

Зміна форми еритроцитів при механічному перемішуванні та заміщенні в середовищі сульфату на хлорид

В.В. Рамазанов, С.В. Руденко

*Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, Харків;
e-mail: ramazanovviktor9891@gmail.com*

За низького значення рН середовища еритроцити не здатні підтримувати дискоїдну форму і трансформуються в стоматоцити. Водночас при рН 5,0 сульфатного середовища в умовах механічного перемішування клітинної суспензії, еритроцити частково ретрансформуються в дискоїдні форми, тоді як у середовищі з хлоридом (рН 5,0) перетворення відбувається з високою інтенсивністю. Це вказує на те, що деякі сайти мембран еритроцитів, що пов'язують хлорид, можуть виявитися додатковою ланкою регуляції форми еритроцитів в умовах механічного впливу на клітинну суспензію. Ми досліджували зміну форми еритроцитів при нормальному значенні рН (7,4) внаслідок заміщення в середовищі Na_2SO_4 на NaCl і запису посилення інтенсивності флукутації оптичної щільності (ОЩ), як показника підвищення рівня вмісту дискоїдних клітин (нормоцитів) у клітинній суспензії, що переміщується. Встановлено, що в середовищі, яке містить Na_2SO_4 (110 ммоль/л) еритроцити протягом 20 с трансформуються в дрібні стоматоцити. При підвищенні концентрації NaCl з 15 до 105 ммоль/л число дискоїдних клітин збільшується, а при концентрації від 105 до 150 ммоль/л навпаки знижується. При виключенні механічного перемішування у середовищах із концентраціями NaCl 30–90 ммоль/л еритроцити морфологічно є стоматоцитами. Тоді як у середовищі, що містить 150 ммоль/л NaCl , вони представлені диско-ехіноцитами та ехіноцитами. Отримані результати показують, що механічне перемішування клітинної суспензії сприяє ретрансформації стоматоцитарних еритроцитів у дискоїдні форми. Послаблення ретрансформуючої ефективності перемішування при підвищенні концентрації NaCl від 105 до 150 ммоль/л і розвиток ехіноцитозу при 150 ммоль/л NaCl вказують на існування 2 типів сайтів для хлориду. Заповнення хлоридом 1-го типу при концентрації NaCl у середовищі 15–105 ммоль/л призводить до встановлення дискоїдних форм еритроцитів. Заповнення 2-го типу сайтів при концентрації NaCl в середовищі 105–150 ммоль/л призводить до розвитку ехіноцитозу. Ретрансформуюча властивість механічного перемішування може бути пов'язана зі зміною ступеня наповнення хлоридом зазначених типів сайтів.

Ключові слова: еритроцити; хлорид; сульфат; форма клітин.

ВСТУП

Властивість еритроцитів адаптувати свою форму до змінних умов потоку і до проходження через кровеносні мікросудини визначається як деформованість, яка сприяє нормальному кровотоку та ефективній перфузії периферичних тканин [1]. Форма еритроцитів може змінюватися внаслідок зміни іонного складу та рН інкубаційного середовища [2]. При кислому значенні рН (5,5) середовища із хлоридом натрію еритроцити стають стомато-

цитами [3]. Тоді як у середовищі з сульфатом натрію при кислому значенні рН (5,5) вони набувають форми ехіноцитів і протягом 15–30 хв трансформуються в напрямку ехіноцити → дискоцити → стоматоцити [4]. Як вважають автори зазначеної роботи, повільне становлення стоматоцитозу визначається незначною швидкістю $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ - обміну порівняно з Cl^-/Cl^- - обміном, а сам процес визначається розподілом транспортних сайтів аніонного переносника між внутрішньою та зовнішньою

