НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧАБАНЕНКО ОЛЕНА ОЛЕКСІЇВНА

УДК 611.018.51:57.043:577.352.4:547.42/43

ДИСЕРТАЦІЯ

РЕАКЦІЯ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ НА ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК І ВИДАЛЕННЯ КРІОПРОТЕКТОРУ ПІСЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ

за спеціальністю 091 – біологія
09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ (О.О. Чабаненко)

Науковий керівник д.б.н., пров.н.с. Н.М. Шпакова

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Чабаненко О.О. Реакція еритроцитів ссавців на постгіпертонічний шок і видалення кріопротектору після заморожування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню дії факторів кріопошкодження на еритроцити ссавців під час розморожування та на етапі видалення гліцерину (дегліцеринізація), а також розробці підходів, які дозволяють підвищити стійкість клітин із залученням амфіфільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин.

На даний час в Україні запаси донорської крові людини суттєво обмежені внаслідок зменшення кількості донорів, поширення захворювань, що передаються з кров'ю, та збільшення попиту на неї за умов надзвичайних ситуацій і проведення бойових дій. Кріоконсервування еритроцитів при низьких та наднизьких температурах дозволяє постійно мати їх у наявності продовж тривалого терміну. Останнім часом все більш приділяється увага пошуку шляхів модернізації існуючих методів довгострокового зберігання еритроцитів, а саме – на вдосконалення процедури дегліцеринізації.

Успіхи в цьому напрямку неможливі без проведення фундаментальних досліджень у напрямку поширення уявлень щодо механізмів кріопошкодження та кріозахисту клітин. Постгіпертонічний шок еритроцитів моделює вплив на еритроцити факторів, які діють на етапі

розморожування, а також після перенесення у кров'яне русло клітин, кріоконсервованих під захистом проникного кріопротектору.

Використання амфіфільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин, для дослідження особливостей розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців, які відрізняються білково-ліпідним складом їх мембран, дозволить сформувати цілісне уявлення щодо механізму антигемолітичної дії амфіфільних сполук за умов постгіпертонічного шоку. Амфіфільні сполуки, що застосовувалися в роботі, характеризуються різним трансбішаровим розподілом у мембрані: неіонний децил-β,D-глюкопіранозид та аніонний децилсульфат натрію вбудовуються в зовнішній моношар ліпідного бішару і викликають трансформацію клітин за типом дискоцит-ехіноцит; катіонні трифторперазин і хлорпромазин – у внутрішньому моношарі з супутньою зміною форми клітин за типом дискоцит-стоматоцит.

У дисертаційній роботі *вперше* показано антигемолітичну активність амфіфільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців (людина, кролик, щур) за температури 0°С. Порівняльний аналіз ефективності амфіфільних сполук за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів різних видів ссавців виявив наступне: для еритроцитів людини величини максимальної антигемолітичної активності усіх амфіфільних сполук сумірні і знаходяться в діапазоні 60-70%; для клітин кролика більш ефективними є аніонний децилсульфат натрію та неіонний децил-β,D-глюкопіранозид ($АГ_{макс}$ активність становила 71 та 72% відповідно), а для еритроцитів щура – катіонні хлорпромазин і трифторперазин ($АГ_{макс}$ активність – 81 і 84% відповідно). На підставі того факту, що амфіфільні сполуки, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, проявляють антигемолітичну активність за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів, можна вважати, що для запобігання

розвитку гемолітичної пори на етапі регідратації клітин важливою є не наявність або відсутність заряду, а саме амфіфільність сполук.

Для оцінки стану клітин, які збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку і амфіфільних сполук (при 0°С), використовували тест, пов'язаний з нагріванням еритроцитів до 37°С. *Отримані результати* свідчать, що еритроцити людини, які збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку (0°С) і децилсульфату натрію (400 мкмоль/л), є стійкими до подальшого нагрівання (до 37°С), а після застосування трифторперазину (150 мкмоль/л) і децил-β,D-глюкопіранозиду (600 мкмоль/л) – чутливими до підвищення температури. При цьому в присутності трифторперазину розвиток гемолізу еритроцитів спостерігається за температури 20°С і вище, а при використанні децил-β,D-глюкопіранозиду – тільки за 37°С.

Проведення мікроскопічних досліджень дозволило простежити за поведінкою окремо взятих еритроцитів, які збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку і амфіфільних сполук (0°С), за умов підвищення температури. У разі використання трифторперазину у зразку за температур 4–12°С присутні еритроцити з ознаками стоматоцитозу. У процесі подальшого нагрівання зразку відбувається розвиток двох подій: клітини набувають ознак сферостоматоцитозу, а їх кількість у полі зору зменшується. При використанні децил-β,D-глюкопіранозиду за 4–8°С в зразку спостерігаються округлі клітини, які з підвищенням температури (від 12 до 28°С) набувають ознак ехіноцитозу, а при подальшому підвищенні температури (37°С) з'являються тіні еритроцитів. Після використання аніонного децилсульфат натрію та підвищення температури незначно збільшується розмір клітин, але їх кількість не змінюється.

Результати вивчення чутливості еритроцитів людини, попередньо насичених гліцерином, до дії постгіпертонічного шоку показали, що постгіпертонічний гемоліз клітин залежить від використовуваної

концентрації кріопротектору і температури експерименту. Виявлено, що у присутності гліцерину (у концентраціях 5, 10, 15%) за температури 37°С підвищується рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів тільки у разі використання високої концентрації (15%) кріопротектору, тоді як за температури 0°С гліцерин викликає підвищення постгіпертонічного гемолізу в усьому концентраційному діапазоні. Рівні постгіпертонічного гемолізу еритроцитів у присутності гліцерину (15%) за температур 0 та 37°С суттєво відрізняються (38 та 93% відповідно) на відміну від контрольних клітин. Результати вивчення температурної залежності постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), показали різке зниження рівня гемолізу еритроцитів (приблизно в 3 рази) в температурному діапазоні 5-25°С.

Зважаючи на те що, рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів визначається умовами середовища дегідратації, тому вивчали чутливість еритроцитів до дії постгіпертонічного шоку за умов використання комбінованих середовищ, які містять проникний гліцерин і непроникний хлорид натрію в різних співвідношеннях (загальна осмоляльність 2370 мОсм/л) на етапі дегідратації. У вищевказаних умовах гліцерин в концентрації 2-7% у складі комбінованих середовищ не викликав додаткового пошкодження еритроцитів порівняно з контролем (середовище дегідратації 7% NaCl), тоді як гліцерин в концентрації (11-15%) призводив до підвищення постгіпертонічного гемолізу еритроцитів за температури 37 і 0°С. Це свідчить про те, що розвиток постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини не визначається загальною осмоляльністю комбінованого середовища на етапі дегідратації.

Слід зазначити, що використання амфіфільних речовин за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), дозволяє нівелювати раніше виявлену пошкоджувальну дію кріопротектору.

Гліцерин є проникним кріопротектором, тому після розморожування еритроцитів необхідний етап його видалення з клітин. У роботі після насичення і врівноваження еритроцитів із кріоконсервантом на основі гліцерину (ЦНДІГПК 11_4) суспензію еритроцитів швидко заморожували шляхом занурення в рідкий азот (–196°С). Після розморожування еритроцитів здійснювали процедуру видалення кріопротектору з клітин способом трикратного серійного центрифугування.

Вперше виявлено, що за умов дегліцеринізаціі еритроцитів людини, заморожених до –196°С під захистом гліцерину (15%), трифторперазин, децилсульфат натрію та децил-β,D-глюкопіранозид знижують рівень гемолізу клітин і проявляють при цьому високу антигемолітичну активність (42, 52 і 74% відповідно).

Порівняльний аналіз отриманих в роботі результатів свідчить про те, що як за умов моделі постгіпертонічного шоку, так і при видалені гліцерину з розморожених еритроцитів усі амфіфільні сполуки, незалежно від характеру їх трансмембранного розподілу, знижують рівень гемолізу та мають високу антигемолітичну активність. Оскільки захисний ефект амфіфільних сполук виявлено у модельному експерименті та за умов заморожування-розморожування еритроцитів людини, можна підтвердити доцільність застосування моделі постгіпертонічного шоку для вивчення дії факторів кріопошкоджень на клітини.

На підставі отриманих результатів і аналізу літературних даних можна припустити, що як за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів, так і при дегліцеринізації клітин ефективність амфіфільних речовин, швидше за все, обумовлена їх здатністю вбудовуватися в мембрану в місця формування дефектів, і у такий спосіб значно збільшувати критичний гемолітичний об’єм клітин і, як наслідок, запобігати їх руйнуванню.

Ключові слова: еритроцити ссавців, постгіпертонічний шок, постгіпертонічний гемоліз, гліцерин, дегліцеринізація, амфіфільні сполуки.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових виданнях України

1. Семионова ЕА, **Чабаненко ЕА**, Орлова НВ, Зубов ПМ, Шпакова НМ. К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27 (3): 219 – 29. (Scopus)
2. **Чабаненко ЕА,** Шапкина ОА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние глицерина на постгипертонический шок эритроцитов. Вісник проблем біології і медицини. 2018; 2 (143): 379 – 82.
3. **Чабаненко ЕА,** Орлова НВ, Шпакова НМ. Реакция эритроцитов на изменение температурно-осмотических условий среды в присутствии глицерина. Доповіді Національної академії наук України. 2019; (2): 84 – 9.
4. **Чабаненко ЕА**, Ершова НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние амфифильных соединений на постгипертонический шок эритроцитов человека. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2019; 33: 84 – 90.
5. **Чабаненко ОО,** Єршова НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив децилсульфату натрію та хлорпромазину на постгіпертонічний шок еритроцитів ссавців. Біологія тварин, 2019; 21 (4): 84 – 90.
6. **Чабаненко ОО,** Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив сумісної дії проникального і непроникального компонентів середовища на розвиток постгіпертонічного лізису еритроцитів людини. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (3):236 – 46. (Scopus)

Наукові праці, які засвічують апробацію матеріалів дисертації

Статті в збірках матеріалів конференцій

7. **Чабаненко ОО**, Сєміонова КА, Шапкіна ОО, Орлова НВ. Стійкість кріоконсервованих еритроцитів при видаленні гліцерину. Science and life: Proceedings of article the international scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary - Kiev, Ukraine; 2017, с. 674 – 8.

8. **Chabanenko OO**, Shapkina OO, Orlova NV, Shpakova NM. Glycerol-based improvement of erythrocytes posthypertonic shock model. Modern methodologies, innovations and operational experience in the field of biological sciences; 2017 Dec 28; Lublin, Republic of Poland; 2017. p. 205 – 8.

9. **Чабаненко ЕА**, Ершова НА, Орлова НВ, Ершов СС, Шпакова НМ. Коррекция чувствительности эритроцитов млекопитающих к постгипертоническому шоку в присутствии децилсульфата натрия. Природничі науки: історія, сучасність, майбутнє, досвід ЄС: матеріали. міжнародної наукуво-практичної конференції. м. Влоцлавек, Республіка Польща, Вересень 27–28.09. 2019 м. Влоцлавек, 2019. с. 143 – 6.

Тези наукових доповідей конференцій

10. **Чабаненко ЕА,** Семионова ЕА, Шпакова НМ. Эритроцит как объект криобиологических исследований. Матеріали ІІ міжнародної. науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії»; 2015 Листоп 12-13. Харків: НФаУ «Наука»; 2015, с. 383 – 4.

11. **Чабаненко ОО,** Сєміонова КА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Ефективність хлорпромазину в модельних експериментах і при видаленні гліцерину з кріоконсервованих еритроцитів. Матеріали VIII Всеукраїнської

науково-практичної конференції. «Біологічні дослідження – 2017», 2017 Березня 14–16; Житомир:ЖДУ ім. Івана Франка; 2017, с. 348 – 50.

12. **Чабаненко ЕА**, Шпакова НМ, Орлова НВ. Влияние хлорпромазина на устойчивость эритроцитов млекопитающих в условиях гипотонического шока. LXXI Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017»; 2017. с. 220.

13. **Чабаненко ЕА**, Семионова ЕА, Шпакова НМ. Хлорпромазин и постгипертонический шок как модель повреждения криоконсервированных клеток при их отогреве. Проблемы криобиологии и криомедицины; 2017; 27 (2): 161. (Scopus)

14. **Чабаненко ЕА**, Ковалев ГА. Перспективы применения глицерина для профилактики контактных отморожений. Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики; 2018 Квіт 20; Харків; 2018, с. 247.

15. **Чабаненко ЕА**, Шпакова НМ, Орлова НВ. Чувствительность эритроцитов человека к постгипертоническому шоку в присутствии глицерина. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 183. (Scopus)

16. **Чабаненко ОО**, Шпакова НМ, Орлова НВ. Антигемолітична ефективність хлорпромазину та його влив на структурно-динамічний стан мембран еритроцитів. Матеріали Тематичного VII з’їзду Українського біофізичного товариства; 2018 Жовт 29–31; Київ; 2018, с. 22.

17. **Chabanenko OO**, Orlova NV, Shpakova NM. Glycerol and posthypertonic shock of erythrocytes when varing medium temperature and osmolality. Cryobiology. 2018 Dec; 85: 179.

18. **Чабаненко ОО**, Єршова НА, Ніпот ОЄ, Єршов СС, Шапкіна ОО, Орлова НВ, та ін. Вивчення постгіпертонічного пошкодження еритроцитів людини у модельному експерименті з

використанням амфіфільних сполук. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю від дня народження академіка Л.Т. Малої «Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: Досвід та нові напрямки розвитку», 2019 Квіт 11–12; Харків, 2019, с. 266.

19. **Chabanenko O**, Yershova N, Orlova N, Shpakova N. Antihemolytic activity of amphiphilic compounds under conditions of posthypertonic shock of human red blood cells. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine, p. 42.

20. **Чабаненко О,** Єршова Н, Орлова Н, Шпакова Н. Роль гліцерину в розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів людини. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine, p. 61.

21. **Чабаненко ЕА**, Орлова НВ, Шпакова НМ. Постгипертонический лизис эритроцитов в комбинированных средах. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29 (2): 154. (Scopus)

22. **Chabanenko OO**, Yershova NA, Shpakova NM. Effect of amphiphilic compounds on posthypertonic lysis of erythrocytes. Probl Cryobiol Cryomed. 2020; 30 (3): 286. (Scopus)

23. **Chabanenko O**, Yershova N, Shpakova N. Adequacy of posthypertonic shock model to real cryopreservation conditions during deglycerolization of erythrocytes. Cryobiology. 2020; 97: 276.

ANNOTATION

Chabanenko O.O. Response of mammalian erythrocytes to posthypertonic shock and cryoprotectant removal after freezing. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Philosophy in 09 – Biology in specialty 091 – Biology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis is devoted to research the effect of the factors of cryopreservation on mammalian erythrocytes during thawing and at the stage of glycerol removal (deglycerolization) and the development of approaches, improving the stability of cells involving amphiphilic compounds belonging to different classes of surfactant.

Currently the stocks of human donor blood in Ukraine are significantly limited by a reduced number of donors, spread of bloodborne diseases, and increased demand for blood due to emergencies and conducting the military operations. Cryopreservation of erythrocytes at low and very low temperatures allows their constant availability for a long term. Recently, more attention is paid to finding the ways to improve the existing methods of long-term storage of erythrocytes, namely, to boost the method of deglycerolization.

Progress in this area is impossible without fundamental research aimed at expanding the understanding of the mechanisms of cells cryodamage and cryoprotection. Posthypertonic shock of erythrocytes simulates the effect on them by the factors acting during the thawing stage, as well as during the transfer into the bloodstream of cells cryopreserved under the protection of a penetrating cryoprotective agent.

The usage of amphiphilic compounds belonging to different classes of surfactants in the study of the development of posthypertonic hemolysis of erythrocytes for different mammalian species, differing by protein-lipid

composition of their membranes, will provide a holistic notion of the mechanism of antihemolytic action of amphiphilic compounds under conditions of posthypertonic shock. The amphiphilic compounds used in this research are characterized with different transbilyaer distribution in membrane, i.e.: nonionic decyl-β, D-glucopyranoside and anionic sodium decyl sulfate are incorporated into the outer monolayer of the lipid bilayer and cause the transformation of discocyte-echinocyte; cationic trifluoperazine and chlorpromazine are done into the inner monolayer with accompanying change of the cells shape on the type of discocyte-stomatocyte.

In the thesis the antihemolytic activity of amphiphilic compounds belonging to different classes of surfactants under a posthypertonic shock of mammalian erythrocytes (human, rabbit, rat) at a temperature of 0°C was for the first time shown. Comparative analysis of the effectiveness of amphiphilic compounds under posthypertonic shock of erythrocytes of different mammalian species revealed the following: for human erythrocytes, the values of maximum antihemolytic activity of all amphiphilic compounds are comparable and were within range of 60-70%; for rabbit cells anionic sodium decyl sulfate and nonionic decyl-β, D-glucopyranoside are more effective (AH_{max} activity was 71 and 72%, respectively), and for rat erythrocytes those were cationic chlorpromazine and trifluoperazine (AH_{max}%) , i.e. 81 and 84%. Based on the fact that amphiphilic compounds belonging to different classes of surfactants exhibit an antihemolytic activity under posthypertonic shock of erythrocytes it can be assumed that to prevent the development of hemolytic pores at the rehydration stage not the presence or absence of a charge, but namely the amphiphilic features of compounds is important.

To assess the state of cells preserved after the combined action of posthypertonic shock and amphiphilic compounds (at 0°C), a test involving the heating of erythrocytes to 37°C was used. The findings testify that human erythrocytes, preserved after the combined action of posthypertonic shock (0°C)

and sodium decyl sulfate (400 μmol/L) are resistant to further heating (up to 37°C), and after usage of trifluoperazine (150 μmol/L) and decyl-β,D-glucopyranoside (600 μmol/L) they are sensitive to temperature rise. In the presence of trifluoperazine, the development of hemolysis of erythrocytes is observed at a temperature of 20°C and higher, and when using decyl-β, D-glucopyranoside it is found only at 37°C.

Performed microscopic studies enabled to track the behavior of individual erythrocytes preserved after a combined action of posthypertonic shock and amphiphilic compounds (at 0°C) with temperature increase. When using trifluoperazine the sample have erythrocytes with the signs of stomatocytosis at temperatures of 4–12°C. In the process of further heating of the sample, two events are developing: the cells acquire the signs of spherostomatocytosis, and their number in the field of view is sharply reduced. When using decyl-β,D-glucopyranoside at 4–8°C the sample there are found roundish cells, which with the temperature increase (from 12 up to 28°C) acquire the signs of echinocytosis, and with a further temperature rise (37°C) the erythrocytes' ghosts appear. After using the anionic sodium decyl sulfate and the temperature rise, the cell size is slightly enhanced, but without changing the amount.

The results of studying the sensitivity of human erythrocytes, pre-saturated with glycerol, to the action of posthypertonic shock showed that posthypertonic hemolysis of cells depends on the used concentration of cryoprotective agent and temperature of the experiment. It was found that in the presence of glycerol (in concentrations of 5, 10, 15%) at a temperature of 37°C increased the level of posthypertonic hemolysis of erythrocytes only when using a high concentration (15%) of cryoprotective agent, while at a temperature of 0°C the glycerol causes an increased posthypertonic hemolysis throughout the concentration range. Levels of posthypertonic hemolysis of erythrocytes in the presence of glycerol (15%) at temperatures of 0 and 37°C strongly differ (38 and 93%, respectively) in contrast to the control cells. The results of studying the

temperature dependence of posthypertonic hemolysis of erythrocytes pre-treated with glycerol (15%) showed a sharp decrease in the level of hemolysis of erythrocytes (approximately 3 times) within the temperature range of 5–25°C.

Due to the fact that the posthypertonic hemolysis level of erythrocytes is determined by dehydration medium conditions, therefore we studied the sensitivity of erythrocytes under posthypertonic shock using the combined media containing penetrating glycerol and non-penetrating sodium chloride in various ratios (total osmolality 2,370 mOsm/L). Under the above conditions, 2-7% glycerol in the combined media did not cause additional damage of erythrocytes compared to control (dehydration medium 7% NaCl), while glycerol at a concentration (11-15%) led to an increased posthypertonic hemolysis of erythrocytes at 37 and 0°C. This suggests that the development of posthypertonic hemolysis of human erythrocytes is not determined by total osmolality of the combined medium at the dehydration stage.

It should be noted that the usage of amphiphilic compounds under conditions of posthypertonic shock of erythrocytes, pre-treated with glycerol (15%), allows the neutralization of the level the previously detected damaging effect of cryoprotective agent.

Glycerol is a permeable cryoprotective agent, so after thawing of erythrocytes, a stage of its removal from cells is necessary. In our work, after saturation and equilibration of erythrocytes with glycerol-based cryopreservative (CSRIHBT 11_4), the erythrocyte suspension was rapidly frozen by immersion into liquid nitrogen (–196°C). After thawing of erythrocytes, the cryoprotective agent from the cells was removed by the method of three-fold serial centrifugation.

For the first time it was found that under deglycerolization of human erythrocytes frozen to –196°C under the protection of glycerol (15%), trifluoperazine, sodium decyl sulfate and decyl-β, D-glucopyranoside reduced

the level of hemolysis of cells and showed a high antihemolytic activity (42, 52 and 74% respectively).

Comparative analysis of obtained results in this work showed that both under the posthypertonic shock model and glycerol removal from thawed erythrocytes, all amphiphilic compounds, regardless of their transmembrane distribution, reduced hemolysis and had a high antihemolytic activity. Since the protective effect of amphiphilic compounds was found in a model experiment and under conditions of freeze-thawing of human erythrocytes, it is possible to confirm the expediency of using the posthypertonic shock model to study the effect of cryodamage factors on cells.

Based on the results and published reports' analysis, we can assume that both under posthypertonic shock of erythrocytes and deglycerolization of cells, the effectiveness of amphiphilic compounds is apparently stipulated by their ability to incorporate into the membrane at the sites of defect formation, and thereby significantly increase the critical hemolytic volume of cells and, as a consequence, prevent their destruction.

Key words: mammalian erythrocytes, posthypertonic shock, posthypertonic hemolysis, glycerol, deglycerolization, amphiphilic compounds.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 18
ВСТУП 19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 28
1.1. Роль гліцерину в природі і при кріоконсервуванні еритроцитів .. 28
1.2. Явище постгіпертонічного шоку 41
1.3. Амфіфільні сполуки як антигемолітичні агенти 47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 57
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ АМФІФІЛЬНИХ СПОЛУК НА ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ 70
3.1. Постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини в присутності амфіфільних сполук 71
3.2. Постгіпертонічний гемоліз еритроцитів кролика та щура в присутності амфіфільних сполук 82
3.3. Стійкість еритроцитів людини до нагрівання після сумісної дії постгіпертонічного шоку і амфіфільних сполук 99
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ГЛІЦЕРИНУ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ДО ДІЇ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ 110
4.1. Стійкість еритроцитів людини при варіюванні умов проведення постгіпертонічного шоку 111
4.2. Вплив сумісної дії проникного (гліцерин) і непроникного (хлорид натрію) компонентів середовища на розвиток постгіпертонічного гемолізу еритроцитів 131
РОЗДІЛ 5. ЗАСТОСУВАННЯ АМФІФІЛЬНИХ СПОЛУК НА ЕТАПІ ВИДАЛЕННЯ ГЛІЦЕРИНУ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ 142
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 159
ВИСНОВКИ 166
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 168

ДОДАТОК А. Список публікацій здобувача за темою дисертації 197
ДОДАТОК Б. Відомості про апробацію результатів дисертації..... 201

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AQP – аквапорин

C10 – децилсульфат натрію

C12 – додецилсульфат натрію

FSC – forward scatter (переднє розсіювання)

АГ активність – антигемолітична активність

$АГ_{макс}$ активність– максимальна антигемолітична активність

ГК – гіпертонічний кріогемоліз

ГЛ – гіпотонічний лізис

ГШ – гіпертонічний шок

ДГП – децил-β,D-глюкопіранозид

ККМ – критична концентрація міцелоутворення

ОГП – октил-β,D-глюкопіранозид

ПАР – поверхнево-активні речовини

ПГГ – постгіпертонічний гемоліз

ПГШ – постгіпертонічний шок

СМ – сфінгомієлін

ТФП – трифторперазин

ФЕА – фосфатидилетаноламін

ФГ – фосфатидилгліцерин

ФІ – фосфатидилінозитол

ФС – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолін

ХПР – хлорпромазин

ХС – холестерин

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Кріоконсервування забезпечує тривале зберігання біологічних об’єктів з подальшим відновленням їх функцій після розморожування. Саме низькотемпературне зберігання компонентів крові може забезпечувати потреби в їх запасах, що є необхідним при різних хірургічних втручаннях, лікуванні інфекційних і гематологічних захворювань [1 – 3], особливо для донорів з рідкісними групами крові [4]. В даний час запаси донорської крові людини в Україні суттєво обмежені скороченням кількості донорів, поширенням захворювань, що передаються з кров’ю, та збільшенням попиту на неї за умов надзвичайних ситуацій і проведення бойових дій.

