SCIENTIFIC RESEARCH IN THE MODERN WORLD

Proceedings of III International Scientific and Practical Conference

Toronto, Canada

12-14 January 2023

Toronto, Canada

2023

UDC 001.1

The 3rd International scientific and practical conference "Scientific research in the modern world" (January 12-14, 2023) Perfect Publishing, Toronto, Canada. 2023. 796 p.

ISBN 978-1-4879-3795-9

The recommended citation for this publication is:
Ivanov I. Analysis of the phaunistic composition of Ukraine // Scientific research in the modern world. Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference. Perfect Publishing. Toronto, Canada. 2023. Pp. 21-27. URL: https://sci-conf.com.ua/iii-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-scientific-research-in-the-modern-world-12-14-01-2023-toronto-kanada-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 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: toronto@sci-conf.com.ua

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

©2023 Scientific Publishing Center "Sci-conf.com.ua" ®
©2023 Perfect Publishing ®
©2023 Authors of the articles

УДК 57.043: 612.111: 576.31

МОДИФІКАЦІЯ ФОРМИ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ЗАМІЩЕННІ У СЕРЕДОВИЩІ СУЛЬФАТУ НА ХЛОРИД І ДІЇ СТИЛЬБЕНДИСУЛЬФОНАТУ

Рамазанов Віктор Володимирович,
к.б.н., с.н.с.
Руденко Сергій Віталійович,
к.б.н., с.н.с.
Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини НАН України
м. Харків

Анотація. В роботі досліджували зміну форми інтактних та кріоконсервованих еритроцитів при заміщенні в середовищі сульфату на хлорид, а також модифікуючу дію стильбендісульфонату DIDS на форму клітин у цих умовах. Встановлено, що підвищення концентрації хлориду від 15 до 45 ммоль/л викликає ретрансформацію еритроцитів у дискоцити, форма яких підтримується при подальшому збільшенні хлориду до 105 ммоль/л для інтактних клітин. Для кріоконсервованих клітин, починаючи від 60 ммоль/л хлориду та вище, ступінь дискоїдних клітин різко знижується. Наявність 60-105 ммоль/л хлориду при максимальному рівні дискоїдних клітин відзначається розвиток сферогенного ефекту DIDS для інтактних, але не для кріоконсервованих еритроцитів. Отримані результати призводять до припущення, що пептидні сегменти аніонного каналу клітинних мембран включають хлорид-зв'язувальні сайти, які контактують з міжфазними ділянками каналу і заповнення яких хлоридом детермінує структуру зазначених ділянок, що відповідає дискоїдній формі клітин. Розвиток дискоїдності клітин при концентрації хлориду 15-45 ммоль/л визначається зв'язуванням аніонів із деякою частиною сайтів – сайти (а). Для стабілізації досягнутої дискоїдності необхідне зв'язування хлориду з додаткової частиною сайтів – сайти (б), при концентрації аніону в середовищі 60-105 ммоль/л, яке не проявляється для

кріоконсервованих еритроцитів при трансформації їх у сфери. Ймовірно, ця втрата здатності підтримувати дискоїдність у кріоконсервованих клітин визначається порушенням динаміки зв'язування хлориду з сайтами (б) через пошкодження структури ділянок мембран, які включають ці сайти, що спричиняє блокування механізму стабілізації дискоїдності еритроцитів. Для сферогенного ефекту DIDS необхідно заповнення хлоридом сайтів (а) і певний ступень заповнення сайтів (б), які характерні для фізрозчину. Ймовірно, DIDS при нейтралізації позитивніх зарядів у вхідній порожнині аніонного каналу викликає порушення вказаного рівноважного заповнення сайтів, що призводить до модифікації структури міжфазних ділянок каналу і сфероцитозу.

Ключові слова. еритроцити, кріоконсервування, сульфат, хлорид, стильбендісульфонат DIDS, форма клітин.