сторонами мембрани. Аніонний переносник, що був сформований білком смуги 3, який є основним трансмембранним білком мембран еритроцитів, здійснює сполучення ліпідного біслою та цитоскелета, сприяє тим самим деформованості і стабілізації форми клітин [5]. Водночас в умовах механічного перемішування у середовищі, що містить хлорид натрію (рН 5,0) еритроцити ретрансформуються в дискоїдні форми, тоді у середовищі, що містить сульфат натрію відзначається низький ступінь перетворення [6]. По-перше, це вказує на те, що сайти, які зв'язують хлорид, можуть включатися в регуляцію форми еритроцитів. По-друге, зміна форми не залежить від швидкості проникнення аніонів через мембрану, оскільки сульфат проникає на 3-4 порядки повільніше, ніж хлорид [7]. Крім того, при блокуванні транспортного сайту інгібіторами DIDS або азидобензилфлорезином не виявляється погіршення деформованості еритроцитів [8]. Ці дані вказують, що фіксація транспортних сайтів переносника на зовнішній стороні мембрани не впливає на зміну форми еритроцитів. Існують кілька мутацій, що призводять до одиничних амінокислотних замін у пептидних доменах аніонного переносника, які викликають зниження аніонообмінної активності та спадковий стоматоцитоз. Показано, що для мутацій R730C і G796R активність $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ – обміну знижується на 70 і 50% відповідно [9]. У сульфатному середовищі при рН 7,4 як і при рН 5,5 відбувається подібний повільний $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ – обмін [7], водночас немає даних про форму еритроцитів при нормальному значенні рН у зазначеному середовищі.

Наявні літературні дані, з одного боку, вказують на те, що зміна форми еритроцитів визначається швидкістю обміну аніонами, з іншого боку, не залежить від цього обміну та відбувається в умовах фіксування транспортних сайтів на зовнішній стороні мембрани. Крім того, при низькому значенні рН середовища, певні хлоридзв'язувальні сайти мембран еритроцитів можуть включа-

тися в регуляцію форми еритроцитів при їх перемішуванні. Виникає питання про зміну форми еритроцитів за нормального значення рН середовища та підвищення концентрації хлориду при механічному впливі на клітинну суспензію.

Мета нашої роботи – дослідити зміну форми еритроцитів при заміщенні в середовищі сульфату на хлорид та перемішуванні клітинної суспензії.

МЕТОДИКА

У роботі використовували інгібітор аніонного каналу DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid, disodium salt; «Sigma», США). В експериментах використовували хлоридне середовище (ммоль/л) NaCl – 150, тріс (рН 7,4) – 10 та сульфатне середовище – Na_2SO_4 – 110, тріс (рН 7,4) – 10. Еритроцити донорської крові, що була отримана з Центру Служби Крові м. Харків, осаджували центрифугуванням при 1200g протягом 3 хв при кімнатній температурі з подальшим видаленням плазми та білих клітин. Осад еритроцитів тричі відмивали центрифугуванням в аналогічному режимі в хлоридному середовищі (співвідношення клітин та середовища 1:20), гематокрит кінцевого осаду становив 70–74%. Форму еритроцитів досліджували методом реєстрації інтенсивності флукутації оптичної щільності (ОЩ) клітинної суспензії при перемішуванні у СФ-кюветі магнітної мішалки зі швидкістю 420 об/хв. Тестування проводили на спектрофотометрі (СФ-4А), сполученому із самописцем, при довжині хвилі 720 нм. ОЩ суспензії еритроцитів становила 0,3–0,35 од., що відповідало гематокриту 0,02% ($\sim 3,0 \times 10^6$ кл./мл). Еритроцити, що мають форму дисків, розсіюють світло анізотропно. При їх переміщенні в суспензії анізотропія постійно змінюється, що викликає флукутацію ОЩ. Клітини, що були представлені сфероцитами, дають ізотропне світлорозсіювання незалежно від їхньої орієнтації в промені світла, флукутацій ОЩ

не виявляється. Клітини які були представлені стоматоцитами, також не виробляють флуктуації ОЩ [2]. Її не спостерігають за відсутності перемішування. Це підтверджує те, що флуктуація ОЩ зумовлена зміною орієнтації клітин у світловому промені. Таким чином, при використанні цього методу, можна оцінити зміну форми еритроцитів під впливом різних середовищ та реагентів.

Морфологію еритроцитів досліджували за допомогою оптичного мікроскопу (STUDAR E, об'єктив 40/0,65; 160/0,17). У середовища з різним співвідношенням Na_2SO_4 та NaCl вносили еритроцити з кінцевим гематокритом 1,5–1,7%. Суспензію перемішували і через 1 хв для фіксації форми клітин вносили глутаровий альдегід з кінцевою концентрацією 0,4% та витримували не менше ніж 20 хв з подальшим тестуванням морфології еритроцитів.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