Кріоконсервування біологічних об’єктів під захистом проникного кріопротектору складається з наступних етапів: насичення клітин кріопротектором, заморожування, зберігання, відігрівання та подальше видалення кріопротектору [5]. Зберігання еритроцитів при наднизьких температурах (–196°C) не призводить до їх пошкодження, тому що за цих умов загальмовується клітинний метаболізм [6]. Руйнування клітин відбувається на етапах заморожування і розморожування внаслідок дії кріопошкоджувальних факторів [7, 8]. Для визначення внеску кожного з них у загальне кріопошкодження клітин використовують модельні експерименти [9 – 12]. Гіпертонічний шок і гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів моделюють вплив на клітини кріопошкоджувальних факторів, що діють на етапі заморожування [7, 9]. Вплив на еритроцити факторів, що діють на етапі розморожування, вивчають за допомогою постгіпертонічного шоку [11]. Постгіпертонічний шок є моделлю, яка дозволяє вивчати вплив на еритроцити різкого зниження осмоляльності середовища (від гіпертонічних значень до ізотонічних).

Пошкодження еритроцитів в модельних експериментах пов’язано з формуванням і розвитком мембранних дефектів. Застосування низки мембранотропних речовин з різними фізико-хімічними властивостями дозволяє знизити рівень пошкодження клітин за умов гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців. Причому в ряді робіт показано, що ефективність речовин залежить як від ендогенних (особливості цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів різних видів ссавців), так і екзогенних факторів (температура, осмоляльність середовища та ін.). Використання амфіфільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин, дозволило досить повно вивчити особливості прояву їх антигемолітичної активності [9, 12].

Роботи з можливої корекції постгіпертонічного гемолізу еритроцитів поодинокі і розрізнені. Нещодавно проведені експериментальні дослідження показали, що як за умов постгіпертонічного шоку, так і на етапі видалення гліцерину з еритроцитів людини, які були піддані заморожуванню-відігріву, катіонна амфіфільна сполука хлорпромазин проявляє високу антигемолітичну активність [12]. Наразі залишаються відкритими ряд питань. По-перше, чи буде хлорпромазин проявляти ефективність за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів тварин, мембрани яких відрізняються білково-ліпідним складом від еритроцитарних мембран людини [13, 14]. По-друге, чи є виявлений антигемолітичний ефект хлорпромазину за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів людини і на етапі видалення гліцерину з розморожених клітин специфічним або він буде характерний і для інших амфіфільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин.

Виходячи з вищевикладеного, можна зробити висновок, що дослідження реакції еритроцитів ссавців на дію постгіпертонічного шоку і видалення гліцерину з розморожених клітин із залученням поверхнево-

активних речовин, що належать до різних класів, є актуальною проблемою кріобіології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота виконана в рамках відомчих науково-дослідних робіт відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за темами: «Дослідження чутливості еритроцитів ссавців до охолодження, дегідратації та заморожування при дії модифікуючих факторів і кріопротекторів» (номер державної реєстрації 0114U0001318); «Вивчення механізмів кріопошкодження еритроцитів ссавців на моделі постгіпертонічного шоку і після розморожування» (номер державної реєстрації 0119U100441), де автор самостійно виконувала окремі розділи.

Мета і завдання дослідження

Мета роботи – провести порівняльне дослідження ефективності амфіфільних сполук (хлорпромазин, трифторперазин, децилсульфат натрію, децил-β,D-глюкопіранозид) за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів і процесу дегліцеринізації клітин після заморожування (до -196ºС).

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні завдання.

1. Вивчити вплив амфіфільних сполук (катіонні трифторперазин і хлорпромазин, аніонний децилсульфат натрію, неіонний децил-β,D-глюкопіранозид) на чутливість еритроцитів ссавців (людина, кролик, щур) до дії постгіпертонічного шоку за температури 37 і 0°С.

2. Дослідити вплив підвищення температури на стан еритроцитів людини, що збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку та амфіфільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин із залученням спектрофотометричного і мікроскопічного методів.

3. Вивчити постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини в залежності від концентрації гліцерину, температури та співвідношення

проникного (гліцерин) і непроникного компонентів (NaCl) у складі комбінованого середовища на етапі дегідратації.

4. Дослідити в порівняльному аспекті можливість використання амфіфільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, на етапі дегліцеринізації еритроцитів, заморожених до –196°С під захистом гліцерину (15%).

Об'єкт і предмет дослідження

Об'єкт дослідження – явище постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців.

Предмет дослідження – стійкість еритроцитів ссавців (людина, кролик, щур) за умов постгіпертонічного шоку та при видаленні гліцерину з розморожених еритроцитів у присутності амфіфільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин.

Методи дослідження

У роботі були використані наступні методи дослідження: спектрофотометрія, світлова мікроскопія з використанням термоприставки, проточна цитофлуориметрія, осмометрія, рефрактометрія, а також метод швидкого заморожування еритроцитів із використанням кріоконсерванту ЦНДІГПК 11_4 на основі гліцерину із подальшим видаленням кріопротектору способом трикратного серійного центрифугування. За допомогою статистичних методів проведено аналіз отриманих експериментальних даних.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше показана ефективність амфіфільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців за температури 0°С, при цьому для еритроцитів людини величини максимальної антигемолітичної активності усіх досліджувальних амфіфільних сполук сумірні (60-70%), для клітин кролика більш ефективними є аніонний децилсульфат натрію і неіонний

децил-β,D-глюкопіранозид, а для клітин щура – катіонні хлорпромазин і трифторперазин. *Отримані нові результати* щодо стійкості до подальшого нагрівання (0÷37°C) еритроцитів людини, які збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку і різних амфіфільних сполук (0°C). У присутності трифторперазину розвиток гемолізу еритроцитів спостерігається за температури 20°C і вище, а при використанні децил-β,D-глюкопіранозиду – тільки за 37°C; при застосуванні децилсульфату натрію еритроцити виявилися стійкими до подальшого нагрівання. *Вперше* модель постгіпертонічного шоку еритроцитів людини була доповнена дослідженнями з використанням гліцерину. Показано, що за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів людини рівень пошкодження клітин залежить від концентрації гліцерину і температури. Гліцерин при використанні в концентраціях 5, 10, 15% призводить до підвищення рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів за температури 0°C, тоді як за температури 37°C – тільки у разі використання кріопротектору в концентрації 15%. *Отримані нові результати* щодо розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини при застосуванні комбінованих середовищ (гліцерин і хлорид натрію в різних співвідношеннях, загальна осмоляльність 2370 мОсм/л) на етапі дегідратації. Показано, що гліцерин в концентрації 2–7% у складі комбінованих середовищ не викликає пошкодження еритроцитів порівняно з контролем (середовище дегідратації 1,2 моль/л NaCl), тоді як гліцерин в концентрації (11-15%) призводить до підвищення постгіпертонічного гемолізу еритроцитів за температури 37 і 0°C. *Вперше* показана висока ефективність амфіфільних сполук, які є представниками різних класів поверхнево-активних речовин, при дегліцеринізації розморожених еритроцитів людини, після кріоконсервування (–196°C). При цьому найбільш високу антигемолітичну активність проявляв неіонний децил-β,D-глюкопіранозид (70%).

Практичне значення роботи

Розроблений підхід спрямованої корекції чутливості еритроцитів до постгіпертонічного шоку із застосуванням амфіфільних сполук може бути використаним для підвищення стійкості клітин за екстремальних умов.

Наукові результати щодо ефективності представників катіонних, аніонних і неіонних амфіфільних сполук під час дегліцеринізації розморожених еритроцитів людини значно розширюють базу для подальшого пошуку мембранотропних сполук природного походження, здатних проявляти антигемолітичну активність на етапі видалення гліцерину з клітин. Результати дисертаційної роботи можуть бути рекомендовані для використання в навчальному процесі під час підготовки фахівців у кріобіології, мембранології, фармакології і ветеринарії.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Основні результати роботи отримані здобувачем особисто. Автором проаналізована сучасна зарубіжна та вітчизняна наукова література з досліджуваної проблеми, сформульована мета і визначені завдання роботи, сплановані та проведені експерименти, статистично оброблені та проаналізовані результати. Спільно з науковим керівником здійснено аналіз експериментальних досліджень і їх інтерпретація, сформульовані висновки. Роботи, опубліковані у співавторстві з д.б.н. Шпаковою Н. М. і к.б.н. Орловою Н. В., містять результати спільного планування й обговорення результатів. Опубліковані в співавторстві наукові статті повністю відображають концепцію роботи, підтверджують ідеї і рішення поставлених дисертантом завдань.

Автор висловлює щиру подяку колективу відділу кріоцитології ІПКіК НАН України, а також співавторам наукових публікацій за допомогу у проведенні експериментів, за участь в обговоренні результатів

та за наукові дискусії, що дозволило краще спланувати і виконати дисертаційне дослідження.

В опублікованих спільно зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

– у роботі [89] – у проведенні досліджень методом проточної цитофлуорометрії, аналізі, обговоренні результатів та формулюванні висновків.

– у роботі [142] – у плануванні дослідження, аналізі, обговоренні результатів та формулюванні висновків та підготовці матеріалів до друку.

– у роботах [152, 170, 179 – 183] – у плануванні роботи, обґрунтування постановки задач, участь в експериментальних дослідженнях з проведення постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців та вимірювання гемолізу спектрофотометричним методом, у визначені антигемолітичної активності амфіфільних речовин та у статистичній обробці отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку.

– у роботі [184] – у плануванні експериментів, проведенні дослідження морфології еритроцитів ссавців із залученням амфіфільних сполук, аналізі електронно-мікроскопічних фотографій, у проведені нагрівання зразків досліджувальних за допомогою термоприставки/водяної ванни, обговоренні отриманих результатів, формулюванні висновків.

– у роботах [196, 197, 199, 200, 215 – 219] – у формулюванні ідеї та плануванні дослідження; в проведенні експериментальної частини досліджень з вивчення впливу гліцерину, який додавали на різних етапах постгіпертонічного шоку, аналізі та обговоренні результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

– у роботах [231 – 234] – в обґрунтуванні постановки задач, у проведенні швидкого заморожування еритроцитів людини із використанням кріоконсерванту ЦНДІГПК 11_4 з подальшим видаленням гліцерину із залученням амфіфільних сполук, що належать до різних класів

поверхнево-активних речовин, у розрахунку антигемолітичної активності амфіфільних речовин, статистичній обробці отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на наукових форумах: у II міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2015); VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції. «Біологічні дослідження – 2017», (Житомир, 2017); LXXI міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017» (Беларусь, Минск, 2017); 41-ій 42-ій 43-ій 44-ій щорічних конференціях молодих вчених «Холод в біології та медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (Харків, 2017, 2018, 2019, 2020); міжнародній науковій конференції «Science and life» (Чеська Республіка, Карлові Вари – Україна, Київ, 2017); міжнародній науковій конференції «Modern methodologies, innovations and operational experience in the field of biological sciences» (Люблін, Республіка Польща, 2017); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики» (Харків, 2018); 55-му і 57-у щорічних зібраннях Товариства кріобіології «CRYO 2018» (Іспанія, Мадрид, 2018) та «CRYO 2020» (США, Чикаго. 2020); VII з’їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 2018); науковій-практичній конференції з міжнародною участю «Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: Досвід та нові напрямки розвитку» (Харків, 2019); міжнародній науковій конференції «6th Ukrainian congress for cell biology with international representation» (Яремче, 2019); міжнародній науково-практичній конференції «Природничі науки:

історія, сучасність, майбутнє, досвід ЄС» (Влоцлавек, Республіка Польща, 2019); 56-й щорічній зустрічі Товариства з низьких температур у біології «SLTB 2020» (Бельгія, Брюссель, 2020).

Публікація матеріалів.

Основні положення та наукові результати дисертаційної роботи опубліковано в 23 наукових працях, серед яких 6 статей у наукових фахових виданнях (2 з них цитуються у міжнародній базі Scopus) та 3 статті у інших наукових виданнях, 14 тез доповідей міжнародних і національних наукових конференцій.

Об’єм і структура дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 202 сторінках друкованого тексту (з яких 149 сторінок основної частини). Дисертація містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, 3 розділи власних досліджень і їхнє обговорення, узагальнення, висновки, список використаної літератури та 2 додатків. Список літератури містить 235 джерел, у тому числі 140 зарубіжні, розміщених на 29 сторінках тексту. Робота ілюстрована 14 таблицями і 45 рисунками, з яких 8 – мікрофотографій.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль гліцерину в природі і при кріоконсервуванні еритроцитів

Еритроцити – високоспеціалізовані клітини, які не мають ядра і більшості органел та не здатні до поділу. Еритроцити відіграють центральну роль у підтримці гомеостазу та виконують багато найважливіших функцій в організмі, основною з яких є транспорт кисню і вуглекислого газу. До того ж еритроцити виконують поживну, ферментативну, захисну, буферну функції, разом з тим вони забезпечують групову приналежність крові, беруть участь в гемостазі, регуляції кислотно-лужного стану, водно-сольового обміну, в імунних реакціях, у зв’язуванні і перенесенні амінокислот, ліпідів, вірусів, гормонів, а також лікарських засобів [15, 16].

Функціональні характеристики еритроцита обумовлені структурними особливостями його будови. Еритроцити мають двоввігнуту форму і характеризуються високим значенням відношення площі поверхні до об’єму клітини. Ефективність газообміну забезпечується великою площею поверхні, тоді як еластичність еритроцитарної мембрани дозволяє клітині легко змінювати форму і таким чином, проходити крізь вузькі капіляри, розміри яких менше діаметру цієї клітини [17, 18].

Час життя еритроцитів людини у крові становить 100 – 120 днів, руйнуються вони в селезінці та печінці, лише невелика їх частина піддається фагоцитозу в судинному руслі. Середній діаметр еритроцита за нормальних умов становить 7 – 8 мкм. Популяція еритроцитів неоднорідна за формою і розмірами. У крові людини в нормі основну масу (80 – 90%) складають еритроцити двоввігнутої форми – дискоцити. Крім того,

зустрічаються планоцити (з плоскою поверхнею) і старіючі форми еритроцитів – шиповидні або ехіноцити (~ 6%), куполоподібні, або стоматоцити (~ 1 – 3%), і кулясті, або сфероцити (~ 1%). Розрізняють оборотні форми еритроцитів (ехіноцити і стоматоцити), які можуть повертатися до дискоцитів, і необоротно змінені форми (акантоцити, кодоцити, сфероцити і необоротно змінені стоматоцити).

Структура еритроцита складається з поверхневого шару – мембрани і строми клітини – цитоплазми. Будова еритроцита досить проста, але це не стосується архітектоніки його мембрани. Еритроцитарна мембрана ссавців складається з трьох шарів – глікокаліксу, ліпід-білкового матриксу і цитоскелету. Мембрана являє собою ліпідний бішар, пронизаний трансмембранними білками. Зсередини мембрана вистелена білками цитоскелету, а зовні розташований глікокалікс, який складається з вуглеводних залишків інтегральних білків. Загальна будова мембрани та певний набір в ній ліпідів та білків є генетично детермінованими і зберігаються в процесі еволюції [16, 19, 20]. Ліпідний бішар плазматичних мембран за фізіологічних умов є динамічною структурою, яка знаходиться в рідкому агрегатному стані.

Форма еритроцитів і механічні властивості їх мембран (дуже висока лінійна пружність і незначна розтяжність) підтримуються білок-білковими і білок-ліпідними взаємодіями [21]. Найбільш відомими серед них є зв’язки між білками цитоскелету (горизонтальні взаємодії) і містки між мембранним скелетом і різними мембрано пов’язаними білками, ліпідами (вертикальні взаємодії). Вважають, що горизонтальні взаємодії відповідальні за підтримання архітектури і стабільності білкової мережі [22], тоді як вертикальні взаємодії значимі за умов стресу, так як вони забезпечують взаємодію ліпідного бішару з білковим цитоскелетом [23].

Інтерес до еритроцитів обумовлений важливістю виконуваних ними функцій, основною з яких є транспортування кисню і вуглекислого газу.

Обов’язковими показаннями до проведення гемотрансфузії є гостра крововтрата (більше 20% об’єму циркулюючої крові); важкі травматичні операції, що супроводжуються великим пошкодженням тканин і кровотечею; травматичний шок II–III ступеня та хвороби крові. Переливання компонентів крові може бути призначене як допоміжний захід у випадку анемії (гемоглобін < 80 г/л, гематокрит < 30%), порушеннях згортання крові, запальних захворюваннях з важкою інтоксикацією при отруєннях, довготривалих кровотечах, хронічних запаленнях, зниженні імунного статусу організму [24].

Еритроцити є життєво необхідними, тому вкрай важливо мати певні запаси крові. Виходячи з цього, питання щодо розробки заходів для забезпечення довготривалого зберігання компонентів крові є актуальним. Зберігання біологічного матеріалу за гіпотермічних умов дозволяє лише частково вирішити вищезазначену проблему, тому що в цьому разі термін зберігання є обмеженим лише кількома тижнями [24].

Відомо, що тварини за типом теплообміну поділяються на теплокровних (гомойотермні) та холоднокровних (пойкілотермні). У разі зниження температури навколишнього середовища гомойотермні тварини, які підтримують приблизно постійну температуру тіла, реагують виробленням енергії, тоді як пойкілотермні – пристосувальними реакціями [25].

Стійкість до заморожування – є однією з вершин розвитку адаптації живих організмів, що дозволяє окремим видам витримувати несприятливі умови навколишнього середовища, і, як наслідок, поширюватися і завойовувати найхолодніші регіони Землі. Більшість морозостійких тварин можуть вижити за несприятливих умов впродовж тривалого часу (від декількох днів до місяців). За цих умов у них спостерігаються радикальні зміни, що призводять до загальмування життєво важливих функцій. Морозостійкість проявляється у різних груп тварин, які переносять

температури нижче за 0°С [26]. До них відносяться численні комахи, різні приливні безхребетні (окремі черевоногі молюски, двостулкові молюски, мушлі), дрібні ґрунтові безхребетні, земноводні та рептилії [27 – 29], а також деякі види рослин та мікроорганізмів [30].

Серед хребетних тварин, які переносять заморожування, лідерами є дві євразійські саламандри: *Salamandrella keyserlingii* та *Salamandrella schrenckii*. Вони демонструють повну виживаність при впливі температури –10, –15 або –20°С, а деякі особини витримують значення температури –30 або –35°С [31, 32].

У тих видів тварин, для яких тривале заморожування (дні, тижні) має важливе значення для їх зимового виживання, спостерігається перетворення значної кількості води на позаклітинний лід. Лід – це поганий розчинник, тому розчинені речовини не включаються до кристалів льоду і осмоляльність залишку позаклітинної рідини підвищується. Як наслідок, вода виходить з клітин, і об’єм клітин/органів зменшуються по мірі накопичення льоду. Стиснення клітин понад критичного мінімального об’єму може призвести до повного пошкодження мембран [26].

Заради виживання при низьких температурах живі організми виробили дві стратегії, які спрямовані або на запобігання заморожуванню, або на забезпечення толерантності до заморожування. Поширеною ознакою морозостійкості серед холоднокровних тварин є накопичення високих концентрацій низькомолекулярних органічних молекул, які діють як кріопротектори. Наземні безхребетні зазвичай накопичують великі кількості осмолітів, зокрема гліцерину [33].

При дослідженні виживання за умов заморожування трьох видів лісових жаб (*Rana sylvatica*, *Hyla versicolor* і *Hyla crucifer* (нині *Pseudacris crucifer*) було встановлено, що відсоток льоду, розрахований для виду гілід, становив 35%, (від загального вмісту), а рівень гліцерину у м’язах і сечовому міхурі – 300 ммоль/л. Сукупність даних свідчить про те, що

гілідні жаби піддаються сезонному накопиченню гліцерину в період осіннього загартовування холодом (подібно комахам) для забезпечення базового рівня кріозахисту, але за умов заморожування в їх організмі може запускатися додатковий синтез гліцерину і глюкози [34]. Саламандра *Salamandrella keyserlingii* [31] як і гілідні жаби, використовує гліцерин як кріопротектор, як правило, в поєднанні з деякою кількістю глюкози [34, 35].

Синтез гліцерину в організмі тварин здійснюється в основному в печінці і включає перетворення глюкозо-6-фосфат на триозофосфати за допомогою гліколізу з подальшою дією гліцерин-3-фосфатдегідрогенази та гліцерин-3-фосфатази з утворенням гліцерину, який потім виводиться з печінки і розподіляється по всіх клітинах. За умов заморожування гліцерин (разом з глюкозою та ін.) підвищує осмоляльність рідини організму і діє колігативно, зводячи до мінімуму зменшення об’єму клітин. При цьому збільшена кількість мембранних переносників (аквапорини, аквагліцеропорини, переносники глюкози), сприяючи розподілу води і кріопротекторів між внутрішньо- і позаклітинним просторами, забезпечує структурну і функціональну цілісність клітин після відігріву [26].

Аквапорини (AQP) представляють собою інтегральні мембранні білки, через які здійснюється транспорт води набагато швидше, ніж шляхом дифузії через ліпідний бішар. При цьому через аквапорини не проходять іони та більшість розчинених речовин. Аквагліцеропорини – це водні канали, які переносять гліцерин і кілька інших невеликих незаряджених розчинених речовин, таких як CO_2, аміак і сечовину. Аквапорини відіграють важливу роль в перерозподілі води всередині тіла земноводних або рептилій під час заморожування і відігріву [36].

При вивченні сірої деревної жаби Коупа (*Hyla chrysoscelis*), яка використовує гліцерин як кріопротектор, було показано, що рівень білка

аквагліцеропорину значно різнився між акліматизованими до тепла (20°C) і до холоду (4°C) жабами і був в 2,3 раза вище в еритроцитах останніх [26].

Дослідження японської деревної жаби *Hyla japonica* продемонстрували роль аквагліцеропоринів у її виживанні під час заморозків. Вплив температури –4°C продовж 6 годин (з подальшим 1 годинним відновленням) на жаб призводить до підвищення рівня гліцерину в сироватці крові розморожених жаб (в 10 разів) порівняно з не замороженими тваринами, які знаходяться в сплячці. Аквагліцеропорин (AQP-h9) був виявлений в 11 органах жаб, що досліджувались. Цей білок полегшував транспорт води та гліцерину, що було визначено за допомогою аналізу набухання. Коли кРНК-AQP-h9 вводили в яйця *Xenopuslaevis,* проникність гліцерину збільшувалася приблизно в 4 рази і пригнічувалась в разі додавання $HgCl_2$ [37].

Крім того, при дослідженні деревних жаб Аляски [38] було показано, що взимку (на відміну від літа) в плазматичних мембранах печінки підвищується вміст фосфатидилетаноламіну (ФЕА) і знижується вміст фосфатидилсеріну (ФС). Це може збільшити текучість мембран при низьких температурах навколишнього середовища. У жаб з Огайо взимку спостерігалося аналогічне збільшення ФЕА в мембранах печінки, але при цьому знижувався рівень фосфатидилхоліну (ФХ).

Таким чином, стійкість до заморожування пойкілотермних організмів, що розглядається з позицій пристосувальних реакцій до надзвичайних умов існування, і оцінюється як одна з вершин розвитку адаптації живих організмів, забезпечується комплексною зміною їх метаболізму, основна роль в яких відводиться синтезу гліцерину як кріозахисної сполуки і зміни складу мембран, спрямованих на забезпечення транспорту гліцерину і води в клітині і організмі в цілому [26]. Продовження досліджень в даному напрямку стало підставою для

розвитку кріобіології з використанням гліцерину при кріоконсервуванні різних біологічних об’єктів [5, 7, 39 – 41].

Слід зазначити, що гліцерин знайшов застосування в більш ніж 2000 напрямках промисловості: у виробництві косметичних і миючих засобів та пластмас, у сільському господарстві, у текстильній, паперовій, шкіряній, лакофарбовій галузях промисловості. У харчової промисловості він частіше зустрічається під назвою «харчовий стабілізатор Е422». Гліцерин використовується у фармацевтичній промисловості як основа для мазей і паст, а також для отримання тринітрогліцерину, який має судиннорозширюючу дію та застосовується в медицині для лікування стенокардії [42, 43].

Гліцерин (або гліцерол) згідно класифікації IUPAC має назву пропан-1,2,3-тріол (propane-1,2,3-triol) або пропантріол-1,2,3. Зручніше застосовувати тривіальну назву – гліцерин, тому що ця назва входить до багатьох похідних сполук на його основі $C_3H_5(OH)_3$. Гліцерин – це триатомний спирт, що являє собою в’язку прозору рідину з солодким смаком [5, 39].

Встановлення кріозахисних властивостей гліцерину за природних умов заморожування біологічних об’єктів різної складності організації було підставою для застосування цієї сполуки в лабораторних умовах для цілеспрямованого збереження біологічного матеріалу. Це стало підґрунтям для розвитку теоретичної та практичної кріобіології [5, 7, 39].