Раніше було показано, що внесення інгібітору аніонного каналу DIDS в суспензію еритроцитів здійснює усунення флуктуації ОП з паралельним підвищенням ОП, що характерно для трансформації дискоцитів у сферичні форми клітин (сферогенний ефект DIDS) [1, с. 67]. У сульфатному середовищі еритроцити стають сферами, при цьому жодного ефекту DIDS на форму не виявляється. Разом з тим при pH 5,0 сульфатного середовища еритроцити частково представлені дискоїдними формами, а дія DIDS справляє значний дискогенний ефект [1, с. 67], подібний до альбуміну у фізрозчині при pH 7,4 [2, с. 565]. При взаємодії в аніонному каналі DIDS нейтралізує позитивно заряджений амінокислотний залишок Lys539 і вносить у вхідну порожнину дві свої SO_3^- -групи, одна з яких нейтралізує Arg730, а друга, можливо, екранує Lys851 [3, с. 1507]. Тому DIDS може вважатися модифікатором зарядів вхідній порожнини аніонного каналу і, відповідно, модифікатором динаміки зв'язування аніонів з вказаними залишками амінокислот. Подані дані літератури, по-перше, вказують на те, що наявність хлориду в середовищі необхідна для підтримки дискоїдності клітин та сферогенного ефекту DIDS. По-друге, характер модифікуючої дії DIDS на форму еритроцитів

визначатиметься pH і складом середовища інкубації, при зміні яких може модифікуватися електростатична (ЕС) структура мембран. Аналіз інгібуючого впливу хлориду на транспорт сульфату в еритроцити показав можливість наявності 2-х типів хлорид адсорбуючих сайтів [4, с. 99], тоді як при інгібуванні транспорту хлориду сульфатом останній зв'язується тільки з одним типом сайтів [5, с. 87]. Дані сайти можуть бути сформовані аргеніновими та лізиновими залишками амінокислот як зовнішніх, так і трансмембранних пептидних сегментів аніонного каналу та локалізуватися як біля входу [3, с. 1507], так і в міжфазній зоні каналу [6, с. 253]. Представлені дані літератури призводять до постановки питань про роль аніон-адсорбуючих сайтів та хлориду у модифікації форми еритроцитів, стабілізації дискоїдної форми клітин та механізму сферогенного ефекту DIDS.

Мета роботи – дослідити зміну форми інтактних та кріоконсервованих еритроцитів при заміщенні в середовищі сульфату на хлорид, а також модифікуючу дію DIDS на форму клітин у цих умовах.

Матеріали та методи. В роботі використовували інгібітор аніонного каналу та модифікатор форми еритроцитів 4,4'-Diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonate (DIDS, Sigma, США). Використані реактиви для приготування середовищ та розчинів кваліфікувалися як «хч» та «чда». Еритроцити донорської крові осаджали шляхом центрифугування і відмивали середовищем, що містить 0,9% NaCl. Отриманий осад клітин комбінували з середовищем (1:1), що містить гліцерин (38%), сорбітол (2,9%) та NaCl (0,63%), і кріоконсервували при зануренні у рідкий азот (-196°С). Через 30 хв заморожені зразки еритроцитів (1 мл) відігрівали при 40°С протягом 2 хв з подальшим відмиванням клітин при комбінації 2-х розчинів, що містять 6% і 0,9% NaCl за методом, шо був описаний у [7, с. 157]. Зміну форми еритроцитів досліджували при реєстрації інтенсивності флуктуації оптичної щільності (ОЩ, λ=720 нм) клітинної суспензії, що перемішується (~3,0x10^6 кл./мл) у кюветі спектрофотометра (СФ) при температурі 20-22°С. Дискоїдні клітини розсіюють світло анізотропно і виробляють максимальну флуктуацію ОЩ, сферичні

клітини виявляють ізотропне світлорозсіювання – флуктуацій ОЩ не виявляється. Тому інтенсивність флуктуацій ОЩ визначається співвідношенням дискоїдних та сферичних форм клітин [8, с. 53].

Результати та обговорення.

