GLOBAL SCIENCE: PROSPECTS AND INNOVATIONS

Proceedings of I International Scientific and Practical Conference

Liverpool, United Kingdom

7-9 September 2023

Liverpool, United Kingdom

2023

UDC 001.1

The 1st International scientific and practical conference "Global science: prospects and innovations" (September 7-9, 2023) Cognum Publishing House, Liverpool, United Kingdom. 2023. 282 p.

ISBN 978-92-9472-196-9

The recommended citation for this publication is:
Ivanov I. Analysis of the phaunistic composition of Ukraine // Global science: prospects and innovations. Proceedings of the 1st International scientific and practical conference. Cognum Publishing House. Liverpool, United Kingdom. 2023. Pp. 21-27. URL: https://sci-conf.com.ua/i-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-global-science-prospects-and-innovations-7-9-09-2023-liverpul-velikobritaniya-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 countries 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: liverpool@sci-conf.com.ua

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

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

BIOLOGICAL SCIENCES

УДК 612.111: 576.31

ИЗМЕНЕНИЕ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ В СРЕДЕ С ХЛОРИДОМ И СУЛЬФАТОМ ПРИ ВЫСОКОЙ ИОННОЙ СИЛЕ

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. В работе исследовали изменение формы эритроцитов в условиях экранирования отрицательных зарядов гликокаликса вследствие воздействия сред с высокой ионной силой, содержащих хлорид и сульфат. Показано, что в гипертонической среде NaCl (300 ммоль/л) с величиной ионной силы 0,3 (при норме 0,15) эритроциты представлены сферическими формами, вероятно эхиноцитами стадии III. В сульфатной среде, содержащей 110 ммоль/л Na_2SO_4 со значением ионной силы 0,33, после внесения эритроцитов отмечается снижение оптической плотности клеточной суспензии, что указывает на образование стоматоцитов стадии III со сферической формой клеток. Включение в суспензию эритроцитов с сульфатной средой NaCl (45 ммоль/л), с конечной ионной силой 0,38, вызывает ретрансформацию стоматоцитов в дискоидные формы. Полученные результаты приводят к следующим выводам. Высокая ионная сила гипертонической среды инкубации (0,3) не является достаточным и не является независимым фактором инициации эхиноцитоза эритроцитов. Развитие эхиноцитоза в гипертонической среде, содержащей 300 ммоль/л NaCl, определяется параллельным действием высокой ионной силой среды и гиперосмотическим воздействием. Дискогенное

действие среды с высокой ионной силой при внесении в сульфатную среду NaCl (45 ммоль/л), определяется ограничением повышения внутриклеточного pH и инициацией механизма развития дискоидности при взаимодействии хлорида со специфическими сайтами межфазной области анион-транспортного белка, с которыми не связывается сульфат, а также воздействием потока жидкости при перемешивании эритроцитарной суспензии.

Ключевые слова. эритроциты, хлорид, сульфат, ионная сила, форма клеток.

Согласно одной из гипотез катионы Na+ солевой среды проникают в сеть гликокаликса эритроцитов и экранируют отрицательные электрические заряды, уменьшая силу их отталкивания. Ожидается, что увеличение ионной силы вызовет сморщивание поверхности и тенденцию к стоматоцитозу, тогда как уменьшение ионной силы приведет к развитию эхиноцитарных форм клеток [1, с. 198]. Вместе с тем, в эксперименте наблюдается противоположная картина – повышение pH или ионной силы среды инкубации вызывает развитие эхиноцитоза эритроцитов, тогда как снижение pH или ионной силы, приводит к стоматоцитозу [2, с. 343]. Модификацию формы эритроцитов в эксперименте при изменении ионной силы среды можно объяснить с позиции модели, которая объединяет механохимические свойства мембранного цитоскелета как ионного двумерного геля и липидного бислоя, в котором монослои обладают свойством изменять свою площадь относительно друг друга [3, с. 319]. В то же время, данная модель не в полной мере объясняет направление изменения формы клеток в эксперименте при отклонении pH экспериментальной среды.