При внесенні еритроцитів у сульфатне середовище у перші секунди флуктуації ОЩ послаблюються, що відображає утворення сферичних форм клітин (рис. 1). Морфологічний аналіз показав, що у сульфатному середовищі еритроцити були представлені дрібними стоматоцитами (рис. 2). Заміщення у середовищі частини Na_2SO_4 на NaCl (до 15 ммоль/л) викликає появу флуктуації ОЩ клітинної суспензії (див. рис. 1). Подальше підвищення концентрації NaCl (до 30 ммоль/л) при заміщенні Na_2SO_4 викликає посилення флуктуації ОЩ. Підвищення NaCl до 45 ммоль/л приводить до додаткового приросту флуктуації ОЩ, інтенсивність якої зберігається до концентрації NaCl 105 ммоль/л. В інтервалі концентрацій NaCl 105–150 ммоль/л послаблюються флуктуації ОЩ, тобто число дискоїдних клітин зменшується. Морфологічно в середовищі, що містить 150 ммоль/л NaCl , еритроцити представлені диско-ехіноцитами та ехіноцитами (див. рис. 2), що узгоджується зі слабо вираженою

флуктуацією ОЩ (див. рис. 1). Подібна морфологія з підвищеним індексом сферичності характерна для еритроцитів, що були відмиті від плазми та внесені до фізіологічного розчину з фосфатним буфером [10].

Слід відзначити, що при співвідношеннях $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$: 88/30; 77/45; 66/60; 55/75; 44/90 та 33/105 еритроцити при механічному перемішуванні виявляють високий рівень флуктуації ОЩ, що вказує на високий ступінь дискоїдних форм клітин. Разом з тим у 5 із зазначених середовищ еритроцити морфологічно представлені стоматоцитами (див. рис. 2). Це свідчить про те, що перемішування сприяє ретрансформації клітин. Відомо, що механічне перемішування еритроцитів може трансформувати дискоцити в чашоподібну форму без зміни площі поверхні клітин [11]. Зазначена ретрансформація також під впливом перемішування відзначалася для інтактних та кріоконсервованих еритроцитів у фізіологічному розчині при рН 5,0 [6].

Причиною ретрансформації стоматоцитів у дискоїди можуть бути слабкі взаємодії, що утворилися при електростатичній модифікації мембран внаслідок заміщення в

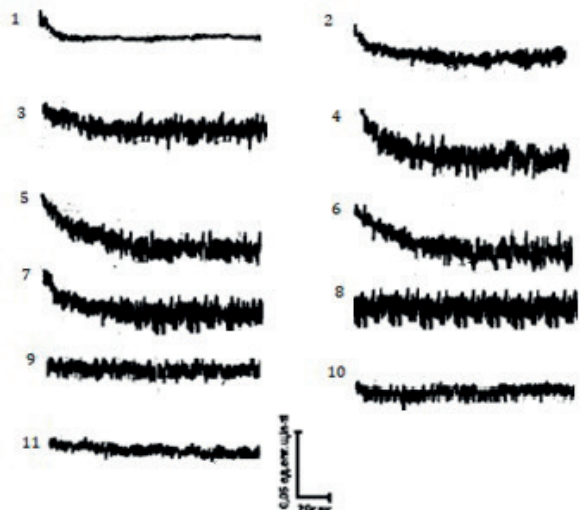


Рис. 1. Зміна флуктуації оптичної щільності суспензії еритроцитів у середовищах з різним співвідношенням $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$: 1 – 110/0; 2 – 99/15; 3 – 88/30; 4 – 77/45; 5 – 66/60; 6 – 55/75; 7 – 44/90; 8 – 33/105; 9 – 22/120; 10 – 11/135; 11 – 0/150

середовищі хлориду на сульфат. Порушення подібних контактів, що утворилися при модифікації мембран у середовищі з низьким рН, визначає відновлення дискоїдних еритроцитів зі стоматоцитарних форм внаслідок нормалізації рН середовища [12]. Слід зазначити, що еритроцити, морфологічно представлені диско-ехіноцитами та ехіноцитами у фізіологічному розчині (див. рис. 2), не здатні ретрансформуватися у дискоцити при механічному перемішуванні, на що вказує низький рівень флуктуації ОЩ клітинної суспензії (див. рис. 1).