Кріоконсервування – це процес збереження структури і функції біологічних систем в результаті заморожування і зберігання за наднизьких температур. При кріоконсервуванні (на відміну від гіпотермічного зберігання) фізіологія клітин не залежить від тривалості зберігання в замороженому стані, тому кріоконсервування є єдиною сучасною технологією, яка підтримує *ex vivo* біологічні функції і забезпечує тривале зберігання об’єкта [44].

При використанні гліцерину в якості кріопротектору було проведено успішне кріоконсервування сперми в 1949 році [7]. Перші успішні результати кріоконсервування еритроцитів людини були продемонстровані ще в 1950 році [41].

Наразі існує два сучасних підхода до кріоконсервування еритроцитів за допомогою проникного кріопротектору гліцерину із використанням різних швидкостей заморожування (швидкого та повільного) [6, 8, 40, 45, 46]. Технології кріоконсервування клітин донорської крові людини за ультранизьких (–150÷–196°C) та помірно низьких (–70÷–80°C) температур базуються на застосуванні початкових концентраціях гліцерину 30 – 40% та 57 – 80% відповідно. Захисний ефект гліцерину реалізується шляхом обмеження формування кристалів льоду та мінімізації впливу розчинених речовин і клітинної дегідратації впродовж заморожування [6]. Значний недолік застосування гліцерину як кріопротектору – це необхідність його видалення з розморожених еритроцитів перед трансфузією. До теперішнього часу в усьому світі для проведення безпечних процедур насичення і видалення гліцерину використовують закритий автоматизований пристрій Haemonetics ACP–215 (Haemonetics, США) (рис. 1.1) [47].

Розморожування еритроцитів повинно бути швидким, щоб запобігти росту кристалів льоду (рекристалізація). Кріоконтейнер поміщають у водяну ванну з автоматичною регуляцією температури 40 – 42°C при постійному погойдуванні. Одразу після розморожування розпочинають процедуру відмивання для зниження вмісту гліцерину в еритроцитах перед трансфузією.

Рис. 1.1. Прилад для автоматичної обробки еритроцитів ACP-215 (Haemonetics, США).

Існує декілька методів проведення процедур відмивання еритроцитів:

• оборотна цитоагломерація;

• безперервне центрифугування на сепараторах крові;

• серійне центрифугування.

Найбільш поширеним є метод серійного центрифугування, який заснований на принципі поступового розведення. Розчини готують на основі непроникних в клітину сполук – манітні, сахарозні або сольові (натрію хлорид). Видалення гліцерину з розморожених еритроцитів проводять у три етапи. Перше відмивання зазвичай здійснюється гіперосмоляльним розчином, на другому етапі відмивання застосовують розчин, який або менший за осмоляльністю або ізотонічний та третій етап відмивання проводять за допомогою фізіологічного розчину. До відмитих еритроцитів, які зберігали під захистом гліцерину в кінцевих концентраціях 15 – 20%, додають ресуспендуючий плазмозамінюючий

розчин ЦНДІГПК 8в у співвідношенні 1:1 (за вагою) і зберігають за температури 4±2°С перед трансфузією впродовж не більш ніж 24 години. В якості середовищ для ресуспендування відмитих еритроцитів, які зберігали при помірно низький температурі застосовують: Льв. ІПК – 15, Льв. ІПК – 13, Льв. ІПК – 16 [40].

Результат успішного кріоконсервування еритроцитів залежить від якості вихідної крові, дотримання часових інтервалів перед заморожуванням та ін. [48].

Застосовують наступні методи оцінки відмитих еритроцитів:

1. Здатність еритроцитів до агрегації і деформації;
2. Визначення вмісту залишкового гліцерину – 180 мг%;
3. Визначення осмотичної крихкості еритроцитів;
4. Гематологічні показники: середній об’єм еритроцитів; визначення концентрації гемоглобіну – загальний клітинний (20 – 22 г) і вільний від 40 до 120 мг%); вміст АТФ (не менш ніж 2,5) та 2,3 ДФГ (не менш ніж 0,6 ммоль) [40, 49].

Незважаючи на всі переваги методів зберігання життєздатності еритроцитів за умов низьких температур, недоліками є трудомісткість і дороге проведення процедур при видаленні проникного кріопротектору [50]. Наразі проводяться роботи, спрямовані на вдосконалення методу процедури видалення гліцерину шляхом варіювання складу середовищ для відмивання і тривалості врівноваження на кожному з трьох етапів [48, 51]. У роботі [51] проведені дослідження, спрямовані на скорочення тривалості трьохетапної процедури дегліцеринізації кріоконсервованих еритроцитів. Так, зменшення часу дегліцеринізації до 3 хв показали кращі результати, при цьому рівень гемолізу клітин був нижче 20%.

У банках крові Китаю в процесі дегліцеринізації використовують розчини 9% NaCl і 0,9% NaCl, у той час як Американська асоціація банків крові встановила вказівки щодо використання стандартних середовищ

(12% NaCl і 0,9% NaCl та 0,2% глюкози) на етапі відмивання з використанням приладу ACP–215. Було показано, що використання модифікованих розчинів (9% NaCl і 0,9% NaCl) з використанням ACP–215 не впливає на якість відмитих еритроцитів порівняно із застосуванням стандартних розчинів [52].

Автори роботи [53] вивчали вплив попередньої обробки гліцерином на відновлення і активність антиоксидантних ферментів ліофілізованих еритроцитів. Отримані дані продемонстрували, що попередня обробка гліцерином позитивно впливає на відновлення і активність антиоксидантних ферментів ліофілізованих еритроцитів. Це дозволило авторам запропонувати метод збереження еритроцитів шляхом попередньої обробки гліцерином і подальшого сублімаційного висушування.

Авторами роботи [54] був запропонований протокол гліцеринізації, у якому кінцева концентрація гліцерину становила 40% (об./об.) Застосування даного методу показало збереженість більш 98,5% еритроцитів після заморожування (–80°C), без будь-яких відмінностей порівняно зі стандартним методом насичення клітин (кінцева концентрація гліцерину до 40% (мас./об.). Повне видалення гліцерину (більш 99,9%) з кріоконсервованих еритроцитів (з використанням концентрації 40% об./об.) призводило до загального лізису ~ 8% порівняно із застосуванням стандартного методу (~ 12 – 15%). При цьому фенотип еритроцитів після кріоконсервування/дегліцеринізаціі не відрізнявся від фенотипу свіжих еритроцитів. Ці результати вказують на те, що кріоконсервування і дегліцеринізація еритроцитів при використанні запропонованого методу (гліцерин в кінцевій концентрації 40% (об./об)) не чинить значного впливу на фенотип еритроцитів (порівняно зі свіжими клітинами.

Після розморожування кріоконсервованих еритроцитів їх пошкодження при подальшому зберіганні посилюється. Виявлений факт погіршення біохімічних показників розморожених і відмитих еритроцитів свідчить про те, що час зберігання таких клітин перед переливанням має бути мінімізовано [55].

Наразі модернізація методів низькотемпературного зберігання еритроцитів проводиться шляхом додавання до еритроцитів інгібіторів рекристалізації льоду [56, 57]. У роботі [56] використовували речовини (які належать до різних класів), що здатні інгібувати рекристалізацію льоду: арил-глікозиди, арил-альдонамід та неіонні поверхнево-активні речовини на основі лізину. Було показано, що оптимальні ефективні концентрації арил-глікозидів і арил-альдонаміду відрізняються та їх величини знаходяться в діапазоні 5 – 110 ммоль/л. В цих концентраціях вони здатні захищати еритроцити від кріопошкоджень у присутності 15% гліцерину. У дослідженнях [57, 58] застосовували синтезовані сполуки, які мають арильне кільце (гідрофобна частина), що зв’язане з глікозидами: D-галактози, D-глюкози та D-манози, які містять β-зв’язану частину параметоксифенілу. Додавання 110 ммоль/л пара-метоксифеніл-β-D-глікозиду та 30 ммоль/л пара-бромофеніл-β-D-глікозиду до кріоконсервуючого розчину на основі гліцерину (15%) підвищує збереженість еритроцитів після розморожування на 30 – 50% за використання повільних швидкостей заморожування. Дослідження інгібіторів рекристалізації льоду у наступних роботах виявило, що вищезазначені сполуки були також ефективні за умов кріоконсервування еритроцитів під захистом непроникного кріопротектору – гідроксиетильованого крохмалю [59].

Поряд з використанням гліцерину проводилися дослідження з вивчення інших проникних кріопротекторів за умов кріоконсервування еритроцитів. На основі чисельних досліджень ефективності

1,2-пропандіолу як кріопротектору за умов кріоконсервування еритроцитів в ІПКіК НАН України був розроблений д.м.н. Воротиліним О.М. кріоконсервант «Пропандіосахароль» на основі 1,2-пропандіолу (37%) і сахарози [60]. Фахівцями ІПКіК НАН України були розроблені основні етапи ефективної кріотехнології довгострокового зберігання еритроцитів під захистом кріоконсерванту «Пропандіосахароль» за температур –150 ÷ –196°С із використанням сучасних одноразових полімерних контейнерів. Для відтворення кожного з основних етапів кріотехнології створені і експериментально відпрацьовані спеціальні оригінальні методи [40].

На відміну від проникних кріопротекторів, непроникні або екзоцелюлярні забезпечують лише позаклітинний захист клітин. Цей ефект досягається тим, що утворюючи оболонку навколо плазматичної мембрани клітини, вони здатні стабілізувати мембрану, а з іншого боку сприяють формуванню дрібнокристалічного льоду. Крім того, вони перешкоджають осмотичним перепадам, сприяють зниженню концентрації проникних компонентів та знижують їх токсичність. В якості непроникних широко застосовують вуглеводи (трегалоза, сахароза) та біомакромолекули (білки та полімери, поліетиленоксид з молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500), полівінілпіролідон (ПВП), гідроксиетильований крохмаль (ГЕК) [39].

На основі кріопротектору ПЕО-1500 було розроблено два методи низькотемпературного зберігання еритроцитів людини:

1) метод із використанням ПЕО-1500 в концентрації 40% в поєднанні з холін хлоридом і швидкого занурення в рідкий азот.

2) метод заморожування в рідкому азоті з використанням ПЕО-1500 в концентрації 30%, що включає попередню холодову адаптацію при 0 – 4°С [61].

Розроблені протоколи для довгострокового зберігання еритроцитів на основі непроникних кріопротекторів (ГЕК, ПВП, ПЕО-1500) не

знайшли широкого застосування в клінічній практиці. Наприклад, кріоконсерванти на основі ПВП мають канцерогенні властивості. Кріопротектор ГЕК депонується в ретикулоендотеліальної системі людини [39].

Останнім часом все більше уваги приділяється розробці комбінованих кріозахисних середовищ на основі проникного і непроникного кріопротекторів для кріоконсервування еритроцитів ссавців [62 – 64].

Незважаючи на достатню кількість протоколів для довгострокового зберігання еритроцитів, у світовій практиці низькотемпературних банків крові широко застосовують метод швидкого заморожування під захистом гліцерину в низьких концентраціях [6, 40]. Саме тому в нашій роботі використовували затверджений протокол заморожування еритроцитів людини під захистом консерванту ЦНДІГПК 11_4.

1.2. Явище постгіпертонічного шоку

Процес низькотемпературного консервування складається з багатьох послідовних етапів: отримання біологічного матеріалу, інкубування та врівноваження зразка з кріопротектором, заморожування, зберігання, розморожування і видалення проникного кріопротектору [39]. На кожному із зазначених етапів розвивається цілий комплекс подій, який значною мірою буде визначати результуючий успіх низькотемпературного зберігання біологічного матеріалу [48].

Пошкодження біологічного матеріалу відбувається як на етапах його заморожування, так і відігріву. В процесі заморожування на клітини діють ряд кріопошкоджувальних факторів, таких як формування кристалів льоду, зміна температури, pH, тонічності середовища та ін. Вплив на клітини факторів кріопошкоджень, які діють на етапі заморожування, моделюють

за допомогою гіпертонічного шоку (ГШ) і гіпертонічного кріогемолізу (ГК). Вивченню цього питання присвячено досить багато робіт [65– 67]. Явище постгіпертонічного гемолізу, яке реалізується на етапі відігріву та під час видалення кріопротектору із розморожених клітин, наразі вивчено недостатньо. Роботи з вивчення явища постгіпертонічного шоку (ПГШ) розрізнені та відокремлені [68 – 73].

Перша спроба пояснити механізм постгіпертонічного гемолізу (ПГГ) виникла ще у 1944 році. Так, у роботі Söderström [72] пояснює механізм тим, що сіль потрапляє в клітину в гіпертонічному розчині, а потім клітина при подальшому перенесенні в ізотонічний розчин реагує аналогічно таким чином якби нативні клітини вносили до більш гіпотонічного середовища, та назвав це «парадоксальним гіпотонічним гемолізом». Вимірюючи концентрацію іонів хлору було показано, що поглинання солі відбувається саме в гіпертонічному середовищі [72, 74].

У 1953 році Lovelock J.E. [75] для пояснення причин пошкодження клітин при повільному заморожуванні-відігріві сформулював гіпотезу, згідно з якою причиною кріопошкоджень при повільному заморожуванні є ліотропна дія солей та пошкодження клітин відбувається в результаті ефекту підвищення концентрації зовнішнього розчину (позаклітинного середовища) при виморожуванні води. Автор показав, що під час інкубації клітин в середовищах з підвищеною концентрацією солі в надосаді з’являються холестерин (ХС) і мембранні фосфоліпіди. Втрата мембранних ліпідів призводить до порушення проникності мембрани по відношенню до катіонів. Ступінь пошкодження зростає в міру збільшення тривалості контакту клітин з гіпертонічним розчином електролітів. Він припустив, що плазматична мембрана стає проникна для катіонів за концентрації, яка перевищує 0,8 моль/л і клітина буде навантажуватися натрієм під час дії більш високих концентрацій. Подальше ресуспендування в ізотонічному середовищі буде ініціювати надходження

води всередину клітини, що приведе до лізису – постгіпертонічному гемолізу. Гіпотеза, висунута Lovelock J.E., в подальшому неодноразово критикувалася, але наявність межі позаклітинної концентрації як пошкоджувального фактора і те, що головним локусом кріопошкоджень є плазматична мембрана – знайшли відображення в подальшому розвитку теорії кріопошкоджень.

Після цієї висунутої гіпотези, дослідження явища ПГГ проводилося більш інтенсивно, що призвело до появи цілого ряду робіт і гіпотез. Так, у 1968 році в роботі [74] було показано, що в середовищах, осмотичний тиск яких перевищує 1300 мОсмоль/кг, мембрани еритроцитів втрачають властивості напівпроникності: спостерігається витік іонів калію з клітин і надходження речовин з навколишнього середовища. У той же час Meryman H.T. [76] запропонував гіпотезу мінімального об’єму, в якій припустив, що основним фактором у процесі пошкодження еритроцитів є нездатність плазматичної мембрани клітини, що зменшилася до мінімально можливого об’єму, протистояти напрузі. Руйнування клітин відбувається при досягненні критичної напруги в результаті порушення вибіркової проникності мембрани за рахунок градієнта осмотичного тиску між внутрішньо- та позаклітинним середовищем. Було виявлено, що ПГГ розвивається при застосуванні гіпертонічних не електролітних розчинів: глюкози, сахарози тощо [68, 77].

У своєї роботі Farrant J. і Morris G. J. [78] припустили, що порушення мембранної проникності для позаклітинних іонів відбувається в результаті зростання осмотичного градієнта на мембрані. Автори припустили, що при заморожуванні під час стиснення клітини втрачають частину мембранного матеріалу. При розморожуванні відновлення вихідного клітинного об’єму, згідно з їхньою гіпотезою, має супроводжуватися утворенням в мембрані дефектів.

За результатами досліджень [79] було висунуто гіпотезу щодо механізму ПГГ еритроцитів. Запропоновано, що ПГГ еритроцитів відбувається в результаті набухання клітин через загальний вміст розчинених речовин згідно до колоїдно-осмотичного механізму. Пізніше авторами роботи [80] було ретельно описано механізм колоїдно-осмотичного лізису, який обумовлений врівноваженням іонів K^+ і Na^+ та появою надмірного осмотичного тиску, пов'язаного з наявністю внутрішньоклітинного гемоглобіну.

В подальших дослідженнях [70] виявлено, що розвиток ПГГ еритроцитів відбувається у зв'язку з формуванням у мембрані клітин гемолітичних пор на стадії регідратації. До того ж дані, проведені у роботі [70], свідчать, про те що, стадія дегідратації є визначальною у розвитку ПГГ. У середовищі дегідратації створюються умови для подальших пошкоджень і рівень гемолізу залежить від складу середовищ дегідратації та регідратації. При цьому лізис клітин після інкубування в 1,2 моль/л сахарози нижче, ніж у електролітному середовищі 1,5 моль/л NaCl. Рівень гемолізу еритроцитів за умов ПГШ залежить як від тривалості інкубування клітин у середовищі дегідратації, так і від температури. Було показано, що еритроцити більш стійкі до ПГШ за температури 0°С, ніж за 37°С [69]. Автори пояснюють цей ефект тим, що за низької температури перебіг біохімічних реакцій сповільнюється та створюється структурний комплекс мембрана-цитоскелет-цитогель. При 37°С процес формування неоднорідних дефектних структур (дефектів) відбувається з більшою швидкістю, що і проявляється в збільшенні рівня пошкодження клітин [71].

Повернення еритроцитів в ізотонічне середовище (етап регідратації) після їх інкубування в гіпертонічному розчині (етап дегідратації) призводить до розвитку ПГГ. Одна з фізичних причин ПГГ еритроцитів полягає у тому, що на етапі дегідратації в клітину проникає додаткова

кількість розчинених речовин, що обумовлює надмірне надходження води в клітини на етапі регідратації. Тому перш ніж поза- та внутрішньоклітинні концентрації встигнуть врівноважитись у середовищі регідратації, мембрани розтягуються до такого об'єму, що це призводить до їх механічного пошкодження. Повернення насичених кріопротектором клітин в ізотонічне середовище призводить до надмірного збільшення клітинного об'єму внаслідок дії більших осмотичних градієнтів на мембрані. Тому що швидкість входу води вище порівняно зі швидкістю виходу гліцерину з клітин. Чим більше концентраційний градієнт на мембрані і менше проникність кріопротектору, тим більше зростає клітинний об'єм на стадії відмивання від кріопротектору в результаті компенсуючого осмотичного градієнту, а отже і рух води в клітину. Під час виходу з клітини кріопротектору за градієнтом його концентрації осмотичний тиск внутрішньоклітинного вмісту знижується, і надлишкова вода залишає клітину [81].

Проведені дослідження за умов ПГШ еритроцитів людини у присутності катіонів Ca^{2+} показало, що рівень пошкодження клітин знижується за використання їх в концентрації 100 ммоль/л. Слід зазначити, що такий вплив іонів Ca^{2+} до дії ПГШ спостерігається за умов дегідратації у середовищі 1,5 моль/л NaCl з подальшим перенесенням у фізіологічний розчин (0,15 моль/л NaCl). За умов регідратації в ізотонічному розчині сахарози з попереднім інкубуванням у середовищі дегідратації в сольовому розчині 1,5 моль/л NaCl позитивного впливу іонів Ca^{2+} не реєструється. В той же час зниження рівня ПГГ у присутності іонів Ca^{2+} не відбувається за умов дегідратації в середовищах 1,2 моль/л сахарози та подальшим перенесенням в ізотонічні розчини сахарози та NaCl [82].

Отримані дані у роботі [83] щодо варіювання pH на стадії регідратації ПГШ еритроцитів вказують на те що лізис клітин, які були проінкубовані в гіпертонічному середовищі (1,5 моль/л NaCl), не залежить

від pH. Було встановлено [73], що рівень ПГГ еритроцитів зменшується у разі варіацій аніонного складу середовищ регідратації, які містили хлорид, піруват, сульфат і цитрат, та становить 80, 60, 45 і 3% відповідно. Вказані відмінності пов'язані з проникною здатністю цих речовин: чим вища їх проникність, тим вище рівень ПГГ еритроцитів. Попереднє інкубування еритроцитів людини з сульфгідрильними реагентами: йодацетамід, парахлормеркурійбензоат, N-етилмалеімід та гемін, збільшує рівень ПГГ клітин у разі присутності іонів хлориду в середовищі регідратації. Однак у випадку, коли середовище регідратації містило цитрат або сахарозу рівень гемолізу еритроцитів не змінювався [84]. У роботі [79] було показано, що додавання у певних концентраціях декстрану (молекулярна маса 250), рафінози, сахарози та манітолу в ізотонічне середовище призводить до зниження ПГГ еритроцитів людини.

Інкубація клітин у гіпертонічних середовищах дегідратації (до 2,7 моль/л NaCl, 37°C) не призводить до розвитку гемолізу еритроцитів [9], проте спостерігається їх зневоднення і стиснення, в результаті чого в мембрані можуть утворюватися мікродефекти і перерозподілятися внутрішньо- та позаклітинні іони. Насамперед відбувається вихід іонів K^+ [85, 86] та вхід до клітин позаклітинних іонів Na^+ [67].

На сьогодні останнім запропонованим поясненням механізму ПГГ еритроцитів є гіпотеза Muldrew K. [87], яка постулює, що в процесі заморожування клітини втрачають клітинну воду за рахунок утворення позаклітинного льоду, внаслідок це призводить до збільшення концентрації іонів у клітині. Ці внутрішньоклітинні іони зв'язуються з цитоплазматичними білками, що призводить до зниження кількості цих іонів у цитоплазмі. В результаті зростає вхід потоку іонів з позаклітинного середовища. При розморожуванні еритроцитів вода проникає у внутрішньоклітинне середовище і білки звільняють іони у відповідь на розведення цитоплазми. Підвищення вмісту внутрішньоклітинних вільних

іонів провокує додатковий вхід води в клітини, що призводить до їх набухання. Лізис еритроцитів відбудеться в разі перевищення площі поверхні плазматичної мембрани при досягненні критичного вмісту внутрішньоклітинної води.

Останнім часом вивчення ПГШ все більш привертає увагу дослідників. Нещодавно було досліджено особливості розвитку ПГГ еритроцитів ссавців (за умов варіювання осмоляльності та температури середовища) та показана можливість корекції ПГГ еритроцитів людини із залученням глюкози та хлорпромазину [11, 88, 89]. Саме тому доцільно продовжувати та розвивати дослідження у цьому напрямку.

1.3. Амфіфільні сполуки як антигемолітичні агенти

В даний час поверхнево-активні речовини (ПАР) застосовуються в різних галузях промисловості, сільському господарстві, фармації тощо [90]. Поверхнево-активні речовини (сурфактанти, детергенти) це зазвичай органічні амфіфільні сполуки, які являють собою молекули, що містять гідрофільну (голова) та гідрофобну частину (хвости) [91, 92]. Амфіфільність (від дав.-гр. αμφις – обоє) – це здатність сполук мати одночасно гідрофільні та гідрофобні (ліпофільні) властивості [93]. Традиційно класифікація ПАР заснована на їх фізико-хімічних властивостях чи функціональності. Найбільш поширена фізична властивість, яку використовують у класифікації – це іоногенність. Поверхнево-активні речовини є зарядженими та незарядженими, іонні та неіонні [93].

Згідно класифікації ПАР ISO Шварца і Перрі 1960 року наразі існує чотири основні класи ПАР: аніонні, катіонні, неіонні та цвітеріонні або амфотерні [94]. Аніонні сполуки являють собою речовини, що містять гідрофобну частину та одну або декілька полярних груп, які у водному розчині дисоціюють з утворенням негативно заряджених іонів. Найбільш

відомі аніонні ПАР – це солі карбонових кислот або мила, в яких негативний заряд забезпечує іонізована карбоксильна група ($–CO_2^–$). Алкілсульфати, алкілсульфонати також є одним із найважливіших класів аніонних ПАР, які мають сульфо ($–OSO_3^–$) і сульфонову ($–SO_3^–$) групи.

Катіонні ПАР на відміну від аніонних, дисоціюють у водному розчині з утворенням позитивно зарядженого іону з гідрофобним ланцюгом. Переважно до цього класу належать сполуки, що мають четвертинний атом азоту – нітрогеновмісні.

Неіонні ПАР мають незаряджену полярну групу. Поширеними неіонними ПАР є олігомерні ланцюги оксиду етилену, типові представники кільцевих полярних груп: глюкоза, сахароза та ін. Найвідомішим представником цього класу ПАР є тритон Х-100.

Амфотерні ПАР визначаються як речовини, що мають в своїй структурі аніонну та катіонну гідрофільну групу. Цей тип ПАР одночасно містить іони, які здатні утворювати катіон або аніон в залежності від умов навколишнього середовища, таких як зміна pH тощо.

Розмір полярної групи неіонного ПАР може варіювати в широкому діапазоні, тоді як у іонних розмір полярної групи більш менш постійний. Слід зазначити, що фізико-хімічні властивості ПАР у розчині визначаються співвідношенням розміру гідрофобної та полярної груп, а не їх абсолютними розмірами [93].

