический стресс внутренней поверхности клеточных мембран, создаваемый высокой концентрацией глицерина при оттаивании, является основным фактором, который определяет уровень сохранности эритроцитов и не зависит от процедуры упрочнения клеточных мембран. Поэтому коррекция состава криоконсерванта при снижении концентрации глицерина и повышении концентрации сорбитола, как непроникающего криозащитного компонента, остается актуальной. Свежие

эритроциты, полученные из капиллярной крови безымянного пальца добровольцев и отмытые физраствором, производили DIDS-индуцированную ретрансформацию, хотя выявлялось различие в поведении кривых изменения формы эритроцитов. В экспериментах были использованы эритроциты от 12 добровольцев, но только в 4-х случаях отмечалась ускоренная ретрансформация (Рис., трек 8), тогда как в 8-ми случаях ретрансформация была сравнительно затянутой (Рис., трек 9).

Как было отмечено выше, включение в среду при ГТХ эритроцитов субстратов для стимуляции синтеза глутатиона обеспечивает снижение потерь мембранных белков, включая антиген Duffy и, соответственно, предупреждение везикуляции мембран эритроцитов при ГТХ [8, с. 867]. Показано, что при эндотоксимии эритроциты связывают хемокины IL-8 и RANTES, взаимодействующие in vivo с антигеном Duffy, который также формирует рецептор для малярийного плазмодия. Авторы работы сделали заключение, что эритроциты связывают хемокины, ограничивая их эффективную концентрацию в плазме и способствуют их выведению из организма [12, с. 1]. Сопутствующая потеря глутатиона, белков и антигенов в эритроцитах, подвергшихся окислительному стрессу, может поставить под угрозу функцию утилизации не только активных радикалов кислорода и азота, но и провоспалительных цитокинов и хемокинов [13, с. 100644], а активация синтеза глутатиона может защитить указанные функции [8, с. 867]. Это имеет большое значение при трансфузии эритроцитов пациентам в критическом состоянии, после операций и травм, при сепсисе и других анемических состояниях, при которых развивается нитроксидативный стресс, системное воспаление и иммуносупрессия [13, с. 100644; 14, с. 804].

Интактные эритроциты из капиллярной крови добровольцев производят различную DIDS-индуцированную ретрансформацию (Рис., трек 8, 9), что, возможно, как-то связано с различием антиоксидантного потенциала эритроцитов разных индивидуумов по причине физиологической особенности каждого организма [15, с. 718]. Установлено, что показатели окислительного

повреждения эритроцитов при ГТХ снижались и были удовлетворительными, если до сдачи крови доноры принимали смесь антиоксидантов в течение 10 дней [16, с. 16]. Это, вероятно, связано с тем, что эритроциты в норме в сосудистом русле подвергаются нитроксидативному стрессу, который понижает их максимально возможный антиоксидантный потенциал [15, с. 718]. Поэтому полученные результаты совместно с данными литературы указывают на то, что различие DIDS-индуцированной ретрансформации эритроцитов от разных доноров может определяться различием их антиоксидантного потенциала.

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность разработки среды, при инкубации в которой эритроциты стимулируют синтез глутатиона и повышают свой антиоксидантный потенциал, который может обеспечить повышение прочности связи белков с клеточными мембранами. Использованная на данном этапе среда прединкубации эритроцитов перед замораживанием обеспечивает удовлетворительное восстановление DIDS-индуцированной ретрансформации криоконсервированных клеток. Вероятно, упрочнение связи белков с клеточной мембраной при стимуляции синтеза глутатиона приводит к предупреждению значительного нарушения электростатической структуры клеточной поверхности эритроцитов при криоконсервировании. Это в определенной степени способствует сохранению деформационной эластичности клеток, которая отражается и подтверждается индуцированной ретрансформацией клеток в сульфатной среде при действие заряженного реагента DIDS, что подчеркивает роль изменения электростатической структуры поверхности мембран в механизме регуляции формы эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Рамазанов В. В., Воловельська Є. Л., Руденко С. В. 2022. Форма-модифікація еритроцитів у сульфатному середовищі. The 11th International scientific and practical conference “Results of modern scientific research and

development” (16-18.01.22). Madrid, Spain. P. 50.

2. Yoshida T., Prudent M., D'alessandro A. 2019. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. Blood Transfus. V. 17, № 1. P. 27. doi:10.2450/2019.021718.

3. Bogner V., Keil L., Kanz K.G. 2009. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution and adverse clinical outcome in multiple injured patients. Eur J Med Res. V. 14. № 7. P. 284.

4. Spitalnik S.L. 2014. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, mmunity, and infection. Transfusion. V. 54. № 10. P. 2365. doi: 10.1111/trf.12848.

5. Lelkens C.C. 2003. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. Transfusion. V. 43. № 2. P. 157. doi: 10.1046/j.1537-2995.

6. Bizjak D.A., Jungen P., Bloch W., Grau M. 2018. Cryopreservation of red blood cells: Effect on rheologic properties and associated metabolic and nitric oxide related parameters. Cryobiology. V. 84. P. 59. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.08.001.

7. Holovati J.L., Wong K.A., Webster J.M. 2008. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. Transfusion. V. 48. P. 1658. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01735.x.

8. Dumaswala U. J., Zhuo L., Mahajan S., Nair P.N. 2001. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. Am J Cell Physiol. V. 280. № 4. P. 867. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C867.

9. Nader E., Romana M., Guillot N., Fort R., Stauffer E., Lemonne N., Garnier Y. 2020. Association Between Nitric Oxide, Oxidative Stress, Eryptosis, Red Blood Cell Microparticles, and Vascular Function in Sickle Cell Anemia. Front Immunol. V. 11. P. 551441. doi: 10.3389/fimmu.2020.551441. eCollection 2020.

10. 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.

11. Gordiyenko O.I., Anikieieva M.O., Rozanova S.L., Kovalenko S.Ye., Kovalenko I.F., Gordiyenko E.O. 2015. Development of a model to investigate red blood cell surface characteristics after cryopreservation. Cryo Letters. V. 36. № 3. P. 221.

12. Manten A. D., Pajkrt R.J., Winter Y.P., Jong J. 1997. Erythrocyte-bound interleukin-8 and RANTES in human endotoxemia. J. Endotoxin Research. V. 4. № 1. P. 1.

13. Karsten E., Herbert B.R. 2020. The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating immune cells. Blood Rev. V. 41. P. 100644. doi: 10.1016/j.blre.2019.100644.

14. Remy K.E., Hall M.W., Cholette J. 2018. Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation. Transfusion. V. 58. № 3. P. 804. doi: 10.1111/trf.14488.

15. Kuhn V., Diederich L., Keller T.C.S. 2017. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. Antioxid Redox Signal. V. 26. № 13. P. 718. doi: 10.1089/ars.2016.6954.

16. Racek J., Herynková R., Holecek V., Jerábek Z., Sláma V. 1997. Influence of antioxidants on the quality of stored blood. Vox Sang. V. 72. № 1. P. 16. doi: 10.1046/j.1423-0410.1997.00016.x.