

6. USEPA—US Environmental Protection Agency (2002) *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. EPA-821-R-02-012. Washington, DC. pp 120-154.

7. Даллакян Г.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*. *Вода: химия и экология*, 2013, № 10, с. 102-106. [Dallakyan G.A., Ageyeva I.V., Bratkovskaya L.B. Vliyaniye shungita na funktsional'nyuyu aktivnost' mikrovdorosley *Scenedesmus quadricauda*. *Voda: khimiya i ekologiya*, 2013, no. 10, pp. 102-106. (In Russ.)]

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ Ca^{2+} И ФЛАВОНОИДОВ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ ГОЛУБЯ

Сюсин И.В., Ревин В.В., Девяткин А.А.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

ул. Ульянова, 26б, г. Саранск, 430000, РФ

e-mail: ilya.sysin@gmail.com

Аннотация. С помощью метода лазерной интерференционной микроскопии показано, что увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубирования до 3,5 мМоль приводит к изменениям морфологических характеристик эритроцитов голубя. Происходит уменьшение площади клетки и оптической разности хода, которая прямо пропорциональна толщине клетки. Добавление в суспензию эритроцитов, инкубируемых в присутствии высоких концентраций кальция, флавоноидов, выделенных из плодов черной смородины, значения площади и оптической разности хода были сравнимы с контрольными значениями. Мы предполагаем, что из-за своих свойств флавоноиды связывают свободные ионы Ca^{2+} , что приводит к ингибированию процессов направленных на изменение морфологических характеристик эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты голубя, ионы кальция, лазерно-интерференционная микроскопия.

EFFECT OF HIGH CONCENTRATIONS OF IONS Ca^{2+} ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PIGEON'S ERYTHROCYTES

Syusin I.V., Devyatkin A.A., Revin V.V.

Ogarev Mordovia State University

Ulyanov St., 26b, Saransk, 430000, Russia

e-mail: ilya.sysin@gmail.com

Abstract. Using the method of laser interference microscopy, it was shown that an increase in the concentration of Ca^{2+} ions in the incubation medium to 3.5 mM results in changes in the morphological characteristics of the pigeon's erythrocytes. There is a decrease in the area of the cell and the optical path difference, which is directly proportional to the thickness of the cell. Adding to the suspension of erythrocytes incubated in the presence of high calcium concentrations, flavonoids isolated from black currant fruit, the area values and the optical path difference were comparable with the control values. We assume that, because of their properties, flavonoids are bound by free Ca^{2+} ions, which leads to inhibition of processes aimed at changing the morphological characteristics of erythrocytes.

Keywords: Pigeon erythrocytes; Calcium ions; Laser-interference microscopy.

Ионы Ca^{2+} являются универсальными физиологическими агентами, которые участвуют во многих процессах жизнедеятельности эритроцитов. Действия Ca^{2+} проявляется на уровне целой клетки [1-4], на состояние бислоя клеточной мембраны [5], на уровне мембраносвязных и отдельных ферментных систем [6-8]. В литературе имеются данные о том, что увеличение ионов Ca^{2+} приводит к изменению объема клетки [9] и снижению деформируемости эритроцитов из-за работы Са-зависимых К-каналов [10]. Однако, в настоящее время все еще мало данных о механизмах влияния высоких концентраций ионов Ca^{2+} на морфологические характеристики эритроцитов и механизмах защиты клеток от осмотического стресса.

Для защиты организма от воздействия высоких концентраций металлов можно применять фенольные соединения, которые способны хелатировать ионы металлов [11]. Из литературных данных известно, что ионы Ca^{2+} активны только в свободном состоянии. Однако, когда ионы Ca^{2+} образуют комплекс с каким-либо веществом, то активность данных ионов уменьшается.

В связи с выше изложенным, представляло интерес установить корреляцию между морфологическими характеристиками эритроцитов при действии высоких концентраций ионов Ca^{2+} и флавоноидов.

Объектом исследования служили эритроциты периферической крови голубя. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5000 ед/мл). Эритроциты получали путем центрифугирования цельной крови при 1500g в течении 15 минут, эритроциты подвергали трехкратной промывке фосфатным буфером (рН=7,4). Эритроциты разбавляли 1:1 (v/v) фосфатным буфером (рН=7,4) и добавляли раствор CaCl_2 , так что бы конечная концентрация Ca^{2+} составляла 3,5 мМ и раствор флавоноидов, выделенных из плодов черной смородины, в концентрации 0,0025 мг/мл. Инкубацию вели при температуре 40°C. Забор проб осуществляли по прошествии 0, 10, 20, 30 минут.

Морфологические изменения в эритроцитах изучали с помощью метода ЛИМ на автоматизированном интерференционном микроскопе МИИ-4М (Россия). С помощью данного метода исследуется динамика

изменения формы клетки и ее структура, а также функциональное состояние [12,13]. В работе использовали лазер с длиной волны 650 нм, объектив с увеличением x32 и числовой апертурой 0,65. Обработку интерференционных изображений производили с помощью программы fiji-win32.