До ПАР природного походження в першу чергу відносяться полярні ліпіди, які поширені в живих організмах. Наприклад, солі жовчних кислот в організмі виступають як ефективні солюбілізатори гідрофобних компонентів крові. Клітинні мембрани складаються з упорядкованого бішару фосфоліпідів (ФХ, ФС та ін.) [93]. До природних ПАР відносять: гліколіпіди, ліпопептиди, сапоніни та інші полімери [94]. Серед гліколіпідів розповсюдженими є рамноліпіди, які синтезуються культурою мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa*. Відомим ліпопептидом є

сурфактин, що синтезується молочнокислими бактеріями роду *Lactobacillus* [95].

Аніонні амфіфільні сполуки входять до складу більшості миючих засобів і являють собою найпоширеніший клас ПАР [91]. Іони натрію та калію підсилюють розчинність ПАР у воді, у той час як іони кальцію та магнію сприяють розчинності молекул у масляній фазі. Неіонні амфіфіли є другим класом за поширеністю ПАР. На фізико-хімічні властивості неіонних ПАР незначно впливають електроліти у розчині на відміну від іонних амфіфілів. Неіонні ПАР при підвищенні температури втрачають розчинність у воді та стають більш гідрофобними. Навпаки амфіфільні сполуки на основі вуглеводів характеризуються звичайними температурними залежностями, а саме їх розчинність у воді збільшується з ростом температури [93].

Аміни у складі катіонних ПАР проявляють амфіфільні властивості тільки в протонованому стані, тому їх застосування неможливе при високих значеннях pH. Водночас алкілглюкозиди, що належать до неіонних амфіфільних сполук, стабільні при високих значеннях pH і чутливі до низьких pH [93].

При кімнатній температурі зазвичай ПАР являє собою кристалічну речовину. У розчині самоорганізація ПАР призводить до створення різних структур. Амфіфільні сполуки при використанні в низьких концентраціях існують у вигляді істинних розчинів. Зі збільшенням концентрації ПАР їх дифільні молекули або іони асоціюють один з одним і утворюють міцели. Будова міцели може бути різної форми: сферичної, циліндричної, дископодібної, пластинчастої, кубічної, зі зворотною гексагональною структурою та ін. [96, 97]. Концентрацію ПАР, при якій в розчині виникає велика кількість міцел і змінюються властивості розчину, називають критичною концентрацією міцелоутворення (ККМ). Слід зазначити, що величина ККМ амфіфільних сполук залежить від температури, а також

реагує на додавання у розчин солі. Так введення солі призводить до зниження величини ККМ на порядок і переважно залежить від розміру іонів. Найбільш сильно значення ККМ варіюють при зміні заряду противоіону [93].

Підвищений інтерес до амфіфільних речовин у клітинній біології зумовлений тим, що вони характеризуються структурною подібністю з ліпідами клітинних мембран.

Вивчено вплив на зміну форми еритроцитів людини зі застосуванням аніонних, катіонних, неіонних та цвітеріонних амфіфільних сполук. Так аніонні (алкілсульфати натрію), неіонні (додецил-D-мальтозід, децил-β-D-глюкопіранозид) та цвітеріонні (алкилдиметиламмоній пропансульфонат натрію C10 – C16) амфіфільні сполуки викликали трансформацію еритроцитів до ехіноцитарної форми. Тоді як катіонні (хлорпромазин) амфіфільні сполуки змінюють форму по типу дискоцит–стоматоцит [98 – 100]. Вбудовування амфіфільних сполук призводить до трансформації еритроцитів з дискоцитів до ехіноцитів або до стоматоцитарної форми, що зумовлено розширенням зовнішнього або внутрішнього моношару мембрани відповідно. Аніонні і неіонні ПАР вбудовуються переважно в нейтральний зовнішній моношар мембрани, тому і проявляють ехіноцитогенні властивості. Навпаки деякі катіонні ПАР є стоматоцитогенні за рахунок їх переважної інтеграції до негативно зарядженої внутрішньої частини мембрани еритроцита через присутність ФС [101].

Було показано [102], що амфіфільні сполуки збільшують пасивний вхід і вихід калію, а також вихід фосфату і зменшення активного входу калію. Автори припустили, що амфіфіли здатні впливати на динаміку ліпідного бішару і збільшувати його проникність для іонів K^+. Дію досліджуваних сполук автори пояснюють тим, що амфіфіли за допомогою збільшення текучості бішару впливають на конформацію аніонообмінного

білка і Na^+ -K^+ -АТФази, в результаті чого зменшується транспорт фосфату і активний транспорт калію.

Хлорпромазин (ХПР) є одним з найбільш відомих лікарських засобів для лікуванні шизофренії. Вважається, що ХПР проявляє антипсихотичний ефект завдяки блокаді рецепторів допаміну, а також впливу на мускаринові і α-адренергічні рецептори [103]. Водночас ХПР є катіонною амфіфільною сполукою, у якій трициклічна кільцева структура є гідрофобною, і розподіляється у вуглеводневу фазу мембранних двошарових систем, в той час як область третинного пропіламіну є гідрофільною, та добре взаємодіє з полярними головними групами мембранного бішару [104]. Взаємодія ХПР з мембранами еритроцитів, ліпідними бішарами, одношаровими везикулами, та модельними мембранами вивчається продовж багатьох років та триває досі [105, 106]. Визначено, що між ХПР та ліпідними мембранами є електростатична взаємодія, переважно ХПР взаємодіє з негативно зарядженими фосфоліпідами, такими як ФС та фосфатидилгліцерин (ФГ), які знаходяться у внутрішньому моношарі. Проведені дослідження молекулярних взаємодій між ХПР та цвіттеріонним дистеароїлфосфатидилхоліном і негативно зарядженим двошаровим дипальмітоїлфосфатидилгліцерином (ДПФГ) показали, що він спроможний взаємодіяти і порушувати зовнішній моношар ДПФГ, а потім поступово впливати і на внутрішній шар бішару. Взаємодія з ліпосомами на основі ФХ та ФЕА передбачає помірне упорядкування полярних груп і частковий ефект упорядкування в області вуглеводневих ланцюгів 1,2-диміристоїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін ліпідного бішару [107]. У роботі [108] показано, що ХПР у ліпідному бішарі пальмітоїл-2-олеоїл фосфатидилсерину зв’язується переважно з фосфатом ФС, а також із карбоксильними групами серину в бішарі суміші синтетичного 1,2-дипальмітоїл фосфатидилхоліну та пальмітоїл-2-олеоїл фосфатидилсерину.

Вивчення розподілу ХПР у ліпідних мембранах, які складаються тільки з ліпідів (ФХ та суміші ФХ з ФС) та з додаванням до них ХС, показало, що спорідненість ХПР до бішару сильно знижується у присутності холестерину [109]. Автори роботи [110] вважають, що амфіфільні сполуки взаємодіють з мембранними фосфоліпідами і можуть витісняти ХС із плазматичної мембрани через слабкі зв'язки ХС з фосфоліпідами.

Окрім впливу на фосфоліпіди ХПР взаємодіє з мембранними білками, зокрема зі спектрином, що може опосередковано регулювати механічну стабільність мембран [109, 111, 112].

Авторами роботи [113] за допомогою специфічного зонда антроілуабаіна методом флуоресценції було виявлено, що ультрафіолетове випромінювання впливає на взаємодію ХПР з натрієвим насосом Na^+, K^+-АТФази. Ці дані свідчать, що ХПР зв'язується поруч з сайтом уабаїну. Відомо, що ХПР є антагоністом кальмодуліна та здатен інгібувати Ca^{2+}-АТФ-азу плазматичної мембрани [114, 115]. Взаємодія ХПР може модифікувати кальмодулін-залежні системи клітини, змінюючи активність кальмодулін-залежних кіназ, зокрема, спектринкінази. В результаті блокування кальмодуліна змінюється рівень фосфорилювання білків цитоскелету і вміст клітинного АТФ [116].

Розчини ХПР виявились чутливими до зміни pH. Підвищення pH викликає зниження критичної концентрацій міцелоутворення ХПР. Проведені дослідження при варіюванні pH розчину, що містить ХПР, на чутливість клітин показало, що чутливість мембрани збільшується зі збільшенням pH [117]. Разом з тим розмір міцел ХПР у розчині залежить від ряду параметрів: іонної сили та температури середовища. Збільшення іонної сили розчину призводить до росту міцел, що мабуть пов'язано із посиленням гідрофобного ефекту. Вважається, що зі збільшенням концентрації NaCl у розчині позитивно заряджені протоновані амінні

групи оточуються іонами хлориду, внаслідок це призводить до екранування відштовхуючих взаємодій заряд-заряд. Одним із важливих параметрів у процесі агрегації міцел відіграє температура: з підвищенням температури від 15 – 37°С спостерігається незначне збільшення розміру наноструктур, що здебільшого має ентропійний характер [118]. Авторами [119] було встановлено, що ХПР набагато легше вбудовується в мембрани в рідкокристалічному стані, ніж у гелеві бішари.

Водночас дослідженню фізико-хімічних властивостей амфіфільної катіонної сполуки трифторперазину (ТФП) та його здатності взаємодіяти з ліпідами присвячено багато робіт. Трифторперазин як і хлорпромазин є похідним фенотіазіну та використовується для лікування шизофренії. Результати роботи [120] щодо взаємодії ТФП із ліпідним бішаром, що містить аніонний ФГ, отримані калориметричним методом, вказують на те, що молекули ТФП частково розподіляються у вуглеводневій частині бішару, взаємодіючи переважно з метиленовою областю С2 – С8 вуглеводневих ланцюгів, що близька до карбонільної групи. Показано, що ТФП може взаємодіяти з ліпосомами, що містять ФХ утворюючи домени. В концентрації 60 мкмоль ТФП здатен викликати вихід ХС і фосфоліпідів з плазматичної мембрани еритроцитів людини [121]. Дослідження спільної дії двох катіонних амфіфільних сполук, а саме ХПР та ТФП, на ліпідні моношари, основою яких був ФГ, представлені у роботі [122]. Отримані дані свідчать про те, що у разі використання ХПР і ТФП спостерігалось розширення моношарів порівняно з контрольним ліпідом.

В роботі [123] було продемонстровано, що у амфіфільних сполук, які не мають заряду (октил-β,D-глюкопіранозиду (ОГП), додецил- і децил-мальтози), з ростом осмолярності середовища (NaCl, сахароза) значення ККМ зменшувалось. Так, в 2,0 моль/л NaCl величини ККМ неіонних детергентів знижувалися приблизно в 3 – 4 рази, в той час як в сахарозному середовищі (2,0 моль/л) зниження становило близько в 2 рази.

Авторами роботи [124] методом флуоресценції отримана залежність міцелоутворення ОГП від температури. Так, при підвищенні температури від 5 до 40°С значення ККМ зменшувалося приблизно у 2 рази.

У роботі [125] досліджували дію неіонних амфіфільних сполук ряду алкіл-β,D-глюкопіранозидів (з довжиною алкільного ланцюга 6, 7, 8 і 10 атомів вуглецю) на ліпідні мембрани на основі 1,2-діпальмітоіл-sn-гліцеро-3-фосфохолін. Додавання амфіфільних сполук призводило до порушення порядку ліпідів на ділянці жирних ацильних ланцюгів (або хвостів), але в частині головної групи порядок був здебільшого не порушеним. Присутність амфіфільних сполук супроводжується розрідженням мембрани і викликає упорядкування бішару з додаванням білка або без нього. Крім того авторами роботи показано [126], що неіонний децил-β,D-глюкопіранозид зв’язується з тими же місцями у бичачому сироватковому альбуміні, як і аніонний амфіфіл децилсульфат натрію, проте спорідненість до білка для останнього була вища. Мабуть, це зумовлено взаємодією аніонної групи алкілсульфату з аміногрупами залишків лізину альбуміну, тоді як причиною відносно низької спорідненості може бути взаємодія залишку глюкози алкілглюкозиду з гідрофобним білком.

При дослідженні двох ПАР: децилсульфонат натрію та децилсульфат натрію показано [127], що децилсульфату натрію утворює еліпсоїдальні агрегати, на відміну від децилсульфонату натрію, який утворює майже сферичні міцели.

Раніше було виявлено, що амфіфільні сполуки в певних концентраціях здатні проявляти антигемолітичні властивості за умов гіпотонічного шоку еритроцитів (у разі інкубації клітин в середовищах NaCl в концентраціях нижчих ніж ізотонічний розчин). Використання катіонного ТФП за умов гіпотонічного шоку людини (66 ммоль/л NaCl) при кімнатній температурі (10 хв) показало, що максимальна антигемолітична активність спостерігається в концентраційному діапазоні

10 – 17 мкмоль/л [128]. Застосування аніонного децилсульфат натрію та неіонного децил-β,D-глюкопіранозиду (ДГП) показало, що вони здатні проявляти максимальну антигемолітичну активність в концентраціях 708 та 740 мкмоль/л відповідно, тоді як катіонний ХПР у концентрації 20 мкмоль/л [102]. На підставі отриманих результатів автори роботи [99] припустили, що при вбудовуванні в ліпідний бішар амфіфільні сполуки запускають швидке утворення внутрішніх небішарових фаз, які викликають трансбішаровий перерозподіл амфіфілів і бішарових ліпідів і у такий спосіб захищають від гіпотонічного лізису еритроцитів. Багато досліджень [129, 130] свідчать про те, що амфіфіли здатні впливати на перерозподіл фосфоліпідів між моношарами мембрани еритроцитів, тим самим, викликають реорганізацію бішару.

Амфіфільні сполуки в концентраціях, в яких вони проявляють максимальну антигемолітичну активність за умов гіпотонічного гемолізу еритроцитів, здатні викликати везикуляцію, а саме вивільнення ацетилхолінестерази. Для аніонних амфіфілів (алкілсульфати натрію) через 5 хв інкубації вивільнення везикул становило від 4%. Застосування неіонного ДГП та катіонного ХПР не викликало вивільнення ацетилхолінестерази у розчин [131]. Нещодавно в роботі [132] було показано, що ХПР у концентрації 0,6 ммоль/л викликає ендовезікуляцію, тоді як виснаження клітин з АТФ, додавання ванадату чи фтору перешкоджають ендовезикуляції.

Існує друга гіпотеза щодо захисного ефекту амфіфільних сполук за умов гіпотонічного шоку еритроцитів. Вбудовування в ліпідний бішар амфіфілів призводить до розтягування мембрани, в результаті чого збільшується критичний гемолітичний об’єм клітини, що дозволяє їй набухати до більшого об’єму в гіпотонічних розчинах [133].

Було виявлено, що амфіфільні сполуки проявляють антигемолітичну активність не тільки за умов гіпотонічного лізису (ГЛ), а при інших видах

температурно-осмотичного стресу, зокрема, за умов ГШ та ГК еритроцитів. Антигемолітичну активність амфіфільних сполук пов’язують зі здатністю речовин вбудовуватися в мембрану в момент дії стресу на клітини і викликати тимчасове «розупорядкування» мембрани, що в свою чергу, запобігає росту трансмембранних дефектів до розмірів гемолітичних пор [65 – 67].

Дослідження особливостей розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців у присутності амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, при варіюванні фізико-хімічних умов середовища дозволять доповнити наші уявлення щодо механізму антигемолітичної дії амфіфільних сполук за умов стресу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Отримання еритроцитів ссавців

В експериментах були використані еритроцити людини, кролика та щура. Донорська кров здорових чоловіків А $(II)^+$ групи віком від 20 до 35 років була надана Харківським обласним центром служби крові. Кров була заготовлена на консерванті «Глюгіцир» «Біофарма», Україна або ЦФД «Ravimed»). Для отримання крові ссавців використовували статевозрілих самців 12-місячних кроликів та щурів 6-місячного віку, які були надані віварієм Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Забір крові у тварин здійснювали з використанням розчину гепарину (500 од/мл), у кролика (Oryctolagus cuniculus) – із крайової вени вуха, у щурів (Rattus norvegious) – із хвостової вени. Для фіксації щурів використовували універсальну камеру О. Х. Когана.

Дослідження виконували відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р) при дотриманні вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Об’єм взятої для аналізів крові з етичних міркувань був мінімальним, проте достатнім для забезпечення відтворюваних і значущих результатів [134].

Еритроцити одержували методом центрифугування цільної крові при 3000 об/хв (центрифуга ОПн – 3У4.2 «Дастан», Киргістан) упродовж 3 хв у 10-кратному об’ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 5 ммоль/л

фосфатний буфер, pH 7,4) з подальшим видаленням плазми і лейкоцитарного шару. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше двох годин за температури 0°С. Усі використовувані в роботі середовища готували на 5 ммоль/л фосфатному буфері, pH 7,4.

Методи дослідження

2.2. Методика проведення постгіпертонічного шоку еритроцитів

Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали шляхом ізотермічного перенесення еритроцитів з гіпертонічного розчину (середовище дегідратації) в ізотонічний розчин (середовище регідратації) за температури 37 або 0°С. В якості середовищ дегідратації використовували розчини NaCl в діапазоні концентрацій 1,2 – 1,65 моль/л, в якості середовища регідратації – 0,15 моль/л NaCl. У середовище дегідратації (2,0 мл) додавали 200 мкл осаду еритроцитів, а потім аліквоту суспензії (50 мкл) додавали шляхом ізотермічного перенесення в 1,0 мл фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl). Кінцевий гематокрит становив 0,4%. Тривалість інкубування еритроцитів в середовищах дегідратації становило 20 хв, регідратації – 5 хв [11]. Перенесення розчинів здійснювали за допомогою дозаторів «Ленпіпет Колор», а також поршневого дозатора «Gilson».

2.3. Визначення рівня та динаміки гемолізу еритроцитів спектрофотометричним методом

Визначення рівня та динаміки гемолізу еритроцитів здійснювали за допомогою двох методів.

1) Клітини осаджували центрифугуванням упродовж 3 хв при 1000g. Вміст кількості гемоглобіну, який вийшов у супернатант визначали

спектрофотометрично на СФ–4А у проточній кюветі на довжини хвилі 543 нм [135]. Кінцевий гематокрит становив 0,4%. За 100% приймали поглинання у зразку, в який додавали детергент тритон Х–100 у концентрації 0,1%.

2) Для реєстрації динаміки гемолізу еритроцитів в роботі була використана установка для вимірювання малокутового світлорозсіювання клітинних суспензій (розбіжність світлового пучка ± 1,5°), яка створена на базі монохроматора СФ-4А (довжина хвилі 720 нм). Установка, розроблена автором роботи [136] і атестована в ІПКіК НАН України, оснащена високостабільним блоком живлення лампи розжарювання, лінійним підсилювачем фотоструму, логаріфматором, системою регулювання температури для термостатування кювети, і спеціальною магнітною мішалкою. Концентрація суспензії еритроцитів в кюветі становила (1,7–3,5) × 10^6 кл/мл. Рівень гемолізу еритроцитів як функцію часу визначали шляхом реєстрації зміни в часі оптичної щільності суспензії еритроцитів (при довжині хвилі 720 нм) за температури 37 або 19°С. У розглянутому концентраційному діапазоні оптична щільність клітинної суспензії прямо пропорційна кількості інтактних клітин. У зазначених умовах зменшення інтенсивності світла, що пройшло через кювету зі зразком, обумовлено розсіюванням суспензією на малі кути, що визначаються, в свою чергу, кількістю клітин, які містять гемоглобін, що зберігають помітну різницю показників заломлення середовища всередині і зовні еритроцита.

2.4. Методика використання кріопротектору гліцерину за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів

2.4.1. Проведення постгіпертонічного шоку еритроцитів людини у присутності гліцерину на різних етапах

При вивченні впливу гліцерину на різних етапах ПГШ еритроцитів людини експеримент проводили у декількох варіантах. При зміні температурно-осмотичних умов в якості контролю були клітини, які піддавали дії ПГШ за наступною схемою. Вихідну суспензію отримували шляхом розведення еритроцитарної маси 1:1 фізіологічним розчином (1-й етап). Далі аліквоту суспензії еритроцитів (200 мкл) переносили в середовище дегідратації (1,5 моль/л NaCl) і інкубували 20 хв (2-й етап). Потім суспензію (50 мкл) з середовища дегідратації ізотермічно переносили в середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl) (3-й етап). Тривалість інкубування становила 5 хв [11].

Для вивчення впливу гліцерину на різних етапах ПГШ еритроцитів людини експеримент проводили в двох варіантах. У першому варіанті еритроцити попередньо обробляли гліцерином у кінцевій концентрації 15% (20 хв, 37°C) і далі піддавали дії ПГШ (1,5 моль/л NaCl → 0,15 моль/л NaCl). У другому варіанті клітини попередньо обробляли гліцерином, далі піддавали дії ПГШ, проте в цьому випадку гліцерин (15%) був додатково присутній і у середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl).

2.4.2. Методика проведення постгіпертонічного шоку еритроцитів при використанні комбінованих середовищ на етапі дегідратації

Використовували комбіновані середовища, які містили проникний і непроникний компоненти. В якості контролю розглядалися клітини, які піддавали дії ПГШ за наступною схемою. Вихідну суспензію отримували шляхом розведення еритроцитарної маси 1:1 фізіологічним розчином (етап 1). Суспензію еритроцитів (200 мкл) переносили в 1,0 мл гіпертонічного розчину, що містить 7% (1,2 моль/л) NaCl, інкубували впродовж 20 хв (етап дегідратації; етап 2). Потім з цієї проби відбирали 50 мкл суспензії і переносили в 1,0 мл фізіологічного розчину на 5 хв (етап регідратації; етап 3). Кінцевий гематокрит становив 0,4%, температурний режим експерименту – 37 або 0ºС.

Для вивчення ПГГ еритроцитів із використанням гліцерину їх упродовж 20 хв інкубували в середовищах, що містять різні концентрації гліцерину (2–15%) та 0,15 моль/л NaCl, після переносили в фізіологічний розчин на 5 хв. Температурний режим становив 37°С.

Для визначення впливу складу середовища дегідратації на ПГГ еритроцитів проводили їх інкубацію в комбінованих середовищах (етап дегідратації) і потім переносили у фізіологічний розчин (етап регідратації). У комбінованих середовищах вміст гліцерину та NaCl варіювали таким чином, щоб сумарна осмоляльність розчину була незмінною і відповідала осмоляльності розчину, що містить 7% NaCl (2370 мОсм/л). Склад використовуваних у роботі комбінованих середовищ із заданою осмоляльністю наведено в табл. 2.1. Схема проведення експерименту з вивчення ПГШ еритроцитів представлена на рис. 2.1.

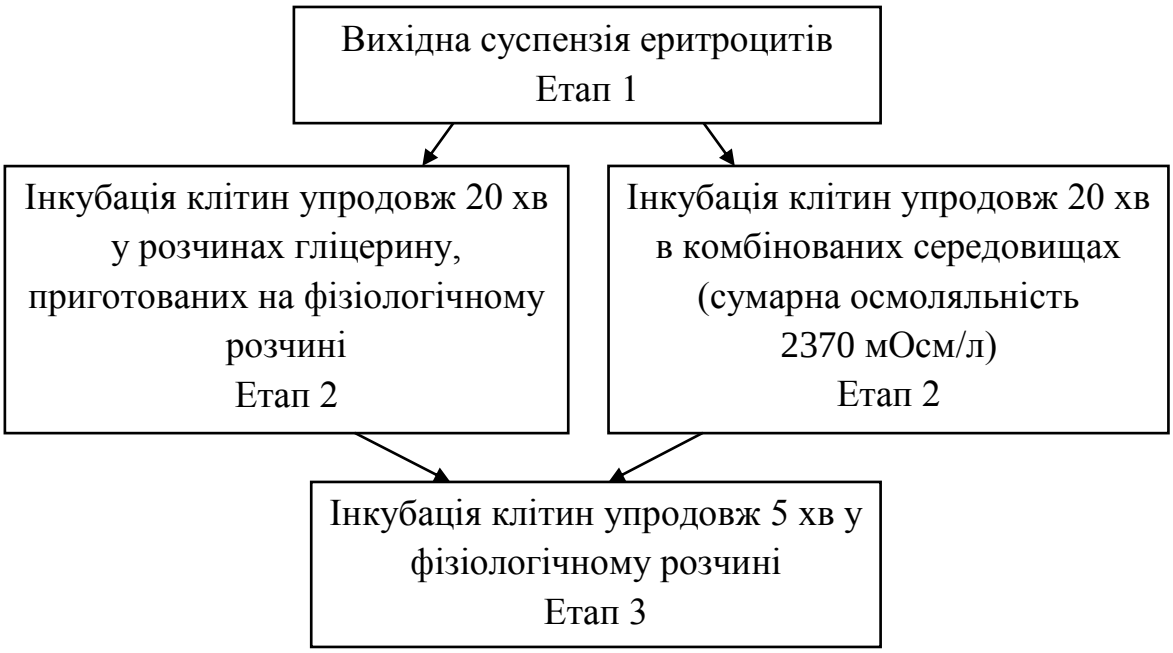


Рис. 2.1. Схема експерименту.

Таблиця 2.1.