При внесенні еритроцитів у сульфатне середовище в 1-і секунди відзначається ослаблення флуктуації ОЩ та зниження ОЩ, що відображає утворення сферичних форм клітин. При цьому включення DIDS до суспензії еритроцитів не викликає змін у поведінку трека ОЩ (Рис. а, трек 1). Заміщення в середовищі частини сульфату на хлорид (15 ммоль/л) викликає появу флуктуації ОЩ клітинної суспензії, а включення DIDS до суспензії призводить до деякого зниження ОЩ (Рис. а, трек 2). Подальше підвищення хлориду (30 ммоль/л) при заміщенні сульфату викликає посилення флуктуації ОЩ та відповідь на DIDS (Рис. а, трек 3). Зміна рівня ОЩ без зміни інтенсивності флуктуації ОЩ на дію DIDS (Рис. а, треки 2,3) може визначатися зміною розміру наноструктур поверхні мембран [9, с. 6585]. Наступне підвищення хлориду (до 45 ммоль/л) при заміщенні сульфату викликає приріст посилення флуктуації ОЩ, при цьому реакції на дію DIDS не спостерігається (Рис. а, трек 4). При подальшому підвищення Cl^- в умовах максимальної флуктуації ОЩ відзначається розвиток сферогенного ефекту DIDS (Рис. а, треки 5-8), який послаблюється при додатковому підвищенні Cl^- на фоні ослаблення флуктуації ОЩ (Рис. а, треки 9-11). Відсутність сферогенного ефекту DIDS у треках 2-4 та поступове посилення сферогенної дії DIDS від треку 5 до треку 8 вказує на те, що для ефекту DIDS потрібна присутність у середовищі певної концентрації хлориду та його зв'язування з певними сайтами в мембрані. Початок прояву ефекту DIDS відзначається при концентрації хлориду в середовищі не менше ніж 60 ммоль/л (Рис., трек 5). Можливо, деяке зниження ОЩ на початку треків 4-7 при зростанні концентрації хлориду відображає відновлення фізіологічної структури поверхні мембран, що сприяє посиленню ефекту DIDS. Ослаблення флуктуації ОЩ і, відповідно, зниження ступеня дискоїдних клітин при зменшенні концентрації двозарядного сульфату до нуля (Рис. а., треки 9-11)

вказує на те, що зниження електронегативності поверхні клітин викликає зниження ступеню дискоїдних клітин.

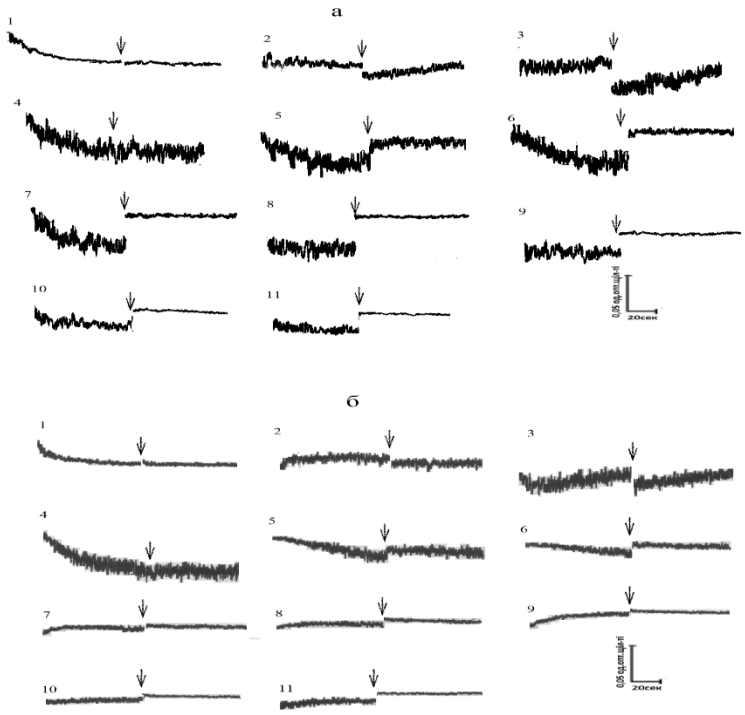


Рис. Зміна флуктуації ОЩ суспензії інтактних (а) та кріоконсервованих (б) еритроцитів у середовищах з буфером (10 ммоль/л Трис, pH 7,4) при різному співвідношенні Na_2SO_4/NaCl (ммоль/ммоль): 1 – 110/0; 2 – 99/15; 3 - 88/30; 4 – 77/45; 5 – 66/60; 6 – 55/75; 7 – 44/90; 8 – 33/105; 9 – 22/120; 10 - 11/135; 11 - 0/150. – момент внесення DIDS (2 мкмоль/л) у СФ-кювету.

Розщеплення негативних залишків сіалових кислот поверхні еритроцитів справляє стомацитогенний ефект, тому передбачається, що негативний заряд клітинної поверхні необхідний для підтримки дискоїдної форми [10, с. 198]. Для кріоконсервованих еритроцитів відзначається подібність до посилення флуктуації ОЩ та ефекту DIDS при початкових концентраціях хлориду (Рис. б., треки 2-4) як для інтактних клітин (Рис. а., треки 2-4). Разом з тим, наступне підвищення хлориду не підтримує досягнутий максимальний рівень флуктуації ОЩ треку 4, а навпаки послаблює його (Рис. б., треки 5-9).