У зазначених вище 5 середовищах при співвідношеннях $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$: 88/30; 77/45; 66/60; 55/75 та 44/90, іонна сила розчинів становить: 0,3; 0,28; 0,26; 0,24; 0,22 відповідно, що значно перевищує вміст фізрозчину (0,15). Подібний стоматоцитоз еритроцитів при високій іонній силі відзначається у середовищах, що містять комбіновані складі з включенням солей: Na_3 -цитрат, MgSO_4 , MgCl_2 та Na_2SO_4 [13]. Ці солі містять 2,3-валентні іони, які можуть мати стоматогенний ефект. У цукрозному середовищі відзначається

ретрансформація еритроцитів у 3 фази: диски \rightarrow ехіноцити \rightarrow диски \rightarrow стоматоцити. Показано, що Ca^{2+} , який був доданий у середовище перед внесенням клітин, інгібує фазу ехіноцитозу та сприяє стоматогенному ефекту [2]. Останній для подібних катіонів (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} та La^{3+}), показаний раніше на еритроцитах і тінях [14]. Крім того, відомо, що додавання цитрату натрію в інкубаційне середовище з іонною силою 0,15 є умовою прояву стоматогенного ефекту середовища на клітини [15].

Модель зміни форми еритроцитів основана на залежності натягу двовимірного іонного гелю спектрину від рН, передбачає, що цитоскелет мембрани латерально скорочуватиметься при низькому значенні рН і розширюватиметься при високому, викликає ехіноцитоз і стоматоцитоз, відповідно. У цій моделі слід враховувати підвищення внутрішньоклітинних концентрацій K^+ та Na^+ , яке в інтактних еритроцитах пов'язане зі стисненням клітин та підвищенням pH_{in} . Ці катіони посилюють екранування негативних зарядів спектрину, що може протидіяти ефек-

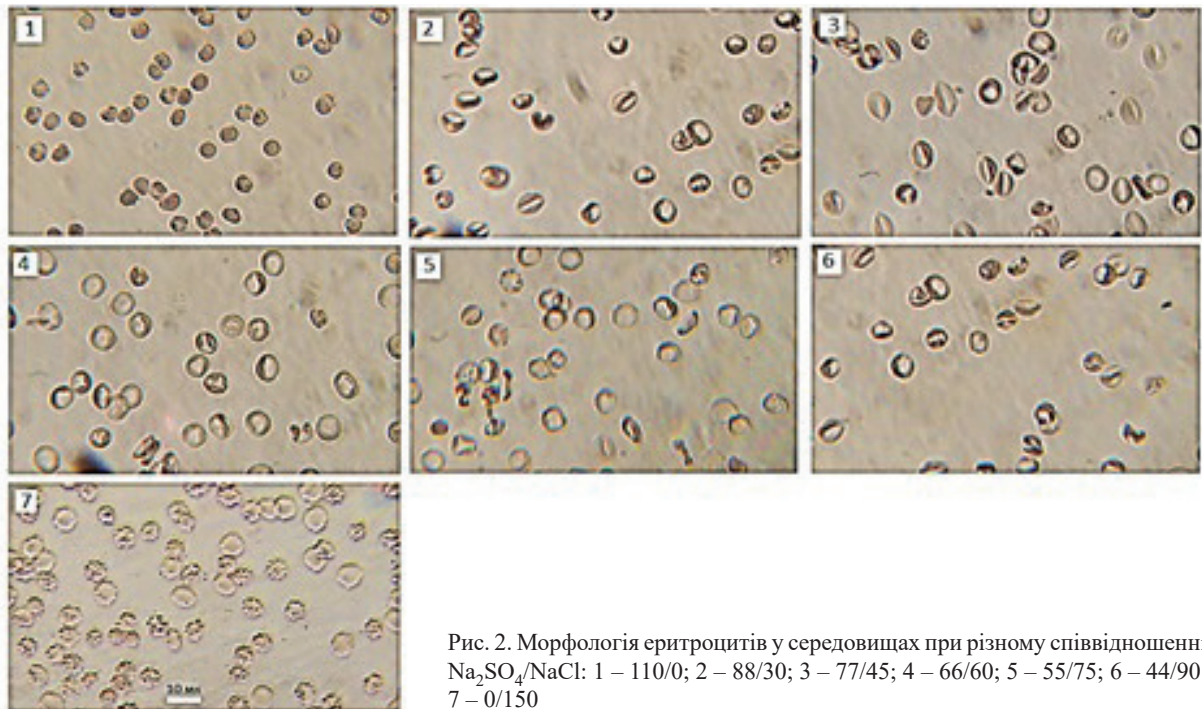


Рис. 2. Морфологія еритроцитів у середовищах при різному співвідношенні $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$: 1 – 110/0; 2 – 88/30; 3 – 77/45; 4 – 66/60; 5 – 55/75; 6 – 44/90; 7 – 0/150