Склад комбінованих середовищ (сумарна осмоляльність 2370 мОсм/л)

Середо-вище	Гліцерин			Хлорид натрію		
	Концентрація		Осмоляльність	Концентрація		Осмоляльність
	%	моль/л	мОсм/л	%	моль/л	мОсм/л
1	0	0	0	7	1,2	2370
2	2	0,22	236	6,2	1,06	2134
3	5	0,54	656	5	0,86	1714
4	7	0,76	940	4,2	0,71	1430
5	10	1,09	1370	2,9	0,5	1000
6	11	1,19	1510	2,5	0,43	860
7	12	1,30	1670	2,0	0,35	700
8	13	1,41	1810	1,6	0,28	560
9	14	1,52	1945	1,2	0,21	425
10	15	1,63	2070	0,9	0,15	300

2.5. Вплив амфіфільних сполук на постгіпертонічний шок еритроцитів і визначення розміру плато, ефективних концентрацій і антигемолітичної активності

У роботі використовували амфіфільні сполуки, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин: катіонних, аніонних та неіонних. В якості катіонних (позитивно заряджених) амфіфільних сполук використовували хлорпромазин і трифторперазин, аніонних – додецилсульфат натрію і децилсульфат натрію, та неіонних – децил-β,D-глюкопіранозид. Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали шляхом ізотермічного перенесення еритроцитів із середовища дегідратації (1,65 моль/л NaCl) в середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl) за температури 37 або 0°С. Амфіфільні речовини додавали в середовище регідратації перед внесенням клітин в нього клітин [89].

2.5.1. Обчислення максимальної антигемолітичної активності, розмірів плато і ефективних концентрацій амфіфільних сполук

Для оцінювання та порівняння ефективності дії амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів використовували поняття плато, ефективних концентрацій та максимальної антигемолітичної активності,. Плато – це діапазон концентрацій амфіфільної сполуки, в межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів, а ефективна концентрація ($С_{еф}$) – відповідає середині плато. Максимальну антигемолітичну активність ($АГ_{макс}$) амфіфільних сполук виражали як відсоток зниження гемолізу клітин у присутності речовини відносно гемолізу в зразку, що не містить амфіфіл. Значення максимальної антигемолітичної активності амфіфільних сполук розраховували за формулою:

$$АГ_{макс} = \frac{к - а}{к} \times 100\%$$

де *к* — величина гемолізу еритроцитів за відсутності амфіфільної речовини; *а* — мінімальна величина гемолізу еритроцитів у присутності амфіфілу.

2.6. Дослідження морфології еритроцитів методом світлової мікроскопії

Морфологічний аналіз еритроцитів здійснювали методом світлової мікроскопії на мікроскопі STUDAR E (Польща) з фотографічною реєстрацією морфологічної картини цифровою фотокамерою Sumsung PL-80. Суспензію еритроцитів, оброблених гліцерином, а також кріоконсервованих під захистом гліцерину, розподіляли рівномірно тонким шаром між предметним і покривним склом.

Морфологічні особливості клітин, які збереглися після проведення ПГШ за температури 0°С, при подальшому нагріванні зразка оцінювали з використанням лазерного скануючого мікроскопа AxioObserver Z1 LSM 510 META («CarlZeiss», Німеччина), оснащений термоприставкою. Швидкість нагріву зразка клітин становила 1°С/хв. у діапазоні температур від 4 до 37°С. У роботі використовували скляне предметне скло з силіконізованою поверхнею. Предметне скло силіконізували за допомогою Silicone марки «Serva». Нанесення силікону на поверхню предметного скла здійснювали тонким шаром та потім упродовж 1 – 1,5 годин витримували у сухожарній шафі за температури 100°С.

Для морфологічної оцінки особливостей форми та поверхневої архітектоніки еритроцитів застосовували загальноприйняту класифікацію [137]. Обробку знімків здійснювали за допомогою програмного забезпечення AxioVision 4.7.

2.7. Оцінка порушення асиметрії мембран еритроцитів методом проточної цитофлуорометрії

Для оцінки кількості еритроцитів з порушеною асиметрією клітинної мембрани використовували набір «Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit» («Becton Dickinson», США), який включає аннексін V, кон'югований з флуорохромом - флуоресцеінізотіоціонатом (Annexin V FITC) і буфер. Ступінь порушення асиметрії мембрани визначається за експонуванням на поверхні клітин фосфатидилсерину, який є маркером фосфоліпідів внутрішнього моношару ліпідного бішару. З цією метою використовували Ca^{2+} - залежний білок аннексін V (молекулярна маса 35-36 кДа), який має високу спорідненість до фосфатидилсерину [138]. Аннексін V, кон'югований з флуорохромом флуоресцеінізотіоціонатом (FITC), зберігає високу спорідненість до даного фосфоліпіду, тому використовується як чутлива мітка для аналізу клітин з порушеною асиметрією мембрани методом проточної цитофлуориметрії.

Експеримент проводили у двох варіантах. У першому варіанті еритроцити людини інкубували (20 хв) в фізіологічному розчині, який містив С10 у концентрації 180 та 400 мкмоль/л при 0°С. У другому варіанті еритроцити людини піддавали дії ПГШ (20 хв у середовищі дегідратації, 1,65 моль/л NaCl; 5 хв у середовищі регідратації, 0,15 моль/л NaCl) при 0°С. Амфіфільна сполука (С10) була присутня у середовищі регідратації перед внесенням клітин. Контролем були еритроцити, які інкубували у середовищах за відсутності амфіфільної речовини.

Після цього клітини ресуспендували в зазначеному розчині буфера для забарвлення у концентрації 1×10^6 кл/мл. Далі відповідно до протоколу Annexin V FITC до 100 мкл клітинної суспензії (1×10^6 кл/мл) додавали 5 мкл Annexin V FITC, перемішували та інкубували 15 хв за кімнатної температури в темряві. Після закінчення часу інкубування до

кожного зразку додавали 400 мкл робочого розчину буфера для забарвлення і здійснювали вимірювання на проточному цитофлуориметрії «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Інтенсивність флуоресценції вимірювали на флуоресцентному каналі FL1 за довжини хвилі збудження 488 нм і довжини хвилі емісії 530 нм. Кількість аннексін-мічених клітин визначали в правому квадранті R1 цитограм. Для мінімізації помилки у зразку аналізували 100 000 подій. Результати вимірювання оцінювали за допомогою програмного забезпечення «CELLQuestPro» («BectonDickinson»).

2.8. Метод кріоконсервування еритроцитів людини

Для кріоконсервування еритроцитів використовували кріоконсервант (ЦНДІГПК 11_4) наступного складу: 300 мл гліцерину; 40 г маніту; 7 г натрію хлориду; 0,3 г натрію фосфату двозаміщеного, доводячи об’єм водою для ін’єкцій до 1000 мл. На етапі підготовки до заморожування спершу еритроцити людини осаджали шляхом серійного центрифугування з фізіологічним розчином NaCl у співвідношенні 1:10 дворазово при 3000 об/хв і одноразово 1500 об/хв.

Кріоконсервант додавали крапельно (повільно) до еритроцитів у співвідношенні 1:1 (за вагою) при постійному перемішуванні за температури 20 – 22°С упродовж не більше 10 хв. Для еквілібраціі (врівноваження) еритроцитів з кріоконсервантом суспензію залишали на 5–10 хв при постійному перемішуванні. Кінцева концентрація гліцерину становила 15%.

Суспензію еритроцитів заморожували в поліетиленових ампулах місткістю 2,0 мл шляхом швидкого занурення у рідкий азот (–196ºС). Після зберігання (30 хв) розморожування клітинної суспензії здійснювали у

водяній ванні при температурі +40–42°С при постійному погойдуванні зразків упродовж 2–3 хв до зникнення твердої фази.

Видалення гліцерину з розморожених еритроцитів здійснювали в 3 етапи за стандартною методикою [40]. В якості середовищ для відмивання застосовували сольові розчини, які додавали до еритромаси у співвідношенні 1:1 (за вагою) і після ретельного перемішування суспензію центрифугували. До розмороженої суспензії еритроцитів додавали розчин, що містить 0,6 моль/л NaCl (середовище 1). Після центрифугування та видалення надосадової рідини до еритроцитів поступово, при постійному їх перемішуванні, додавали фізіологічний розчин 0,15 моль/л NaCl (середовище 2). Процедуру відмивання еритроцитів повторювали з додаванням фізіологічного розчину 0,15 моль/л NaCl (середовище 3).

2.9. Метод осмометрії

Осмоляльність розчинів NaCl і гліцерину визначали за допомогою осмометра ОМКА 1Ц – 01 (Україна, Одеса). У кювету приладу вносили 200 мкл досліджувального розчину та проводили вимірювання. Визначення осмоляльності засновано на вимірюванні температури замерзання досліджуваного розчину. У холодильнику приладу рідина охолоджується до температури нижчої, за температуру замерзання. Під дією вібрації в переохолодженій рідині виникають первинні зародки кристалізації, і йде процес замерзання. При цьому виділяється прихована теплота кристалізації та температура проби підвищується до температури замерзання, що визначається терморезистором. Індикація здійснюється в одиницях концентрації – ммоль/кг [139].

2.10. Метод рефрактометрії

Для дослідження концентрації розчинів NaCl використовували метод рефрактометрії. Досліджуваний розчин і дистильовану воду витримували 30 хв біля рефрактометра для вирівнювання температур. На призму рефрактометра наносили 500 мкл дистильованої води та вимірювали показник його заломлення та калібрували до значення 1.333. Досліджуваний розчин також наносили на призму рефрактометра 500 мкл та визначали показник заломлення. Концентрації приготованих розчинів контролювали за допомогою табличних даних, в яких наведені показники заломлення розчинів з відомою концентрацією [140].

2.11. Статистична обробка даних

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» («StatSoft Inc., США). Експериментальні дані представлені як медіана результатів (Me) і ступінь розсіювання у вигляді інтерквартильного інтервалу (Q1–Q3). Статистичну значущість відмінностей досліджуваних числових показників перевіряли за критерієм Манна-Уїтні або за використання Т-критерію Вілкоксона. Відмінності вважали значущими при $p \leq 0,05$.

2.12. Реактиви

У роботі використані наступні реактиви: додецилсульфат натрію, децилсульфат натрію («СінтезПАВ», Росія), хлорпромазин гідрохлорид, децил-β,D-глюкопіранозид («Calbiochem», США) трифторперазин («Sigma», США), тритон Х-100 («Serva», Німеччина), Гліцерин кваліфікації «осч» (ДІА^{e}М, Німеччина) та реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» і «чда».

У роботі були використані наступні стокові розчини амфіфільних сполук у концентрації (ммоль/л): хлорпромазин гідрохлорид – 40, трифторперазин– 30, додецсульфат натрію – 8, децилсульфат натрію – 14, децил-β,D-глюкопіранозид– 8.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ АМФІФІЛЬНИХ СПОЛУК НА ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

За допомогою моделі постгіпертонічного шоку вивчають вплив на клітини факторів кріопошкоджень, дія яких реалізуються на етапі розморожування біологічних об’єктів [11]. Постгіпертонічний шок здійснюється в результаті інкубування клітин в гіпертонічному середовищі (1 етап або етап дегідратації) з подальшим перенесенням в ізотонічне середовище (2 етап або етап регідратації). При вивченні ПГШ еритроцитів ссавців показано, що рівень ПГГ еритроцитів, в першу чергу, визначається етапом дегідратації, тобто концентрацією електроліту або неелектроліту [11, 141]. З підвищенням концентрації солі на 1-му етапі ПГШ супроводжується зростанням ПГГ еритроцитів людини і тварин [11].

Дослідниками було вжито різні підходи, спрямовані на зниження пошкодження еритроцитів за умов ПГШ. Для цього варіювали склад середовищ дегідратації і регідратації. При дослідження ролі якісного складу середовища дегідратації в розвитку ПГГ еритроцитів показано, що після інкубування в неелектролітному середовищі (1,2 моль/л сахароза) лізис клітин нижче, ніж після використання електролітного середовища (1,5 моль/л NaCl). Ці дані вказують на різний механізм розвитку ПГГ еритроцитів у електролітних та неелектролітних середовищах [70]. Заміна у середовищі регідратації аніонів хлориду на аніони пірувату, сульфату і цитрату призводить до зниження рівня ПГГ еритроцитів [84]. При застосуванні модифікаторів еритроцитарної мембрани (йодацетамід, парахлормеркурійбензоат, N-етилмалеімід) та геміну спостерігається зростання ПГГ еритроцитів [73]. Таким чином, спроби модифікації еритроцитів людини з метою зниження їх чутливості до дії ПГШ не мали

успіху і питання спрямованої корекції ПГГ еритроцитів залишався відкритим.

Про зниження чутливості еритроцитів до ПГШ в присутності ХПР згадувалося в роботі [141], однак для опису зазначеного ефекту використовувалася тільки якісна оцінка. В роботі [12] при вивченні особливостей розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини у присутності ХПР показана і кількісно охарактеризована його антигемолітична активність.

3.1. Постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини в присутності амфіфільних сполук

Відомо, що низка амфіфільних сполук в мікромолярних концентраціях здатна знижувати рівень пошкодження клітин під час дії на них різних видів стресових факторів, зокрема ГШ [9, 65, 66], ГК [10, 67] та ГЛ [102, 142, 143]. У ряді робіт з вивчення температурно-осмотичної чутливості еритроцитів ссавців [144 – 146] в присутності амфіфільних сполук, які є катіонними похідними фенотіазину – ХПР і ТФП, показана їх висока ефективність. Виходячи з того, що ТФП проявляв більш виражений антигемолітичий ефект за умов ГШ [144] та ГК [145, 146], становило інтерес дослідити вплив ТФП на чутливість еритроцитів до дії постгіпертонічного шоку.

Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали шляхом ізотермічного перенесення еритроцитів із середовища дегідратації у середовище регідратації за температури 37 або 0°С. Тривалість інкубації еритроцитів у середовищі дегідратації 20 хв, в середовищі регідратації – 5 хв [11].

Робота присвячена вивченню впливу амфіфільних сполук на чутливість еритроцитів до дії ПГШ. Для амфіфілів характерний подвійний

ефект [147], вони можуть як інгібувати, так і активувати ПГГ еритроцитів, тому умови проведення ПГШ повинні бути такими, щоб забезпечити рівень гемолізу еритроцитів досить високий, але такий, що не перевищує 70%. Саме тому при проведенні ПГШ еритроцити переносили з середовища, що містить 1,65 моль/л NaCl, в фізіологічний розчин (0,15 моль/л NaCl).

Трифторперазин і хлорпромазин є похідними фенотіазину, які входять в групу нейролептичних лікарських препаратів [128]. Структурні формули ТФП і ХПР наведені на рис. 3.1.

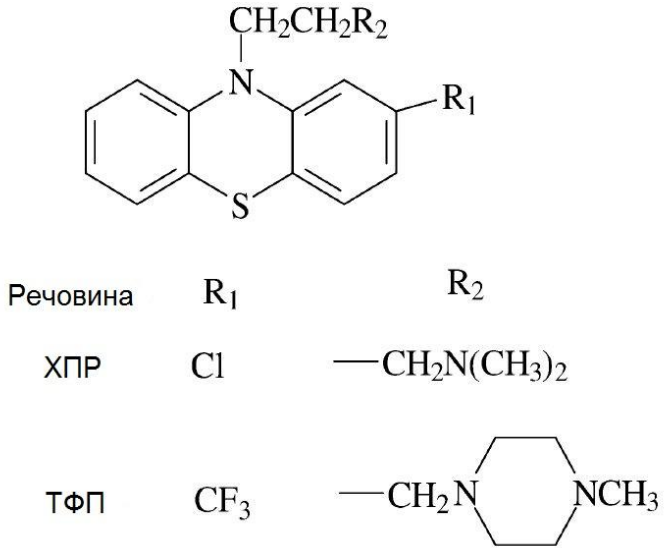


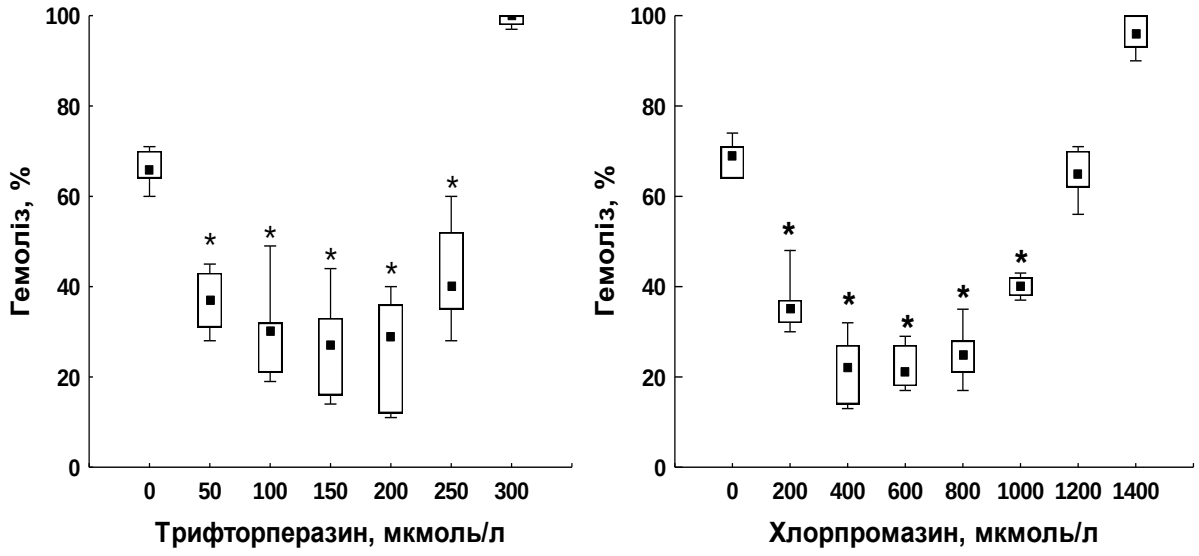
Рис. 3.1. Структурні формули хлорпромазину і трифторперазину [122].

Гідрофільною є нециклічна структура з позитивним зарядом у атома азоту, а гетероциклічна структура являє собою гідрофобну частину молекули хлорпромазину. Хлорпромазин – це похідне фенотіазину, а ТФП – піперазинове похідне фенотіазину. Обидві речовини мають позитивний заряд, тому їх відносять до катіонних ПАР, які вбудовуються в еритроцитарну мембрану і розподіляються переважно у внутрішньому моношарі ліпідного бішару. Характер зазначеного розподілу обумовлений

електростатичною взаємодією між позитивно зарядженими амфіфільними молекулами і негативно зарядженими компонентами внутрішнього моношару мембрани. Переважне накопичення ТФП і ХПР розширює внутрішню частину мембрани еритроцитів, змушуючи її деформуватися всередину і трансформуючи клітин по типу дискоцит – стоматоцит [148].

На рис. 3.2 подані залежності рівня ПГГ еритроцитів людини від концентрації позитивно заряджених амфіфільних сполук (ТФП і ХПР) у середовищі регідратації за температури 0°С. З рис. 3.2, А видно, що гемолітична залежність, отримана для ТФП, характеризується наявністю трьох ділянок. Зі збільшенням концентрації спостерігається поступове зниження рівня пошкодження клітин, після чого залежність виходить на плато і при подальшому підвищенні концентрації амфіфілу ПГГ еритроцитів зростає. Отже у низьких концентраціях ТФП захищає еритроцити від пошкодження за умов ПГШ, в той час як у високих – надає літичну дію на клітини. Подібна подвійність дії амфіфільних речовин описана в роботах [147, 148].

При порівнянні залежностей, отриманих для ТФП і ХПР (рис. 3.2), видно, що розмір плато для ТФП, порівняно з ХПР, зміщено у бік менших концентрацій (100 – 200 мкмоль/л). Літична дія ТФП спостерігається при його застосуванні у концентрації 300 мкмоль/л, в той час як ХПР за цієї концентрації проявляє захисний ефект. Літична дія ХПР (рис. 3.2, Б) спостерігається за значно більших концентрацій (1200 мкмоль/л і вище). Слід зазначити, що характер концентраційної залежності ХПР узгоджується з даними отриманих у роботі [12].



А Б

Рис. 3.2. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації трифторперазину (А) і хлорпромазину (Б) в середовищі регідратації (0°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

Розвиток детергентного лізису еритроцитів пов’язують зі здатністю амфіфільних молекул до міцелоутворення [148]. Амфіфіли при використанні в низьких концентраціях існують у вигляді істинних розчинів. Зі збільшенням концентрації ПАР їх дифільні молекули або іони асоціюють один з одним і утворюють міцели. Концентрацію ПАР, при якій в розчині виникає велика кількість міцел, і змінюються властивості розчину, називають критичною концентрацією міцелоутворення (ККМ).

Катіонні сполуки, що застосовували в дослідженні, розрізняються за структурою (рис. 3.1) та за фізико-хімічними властивостями [122]. Так величина ККМ для ТФП становить 42 мкмоль/л [121], а для ХПР – 22000 мкмоль/л [148]. Слід зазначити, що ефективні концентрації ТФП, за

яких спостерігається мінімальний рівень ПГГ еритроцитів, перевищують значення його ККМ (42 мкмоль/л). Можливо припустити, що механізм захисної дії цієї амфіфільної сполуки пов'язаний з його здатністю до міцелоутворення.

Під час здійснення ПГШ еритроцитів за температури 37°С ТФП не тільки не знижує рівень ПГГ, а ще викликає додаткове пошкодження клітин (рис. 3.3). Слід зазначити, що автори роботи [12] показали відсутність протекторної дії ХПР під час здійснення ПГШ еритроцитів за температури 37°С.

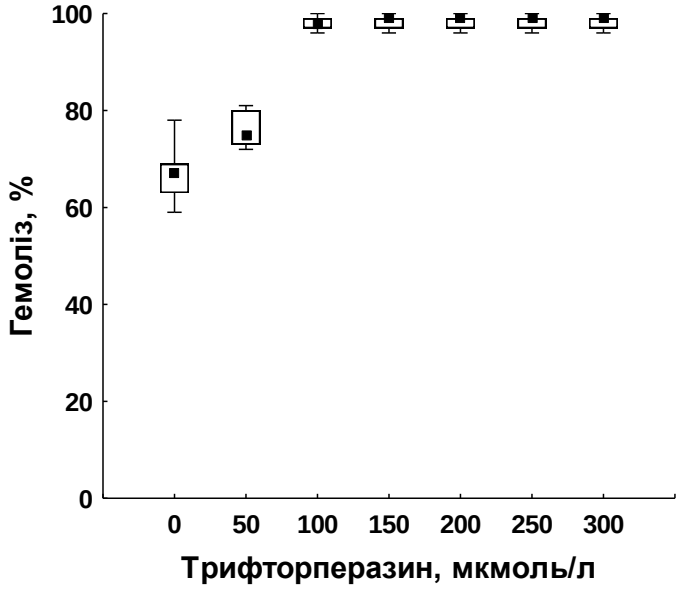
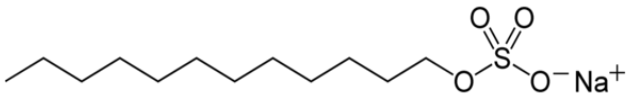


Рис. 3.3. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації трифторперазину в середовищі регідратації (37°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

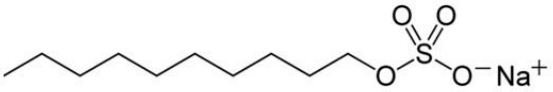
Дослідження впливу низки амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, на чутливість еритроцитів до дії ГШ і ГК, показало їх ефективність, тобто здатність цих сполук знижувати рівень гемолізу клітин за вказаних умов [10, 65, 67]. Тому становило інтерес дослідити дію представників негативно заряджених і незаряджених амфіфільних сполук

на чутливість еритроцитів до дії ПГШ. В якості аніонних ПАР були обрані алкілсульфати, ефективність яких була показана при дослідженні інших видів стресу [65, 145, 146].

Аніонні амфіфіли представлені гомологами алкілсульфату натрію з довжиною алкільного ланцюга 10 і 12 вуглецевих атомів: децилсульфат і додецилсульфат натрію (С10 і С12 відповідно). Молекули цих аніонних сполук мають гідрофобну частину – насичений аліфатичний ланцюг і гідрофільну частину – сульфатну групу, яка має негативний заряд.



А



Б

Рис. 3.4. Структурні формули додецилсульфат натрію (А) і децилсульфат натрію (Б).

При вивченні впливу алкілсульфатів на ПГГ еритроцитів були отримані залежності гемолізу клітин від концентрації амфіфілу за температури 0°С. Дані, отримані для еритроцитів людини, подані в табл. 3.1 і на рис. 3.5.

Проведені експерименти щодо застосування С12 за температури 0°С (табл. 3.1) показали, що амфіфіл впливає на рівень ПГГ еритроцитів, але ступінь зниження гемолізу є незначним. У порівняльному дослідженні ефективності алкілсульфатів (С10 и С12) при вивченні ГК еритроцитів людини було показано, що гомолог з коротким ланцюгом проявляє більшу антигемолітичну активність [65, 146]. Виходячи з того, що С12 проявляв

низьку ефективність за умов ПГШ (табл. 3.1) і зважаючи на дані робіт [65, 146], в наступній серії експериментів використовували речовину з гомологічного ряду алкілсульфатів з вуглеводневим ланцюгом С10 – децилсульфат натрію.