В гипертонической среде с высокой ионной силой (0,3), содержащей 300 ммоль/л NaCl (~600 мОсм/кг H2O) эритроциты представлены эхиноцитами стадии III (сферические и эллипсоидные формы) [4, 015009]. В гиперосмотической среде с «нулевой» ионной силой, содержащей 600 ммоль/л сахарозы (~600 мОсм/кг H2O) клетки представлены эхиноцитами стадий I и II и стоматоцитами стадии I [5, с. 21]. Принято считать, что низкое значение pH

производит стоматоцитогенное действие [2, с. 343]. Вместе с тем, исследование формы эритроцитов в потоке при перемешивании клеточной суспензии в СФ-кювете установлено, что при значении pH5,0 в хлоридной среде возрастает степень дискоидных клеток, а в сульфатной среде при pH5,0 с высокой ионной силой (0,33 при норме 0,15) отмечается появление дискоидных форм клеток. При этом в сульфатной среде возобновляется дискогенное действие альбумина, подобное таковому в хлоридной среде с нормальной ионной силой [6, с. 77]. Эти данные приводят к предположению, что в хлоридной среде (pH7,4), связывание хлорида со специфическими сайтами в клеточных мембранах производит модификацию электростатической структуры в местах связывания, которая способствует установлению и упрочнению дискоидных форм клеток, т.е., нормоцитов. Вместе с тем, в среде с сульфатом (pH7,4), который не связывается с указанными сайтами, дискогенности не происходит, но при pH 5,0 данное действие отмечается [6, с. 77], что подтверждает предположение о роли модификации электростатической структуры локальных участков мембран в становлении дискоцитов. В сумме представленные данные приводят к постановке вопроса об изменении формы эритроцитов в условиях экранирования зарядов гликокаликса катионами Na+ вследствие воздействия сред с высокой ионной силой, но с различным содержанием хлорида и сульфата.

Цель работы – исследовать изменение формы эритроцитов при воздействии сред с высокой ионной силой с различным содержанием хлорида и сульфата.

Материалы и методы. Использованные реактивы для приготовления растворов квалифицировались как «хч» и «чда». Эритроциты донорской крови осаждали и отмывали средой, содержащей 0,9% NaCl. 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°С. 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 [6, с. 77].

Результаты и обсуждение. При внесении эритроцитов в среду, содержащую 150 ммоль/л NaCl, отмечается определенный уровень флуктуации ОП клеточной суспензии, т.е., часть эритроциты представлена дискоидными формами (Рис., трек 1). Внесение в суспензию NaCl с конечной концентрацией 300 ммоль/л и с ионной силой (I) равной 0,3 при норме 0,15, приводит к повышению ОП с устранением флуктуации ОП, что характерно при осмотическом сжатии клеток с образованием сферических форм (Рис., трек 2). Сферичность клеток также отмечается при внесении эритроцитов в среду с изначальной концентрацией NaCl 300 ммоль/л (Рис., трек 3). Образование эхиноцитов в гипертонической среде NaCl (в нашем случае сферическая форма эхиноцит-III) согласуется с данными литературы [4, 015009], а также с теоретическими представлениями. Согласно теоретическим расчетам, повышение концентрации катионов и снижение внутриклеточного pH (pHin) при гипертоническом воздействии [7, с. 71], вызовет экранирование отрицательных зарядов на молекулах спектрина. Согласно модели двумерного ионного геля спектринового цитоскелета на внутренней поверхности мембраны, это приведет к латеральному сжатию цитоскелета и эхиноцитозу эритроцитов [3, с. 319].

Внесение эритроцитов в среду, содержащую 110 ммоль/л Na_2SO_4 с ионной силой равной 0,33 (pH7,4), вызывает начальное снижение ОП клеточной взвеси (40-60 сек) с установлением устойчивого уровня ОП, без проявления флуктуации ОП (трек 4). В величину ОП клеточной суспензии вносит вклад рассеяние света, которое более выражено для сфероцитов по сравнению с дискоцитами и сферическими стоматоцитами, по причине большей площади экваториальной плоскости у сфероцитов [8, с. 565]. Поэтому уменьшение ОП, за счет ослабления рассеяния света в течении ~60 сек и