ту підвищення pH_{in} на цитоскелет і сприяти ехіноцитозу [1]. З одного боку, прогноз цієї моделі відповідає експерименту в середовищі з низькою іонною силою (0,03) при зниженому вмісті хлориду (30 ммоль/л NaCl і сахароза), що спричиняє підвищення pH_{in} [17] та призводить до стоматоцитозу [18]. У такому разі незначне стиснення еритроцитів і таке саме підвищення внутрішньоклітинних концентрацій катіонів [17] не є вирішальним, і до того ж, чинить додатковий стоматогенний фактор – позитивний мембранний потенціал [18, 19]. Разом з тим показано, що мембранний потенціал не має незалежного впливу на форму еритроцитів [12]. У зазначеному середовищі ефект позитивного потенціалу може усунутись при стисканні еритроцитів, що призводить до ехіноцитозу. Тоді як зміна іонної сили середовища у ряді 0,04–0,15, при стійких показниках pH_{in} та об'єму еритроцитів, не впливало на дискоїдну морфологію клітин [12]. Це вказує на те, що морфологія еритроцитів не залежить від іонної сили, а визначається вмістом хлориду в середовищі, зниження якого при заміщенні на сахарозу викликає підвищення pH_{in} [17], яке є основним фактором стоматоцитозу.

З іншого боку, при високому значенні pH в ізотонічному середовищі (150 ммоль/л NaCl, pH 10), де відбувається підвищення pH_{in} [17], навпаки, відзначається ехіноцитоз еритроцитів з високим індексом (сфероєхіноцити, індекс 4) [20]. Разом з тим зниження концентрації хлориду в середовищі викликає пригнічення ехіногенного ефекту високого значення pH. Так, у середовищі, що містить 100 ммоль/л KCl, 20 ммоль/л глюконат калію і 50 ммоль/л CHES (pH 10) відзначається ехіноцитоз із середнім індексом 2 [12]. Тоді як у середовищі, що містить 10 ммоль/л KCl, 6 ммоль/л глюконат калію і 50 ммоль/л CHES (pH 9,0) еритроцити представлені ехіноцитами стадій I і II, з невисоким вмістом форми III і низьким ехіноцитарним індексом (1,4) [3]. Ці дані літератури до певної міри узгоджуються з отриманими нами результатами.

При зниженні концентрації NaCl від 150 до 105 ммоль/л в умовах перемішування еритроцитів підвищується число дискоїдних клітин, ступінь яких підтримується при зниженні NaCl до 45 ммоль/л (див. рис. 1). За винятком механічного перемішування еритроцити морфологічно представлені стоматоцитами (див. рис. 2). Стоматогенний ефект сульфатохлоридного середовища з високою іонною силою (0,3; див. рис. 2) може відзначатися підвищення pH_{in} , що спостерігається в сахарозо-хлоридному середовищі [17]. Оскільки сульфатне середовище викликає значний викид іонів водню з еритроцитів людини, що не характерно для еритроцитів форелі [21]. Розрахункові дані показали, що заміна у середовищі хлориду на двозарядний сульфат може призвести до зниження натягу мембрани [22]. У разі зниження натягу зовнішнього моношару мембрани щодо внутрішнього моношару призводить до стоматоцитозу [16]. Тому стоматоцитоз еритроцитів у сульфатохлоридному середовищі може бути результатом дії одного або двох супутніх факторів (pH_{in} та натяг мембрани).

Представлені дані літератури щодо впливу pH_{in} на форму еритроцитів у експерименті, не дають відповіді на питання про зміну форми в руслі крові при механічному впливі динамічного потоку і стінок мікросудин. У разі механічного перемішування еритроцитів зростання концентрації хлориду в середовищі до 105 ммоль/л викликає підвищення ступеня дискоїдних клітин (див. рис. 1). Зростання концентрації до 150 ммоль/л призводить до зниження числа дискоїдів, де еритроцити морфологічно представлені, в основному, ехіноцитами (див. рис. 2). Це вказує на існування в мембранах сайтів 2 типів, зв'язування хлориду з 1-м типом визначає розвиток дискоїдної форми, зв'язування аніона з 2-м типом визначає зниження ступеня дискоїдів та розвиток ехіноцитарних форм еритроцитів. Слід відзначити, що у сироватці крові концентрація хлориду становить 98–107 ммоль/л [23], що збігається з максимальною