Таблиця 3.1

Вплив додецилсульфат натрію на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини за температури 0°С (Me, n = 7)

Концентрація мкмоль/л	0	20	30	40	50	60	70	80	90
Гемоліз, %	61	48	47*	42*	41*	44*	45*	53	71

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності С12 ($p < 0,05$).

Проведення ПГШ еритроцитів людини за температури 0°С з використанням С10 (рис. 3.5) показало, що додавання в середовище регідратації амфіфільної сполуки дозволяє значно знизити рівень ПГГ клітин. З отриманої концентраційної залежності, видно що зі збільшенням концентрації С10 до 200 мкмоль/л спостерігається поступове зниження рівня пошкодження клітин, після чого залежність виходить на плато і при подальшому підвищенні концентрації амфіфілу (більше ніж 800 мкмоль/л) ПГГ еритроцитів зростає. Слід зазначити, що концентраційні залежності С10 і ХПР (див. рис. 3.2, Б) за умов ПГШ еритроцитів людини схожі. Плато даних сполук практично перекриваються (200 – 800 мкмоль/л). Можливо, це пов’язано з близькими значеннями ККМ для ХПР і С10 22000 і 33000 мкмоль/л відповідно [148, 149].

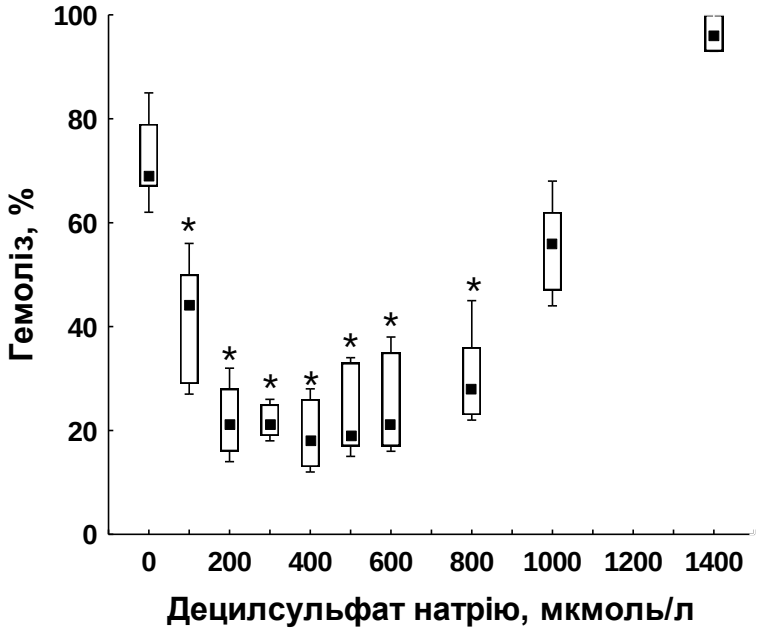


Рис. 3.5. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації децилсульфат натрію в середовищі регідратації (0°C). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

З отриманих результатів, поданих на рис. 3.5. та табл. 3.1, видно, що концентрації, при яких спостерігається мінімальний рівень ПГГ еритроцитів людини за 0°C, для C12 у 10 разів нижчі порівняно з C10. За температури 37°C як C12, так і C10 не знижували ПГГ еритроцитів людини (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив аніонних сполук (С12 і С10) на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини за температури 37°С (Me, n = 7)

Додецилсульфат натрію		Децилсульфат натрію	
Концентрація, мкмоль/л	Гемоліз, %	Концентрація, мкмоль/л	Гемоліз, %
0	67	0	67
20	66	200	69
40	75	400	70
60	85	600	73
80	85	800	83
120	98	1000	100

Оскільки аніонний амфіфіл з довжиною вуглеводневого ланцюга С10 виявляв більш виражений антигемолітичний ефект за умов ПГШ (0°С) еритроцитів людини, тому для порівняння було доцільно використовувати в якості неіонного ПАР з тією ж довжиною ланцюга – С10. Авторами [150] було показано, що зі збільшенням довжини алкільного ланцюга алкілглюкопіранозидів (С6 – С10) їх ефективність зростає. Тому був обраний з гомологічного ряду глюкопіранозиду саме децил-β,D-глюкопіранозид (ДГП), структурна формула якого наведена на рис. 3.6.

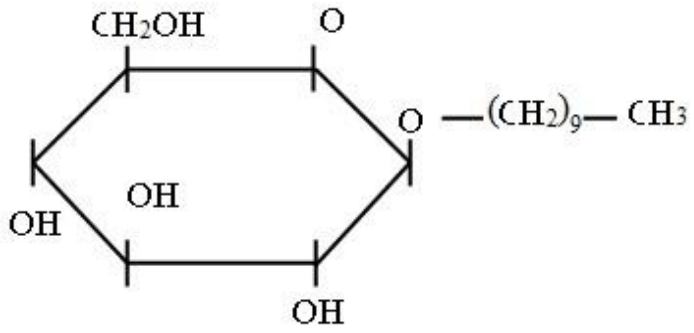


Рис. 3.6. Структурна формула децил-β,D-глюкопіранозиду

На рис. 3.7 подана концентраційна залежність ПГГ еритроцитів людини від концентрації неіонного ДГП в середовищі регідратації за температури 0°С. Децил-β,D-глюкопіранозид значно знижує рівень ПГГ еритроцитів. З концентраційної залежності видно, що характерною особливістю для цієї амфіфільної сполуки є найбільш широке плато концентрацій. Для неіонного ДГП концентраційне плато набагато ширше (у 3 рази) та зміщується праворуч у бік більших концентрацій ДГП по осі Х порівняно з плато С10 і ХПР (рис. 3.2, Б і рис. 3.5). Незважаючи на зазначені відмінності в розмірах плато для досліджуваних речовин, існують його ділянки, які перекриваються, тобто є загальними (400 – 600 мкмоль/л) для всіх досліджуваних амфіфілів, крім ТФП (рис. 3.2, А)

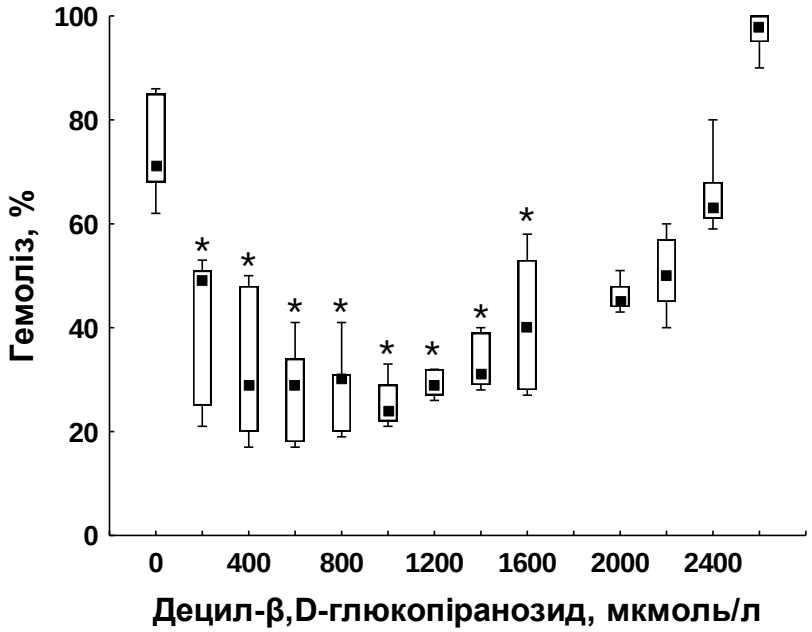


Рис. 3.7. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації децил-β,D-глюкопіранозиду в середовищі регідратації (0°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

За температури 37°С неіонний ДГП практично не знижував рівень ПГГ еритроцитів людини (результати не приведені).

Для того щоб порівняти ефективність амфіфільних речовин з отриманих концентраційних залежностей (див рис. 3.2, 3.5 та 3.7) були визначені розміри плато, обчислені ефективні концентрації і розраховані величини максимальної антигемолітичної активності, які подані у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Значення максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$), ефективних концентрацій ($С_{еф}$) амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів людини (0°С). Значення максимальної антигемолітичної активності представлені як Me – медіана, Q1–Q3 – інтерквартильний інтервал (n = 7).

Значення	ХПР	ТФП	С10	ДГП
$АГ_{макс}$, %	70 (64 – 74)	60 (45 – 77)	74 (66 – 78)	62 (61 – 70)
$С_{еф}$, мкмоль/л	600	150	400	1000

З табл. 3.3 видно, що амфіфільні сполуки проявляють $АГ_{макс}$ активність на рівні 60–70%, при цьому величини ефективних концентрації значно відрізняються. Це може бути пов’язано з їх різними фізико-хімічними властивостями, зокрема величинами ККМ [148, 149, 150].

Раніше при дослідженні температурно-осмотичної чутливості еритроцитів людини була виявлена певна закономірність по відношенню до аніонних амфіфільних сполук. Показано, що речовини з довжиною гідрофобного алкільного ланцюга більше десяти атомів вуглецю характеризуються меншими значеннями ефективних концентрацій порівняно з амфіфільними сполуками, які мають більш короткий гідрофобний ланцюг. Так, за умов ГК еритроцитів людини характерним

для С12 є дуже вузьке плато та приблизно на порядок менше значення ефективної концентрації на відміну від С10 [146]. У той час як за умов ГШ еритроцитів людини ефективна концентрація С12 також була незначно менша порівняно з С10 (в 1,8 раза) [65]. Антигемолітична активність С12 за умов ГШ еритроцитів при 0°С значно нижча, ніж при 37°С. Порівняння ефективності сполуки при ГШ і ГК показало зниження її АГ активності в останньому випадку.

Виявлена в нашій роботі низька ефективність аніонного довголанцюжкового похідного алкілсульфату (С12) за умов ПГШ (при 0°С) узгоджується з раніше отриманими даними про його незначну АГ активність при вивченні в модельних експериментах дії на клітини інших факторів кріопошкоджень [65, 146].

Високу $АГ_{макс}$ активність за умов ПГШ еритроцитів людини проявляють представники різних класів ПАР – катіонний ТФП, неіонний ДГП і аніонний С10 [152]. Слід зазначити, що загальним в будові ДГП і С10 є довжина гідрофобного ланцюга (10 атомів вуглецю) на відміну від ТФП, будова якого різко відрізняється (див. рис. 3.1).

Отже показано, що амфіфільні речовини (ТФП, С10, ДГП), які відрізняються за фізико-хімічними властивостями та належать до різних класів ПАР, здатні значно знижувати рівень ПГГ еритроцитів людини за температури 0°С.

3.2. Постгіпертонічний гемоліз еритроцитів кролика та щура в присутності амфіфільних сполук

Амфіфільні сполуки чинять мембранотропну дію через здатність їх молекул вбудовуватися та розподілятися в еритроцитарній мембрані. Прояв їх антигемолітичної активності залежить як від конкретної використаної речовини, так і особливостей цитоскелет-мембранного

комплексу еритроцитів. Еритроцити ссавців характеризуються загальним планом будови плазматичної мембрани, але мають деякі видові особливості її складу [13]. Це дозволяє припустити відмінність в прояві ефективності амфіфільних сполук за умов ПГШ цих клітин.

У роботах з дослідження температурно-осмотичної чутливості еритроцитів різних видів ссавців [9, 10, 65, 67] була показана різна стійкість клітин до дії ГШ і ГК. Зокрема, максимальну стійкість проявляють еритроцити кролика, а мінімальну – клітини щура [65, 146].

У зв'язку з цим було доцільно дослідити реакцію еритроцитів людини, щура та кролика, які характеризуються не тільки різною чутливістю до змін осмотично-температурних умов, а і відмінностями цитоскелет-мембранного комплексу [13, 153], до дії ПГШ за 37 або 0°С

Результати експериментів з ПГШ еритроцитів ссавців (людини, кролика та щура) за різних температур, що наведені на рис 3.8, дозволили

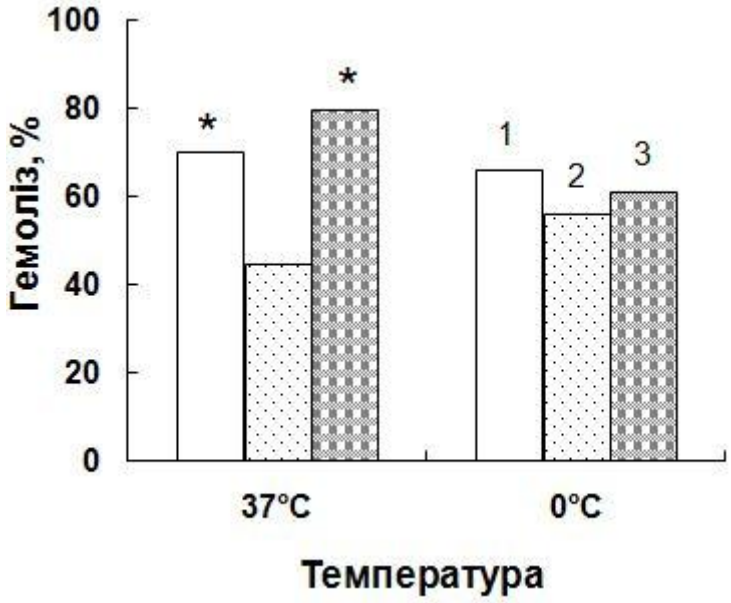


Рис. 3.8. Вплив температури на рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (1) кролика (2) та щура (3). * – статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами кролика, $p < 0,05$. (Me, n = 7). Концентрація NaCl у середовищі дегідратації становила 1,65 моль/л, у регідратації 0,15 моль/л.

виявити деякі видові особливості прояву ПГГ. Видно, що за температури 0°С еритроцити людини та тварин не відрізняються за рівнем ПГГ, у той час як за 37°С отримані статистично значущі відмінності: еритроцити кролика більш стійкі порівняно з клітинами людини і щура. Це узгоджується з даними, що були отримані при дослідженні чутливості еритроцитів різних видів ссавців до дії ПГШ [11].

Виявлені відмінності в чутливості еритроцитів кролика та щура до дії ПГШ за температури 37°С, напевно, зумовлені характеристиками дифузійної водної проникності їх плазматичних мембран. Відомо, що за 37°С дифузійна водна проникність еритроцитів щура ($17,5 \times 10^3$ см/с) найвища порівняно з клітинами людини ($6,1 \times 10^3$ см/с) і кролика ($13,5 \times 10^3$ см/с) [154]. Така висока водна проникність еритроцитів щура призводить до різкого входу води в клітини в момент їх перенесення із середовища дегідратації в середовище регідратації, внаслідок чого клітини швидко набухають і при досягненні критичного гемолітичного об’єму, лізують. Той факт, що за 0°С не виявлено відмінностей в рівні ПГГ еритроцитів досліджуваних видів ссавців, можливо пов’язаний з тим, що за низької температури мембрани клітин кролика і щура не відрізняються показниками дифузійної водної проникності [154]. З іншого боку водна проникність для клітин людини становить $6,1 \times 10^3$ см/с, що в 2 рази нижче ніж проникність води для кролика, але рівень ПГГ еритроцитів кролика нижче (рис. 3.8). Можливо чутливість еритроцитів ссавців до дії ПГШ обумовлено не тільки характеристиками водної проникності їх мембран, а й іншими факторами. Насамперед це може визначатись різним білково-ліпідним складом еритроцитарних мембран.

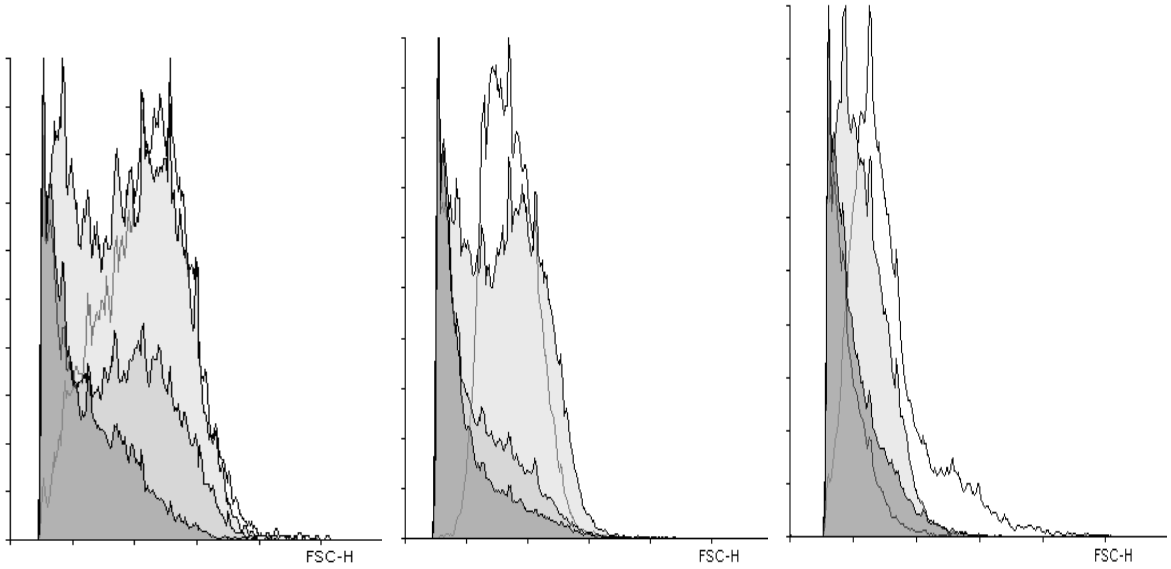
Стійкі до дії ПГШ еритроцити кролика характеризуються високим внутрішньомембранним вмістом ФЕА (34,4%) [13] і ХС (28,9%) [153] (порівняно з клітинами людини і щура). Саме на важливість цих показників еритроцитарної мембрани (вміст неламеллярного ФЕА і ХС) в

прояві стійкості еритроцитів ссавців до дії іншого виду стресу – ГК вказують результати кореляційного аналізу [9]. Неламеллярні фосфоліпіди забезпечують стійкість клітин до дії стресового фактора, ймовірно, за рахунок утворення гексагональної структури в ламеллярній упаковці ліпідів мембрани [155], що може запобігати розвитку трансмембранних пор [156]. Холестерин сприяє модулюванню фізико-хімічних властивостей клітинних мембран [157]. Численні експериментальні дані підтверджують залежність стійкості еритроцитарних мембран до дії різних факторів від вмісту в них ХС [158 – 160]. Слід зазначити, що в мембрані еритроцитів кролика відсутній трансмембранний білок – глікофорин А [161], тому їх мембрани характеризуються меншою здатністю зв’язувати гемоглобін [162].

Раніше було показано, що рівень ПГГ еритроцитів ссавців за умов перенесення клітин із середовищ дегідратації (1,0–2,0 моль/л NaCl) у середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl) визначається умовами середовища дегідратації. Так, чим вище концентрація солі в середовищі дегідратації, тим більше рівень пошкодження клітин при їх перенесенні в середовище регідратації [11]. Тому, важливо оцінити стан еритроцитів ссавців у гіпертонічних середовищах за допомогою методу проточної цитометрії. В якості середовищ дегідратації використовували розчини з різними концентраціями NaCl (0,4 – 2,0 моль/л). Час інкубування становило 20 хв за температури 37°С. Контролем вважали клітини, які інкубували у фізіологічному розчині 0,15 моль/л NaCl впродовж указаного часу.

Результати, отримані методом проточної цитометрії виявили значні зміни розподілу еритроцитів при зростанні концентрації солі в середовищі дегідратації (рис. 3.9). Так крива розподілу клітин продемонструвала декілька особливостей, які можуть бути пов’язані з морфологічними характеристиками еритроцитарної популяції у певному гіпертонічному

розчині. Так, при концентрації 0,8 моль/л NaCl крива розподілу еритроцитів людини та кролика має два максимуми, що характерно для клітин плаской форми, для еритроцитів щура такої особливості не спостерігається. При концентраціях NaCl від 1,0 до 2,0 моль/л крива розподілу поступово звужується, вказуючи на формування популяції клітин сферичної форми.



А Б В

Рис. 3.9. Типові гістограми розподілу еритроцитів людини (А), кролика (Б), щура (В) в середовищах, що містять 0,15 моль/л NaCl (біле забарвлення); 0,8 моль/л NaCl (світло-сіре забарвлення); 1,2 моль/л NaCl (середньо-сіре забарвлення); 2,0 моль/л NaCl (темно-сіре забарвлення).

Чисельним відображенням розподілу клітин у цитометричних дослідженнях зазвичай є медіана. Її значення пропорційне ступеню розсіювання світла та несе інформацію про розмір клітин та їх морфологічні характеристики. Середні значення медіани для еритроцитів досліджуваних ссавців наведені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Середні значення медіани розподілу еритроцитів ссавців за параметром FSC (ум.од.) у розчинах NaCl.

Ссавці	Концентрація NaCl, моль/л						
	0,15	0,4	0,8	1,0	1,5	1,75	2,0
Людина	205	109	197	145	108	107	94
Кролик	168	173	169	96	79	84	79
Щур	144	114	114	87	75	93	99

Аналізуючи отримані результати, слід зазначити, що контрольне значення медіани пропорційно розміру клітин досліджуваних ссавців, яких можна розмістити за діаметром еритроцитів наступним чином: людина > кролик > щур. Це узгоджується з даними роботи, де показано, що за розмірами еритроцити людини перевищують розміри клітин тварин [163 – 165].

Значення медіани знижується в тому випадку, коли еритроцити людини і щура перебували в середовищі, що містить 0,4 моль/л NaCl. Для клітин людини медіана знижувалася в 1,9 раза, для клітин щура – 1,3 раза. Це узгоджується з даними роботи Александрової Д.І. [166], в якій показано, що за температури 37°С спостерігається зниження гематокриту еритроцитів людини в аналогічних гіпертонічних умовах в 1,4 раза, а клітин щура в середовищах, що містять 0,4 – 0,6 моль/л NaCl в 1,3 раза.

Порівняно з контролем значення медіани розподілу еритроцитів ссавців, починаючи з гіпертонічного розчину 1,0 моль/л NaCl, зменшуються з ростом популяції сфероцитів. Для еритроцитів людини та кролика характерно зниження значень медіани аж до середовища, що містить 2,0 моль/л NaCl. Для клітин щура зниження значень медіани спостерігається тільки до розчину, що містить 1,5 моль/л NaCl.

Інформацію про ступінь мінливості набору даних у межах розподілу може надати коефіцієнт варіації (CV). Ця метрика показує наскільки характеристики клітин відрізняються від середнього значення. Порівнюючи між собою серії гістограм для клітин досліджуваних ссавців можна виділити деякі особливості, що корелюють з рівнем чутливості до постгіпертонічного шоку. Так еритроцити кролика, що є найбільш стійкими до постгіпертонічного шоку, мають розтягнуте праве плече гістограми і характеризуються показниками CV у гіпертонічних розчинах порядку 50 відсотків (табл. 3.5). У той час як розподіл еритроцитів щура характеризується більш однорідним набором даних з CV порядку 30. Можна припустити, що в популяції еритроцитів кролика навіть у високогіпертонічних розчинах (2,0 моль/л NaCl) зберігається частина клітин несферичної форми, що є стійкими до постгіпертонічного пошкодження. У той час як для клітин щура частина сфероцитів є більш вагомою.

Таблиця 3.5

Середні значення коефіцієнту варіації розподілу еритроцитів ссавців за параметром FSC (ум.од.) у розчинах NaCl.

Вид ссавця	Концентрація NaCl, моль/л						
	0,15	0,4	0,8	1,0	1,5	1,75	2,0
Людина	30	44	46	52	54	50	45
Кролик	24	32	42	52	50	56	57
Щур	38	32	36	36	32	39	34

Еритроцити людини, кролика і щура відрізняються за розмірами, складом цитоскелет-мембранного комплексу і цитоплазми, активності транспортних шляхів та ін. Ці клітини характеризуються різною чутливістю до дії ПГШ (рис. 3.8). Виходячи з вищевикладеного, доцільно

було вивчити вплив представників різних класів ПАР на розвиток ПГГ еритроцитів ссавців.

За використання катіонних сполук (ТФП і ХПР) за умов ПГШ еритроцитів кролика та щура були отримані концентраційні залежності, які представлені на рис. 3.10 і 3.11 відповідно. За температури 0°С позитивно заряджені амфіфільні сполуки, ТФП і ХПР знижують рівень ПГГ еритроцитів кролика та щура (рис. 3.10. і рис. 3.11). При застосуванні ХПР плато концентраційної залежності для клітин кролика та щура перекриваються і охоплюють діапазон від 200 до 700 мкмоль/л, тоді як плато ТФП є значно меншим і знаходиться в межах 150 – 200 мкмоль/л.