Мы проводили исследование изменения параметров суспензии эритроцитов голубя при высокой концентрации кальция в среде инкубирования и экстрактом флавоноидов, выделенных из плодов черной смородины. Мы регистрировали такие параметры клеток как площадь (см. рис. 1а) и максимальную оптическую разность хода лучей (ОРХ), которая характеризует толщину клетки (см. рис. 1б).

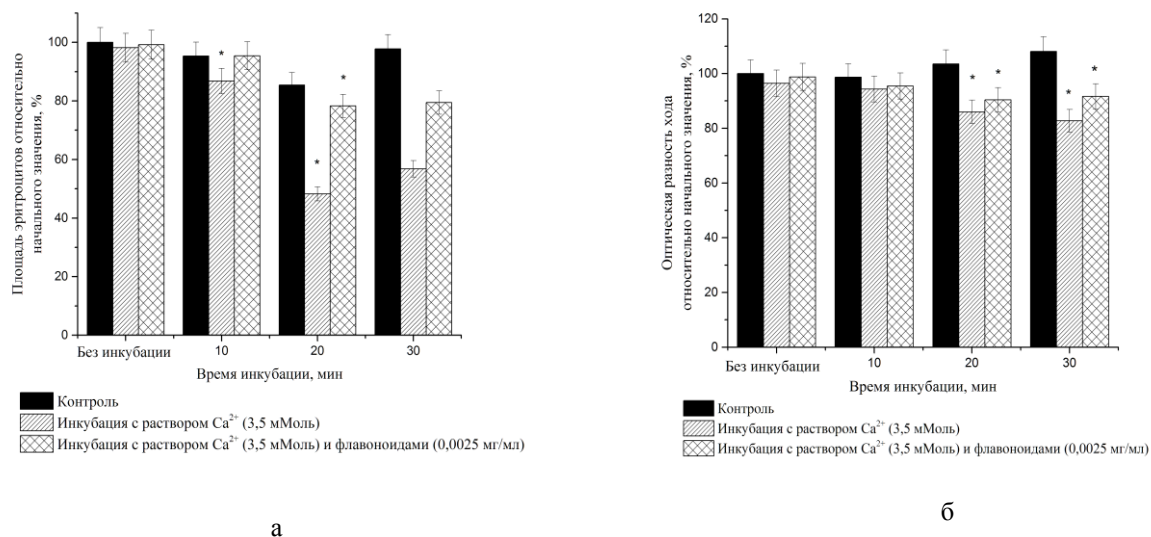


Рисунок 1 – Параметры эритроцитов голубя, полученные с помощью ЛИМ: а – площадь эритроцитов; б – максимальная оптическая разность хода луча, * – p < 0,05

Как можно видеть из представленных графиков, площадь эритроцита контрольного образца не значительно изменяется со временем (см. рис. 1а). При добавлении в суспензию эритроцитов раствора CaCl₂ в начальный момент времени происходит не значительное уменьшение площади эритроцитов в пределах погрешности. По истечению 20 минут инкубации мы наблюдаем резкое уменьшение площади на 15,4%. Дальнейшее увеличение времени инкубирования до 30 минут происходит возрастание данного параметра и становится сравним с контрольным значением.

В варианте опытов с флавоноидами мы так же наблюдаем изменение площади эритроцитов, однако они менее выражены. Так по истечению 20 минутной инкубации значение площади в опыте с повышенной концентрацией ионов Ca²⁺ и флавоноидами было на 8,4% больше относительно данного параметра в опыте с добавлением раствора CaCl₂. При увеличении времени инкубации до 30 минут площадь в опыте с флавоноидами и кальцием не изменялась.

На следующем этапе нашего эксперимента мы исследовали изменение ОРХ. Данный параметр позволяет судить о распределении внутриклеточного вещества и говорить о физической толщине эритроцита, так как значение ОРХ прямо пропорционально произведению показателя преломления и толщины объекта. Результаты нашего исследования представлены на рисунке 1б.

Из полученных данных видно, что с увеличением времени инкубации в контрольном образце происходят изменение данного параметра, мы предполагаем, что это связано с недостатком питательных веществ в клетке.

При увеличении концентрации ионов Ca²⁺ в среде инкубирования значение ОРХ изменяется. Так по истечению 20 минут инкубации значение ОРХ в данном образце уменьшается на 13,6% относительно контрольной пробы, инкубируемой без присутствия кальция. Увеличение времени до 30 минут инкубирования приводит к дальнейшему уменьшению данного показателя. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при увеличении в среде инкубирования концентрации кальция происходят процессы, которые направлены на изменение геометрических параметров клетки.

При добавлении в пробу раствора CaCl₂ и флавоноидов мы наблюдали схожие изменения с теми, что мы наблюдали в опыте с кальцием, однако эти изменения были менее выражены. По истечению 20 минут инкубации значение ОРХ в опыте с флавоноидами и кальцием было на 4,5% больше относительно проб, инкубируемых только с раствором кальция.

