PROGRESSIVE RESEARCH IN THE MODERN WORLD

Proceedings of X International Scientific and Practical Conference

Boston, USA

22-24 June 2023

Boston, USA

2023

UDC 001.1

The 10th International scientific and practical conference "Progressive research in the modern world" (June 22-24, 2023) BoScience Publisher, Boston, USA. 2023. 560 p.

ISBN 978-1-73981-125-9

The recommended citation for this publication is:

Ivanov I. Analysis of the phaunistic composition of Ukraine // Progressive research in the modern world. Proceedings of the 10th International scientific and practical conference. BoScience Publisher. Boston, USA. 2023. Pp. 21-27. URL: https://sci-conf.com.ua/x-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-progressive-research-in-the-modern-world-22-24-06-2023-boston-ssha-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: boston@sci-conf.com.ua

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

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

УДК 57.043: 612.111: 576.31

ИЗМЕНЕНИЕ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЗАМЕДЛЕННОМ ВХОДЕ СУЛЬФАТА В КЛЕТКИ

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 динамику изменения формы эритроцитов в сульфатной среде в условиях замедленного входа сульфата в клетки (pH7,4; 20-22°C). Показано, что в сульфатной среде эритроциты представлены сферическими формами. Присутствие в среде альбумина вызывает ретрансформацию части клеток (~50%) в дискоидные формы в течении 4-5 мин. Присутствие в среде ингибитора анионного канала DIDS инициирует обратимую ретрансформацию эритроцитов от сферических форм до дискоидных в течении 2-3 мин и обратно к сферическим формам к 5-10 мин. Для криоконсервированных эритроцитов действие альбумина менее выражено и производит ретрансформацию меньшей части клеток (~30%). Эффект DIDS на криоконсервированные клетки является заторможенным, но ретрансформация в дискоидные клетки отмечается к 5-10 мин. Данная заторможенность, вероятно, связана с нарушением электростатической структуры клеточных мембран при криоконсервировании эритроцитов. Индуцированное изменение формы эритроцитов осуществлялось в условиях, которые ориентируют анионный переносчик в конформацию с транспортным сайтом, обращенными на внешнюю сторону мембраны. Это позволяет предполагать, что механизм регуляции формы эритроцитов не зависит от перераспределения транспортных сайтов на мембране, которое является сопутствующей реакцией обмена анионами при определенных условиях среды

инкубации. Изменение формы эритроцитов на действие заряженных реагентов (альбумин, DIDS) указывает на то, что механизм модификации формы клеток может включать модификацию электростатической структуры участков мембран.

Ключевые слова: эритроциты, криоконсервирование, сульфат, альбумин, DIDS, форма клеток.

Согласно данным литературы изменение формы эритроцитов может происходить под контролем распределения транспортных сайтов анионного переносчика (AE1) по обе стороны мембраны. По одной из гипотез, смещение транспортных сайтов на внешнюю сторону мембраны приводит к эхиноцитозу клеток [1], тогда как по другой гипотезе – к стоматоцитозу [2]. Поэтому остается нерешенным вопрос о роли распределения транспортных сайтов переносчика в механизме регуляции формы эритроцитов. Показано, что в сульфатной среде при значении pH5,6 (23°C) эритроциты приобретают форму эхиноцитов и ретрансформируют в направлении эхиноциты → дискоциты→ стоматоциты в течение 15-30 мин. Авторы данной работы пришли к выводу, что указанная ретрансформация определяется переориентацией тр.сайтов на внешнюю сторону мембраны с последующим Cl-/SO42- обменом и распределением тр.сайтов между внутренней и внешней поверхностью мембраны [1]. При снижении pH в физрастворе эритроциты стоматоцитируют в течении нескольких секунд, возможно, по причине того, что хлорид распределяется на 3 порядка быстрее, чем сульфат. В таком случае медленный Cl-/SO42- обмен может являться причиной замедления развития стоматоцитоза, которое отражается в выше указанной ретрансформации эритроцитов. В то же время, максимальная скорость Cl-/SO42- -обмена отмечается при pH 6,4 (k=0,121 мин$^{-1}$, 37°C), тогда как при pH 7,4 и 20°C k=0,0021 мин$^{-1}$ [3], а оценка времени полуобмена по формуле t(1/2)=Ln2/k составляет 5,5 часов. Согласно логике механизма «ping-pong» в последних экспериментальных условиях в течение 2-10 мин при заторможенном Cl-/SO42- -обмене значительная часть

транспортных сайтов будет оставаться на внешней стороне мембраны. Вместе с тем, нет данных о морфологии эритроцитов в условиях pH 7,4 и 20°C и ее возможном изменении во времени.