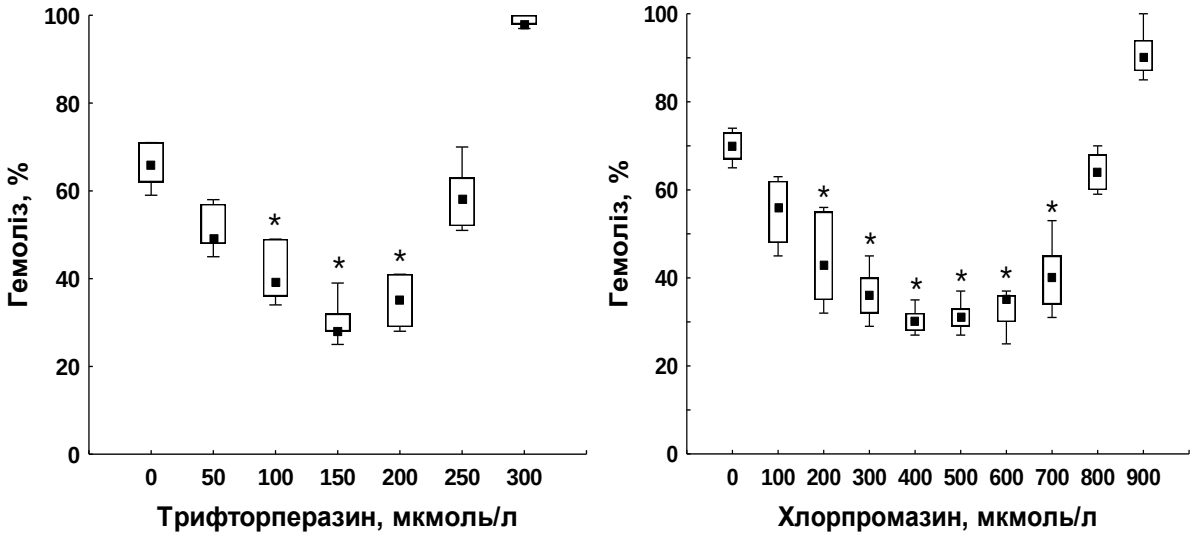


Рис. 3.10. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів кролика від концентрації трифторперазину (А) і хлорпромазину (Б) в середовищі регідратації (0°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

При порівнянні плато катіонних амфіфільних сполук ХПР і ТФП за умов ПГШ еритроцитів людини (див. рис. 3.2) і тварин (рис. 3.10 и 3.11)

видно, що вони рознесені впродовж концентраційної шкали і не перекриваються, при цьому концентраційне плато ТФП зсувається в бік менших концентрацій. Слід зазначити, що обидві катіонні сполуки значно більше знижують рівень ПГГ еритроцитів щура (приблизно у 5 разів), ніж клітин кролика та людини.

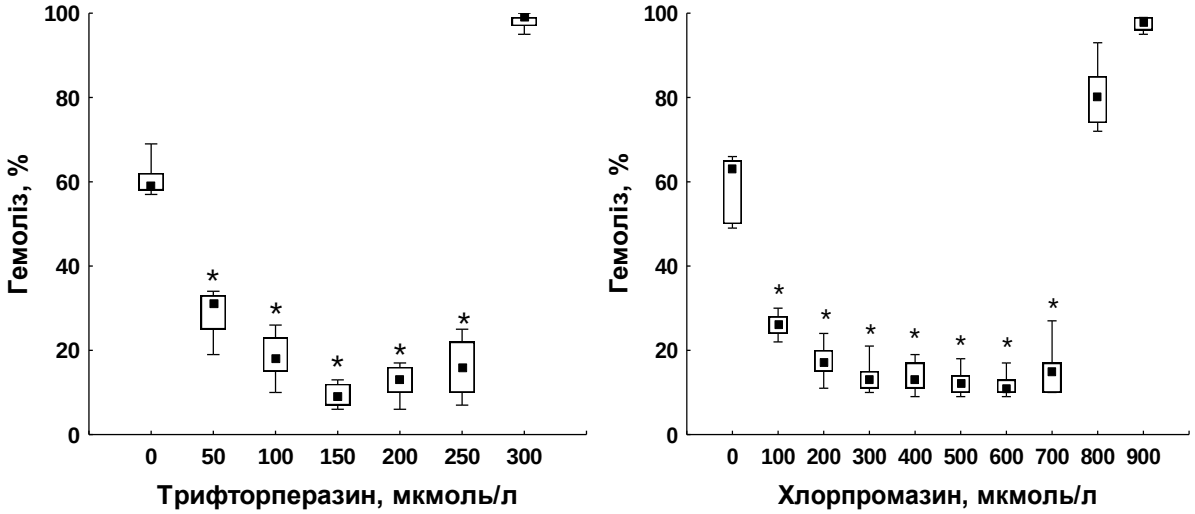


Рис. 3.11. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів щура від концентрації трифторперазину (А) і хлорпромазину (Б) в середовищі регідратації (0°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

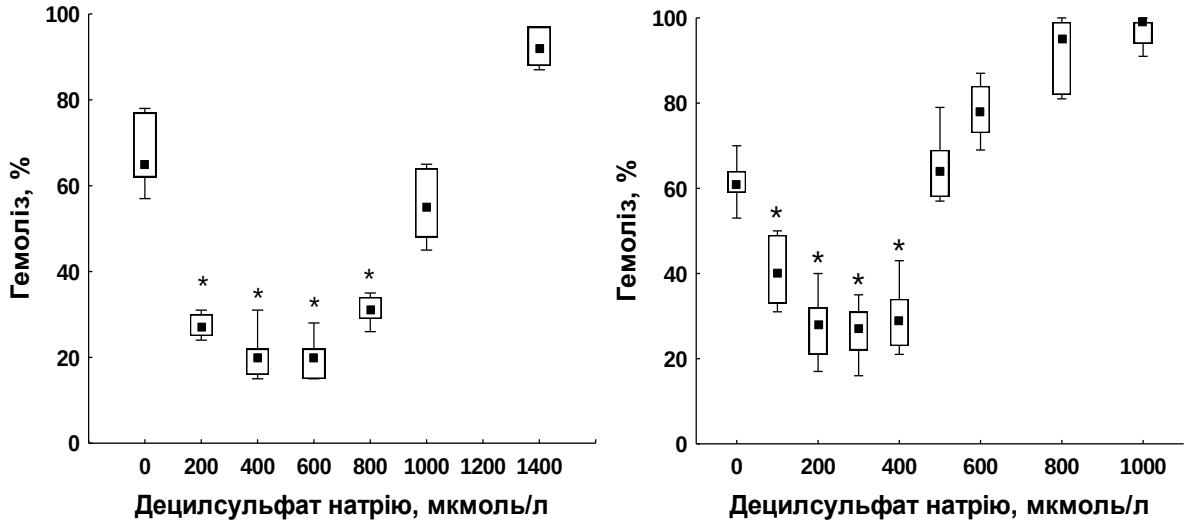
За температури 37°С ТФП і ХПР не знижували рівень ПГГ еритроцитів тварин (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Вплив хлорпромазину та трифторперазину на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів тварин за температури 37°С (Me, n = 7)

Трифторперазин			Хлорпромазин		
Концент-рація, мкмоль/л	Гемоліз, %		Концент-рація, мкмоль/л	Гемоліз, %	
	Кролик	Щур		Кролик	Щур
0	35	85	0	45	80
50	34	87	200	50	87
100	35	89	400	88	86
150	74	95	600	96	92
200	98	99	800	99	98

Для аніонного амфіфілу С10 були отримані концентраційні залежності за умов ПГШ еритроцитів тварин (кролик і щур) за температури 0°С (рис. 3.12). З поданих результатів видно, що вони мають подібні залежності, отриманої для клітин людини (див. рис. 3.5). Незважаючи на те, що характер концентраційних залежностей схожий спостерігаються відмінності в довжині плато: для еритроцитів людини воно охоплює діапазон 200 – 600 мкмоль/л, тоді як для клітин щура характерно більш вузьке плато (200 – 400 мкмоль/л). Висхідна частина концентраційної залежності С10, отриманої для еритроцитів щура, починається з концентрації речовини понад 500 мкмоль/л, тоді як для еритроцитів людини і кролика – з концентрації 1000 мкмоль/л.

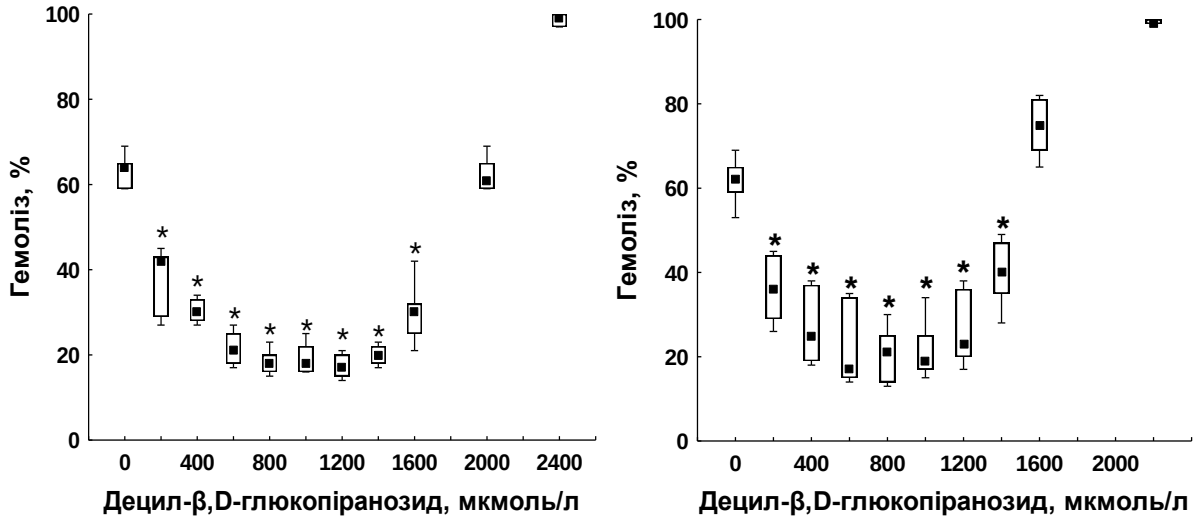


А Б

Рис. 3.12. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів кролика (А) і щура (Б) від концентрації децилсульфат натрію в середовищі регідратації (0°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

При вивчені ПГГ еритроцитів тварин за 0°С у присутності неіонного децил-β,D-глюкопіранозиду (рис. 3.13) було виявлено, що він здатен значно знижувати рівень гемолізу.



А Б

Рис. 3.13. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів кролика (А) і щура (Б) від концентрації децил-β,D-глюкопіранозиду в середовищі регідратації (0°С). ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$).

За даними роботи [167] було показано, що неіонний ДГП знижує рівень гіпертонічного шоку еритроцитів людини незалежно від температури (5–20°С). Дотримуючись даного факту, можливо припустити, що неіонний амфіфіл зможе проявити захисну дію щодо еритроцитів за умов ПГШ за температури 37°С. Проведенні дослідження із застосуванням ДГП показали, що за умов ПГШ еритроцитів кролика та щура при температурі 37°С ця речовина не знижує рівень ПГГ клітин тварин (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Вплив децил-β,D-глюкопіранозиду на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів кролика та щура за температури 37°С (Me, n = 7)

Еритроцити тварин	Концентрація ДГП, мкмоль/л					
	0	200	400	600	800	1200
Кролик	35	36	36	36	36	73
Щур	90	83	82	95	99	100

Для кількісної оцінки ефективності дії досліджених амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів ссавців з отриманих залежностей (рис. 3.2 – 3.13) були встановлені розміри плато, визначені значення ефективних концентрацій та розраховані величини антигемолітичної активності речовин (табл. 3.8). З табл. 3.8 видно, що ефективні концентрації трохи відрізняються для різних видів ссавців, за умов ПГШ еритроцитів, причиною цього є неоднакова ширина плато. Оскільки значення ефективних концентрацій відповідають середині плато, то вони будуть визначатися його розмірами (шириною) і положенням по осі абсцис. Так ефективна концентрація ДГП для еритроцитів людини і кролика становить 1000 мкмоль/л, а щура – 800 мкмоль/л. Це у 2,5 раза перевищує ефективну концентрацію С10 відповідно, у 2 рази – ХПР, і приблизно у 7 разів ТФП. Величина ККМ для молекул ДГП на порядок нижче (2200 моль/л) на відміну від С10 і ХПР [150]. Таким чином, у концентрації 2200 мкмоль/л ДГП досягає значення ККМ, що може надавати літичну дію на клітини.

Таблиця 3.8

Значення максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$), ефективних концентрацій ($С_{еф}$) амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів ссавців за температури 0°С. Значення максимальної антигемолітичної активності представлені як Ме – медіана, Q1–Q3 – інтерквартильний інтервал.

Еритро-цити	Значення	ХПР	ТФП	С10	ДГП
Людина	$АГ_{макс}$, %	70 (64 – 74)	60 (45 – 77)	74 (66 – 78)	62 (61 – 70)
	$С_{еф}$, мкмоль/л	600	150	400	1000
Кролик	$АГ_{макс}$, %	55* (51 – 59) p=0,017961	55 (50 – 58)	71 (68 – 74)	72 (72 – 75)
	$С_{еф}$, мкмоль/л	500	150	500	1000
Щур	$АГ_{макс}$, %	81*§ (73 – 84) p=0,017961	84*§ (81 – 89) p=0,027709	56*§ (50 – 59) p=0,027709	66 (63 – 75)
	$С_{еф}$, мкмоль/л	500	175	300	800

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами людини; § – статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами кролика ($p < 0,05$).

Аналіз ефективності амфіфільних сполук, які належать до різних класів ПАР, за умов ПГШ еритроцитів різних видів ссавців дозволив виявити видові особливості прояву їх антигемолітичної активності. Для еритроцитів людини всі досліджувані амфіфільні сполуки незалежно від їх фізико-хімічних властивостей проявляють досить високу антигемолітичну активність (60–70%) за умов ПГШ. Водночас для еритроцитів кролика більш виражений захисний ефект за умов ПГШ проявляють аніонний С10 і

неіонний ДГП. Навпаки для еритроцитів щура катіонні амфіфільні сполуки (ХПР і ТФП) виявилися найбільш ефективними порівняно з іншими видами ссавців. Слід зазначити, що для еритроцитів всіх досліджуваних видів ссавців неіонний ДГП проявляє приблизно однакову протектуючу дію (на рівні 60–70%). Розташувавши, амфіфільні сполуки в ряд за зменшенням їх антигемолітичної активності за умов ПГШ еритроцитів тварин отримали наступні послідовності: ДГП ≥ С10 > ХПР > ТФП для клітин кролика; ТФП ≥ ХПР > ДГП > С10 для еритроцитів щура.

Отже $АГ_{макс}$ активність досліджуваних амфіфільних речовин дуже відрізняється для тварин (кролика і щура), тоді як для людини вона практично сумірна на рівні 60–70%. Це може бути зумовлено відмінностями фосфоліпідного складу еритроцитарних мембран цих видів ссавців [13, 153].

Одним із принципів організації еритроцитарних мембран є трансбішарова асиметрія [168]: внутрішній і зовнішній моношари плазматичних мембран відрізняються вмістом фосфоліпідів. Внутрішній моношар ліпідного бішару збагачений аніонними фосфоліпідами: ФС, фосфатидилінозитол (ФІ), фосфатидна кислота (ФК) та цвіттеріоним – ФЕА. Тоді як зовнішній переважно містить: ФХ, сфінгомієлін (СМ) та лізофосфатидилхолін.

Згідно гіпотези сполученого бішару два моношари пов’язані та зміна площі одного з ліпідних моношарів призводить до зміни форми клітин [169]. При вбудовуванні ТФП і ХПР в еритроцитарну мембрану спостерігається трансформація клітин за типом дискоцит – стоматоцит, що свідчить про переважний розподіл цих амфіфільних молекул у внутрішньому моношарі мембрани. Аніонні С10, С12 і неіонний ДГП викликають зміну форми еритроцитів за типом дискоцит-ехіноцит, що дозволяє говорити про розподіл молекул в зовнішньому моношарі ліпідного бішару [148].

За умов ПГШ еритроцитів при використанні позитивно заряджених амфіфільних сполук ТФП і ХПР максимально протектуються клітини щура. Цей виявлений ефект може бути обумовлений здатністю еритроцитарних мембран щура пов’язувати значну кількість молекул ТФП і ХПР. Позитивно заряджені амфіфільні молекули при вбудовуванні в мембрану взаємодіють з негативно зарядженими фосфоліпідами, які знаходяться переважно у внутрішньому моношарі мембрани. Однак, дані роботи [13] свідчать про те, що за сумарним вмістом аніонних фосфоліпідів еритроцитарна мембрана щура не відрізняються від клітин людини. Можна припустити, що місця зв’язування катіонних амфіфільних сполук не обмежуються тільки негативно зарядженими фосфоліпідами. На цю роль можуть претендувати холінвмісні фосфоліпіди внутрішнього моношару мембрани. На користь цього припущення свідчать дані роботи [120], в якій було показано, що ТФП може взаємодіяти з ліпосомами, які містять ФХ з утворенням доменів. В роботі [13] показано, що ФХ, який в основному знаходиться в зовнішньому моношарі мембрани, частково представлений і у внутрішньому і, ця частина ФХ у внутрішньому моношарі мембрани еритроцитів щура вище в 1,2–1,4 раза порівняно з клітинами людини і кролика. Це може визначати більшу ефективність даних речовин (ХПР і ТФП) за умов ПГШ еритроцитів щура.

Для еритроцитів кролика катіонні амфіфільні сполуки виявились менш ефективними, ніж аніонні та неіонні [170]. Еритроцитарна мембрана кролика містить більше холестерину, ніж клітини щура та людини [171]. Нерівномірний розподіл ХС між двома моношарами бішару показано як на модельних системах (одношарові везикули 600 Å), приготованих з мононенасичених ліпідів [172], так і на природних мембранах [173]. Кількісний аналіз за допомогою флуоресцентних стеролів (дегідроергостерол і холестатриенол) показав переважний розподіл холестерину у внутрішньому моношарі ліпідного бішару [174]. Зокрема,

для еритроцитів людини показано, що внутрішній моношар плазматичної мембрани містить 78% ХС, та його трансбішаровий розподіл не залежить від температури [175].

Позитивно заряджені ХПР і ТФП вбудовуються та розподіляються переважно у внутрішньому моношарі мембран, який в еритроцитах кролика збагачений ХС за рахунок його високого вмісту [171] та переважного розподілу у цьому моношарі [174]. Можна припустити, що менш виражений антигемолітичний ефект катіонних амфіфілів для еритроцитів кролика за умов ПГШ (порівняно з клітинами людини і щура) зумовлено впливом ХС на характер вбудування та розподілу молекул катіонних амфіфілів у внутрішньому моношарі.

Особливість прояву протекторної дії амфіфільних сполук може визначатися не тільки різним фосфоліпідним складом, але і білковими компонентами мембран еритроцитів ссавців. При дослідженні цитоскелету еритроцитів ссавців були виявлені деякі відмінності. Було виявлено зменшення кількості білків смуги 2.1+2.3 (анкірин) приблизно в 2 рази в еритроцитах кролика і щура порівняно з клітинами людини. Збільшення вмісту білка смуги 4.5 (GLUT1) спостерігається в ряду: людина < кролик < щур [14]. Для мембран еритроцитів щура характерна більша кількість білка смуги 8 і відсутність білка 6 (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази) та 6.9. [14, 176]. В мембрані еритроцитів кролика виявлена велика кількість білка смуги 4.9 порівняно з мембранами еритроцитів людини і щура.

Цитоскелет еритроцитів, який розташовано з цитоплазматичної сторони мембрани, взаємодіє з мембраною та забезпечує стабільність її структури. Ця взаємодія здійснюються за допомогою спеціальних (якірних) білків – анкірину та білку смуги 4.1 [177]. Слід зазначити, що білок смуги 4.1 поділяється на дві суб-смуги в мембрані еритроцитів кролика, в той час як у клітинах щура білки 4.1 і 4.2 мігрують разом [176].

Порівняльний аналіз білкових компонентів у складі цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів людини, кролика та щура не виявив суттєвих відмінностей. Але наявність деяких особливостей може впливати на здатність еритроцитів ссавців протистояти дії температуро-осмотичного стресу. Вищезазначена стійкість еритроцитів кролика за умов ПГШ, ГШ і ГК може бути пов'язана з відсутністю трансмембранного білка – глікофорину А [161]. Висока чутливість еритроцитів щура до дії стресових факторів імовірно обумовлена незначним вмістом якірних білків (анкірину та білка смуги 4) [14].

3.3. Стійкість еритроцитів людини до нагрівання після сумісної дії постгіпертонічного шоку і амфіфільних сполук

Як було показано в підрозділі 3.1, всі амфіфільні сполуки (ТФП, С10, ДГП) за температури 0°С проявляють досить високу антигемолітичну активність за умов ПГШ еритроцитів людини. Однак, їх захисного ефекту не виявлено за температури 37°С. Слід зазначити, що величини ефективних концентрацій амфіфілів за умов ПГШ еритроцитів набагато вищі порівняно з іншими видами стресу. Так, за умов ГШ і ГК еритроцитів концентрації амфіфільних речовин приблизно в 5 – 10 разів нижчі [65 – 67, 144 – 146]. Тому становило інтерес з'ясувати, чи стійкі до нагрівання клітини, які збереглися після проведення ПГШ в присутності амфіфільних речовин в ефективних концентраціях, за 0°С.

Для оцінки стану клітин, які збереглися після дії ПГШ за 0°С і амфіфілу, варіювали температуру. Експеримент проводили у такий спосіб, еритроцити інкубували в середовищі дегідратації (1,65 моль/л NaCl) впродовж 20 хв, потім ізотермічно переносили в середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl) на 5 хв за температури 0°С. Після чого клітинну суспензію нагрівали і витримували 30 хв у водяній ванні при різних

значеннях температури з діапазону 0 – 37°С. Амфіфільні речовини знаходились у середовищі регідратації перед внесенням в неї клітин в концентраціях, які відповідають початку і середині плато.

На рис. 3.14 представлені результати впливу температури на рівень гемолізу клітин, які збереглися після проведення ПГШ за 0°С при використанні ТФП. Видно, що при застосуванні ТФП в концентрації 50 мкмоль/л (початок плато, див рис. 3.2, А) при підвищенні температури пошкодження клітин залишається на одному і тому ж рівні. При використанні ТФП в ефективній концентрації 150 мкмоль/л (середина плато див рис. 3.2, А) гемоліз клітин трохи нижче ніж при застосуванні його в концентрації 50 мкмоль/л за температури 0°С. Однак розвиток постгіпертонічного гемолізу еритроцитів спостерігається за температури 20°С і вище (150 мкмоль/л).

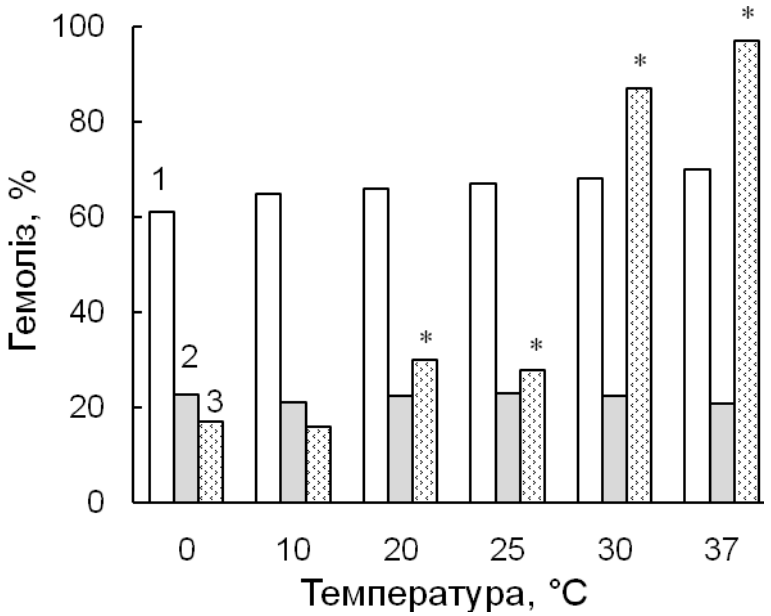


Рис. 3.14. Вплив температури на гемоліз еритроцитів, що збереглися після проведення ПГШ в присутності ТФП в середовищі регідратації; 1 – контроль; 2 – 50 мкмоль/л; 3 – 150 мкмоль/л. (Me, n=7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

За використання ДГП в концентраціях 200 і 600 мкмоль/л (які відповідають початку і середині плато, див. рис. 3.7) нагрівання від 0 до 37°С призводило до лізису еритроцитів (~ 90%) тільки у високій концентрації речовини (600 мкмоль/л) за температури 37°С (рис. 3.15). В концентрації 200 мкмоль/л рівень ПГГ клітин не перевищував 15% при варіюванні температури.