При інгібуванні транспорту хлориду в еритроцити сульфатом відзначається лінійність залежності зворотної величини потоку хлориду від концентрації сульфату ($1/J_{Cl^-}$ від $[SO_4^{2-}]$), що показує наявність одного типу адсорбуючих сайтів для сульфату, ймовірно, біля входу каналу [5, с 87]. При

інгібуванні транспорту сульфату хлоридом виявляється відхилення від лінійності подібної залежності ($1/J_{SO42}$ від $[Cl^-]$) [4, с. 99]. Відхилення від лінійності аналогічних залежностей у ферментативній кінетиці в окремих випадках може визначатися зв'язуванням 2-х молекул інгібітору на молекулі ферменту [11, з. 178]. У будь-якому випадку включення фізіологічного аніону хлориду в сульфатне середовище призведе до витіснення сульфату з 1-го типу сайтів біля входу в канал та зв'язування хлориду з іншими типами сайтів. У сульфатному середовищі при заповненні сульфатом 1-го типу сайтів інтактні та кріоконсервовані еритроцити представлені сферичними формами (Рис. а,б треки 1). Підвищення концентрації хлориду від 15 до 45 ммоль/л викликає розвиток дискоїдності клітин (Рис. а,б треки 2-4), тому можна припустити, що включення механізму розвитку дискоїдності клітин визначається заповненням додаткових Cl-чутливих сайтів. Разом з тим, при подальшому підвищенні концентрації хлориду (60-105 ммоль/л) для інтактних еритроцитів включається механізм розвитку сферогенного ефекту DIDS (Рис. а, треки 5-8), який не проявляється для кріоконсервованих клітин (Рис. б, треки 5-8). Можна сказати, що у кріоконсервованих еритроцитах механізм підтримки дискоїдності та механізм розвитку сферогенного ефекту DIDS заблоковані (Рис. б, треки 5-8) порівняно з інтактними клітинами (Рис. а, треки 5-8)). Дані результати вказують на існування 2-го типу сайтів, частина з яких – сайти (а), які заповнюються хлоридом при концентрації аніону в середовищі 15-45 ммоль/л і включають механізм розвитку дискоїдності еритроцитів. Друга частина – сайти (б), які при заповненні хлоридом (у середовищі 60 -105 ммоль/л) забезпечують стабілізацію досягнутої дискоїдної форми клітин та розвиток сферогенного ефекту DIDS. Можливо, що при кріоконсервуванні еритроцитів відбувається порушення структури ділянок мембран, в яких локалізуються сайти (б), що призводить до порушення динаміки зв'язування хлориду та механізма стабілізації дискоїдності клітин, а також розвитку сферогенного ефекту DIDS.

Згідно з гіпотезою про контроль галідами локальних ЕС потенціалу (ψ_s) і pH (pH_s) у міжфазних ділянках аніонного каналу, зміна концентрації Cl- у

поверхні мембран викликає зміну ψ_s і pH_s [6, с. 253]. Зміна pH_s може викликати модифікацію ЕС заряду ліпідного бислою мембран і форму еритроцитів [12, с. 629]. Можливо, сайти (а) та (б) локалізуються в міжфазній ділянці каналу, зв'язування з якими хлориду визначає відхилення від лінійності залежності ($1/J_{SO42-}$) від [Cl-] при інгібуванні транспорту сульфату даним аніоном [4]. Дослідження ретрансформації еритроцитів у сахарозному середовищі у напрямку ехіноцити→дискоцити→стоматоцити при дії різних аніонів дозволило припустити існування у мембрані хлорид-чутливого сенсора, який запускає механізм зміни форми клітин [13, с. 1767]. Локалізована ініціація механізму зміни форми клітин може бути пов'язана із залишками амінокислот зовнішніх пептидних ділянок аніонного каналу, таких як R432, K551, K558, R646, R656, R782 [3]. Дані залишки можуть утворювати аніон-адсорбуючі сайти 1-го типу, з якими зв'язуються хлорид і сульфат, і які включаються до функціонування каналу. Моделювання динаміки білкових сегментів аніонного каналу у фосфатидилхоліновому біслої показало, що аргенінові залишки R646 і R656 зовнішнього N-глікозильованого сегменту утворюють часте динамічне контактування з фосфатними групами ліпідів [3, с. 1507]. Крім того, лізинові залишки K539, K542 та K851 трансмембранних сегментів утворюють подібне контактування [3, с. 1507], але також включаються у вхідну порожнину каналу і зв’язують хлорид [14, с. 1007], стильбендісульфонати і пиридоксаль-фосфат [3, с. 1507]. З цих даних випливає, що включення негативно заряджених молекул DIDS у порожнину каналу приведе до порушення контакту залишків лізину з фосфатними групами ліпідів та порушенню динаміки зв’язування хлориду. Не виключено, що R646, R656, K851, K539 і K542 утворюють специфічні зв'язки з міжфазною зоною каналу, а деякі з них, можливо, утворюють сайти (а) і (б), які можуть бути пусковими сенсорами структурних модифікацій і ретрансформацій еритроцитів. При зміні ступеню заповнення вказаних сайтів хлоридом, яка визначається конкуренцією даного аніону з фосфатними групами ліпідів, відбувається ініціація зміни форми еритроцитів.