Связывание ингибитора анионного канала ДИДС с мембранами эритроцитов приводит к фиксации конформации переносчика с транспортным сайтом, обращенным на внешнюю сторону мембраны. При этом принято считать, что ДИДС является эхиноцитогенным агентом [4], однако ДИДС-меченые эритроциты могут быть представлены не только эхиноцитами, но и частично дискоцитами [5]. Кроме того, при исследовании ретрансформации эритроцитов в сахарозной среде в направлении эхиноциты→ дискоциты→стоматоциты, включение ДИДС в суспензию клеток на стадии стоматоцитоза приводит к образованию форм клеток, подобных дискоидным [6]. Далее, при pH-титровании ДИДС-меченых эхиноцитарных эритроцитов в цикле pH 7,4↔5,6 на 3-м шаге титрования к pH 5,6 клетки становятся в основном дискоцитами [1]. Последнее указывает на то, что изменение формы клеток может определяться модификацией электростатической (ЭС) структуры ДИДС-меченого переносчика и мембраны вследствие циклического изменения pH.

Представленные данные литературы приводят к постановке вопросов: во-первых, может-ли происходить изменение формы эритроцитов в сульфатной среде при физиологическом значении pH в условиях замедленного обмена анионами и, соответственно, замедленного распределения тр сайтов на мембране; во-вторых, может-ли ДИДС модифицировать форму клеток в условиях ориентации транспортных сайтов переносчика на внешней стороне мембраны.

Цель работы – исследовать изменение формы интактных и криоконсервированных эритроцитов в сульфатной среде при условиях замедленного транспорта сульфата в клетки (pH7,4 и 20-22°C).

Материалы и методы. В работе использовали сывороточный альбумин человека (Sigma, США) и ингибитор анионного канала и модификатор формы

эритроцитов 4,4'-Diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonate (DIDS, Sigma, США). Эритроциты из донорской крови (2 суток хранения при 4°С) осаждали и отмывали средой, содержащей 0,15 моль/л NaCl+5,5 ммоль/л глюкозы при 20-22°С. 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°С). Замороженные образцы клеток (1 мл) отогревали при 40°С, 2 мин с последующим отмыванием клеток комбинациями 2-х растворов, содержащих 1 моль/л NaCl и 0,15 моль/л NaCl+5,5 ммоль/л глюкозы при 20-22°С по методу, описанному в [7]. 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 [8].

Результаты и обсуждение. При внесении эритроцитов в сульфатную среду отмечается снижение ОП клеточной суспензии в течение ~30 сек и далее отмечается незначительное снижение уровня ОП на протяжение 4-5 мин с последующим восстановлением до 10 мин (Рис., трек 1). Для эритроцитов некоторых доноров колебание ОП в интервале 0,5-10 мин не отмечается (Рис., трек 2). При этом отсутствие флуктуаций ОП определяется наличием сферических форм клеток в данной среде.

Для эритроцитов тех и других доноров, присутствие в среде альбумина вызывает выраженное снижение ОП и развитие флуктуации ОП на ~4-5 мин, с последующим некоторым повышением ОП до 10 мин (Рис., трек 3). Присутствие в среде ингибитора анионного канала DIDS инициирует значительное развитие флуктуации ОП на 2-3 мин с последующим повышением ОП и ослаблением флуктуации ОП до 10 мин (Рис., трек 4). Сравнение

эффектов альбумина и DIDS выявляет их некоторую подобность, но для последнего эффект ускорен и более выражен.

Для криоконсервированных эритроцитов, действие альбумина менее выражено, а действие ДИДС вызывает развитие флуктуации ОП только к 5-й мин, интенсивность которой остается таковой до 10 мин экспериментальной прописи (Рис., треки 5-7). Данная интенсивность флуктуации ОП подобна таковой для интактных клеток на 2-3 мин (Рис., трек 4). Сравнивая эффект DIDS на интактные и криоконсервированные эритроциты становится очевидным, что криоконсервирование приводит к ингибированию DIDS-индуцированной обратимой ретрансформации.

Ранее нами было показано, что при повышении в среде DIDS до 20 мкмоль/л приводит к торможению данной ретрансформации, которое, вероятно, связано с адсорбцией излишка заряженных молекул реагента на других участках мембраны вне анионного канала. Есть данные, что при криоконсервировании эритроцитов в среде с глицерином или 1,2-пропандиолом отмечается снижение поверхностного электрического потенциала [9]. Представленные данные приводят к предположению, что ингибирование DIDS-ретрансформации криоконсервированных эритроцитов (Рис., трек 7 в сравнении с трек 4) может быть связано с нарушением ЭС структуры поверхности мембран.