концентрацією, за якої відзначається стійкість дискоїдних форм еритроцитів (див. рис. 1). Зазначений вміст хлориду в сироватці, це необхідний рівень, який підтримується фізіологічними механізмами і не виключено, що саме така концентрація хлориду потрібна для стабілізації дискоцитів. Отримані результати та наведені дані літератури вказують на те, що при нормальному значенні рН зниження концентрації хлориду в середовищі нижче від 0,15 моль/л може справляти дискогенний ефект. Крім того, навіть в умовах потужної ехіногенної дії високого значення рН середовища на еритроцити, зменшення концентрації хлориду спричиняє зменшення ехіноцитарного індексу. Все в сумі вказує на те, що зміна ступеня заповнення хлоридзв'язувальних сайтів може бути одним з факторів регуляції форми еритроцитів.

Запропоновано модель вхідної порожнини аніонного каналу, яка включає позитивно заряджені залишки амінокислот, що зв'язують аніони (K430, K539, K542, K851, R432, R730) [24], при цьому R730 є складником транспортного сайту [25]. Інгібітор аніонного переносника DIDS при взаємодії в каналі нейтралізує позитивно заряджений амінокислотний залишок K542 [26] і вносить у вхідну порожнину дві свої SO_3^- -групи, одна з яких нейтралізує R730 [25]. Аргенінові залишки R646 та R656 позаклітинного N-глікозильованого сегмента аніон-транспортного білка, а також лізинові залишки K539, K542 та K851 трансмембранних сегментів можуть здійснювати динамічне контактування з фосфатними групами анулярних фосфатидилхолінів [25]. Разом з тим у вхідну порожнину каналу можуть включатися зазначені залишки лізину, з якими зв'язуються хлорид та блокатори DIDS та піридоксаль-фосфат [24, 25]. Ці дані показують, що включення молекул DIDS у порожнину каналу призведе до порушення контакту зазначених залишків лізину з фосфатними групами ліпідів і порушення кінетики зв'язування хлориду. Не виключено, що ці залишки аргенінів та лізину утворю-

ють специфічний зв'язок з міжфазною зоною каналу, а деякі з них можуть бути пусковими сенсорами трансформації еритроцитів.

Мутація R730C викликає інгібування $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обміну та спадковий стоматоцитоз [9]. Це підкреслює роль зазначеного амінокислотного залишку у транспорті та у стабілізації нормальної дискоїдної форми еритроцитів. Результати показали, що додавання NaCl в сульфатне середовище з еритроцитами викликає розвиток флуктуації ОЩ, тобто ретрансформацію клітин у диски (рис. 3). Включення інгібітора аніонного переносника DIDS у суспензію клітин перед внесенням NaCl викликає блокування ефекту NaCl. Ці результати вказують на те, що дискогенний ефект хлориду визначається зв'язуванням аніона з аргеніновим або лізиновим залишком аніонного переносника.

Положення про існування в мембранах хлорид та рН-чутливих сенсорів, які запускають механізм зміни форми еритроцитів [2], узгоджується з гіпотезою про контроль галідами локального електростатичного потенціалу (ψ_s) та рН (рНs) у міжфазних ділянках аніонного каналу. В еритроцитах, що суспендовали у сахарозному або сульфатному середовищі, може відзначатися підвищення позитивного ψ_s та рНs [27]. Очевидно, що доданий у ці суспензії хлорид може надійти у зазначені міжфазні ділянки, де його зв'язування із залишками лізину або аргеніну призведе до відновлення електростатичної структури [27] та, можливо, форми клітин.

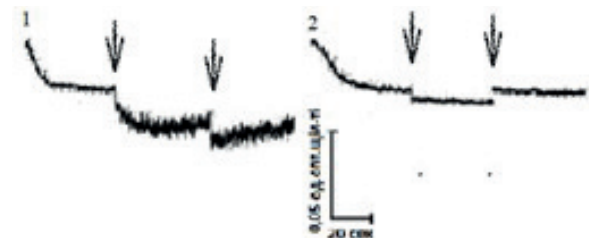


Рис. 3. Вплив послідовного додавання NaCl (25 ммоль/л) та DIDS (2 мкмоль/л) (1) або DIDS та NaCl (2) на розвиток флуктуації оптичної щільності суспензії еритроцитів у середовищі, що містить 110 ммоль/л Na_2SO_4 . \downarrow – моменти додавання реагентів