Мы предполагаем, что такие изменения связаны с активацией Ca-зависимых K-каналов, которые активируются при увеличении концентрации кальция, тем самым приводя к тому, что ионы K⁺ и Cl⁻ выходят из клетки, изменяя объем клетки и как следствие площадь клетки [14,15]. Увеличение концентрации ионов Ca²⁺ приводит не только к нарушению ионного баланса клетки, а также это может привести к нарушению состояния белкового каркаса мембраны эритроцитов и изменениям фосфолипидного состава, что приводит к изменениям деформируемости клеток и изменению объема [10]. При добавлении флавоноидов данные процессы идут менее

интенсивно, скорее всего это связано с тем, что флавоноиды способны образовывать комплексы с ионами металлов, что приводит к уменьшению концентрации свободных ионов.

Благодарности: Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России №1.4539.2017/8.9

Список литературы / References:

1. Angka L., Lee E.A., Rota S.G. Glucopsychosine increases cytosolic calcium to induce calpain-mediated apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Letters*, 2014, vol. 348, pp. 29-37.
2. Bogdanova A., Makhro A., Wangetal J. Calcium in Red Blood Cells – A Perilous Balance. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, pp. 9848-9872.
3. Bruce J.I., Elliott A.C. Oxidant-impaired intracellular Ca^{2+} signaling in pancreatic acinar cells: role of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2007, vol. 293, no. 3, pp. 938-950.
4. Zaidi A. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. *World J Biol Chem.*, 2010, vol. 1, iss. 9, pp. 271-280.
5. Woon L.A., Holland J.W., Kable E.P. Ca^{2+} sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium*, 1999, vol. 25, pp. 313-320.
6. Carafoli E., Santella L., Branca D. Brini, Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Biochem. Mol. Biol.*, 2001, vol. 36, pp. 107-260.
7. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, vol. 99, pp. 1115- 1122.
8. Garcia C.S.N.B., Prota L.F.M., Morales M.M. Understanding the mechanisms of lung mechanical stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2006, vol. 39, pp. 697-706.
9. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Рязжский Г.Г. О механизме регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану при изменении объема клетки. *Биол. мембраны*, 1988, № 8 (5), с. 1030-1041. [Orlov S.N., Pokudin N.I., Ryazhsky G.G. On the mechanism of regulation of ion transport through the plasma membrane with a change in cell volume. *Biol. Membranes*, 1988, no. 8 (5), pp. 1030-1041. (In Russ.)]
10. Трубочева О.А., Шахристова Е.В., Галич А.И., Петрова И.В. Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов. *Вестник ТГПУ*, 2011, вып. 5, с. 69-72. [Trubacheva O.A., Shakhristova E.V., Galich A.I., Petrova I.V. The Effect of Elevated Ca^{2+} -dependent Potassium Permeability of Erythrocyte Deformability. *Vestnik TSPU*, 2011, iss. 5, pp. 69-72. (In Russ.)]
11. Рошаль А.Д., Сахно Т.В. Теоретический анализ структуры комплексов 5- гидроксифлавонолов с ионами металлов и производными бора. *Вестник Харьковского национального университета*, 2001, вып. 7 (30), с. 123-129. [Roshal' A.D., Sahno T.V. Theoretical analysis of the structure of complexes of 5-hydroxyflavonols with metal ions and boron derivatives. *Vestnik Har'kovskogo nacional'noho universiteta*, 2001, iss. 7 (30), no. 532, pp. 123-129. (In Russ.)]
12. Юсипович А.И., Берестовская Ю.Ю., Шутова В.В., Левин Г.Г., Герасименко Л.М., Максимов Г.В., Рубин А.Б. Новые возможности исследования микробиологических объектов методом лазерной интерференционной микроскопии. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 6, с. 1091-1098. [Yusipovich A.I., Berestovskaya Y.Y., Shutova V.V., Gerasimenko L.M., Maksimov G.V., Rubin A.B., Levin G.G. New possibilities of studying microbial objects by laser interference microscopy. *Biophysics*, 2011, vol. 56, iss. 6, pp. 1063-1068. (In Russ.)]
13. Revin V.V., Filatova S.M., Syusin I.V., Yazykova M.Yu., Revina E.S., Gromova N.V., Devyatkin A.A. Study of correlation between state and composition of lipid phase and change in erythrocytes structure under induction of oxidative processes. *International Journal of Hematology*, 2015, vol. 101, iss. 5, pp. 487-496.
14. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular physiology and biochemistry*, 2005, vol. 15, p. 195-202.
15. Syusin I.V., Revin V.V., Tychkov A., Solomadin I., Revina N., Devyatkin A.A. Study of Morphological Characteristics of Pigeon's Erythrocytes and Hemoglobin Properties under the Influence of Ions Ca^{2+} . *Biology and Medicine*, 2016, vol. 7, iss. 4, pp. 1-4.