На основе имеющихся данных при 20°C, pH7,4 и константы скорости транспорта сульфата $k=2{,}1\times10^{-3}$ [3] оценка времени полуобмена $Cl_{in}/SO_4^{2-}{}_{out}$ по формуле: $\tau(1/2)=Ln2/k$ составляет 5,5 часов. Скорость транспорта хлорида на 3 порядка выше, чем сульфата, поэтому, с учетом обмена анионами по механизму «ping-pong», в наших экспериментальных условиях (20°C; pH7,4; 10 мин) большая часть транспортных сайтов будет локализоваться на внешней стороне мембраны, тем более при связывании в анионном канале ингибитора DIDS. Суспензия эритроцитов в физрастворе (pH7,4) производит флуктуацию ОП, что указывает на наличие определенной доли дискоидных форм клеток (Рис., трек 8). Присутствие альбумина в данной среде проявляет свойственный

эффект - вызывает значительное усиление интенсивности флуктуации ОП (Рис., трек 9), которое определяется ретрансформацией эритроцитов в дискоциты [10].

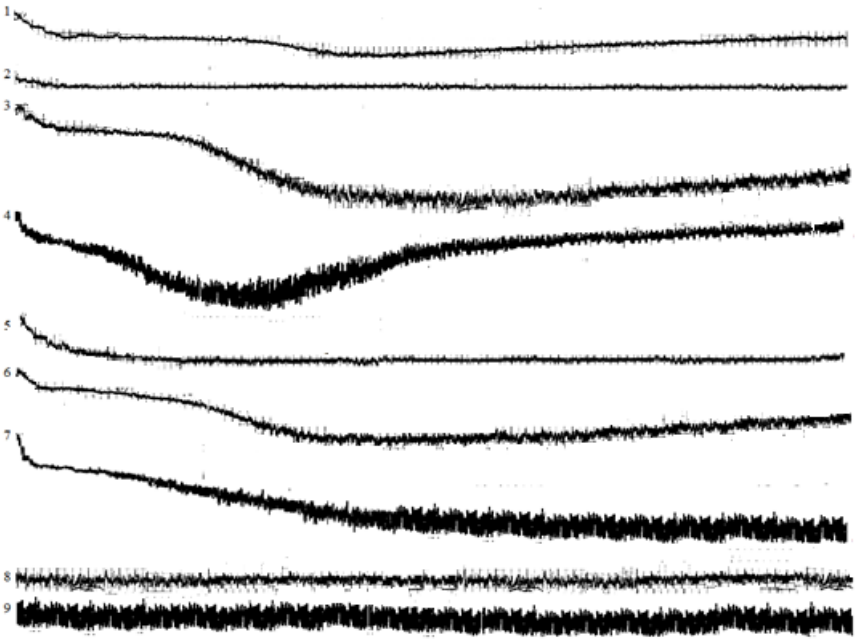


Рис. Изменение интенсивности флуктуаций ОП суспензии эритроцитов донорской крови в экспериментальной среде, содержащей:
1-7 – 110 ммоль/л Na_2SO_4, 10 ммоль/л Трис-буфер (pH7,4); 8,9 – 150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л Трис-буфер (pH7,4). 1-4,8,9 – интактные клетки, 5-7 – криоконсервированные клетки (см. методы). 3,6 – в среду перед клетками добавлен альбумин (0,02%), или 4,7 – DIDS (2 мкмоль/л). 1,2 – характерные прописи ОП для эритроцитов из различных доноров.

Вместе с тем, в сульфатной среде, судя по развитию интенсивности флуктуации ОП не все клетки подвержены действию альбумина (Рис., трек 3) по сравнению с физраствором (Рис., трек 9). Возможно, эритроциты, чувствительные к альбумину относятся к фракциям молодых по возрасту клеток. В тоже время, уровень интенсивности флуктуации ОП при действии DIDS на 2-3 мин (Рис., трек 4), подобен таковому при действии альбумина в физрастворе (Рис., трек 9), что связано с ретрансформацией значительной части клеток.

Альбумина – глобулярный белок с гидрофобными радикалами, молекула

которого несет 15 отрицательных зарядов, что не исключает как гидрофобные, так и электростатические эффекты при воздействии данного белка на форму эритроцитов. Молекула DIDS несет два отрицательных заряда и может произвести электростатический эффект при встраивании во входящую полость анионного канала, которая включает положительные остатки аминокислот [11].