Таким чином, отримані результати показують, що в сульфато-хлоридних середовищах при фізіологічному значенні рН (7,4) еритроцити морфологічно представлені стоматоцитами, тоді як механічне перемішування клітинної суспензії сприяє ретрансформації стоматоцитів у дискоїдні форми. Водночас у фізіологічному розчині (рН 7,4) еритроцити морфологічно представлені ехіноцитами та диско-ехіноцитами, водночас механічне перемішування не сприяє ретрансформації цих форм клітин. Крім того, у сульфатному середовищі (рН 7,4) також не виявляється зазначеної особливості перемішування. Результати вказують на існування в мембранах 2 типів хлоридзв'язувальних сайтів. Заповнення хлоридом 1-го типу при концентрації NaCl у середовищі 15–105 ммоль/л призводить до розвитку дискоїдних форм еритроцитів. Заповнення 2-го типу сайтів при концентрації NaCl у середовищі 105–150 ммоль/л спричинює розвиток ехіноцитозу і, можливо, визначає наявність різних форм клітин. Встановлено, що дискогенний вплив NaCl (25 ммоль/л) на еритроцити у сульфатному середовищі блокується інгібітором аніонного каналу DIDS. Це пов'язано з тим, що білок смуги 3, який формує аніонний переносник, може включати хлоридзв'язувальні сайти, що сприяють стабілізації дискоцитів. Отримані результати вказують на те, що властивість ретрансформуючого механічного перемішування здійснюється тільки на стоматоцитарних формах еритроцитів при заповненні хлоридом сайтів 1-го типу. Тоді як ехіноцитарні клітини, форма яких визначається зв'язуванням хлориду з 2-м типом сайтів, втрачають здатність ставати дискоїдними. Зміна ступеня заповнення хлоридом зазначених типів сайтів може бути складовою механізму модифікації форми еритроцитів.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations

and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

V.V. Ramazanov, S.V. Rudenko

SHAPE CHANGES OF RED BLOOD CELLS DURING MECHANICAL STIRRING AND REPLACEMENT IN THE MEDIUM OF SULFATE TO CHLORIDE

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov; e-mail: ramazanovvictor9891@gmail.com

At low pH, red blood cells (RBCs) are unable to maintain their disc shape and become stomatocytes. At the same time, at pH 5.0 of a sulphate medium, under conditions of mechanical mixing of the cell suspension, RBCs are partially retransformed into discoid forms, whereas in a chloride medium (pH 5.0) this transformation is observed to a high degree. This indicates that the chloride-binding sites of RBC membranes may be an additional link in the regulation of the shape of RBC under conditions of mechanical action on the cell suspension. The work investigated the change in the RBC shape at a normal pH value (7,4) due to the replacement of Na₂SO₄ in the medium with NaCl and recording an increase in the intensity of fluctuations in optical density (OD), as an indicator of an increase in the level of discoid cells (normocytes) in a stirred cell suspension. It has been established that in a medium containing Na₂SO₄ (110 mmol/l), RBCs are transformed into small stomatocytes within ~20 s. With an increase in NaCl concentration in the range of 15-105 mmol/l, an increase in the level of discoid cells is noted. Increasing the NaCl concentration from 105 to 150 mmol/l, on the contrary, causes a decrease in the level of discoid cells. With the exception of mechanical mixing in a medium with NaCl concentrations of 30-90 mmol/l, RBCs are morphologically stomatocytes. Whereas in a medium containing 150 mmol/l NaCl, RBC are represented by disc-echinocytes and echinocytes. The results obtained show that mechanical mixing of the cell suspension promotes the retransformation of stomatocytic RBCs into discoid forms. The weakening of the retransforming efficiency of mixing with an increase in the NaCl concentration in the medium from 105 to 150 mmol/l and the development of echinocytosis at 150 mmol/l NaCl indicates the existence of 2 types of sites for chloride. Chloride binding to type 1, at a NaCl concentration in the medium of 15-105 mmol/l, leads to the establishment of discoid forms of RBC. Chloride binding to type 2 sites, at a NaCl concentration in the medium of 105-150 mmol/l, leads to the development of echinocytosis. The retransforming property of mechanical stirring may be associated with a change in the degree of chloride binding to these types of sites.

Key words: red blood cells; RBC; chloride; sulfate; cell shape.