отсутствие флуктуации ОП, указывает на образование сферических стоматоцитов (Рис., трек 4). По причине того, что скорость проникновения сульфата через мембрану на 3 порядка ниже, чем хлорида, то в сульфатной среде с буфером в интервале 1-5 мин может отмечаться значительное и устойчивое повышение pHin [9, с. 330], которое вызовет развитие стоматоцитоза [3, с. 319]. Ингибиторный анализ при транспорте хлорида сульфатом показывает наличие одного по сродству типа адсорбирующих сайтов для сульфата. Тогда как, при ингибировании транспорта сульфата хлоридом анализ показал наличие как минимум 2-х типов хлорид-связывающих сайтов на молекулу переносчика с разным сродством [10, с. 99]. Ранее мы предположили, что пептидные сегменты анион-транспортного белка клеточных мембранах включают специфические хлорид-связывающие сайты (а) и сайты (б), которые контактируют с межфазными участками анионного переносчика и заполнение которых хлоридом детерминирует структуру указанных участков и форму эритроцитов. Сайты типа (а) заполняются при концентрации NaCl 45 ммоль/л и определяют установление максимальной степени дискоидных клеток, а сайты типа (б) заполняются при повышении концентрации NaCl до 105 ммоль/л и определяют упрочнение дискоидной формы [11, с. 31]. Вероятно, сульфат не связывается с этими сайтами при ингибировании транспорта хлорида. В регуляцию формы эритроцитов, возможно, включаются остатки лизинов K539, K542 и K851, которые локализуются на трансмембранных сегментах анион-транспортного белка и остатки аргининов R646, R656 гликозилированной внешней пептидной петли, поскольку те и другие часто контактируют с фосфатами фосфатидилхолина [12, с. 1507]. Данные остатки-сайты могут являться инициаторами при модификации формы вследствие изменений степени заполнения их хлоридом. Согласно гипотезе о контроле галидами локального межфазного потенциала (ϕ_s) и pH_s в межфазных участках анион-транспортного белка, 10-кратное снижение концентрации хлорида в среде может привести к увеличению положительного ϕ_s на 54 мВ и повышению pH_s на 0,99 единиц при 0°C. Подобное повышение pHs можно ожидать в

сульфатной среде, так как сульфат не связывается с хлорид-связывающим сайтом в межфазных участках анион-транспортного белка [13, с. 283]. Не исключено, что развитие стоматоцитоза эритроцитов в сульфатной среде может быть связано не только с повышением pHin, но и с повышением pHs в межфазных участках анион-транспортного белка.

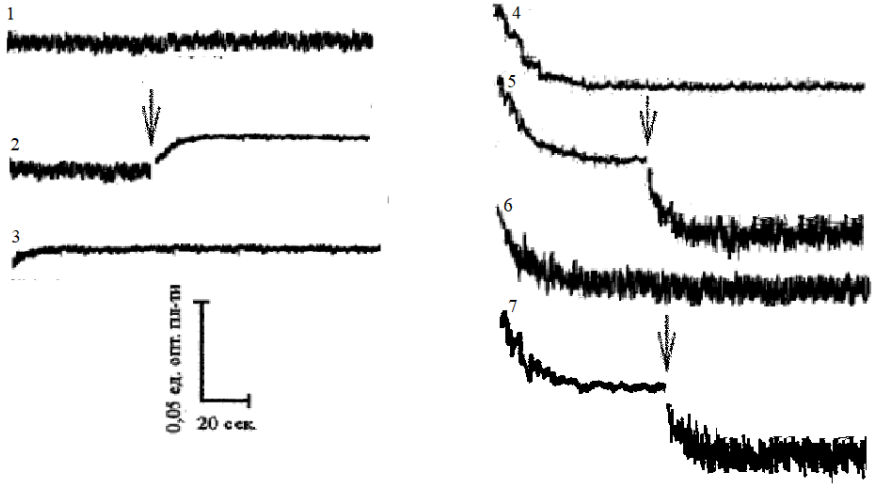

Рис. Изменение флуктуации ОП суспензии эритроцитов при перемешивании в СФ-кювете в различных средах с трис-буфером (pH7,4) (ммоль/л). 1,2 – 150 NaCl; 3 – 300 NaCl; 4,5 – 110 Na_2SO_4; 6 – 110/45 Na_2SO_4/NaCl; 7 – 300/45 сахароза/NaCl. ↓ – дополнительное внесение NaCl в СФ-кювету с конечной концентрацией: 2 – 300 ммоль/л; 5,7 – 45 ммоль/л.