Ранее нами было показано, что альбумин, добавленный в суспензию эритроцитов в физрастворе (pH 7,4), проявляет свойственную быструю ретрансформацию клеток в дискоциты, которая устраняется при pH 5,0. Кроме того, данный эффект устраняется в сульфатной среде при pH 7,4, но восстанавливается при pH5,0 [12]. Вместе с тем, в физрастворе DIDS проявляет сфероцитирующее действие, которое устраняется при pH5,0. Опять же, данный эффект устраняется в сульфатной среде при pH 7,4, но при pH 5,0 данный реагент проявляет действие подобное альбумину – образуются дископодобные формы [13]. Изоэлектрическая точка альбумина равняется 4,8-5,0, поэтому устранение его эффекта может быть связано с обнулением заряда при pH 5,0 в то же время, в сульфатной среде pH7,4 также устраняется его действие. Это указывает на то, что действие альбумина определяется электростатической структурой мембраны. Диссоциируемые группы DIDS имеют отрицательные K_d, поэтому при pH 5,0 степень их диссоциации изменится незначительно. В связи с этим, модифицирующий эффект данного реагента на форму при изменении pH может определяться изменением ЭС структуры мембраны, как и для альбумина.

Гипотеза о контроле галидами локального потенциала и pH_s в межфазных участках анионного канала, предсказывает, что 10-кратное снижение концентрации хлорида в среде может привести к увеличению положительного потенциала на 54 мВ [14]. Согласно данной гипотезе связывание двухзарядных анионов сульфата в указанных участках может привести к изменению их ЭС структуры по сравнению с физраствором. Это, возможно, определяет некоторую подобность изменения кривых ОП при действии заряженных реагентов – альбумина и DIDS (Рис., треки 3, 4). Входная полость анионного

канала включает положительно заряженные остатки аминокислот, связывающие анионы [11]. Взаимодействие DIDS в канале нейтрализует положительно заряженный аминокислотный остаток Lys581 у входа и вносит во входную полость две свои SO_3^- -группы, одна из которых нейтрализует Arg730, а вторая экранируется другими зарядами [15].

Можно предположить, что DIDS-индуцированная обратимая ретрансформация эритроцитов в сульфатной среде (Рис., трек 4) инициируется изменением динамики сульфата в канале с модификацией ЭС структуры входа канала при связывании DIDS. При стимуляции потоком перемешивания клеточной суспензии данная модификация может запускать изменение ЭС структуры межфазных участков мембран, прилегающих к анионному каналу и обратимое изменение формы клеток. В то же время, альбумин, связываясь с липидным бислоем мембраны, приводит к увеличению ζ-потенциала эритроцитов более чем в 3-раза [16]. Возможно, в сульфатной среде альбумин при связывании с бислоем опосредованно может модифицировать изменение ЭС структуры участков мембран, прилегающих к анионному каналу. Представленные результаты указывают на то, что альбумин производит свойственное ретрансформирующее действие на эритроциты в условиях смещения транспортных сайтов анионного переносчика на внешнюю сторону мембраны в сульфатной среде. Данное действие заторможено и слабее выражено по сравнению с физраствором. Ретрансформирующее действие DIDS на эритроциты также осуществляется в указанных условиях к тому же, присутствие ингибитора DIDS указывает на то, что изменение формы клеток происходит без перераспределения транспортных сайтов переносчика. Условия экспериментов и действия реагентов на форму эритроцитов приводят к предположению, что механизм регуляции формы не включает в себя и не зависит от перераспределения транспортных сайтов анионного переносчика, которое, в определенных условиях, может быть только сопутствующей реакцией. Полученные результаты, с учетом ранее опубликованных результатов по влиянию pH на модификацию формы эритроцитов DIDS и

альбумином, позволяют предположить, что действие DIDS на форму эритроцитов в сульфатной среде связано с модификацией ЭС структуры межфазных участков мембран, прилегающих к анионному каналу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. 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.

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. Bursaux E, Hilly M, Bluze A, Poyart C. Organic phosphates modulate anion self-exchange across the human erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta. 1984 Nov 7;777(2):253-60. doi: 10.1016/0005-2736(84)90427-9.

4. 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.

5. Van Dort H.M., Knowless D.W., Chasis J.A., Lee G., Mohandas N., Low P.S. 2001. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. V. 276. № 50. P. 46968.

6. 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.

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. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Рамазанов В.В., Воловельская Е. Л., Руденко С.В. Форма модификация криоконсервированных эритроцитов альбумином. The 4th International scientific and practical conference “Modern science: innovations and prospects” (January 10-12, 2022) SSPG Publish, Stockholm, Sweden. 2022. P. 77-83.

13. Рамазанов В.В., Воловельская Е. Л., Руденко С.В. 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. 2022. P. 67-74.

14. 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

15. 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.

16. 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.