REFERENCES

1. Radosinska J, Vrbjar N. Erythrocyte deformability and Na,K-ATPase activity in various pathophysiological situations and their protection by selected nutritional antioxidants in humans. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11924.
2. Rudenko SV. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1798(9):1767-78.
3. Gedde MM, Yang E, Huestis WH. Shape response of human erythrocytes to altered cell pH. *Blood.* 1995;86(4):1595-9.
4. Gimsa J, Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Mol Membr Biol.* 1995;12(3):247-54.
5. Remigante A, Morabito R, Marino A. Band 3 protein function and oxidative stress in erythrocytes. *J Cell Physiol.* 2021; 236(9): 6225-34.
6. Ramazanov VV, Volovelskaya EL, Rudenko SV. Shape modification of erythrocytes with stilbene-disulfonate. The 6th International scientific and practical conference "Science, innovations and education: problems and prospects". CPN Publ Group, Tokyo, Japan. 2022 Jan. P. 67-74.
7. Passow H. Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1986;103:61-203.
8. Hoefner DM, Blank ME, Davis BM, Diedrich DF. Band 3 antagonists, p-azidobenzylphlorizin and DIDS, mediate erythrocyte shape and flexibility changes as characterized by digital image morphometry and microfiltration. *J Membr Biol.* 1994;141(1):91-100.
9. Frumence E, Genetet S, Ripoche P, Iolascon A, Andolfo I, Le Van Kim C, et al. Rapid Cl⁻/HCO⁻ exchange kinetics of AE1 in HEK293 cells and hereditary stomatocytosis red blood cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(6):654-62.
10. Son M, Lee YS, Lee MJ, Park Y, Bae HR, Lee SY, et al. Effects of osmolality and solutes on the morphology of red blood cells according to three-dimensional refractive index tomography. *PLoS One.* 2021;16(12):e0262106.
11. Jay AW. Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys J.* 1975;15(3):205-22.
12. Gedde MM, Huestis WH. Membrane potential and human erythrocyte shape. *Biophys J.* 1997;72(3):1220-33.
13. Rasia M, Bollini A. Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1372(2):198-204.
14. Sheetz MP. Cation effects on cell shape. *Prog Clin Biol Res.* 1977;17:559-67.
15. Deuticke B. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. *Biochim Biophys Acta.* 1968;163(4):494-500.
16. Stokke BT, Mikkelsen A, Elgsaeter A. Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanochemical properties. *Biophys J.* 1986;49(1):319-27.
17. Glaser R, Donath J. Stationary ionic states in human red blood cell. *Bioelectrochem Bioenerget.* 1984;13(1-3):71-83.
18. Glaser R. Does the transmembrane potential (Delta psi) or the intracellular pH (pHi) control the shape of human erythrocytes? *Biophys J.* 1998;75(1):569-70.
19. Müller P, Herrmann A, Glaser R. Further evidence for a membrane potential-dependent shape transformation of the human erythrocyte membrane. *Biosci Rep.* 1986;6(11):999-1006.
20. Bessis M. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1972;12(6):721-45.
21. Romano L, Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell. *Am J Physiol.* 1984;246(3 Part 1):330-8.
22. Ramazanov VV, Rudenko SV. Red blood cells morphology in environment with high ionic strength, containing sulphate// Modern research in science and education. Proceedings of the 6th International scientific and practical conference. BoScience Publisher. Chicago, USA. 2024. P. 29-38.
23. Li H, Sun S, Yap JQ, Chen J, Qian Q. 0.9% saline is neither normal nor physiological. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2016;17(3):181-7.
24. Zhekova HR, Pushkin A, Kayik G, Kao L, Azimov R, Abuladze N, et al. Identification of multiple substrate binding sites in SLC4 transporters in the outward-facing conformation: Insights into the transport mechanism. *J Biol Chem.* 2021;296:100724.
25. Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, Sansom MSP, Alguel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(7 Part A):1507-32.
26. Salhany JM, Schopfer LM, Kay MM, Gamble DN, Lawrence C. Differential sensitivity of stilbenedisulfonates in their reaction with band 3 HT (Pro-868-->Leu). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(25):11844-8.
27. Wieth JO, Bjerrum PJ. Titration of transport and modifier sites in the red cell anion transport system. *J Gen Physiol.* 1982;79(2):253-82.

*Матеріал надійшов
до редакції 23.10.2023*