При включении в суспензию эритроцитов с сульфатной средой 45 ммоль/л NaCl (конечная I=0,38) отмечается снижение ОП с развитием флуктуации ОП (трек 5), что связано с образованием дискоидных форм клеток. Развитие флуктуации ОП и, соответственно, дискоидности с такой-же степенью выявляется в среде, содержащей изначально подобный состав (ммоль/ммоль) Na_2SO_4/NaCl=110/45 (Рис., трек 6). Кроме того, во взвеси эритроцитов в сахарозной среде, после внесения 45 ммоль/л NaCl (конечная I=0,045) также отмечается снижение ОП с развитием флуктуации ОП (трек 7), т.е., выявляется ретрансформация в дискоидные клетки. Развитие стоматоцитоза в сульфатной среды (I=0,33) подчеркивает то, что высокая ионная сила среды не удовлетворяет требованиям развития эхиноцитоза в среде, содержащей 300 ммоль/л NaCl с I равной 0,3. Вместе с тем, развитие дискоидности при

включении NaCl в сульфатную или сахарозную среду, указывает на то, что инициация механизма развития дискоидности при связывании хлорида со специфическими сайтами (a), не зависит от ионной сила среды. Это, вероятно, связано с тем, что данные сайты локализуются в межфазной области анион-транспортного белка и с тем, что они играют не последнюю роль в регуляции формы эритроцитов. Вместе с тем, развитие дискоидности, может быть дополнительно связано с воздействием потока жидкости на клетки при перемешивании суспензии. Ранее мы показали, что в подобных условиях при снижении pH как хлоридной, так и сульфатной среды до pH5,0 степень дискоидности клеток возрастает [6, с. 77], несмотря на стоматоцитогенный эффект снижения pH среды [2, с. 343].

Скорость перемешивания клеточной суспензии, используемая в наших экспериментах, составляет 7 обор./сек, которая может способствовать ретрансформации стоматоцитов в дискоциты при кислом значении pH [6, с. 77]. Устойчивость эхиноцитарных форм определяется большой отрицательной величиной поверхностного давления спектриновой двумерной ионной сети на внутренней поверхности мембраны (Π_G = -0,3 – -0,6 дин/см). Дискоциты предпочитают невысокие отрицательные величины ($\Pi_G = -6*10^{-3} – -6*10^{-2}$ дин/см), тогда как стоматоцитарные формы предпочитают положительные значения (Π_G = +0,06 – +0,12 дин/см) [3, с. 319]. Поэтому не исключено, что использованная частота перемешивания клеточной суспензии способствует ретрансформации стоматоцитов в дискоциты за счет снижения поверхностного давления в цитоскелете посредством воздействия потока среды на липидный бислой мембраны. Расчетное повышение pHin эритроцитов в сульфатной среде достигает значения 9,3 [7, с. 71]. Это приведет к повышению поверхностного давления в двумерном спектриновом цитоскелете и развитию стоматоцитоза в форме сферических клеток, что отражено на Рис., трек 4. В сульфатной или в сахарозной среде с хлоридом (0,45 моль/л NaCl) расчетное повышение pHin составляет 7,7, т.е., значительно меньше [7, с. 71]. Наряду с меньшим повышением pHin, при 45 ммоль/л NaCl заполняются хлорид-связывающие сайты-(a) в межфазных

участках анион-транспортного белка, которые определяют максимальное развитие степени дискоидных форм эритроцитов [11, с. 31]. В данной ситуации дискогенный эффект превалирует и блокирует развитие стоматоцитоза, что отражено на Рис. в треках 5-7.