Таким чином, отримані результати призводять до припущення, що

пептидні сегменти аніонного каналу мембран еритроцитів включають хлорид-зв'язувальні сайти, які контактують з міжфазною областю каналу, які можливо розділити на частину (а), що заповнюється при ~45 ммоль/л хлориду та частина (б), яка заповнюється при ~105 ммоль/л хлориду. Зміна ступеня заповнення даних сайтів хлоридом може бути пусковою реакцією для спрямованої модифікації форми еритроцитів. Для становлення дискоїдної форми еритроцитів необхідно в середовищі не менше ~45 ммоль/л хлориду, який асоціює з сайтом (а), тоді як дисоціація аніону включає тенденцію розвитку сфероцитозу клітин. Для повного прояву сферогенного ефекту DIDS потрібна присутність у середовищі хлориду в концентрації 90-105 ммоль/л, при якій еритроцити максимально представлені дискоїдними формами. У той же час, при 45 ммоль/л хлориду еритроцити також максимально представлені дискоїдною формою, хоча ефект DIDS не проявляється. Дані результати вказують на те, що для сферогенного ефекту DIDS необхідно заповнення хлоридом сайтів (а) та (б), яке, ймовірно, характерне для фізрозчину. DIDS через нейтралізацію позитивних зарядів у вхідній порожнині каналу, викликає порушення зазначеного рівноважного заповнення сайтів, що призводить до зміни структури міжфазних ділянок каналу і сфероцитозу клітин. Кріоконсервовані еритроцити, як і інтактні клітини, виявляють розвиток дискоїдності при підвищенні концентрації хлориду до ~45 ммоль/л, але не здатні підтримувати її при подальшому підвищення концентрації даного аніону. Це вказує на порушення динаміки зв'язування хлориду сайтом (б), внаслідок пошкодження структури ділянок мембран, які включають дані сайти, що призводить до блокування механізму стабілізації дискоїдності еритроцитів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.

1. Рамазанов В.В., Воловельская Е. Л., Руденко С.В. 2022. Формомодификация эритроцитов стильбен-дисульфонатом. The 6th International scientific and practical conference “Science,innovations and education: problems and prospects” (January 13-15, 2022) CPN Publishing Group, Tokyo, Japan. С. 67.

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

3. Reithmeier R.A., Casey J.R., Kalli A.C., et al. 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.

4. Schnell K.F. 1977. Anion transport across the red blood cell membrane mediated by dielectric pores. J Membr Biol. V. 37. № 2. P. 99. doi: 10.1007/BF01940928.

5. Schnell K.F., Besl E., Manz A. 1978. Asymmetry of the chloride transport system in human erythrocyte ghosts. Pflugers Arch. V. 375. № 1. P. 87. doi: 10.1007/BF00584152.

6. 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

7. 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.

8. Руденко С.В., Румиех М.Х., Бондаренко В.А. 2007. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. Влияние ингибиторов анионного транспорта. Біофізичний Вісник. В. 18(1). С. 53.

9. Gómez A.R., Sánchez-Hernández C.M., Fleitman-Levin I., et al. 2014. Optical Absorption and Visible Photoluminescence from Thin Films of Silicon Phthalocyanine Derivatives. Materials. V. 7. P. 6585. doi:10.3390/ma7096585

10. Rasia M., Bollini A. 1998. Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. Biochim Biophys Acta. V. 1372. № 2. P. 198. doi: 10.1016/s0005-2736(98)00057-1.

11. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. Общие принципы

торможения. Из-во. М.: Мир. 1966. С. 178.

12. Tamura A., Fujii T. 1981. Roles of charged groups on the surface of membrane lipid bilayer of human erythrocytes in induction of shape change J Biochem. V. 90. № 3. P. 629. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133516.

13. 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.

14. 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.