При повышении pH среды и, соответственно, повышении pHin развитие эхиноцитоза эритроцитов в эксперименте, которое противоречит теоретическим представлениям, можно объяснить двумя противодействующими факторами. 1-й – уменьшение объема клеток и повышение концентрации катионов K+, которое противодействует эффекту повышения pHin на спектриновую ионную сеть цитоскелета. 2-й – повышение pH поверхности клеток, которое вызовет уменьшение степени протонации остатков лизина и аргенина анион-транспортного белка и, соответственно, уменьшение степени связывания хлорида с данными сайтами, включая обсуждаемые специфические сайты (а) и (б). Это вызовет дестабилизацию дискоидных форм клеток [11, с. 31], которые, вероятно, начнут трансформировать в эхиноциты. На эту модификацию формы указывает то, что заполнение сайтов (б) в криоконсервированных эритроцитах уже не приводит к стабилизации дискоидных форм [11, с. 31] и клетки, в основном, представлены эхиноцитами стадии III, хотя под действием перемешивания часть их ретрансформирует в дискоиды [6, с. 77]. При понижении pH среды, происходят реакции, противоположные описанным, что определяет развитие стоматоцитоза.

Таким образом, полученные результаты в условиях экранирования отрицательных зарядов сиаловых кислот на поверхности эритроцитов при воздействии высокой ионной силы, которое, вероятно, исключает модификацию формы клеток, связанную с гликокаликсом, приводят к следующим выводам. Дискогенное действие среды с высокой ионной силой (0,38) при сочетании в среде сульфата и хлорида в концентрации NaCl 45 ммоль/л, определяется связыванием хлорида со специфическими сайтами межфазной области анион-транспортного белка с установлением электростатической структуры данной области, соответствующей дискоидной

форме эритроцитов. Ретрансформация стоматоцитов в нормальные дискоидные формы при внесении хлорида в сульфатную среду может происходить вследствие снижения поверхностного давления в спектриновой сети цитоскелета с переменой его знака на отрицательный из-за ограничения повышения внутриклеточного pH. Устойчивость различных форм эритроцитов при соответствующих интервалах поверхностного давления в двумерной сети спектринового цитоскелета может определяться не только величиной pH у внутренней поверхности мембраны, но и степенью заполнения специфических хлорид-связывающих сайтов межфазной области анион-транспортного белка, которая контролируется поверхностной концентрацией хлорида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. 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.

2. Wong P. 1999. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. J Theor Biol. V. 196. № 3. P. 343. doi: 10.1006/jtbi.1998.0845.

3. Stokke B.T., Mikkelsen A., Elgsaeter A. 1986. Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanochemical properties. Biophys J. V. 49. № 1. P. 319. doi: 10.1016/S0006-3495(86)83644-X.

4. Fischer T.H., Valeri C.R., Smith C. J, et al. 2008. Non-classical processes in surface hemostasis: mechanisms for the poly-N-acetyl glucosamine-induced alteration of red blood cell morphology and surface prothrombogenicity. Biomed. Mater. V. 3. № 1. 015009. doi:10.1088/1748-6041/3/1/015009

5. Hardjono I.S., Hamasaki N., Minakami S., Fujino T. 1980. Effects of Osmolarity and Echinocytogenic Drugs on the Transport of Phosphoenolpyruvate through the Red Cell Membrane. Cell Structure and Function. № 5, P. 21. (by Japan Society for Cell Biology).

6. Рамазанов В.В., Воловельская Е. Л., Руденко С.В. 2022.

Модификация формы криоконсервированных эритроцитов альбумином. The 4th International scientific and practical conference “Modern science: innovations and prospects” (January 10-12, 2022) SSPG Publish, Stockholm, Sweden. C. 77.

7. Glaser R., Donath J. 1984. Stationary ionic states in human red blood cells. Bioelectrochemistry and Bioenergetics. V. 13. P. 71.

8. 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.

9. Romano L., Passow H. 1984. Characterization of anion transport system in trout red blood cell. Am J Physiol. V. 246. (3 Pt 1). P. 330. doi: 10.1152/ajpcell.1984.246.3.C330. PMID: 6703047.

10. 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.

11. Рамазанов В.В., Руденко С.В. 2023. Модифікація форми еритроцитів при заміщенні у середовищі сульфату на NaCl і дії стильбендисульфонату. The 3rd International scientific and practical conference “Scientific research in the modern world” (January 12-14, 2023) Perfect Publishing, Toronto, Canada. P. 31.

12. 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.

13. Wieth J.O., Bjerrum P.J., Borders C.L. 1982. Irreversible inactivation of red cell chloride exchange with phenylglyoxal, and arginine-specific reagent. J Gen Physiol. V. 79. № 2. P. 283. doi: 10.1085/jgp.79.2.283.