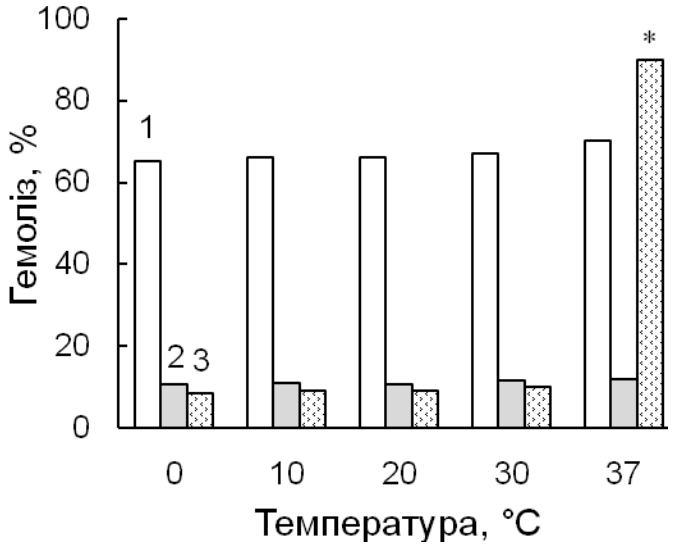


Рис. 3.15. Вплив температури на гемоліз еритроцитів, що збереглися після проведення ПГШ в присутності ДГП в середовищі регідратації; 1 – контроль; 2 – 200 мкмоль/л; 3 – 600 мкмоль/л. (Me, n=7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Подані на рис. 3.16 результати свідчать про те, що підвищення температури від 0 до 37°С не впливає на гемоліз еритроцитів, які збереглися після ПГШ (0°С) при використанні С10 як в низький (180 мкмоль/л), так і в високій концентраціях (400 мкмоль/л).

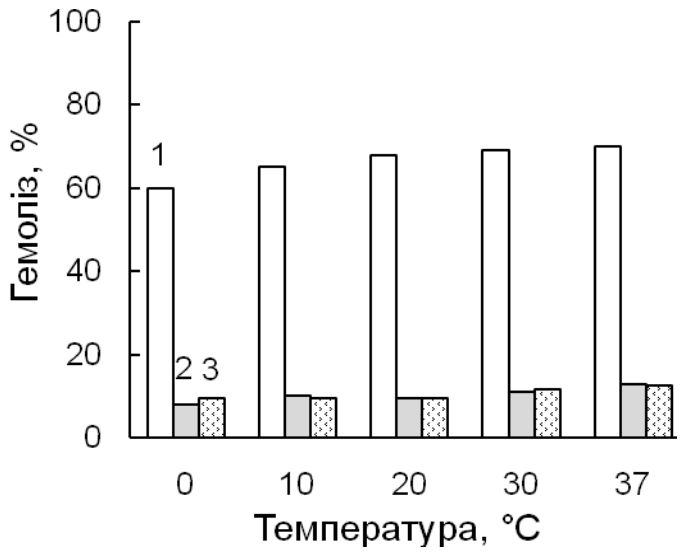


Рис. 3.16. Вплив температури на гемоліз еритроцитів, що збереглися після проведення ПГШ в присутності С10 в середовищі регідратації; 1 – контроль; 2 – 180 мкмоль/л; 3 – 400 мкмоль/л. (Me, n=7).

Таким чином, виявлено, що еритроцити, які збереглися після ПГШ (0°С) у присутності ТФП і ДГП, чутливі до підвищення температури, а у присутності С10 клітини стійкі до подальшого нагрівання. Слід зазначити, що для всіх досліджуваних амфіфільних речовин є можливість підібрати з плато концентрацію, нижче якої клітини будуть зберігати свою цілісність при нагріванні, проте антигемолітична активність амфіфілів буде трохи нижча.

Спектрофотометричне визначення гемолізу еритроцитів відображає пошкодження клітин у всій популяції. Реакцію окремих клітин до підвищення температури можна оцінити за допомогою світлової мікроскопії. По завершенню етапу регідратації спостереження за клітинами, які збереглись після ПГШ, проводили за допомогою світлової мікроскопії. Кінцевий гематокрит становив ~ 6 – 8%. Отримані результати представлені на рис. 3.17 – 3.20.

В якості контролю були еритроцити, які піддавали дії ПГШ (0°С) без додавання амфіфільних сполук (рис. 3.17).

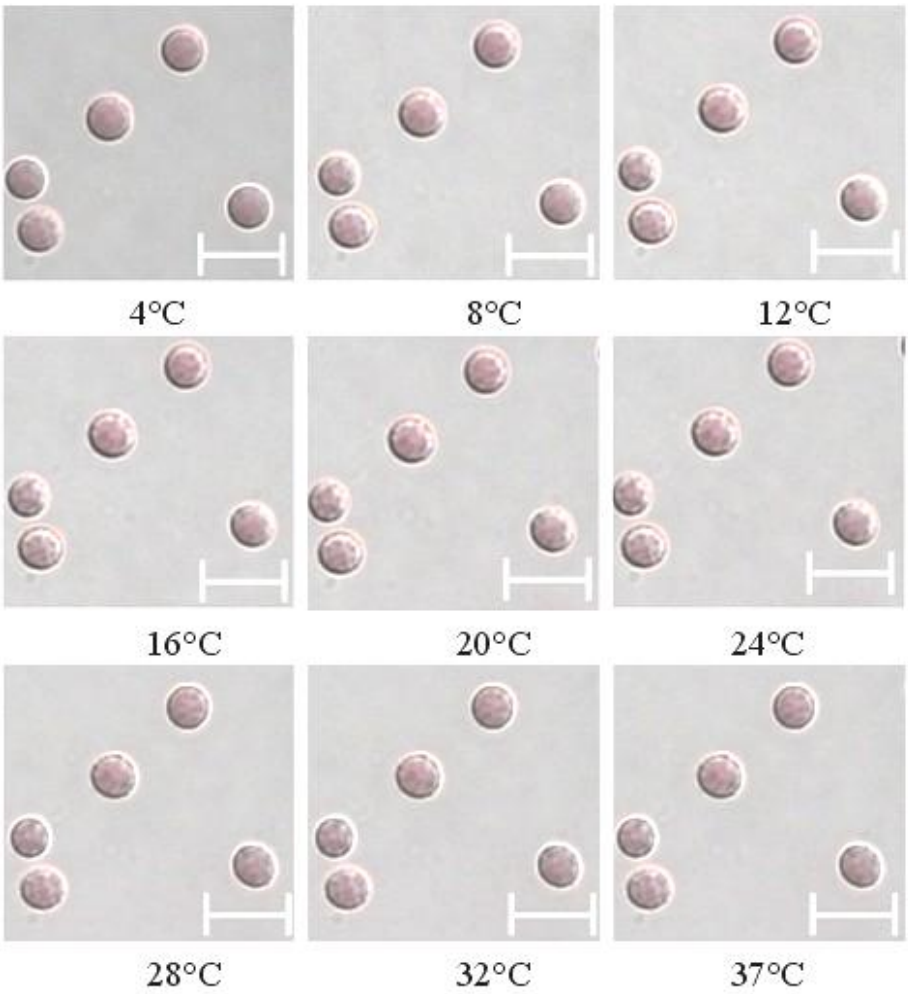


Рис. 3.17. Вплив температури на морфологічні особливості еритроцитів, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку (0°С) у відсутності амфіфільних сполук (├──┤ – шкала 10 мкм).

З рис. 3.17. видно, що контрольні еритроцити представлені сфероехіноцитами в температурному діапазоні 4 – 12°С, для яких характерне збільшення ознак ехіноцитозу в процесі підвищення температури до 37°С. При цьому кількість клітин у зразку не змінюється. Порівняльний аналіз морфології цих клітин показав розвиток ехіноцитарних особливостей еритроцитів при нагріванні [178].

На рис. 3.18 подано вплив температури на морфологічні особливості еритроцитів, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку (0°С) в присутності ТФП. На початку реєстрації морфології практично всі еритроцити мають форму двоввігнутого диска (рис. 3.18). В інтервалі температур (8–16°С) в зразку присутні еритроцити з ознаками стоматоцитозу. Морфологічна трансформація клітин до сфероцитів спостерігається за температури 16°С. Вже при 22°С відзначається поява тіней еритроцитів і при подальшому нагріванні спостерігається їх

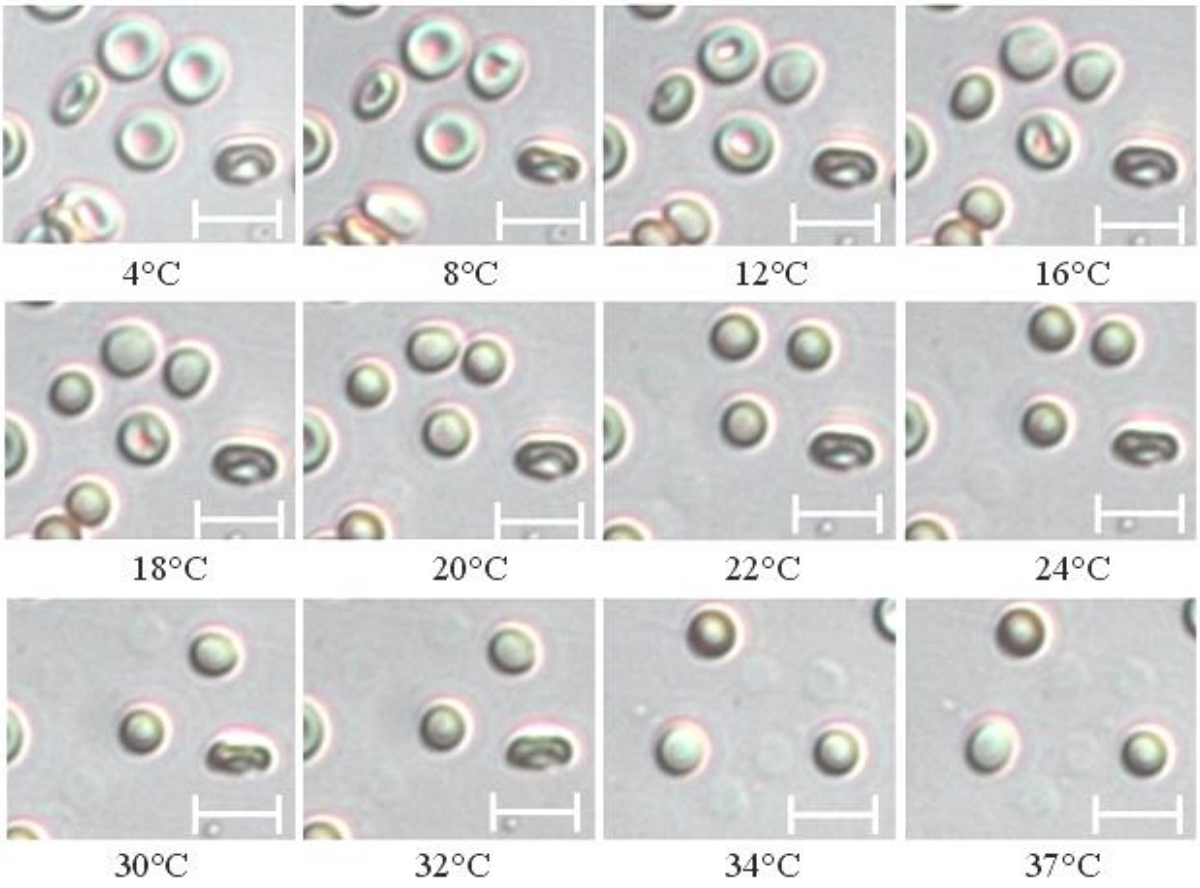


Рис. 3.18. Вплив температури на морфологічні особливості еритроцитів, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку (0°С) в присутності ТФП (150 мкмоль/л) (├──┤ – шкала 10 мкм).

збільшення. За температури 4°С середній діаметр еритроцитів становив 7,42 ± 0,72 мкм, а за 37°С – 6,30 ± 1,17 мкм. При нагріванні ТФП, ймовірно, сприяє реорганізації мембрани, що призводить до лізису.

На рис. 3.19 показано вплив температури на морфологічні особливості еритроцитів, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку (0°С) в присутності ДГП. На початку реєстрації морфологічного стану клітини мають сферичну форму (4–8°С) (рис 3.19). З підвищенням температури від 12 до 28°С клітини набувають ознак ехіноцитозу. За температури 32–37°С еритроцити приймають форму двоввігнутого диска, а

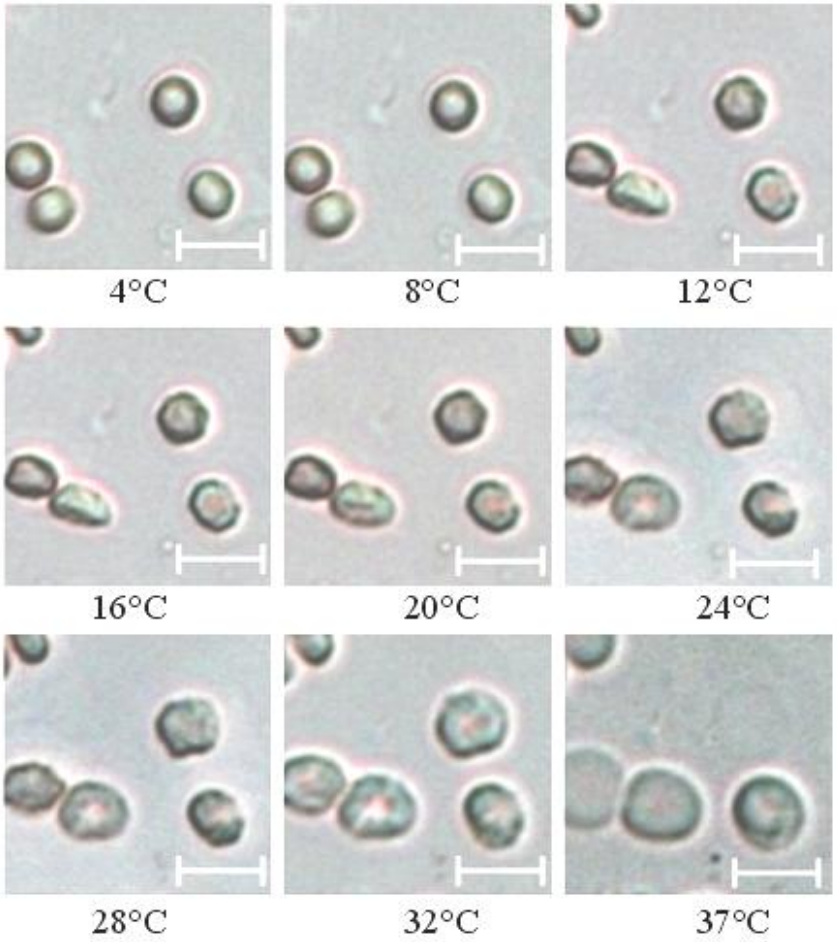


Рис. 3.19. Вплив температури на морфологічні особливості еритроцитів, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку (0°С) в присутності ДГП (600 мкмоль/л). (├──┤ – шкала 10 мкм).

також морфологічний зразок характеризується появою тіней (37°С). За температури 4–8°С середній діаметр еритроцитів становив 5,29±0,65 мкм, а за 37°С – 8,71±0,73 мкм. Слід зазначити, що гемоліз клітин спостерігається тільки за температури 37°С.

Еритроцити, що збереглися після дії ПГШ у присутності аніонного С10 при нагріванні, не піддаються лізису (рис. 3.20) З підвищенням

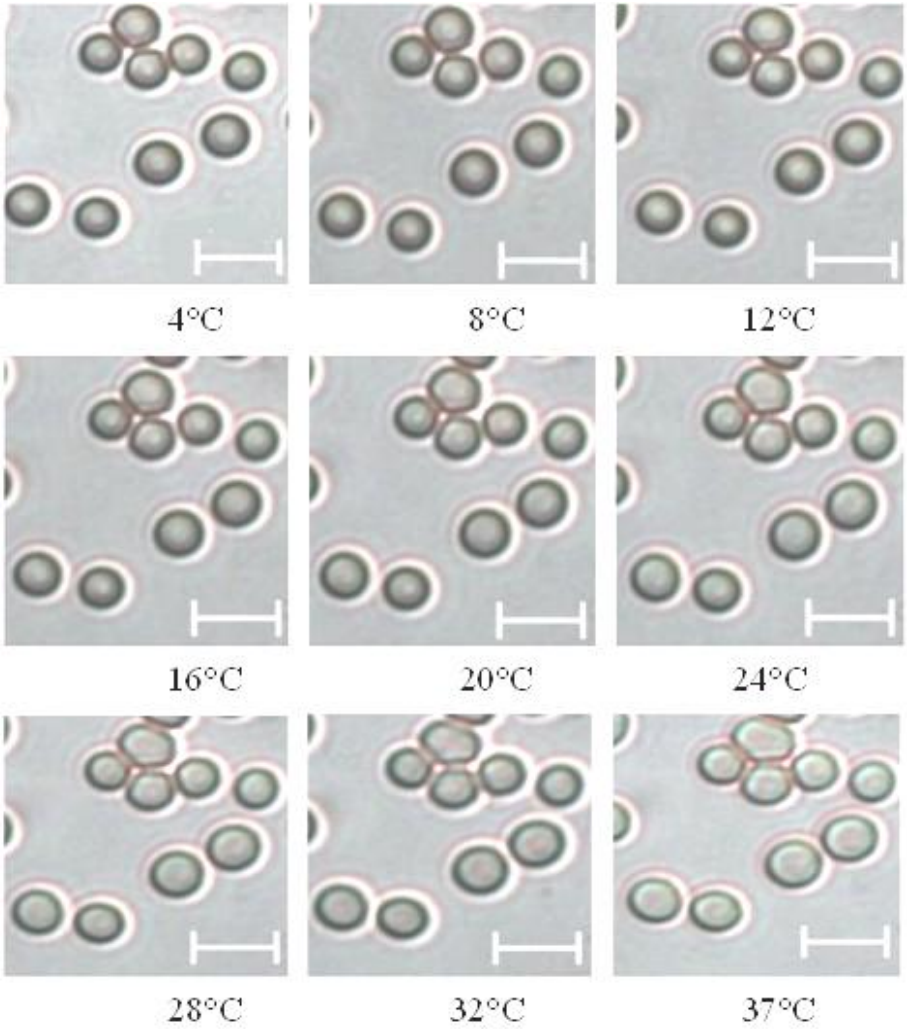


Рис. 3.20. Вплив температури на морфологічні особливості еритроцитів, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку (0°С) в присутності С10 (400 мкмоль/л). (├──┤ – шкала 10 мкм).

температури зразка характерно незначне збільшення клітин. Так за температури 4°С середній діаметр еритроцитів становив 5,26±0,41 мкм, а за 37°С – 6,17±0,53 мкм.

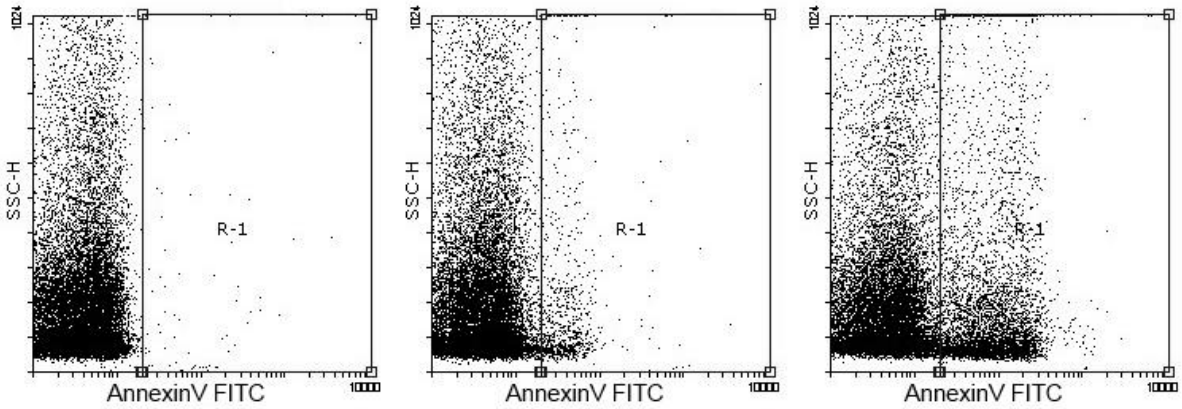
Такі морфологічні зміни і кількість клітин в присутності всіх досліджуваних амфіфільних сполук підтверджуються даними спектрофотометричного методу. Оцінка морфології цих клітин при нагріванні показала, що присутність ТФП (150 мкмоль/л) викликає незворотні зміни еритроцитів стоматоцит-сфероцити з подальшим збільшенням тіней. Використання неіонного ДГП (600 мкмоль/л) за умов ПГШ еритроцитів і подальше їх нагрівання призводить до трансформації клітин від сфероцитів до дискоцитів з незначними ознаками ехіноцитозу при загибелі клітин тільки при 37°С. Застосування аніонного С10 під час нагрівання еритроцитів, що збереглись після дії ПГШ, суттєво не впливає на морфологічний стан та перешкоджає лізису.

Оскільки за використання аніонного С10, кількість клітин не змінюється, це дозволяє говорити про стабільність захисного ефекту речовини під час збільшення температури (від 0 до 37°С). Мабуть, ця сполука може перешкоджати процесу реорганізації еритроцитарної мембрани, що відбувається при підвищенні температури, і, як наслідок, запобігає розвитку трансмембранної гемолітичної пори.

У зв’язку з тим, що еритроцити при підвищенні температури за використання аніонного С10 є стійкими, доцільним було дослідити стан еритроцитарної мембрани в присутності цього амфіфілу методом проточної цитофлуоримерії. Стан мембрани оцінювали за зміною трансмембранного розподілу ФС, який є маркерним фосфоліпідом внутрішнього моношару ліпідного бішару.

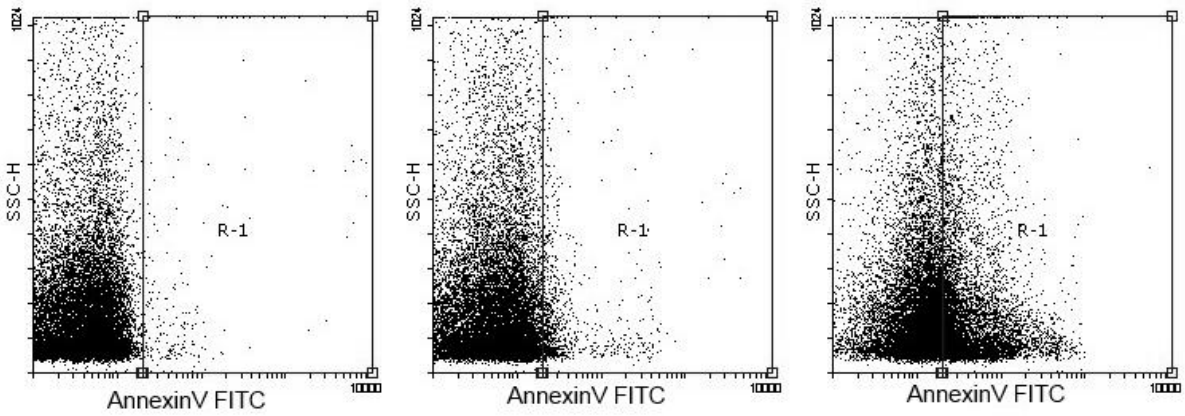
Результати проведених досліджень еритроцитів людини методом проточної цитофлуориметрії показали, що вміст контрольних еритроцитів (у відсутності амфіфілу), що зв’язали аннексін V, становило 0,34%

(рис. 3.21, А). У разі інкубування еритроцитів у фізіологічному розчині в присутності С10 в концентраціях 180 і 400 мкмоль/л кількість позитивно мічених клітин становив 4,32 та 22,6% відповідно. У разі проведення ПГШ еритроцитів при 0°С із залученням С10, відсоток позитивно мічених клітин був незначно вище. У концентрації 180 мкмоль/л складав 5,77%, у 400 мкмоль/л – 38,3% (рис. 3.22).



А Б В

Рис. 3.21. Цитограми еритроцитів людини після обробки децилсульфат натрієм у фізіологічному розчині при 0°С: А – контроль, Б – 180 мкмоль/л С10, В – 400 мкмоль/л С10. (по осі абсцис – інтенсивність флуоресценції аннексінV FITC в умовних одиницях).



А Б В

Рис. 3.22. Цитограми еритроцитів людини після дії постгіпертонічного шоку при 0°С у присутності децилсульфату натрію у середовищі регідратації: А – контроль, Б – 180 мкмоль/л С10, В – 400 мкмоль/л С10. (по осі абсцис – інтенсивність флуоресценції аннексін V FITC в умовних одиницях).

Отримані дані свідчать про те, що зі збільшенням концентрації аніонного С10 відсоток позитивно мічених клітин зростає, що свідчить про трансбішаровий перерозподіл ФС на зовнішній моношар у плазматичних мембранах еритроцитів людини.

За матеріалами розділу 3 опубліковані роботи [89, 142, 152, 170, 179 – 184]

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ГЛІЦЕРИНУ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ДО ДІЇ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ

При заморожуванні біологічного матеріалу найбільшу небезпеку становить механічне пошкодження мембран клітин внаслідок утворення кристалів льоду [185]. Для захисту клітин від пошкодження при заморожуванні використовують проникні та непроникні кріопротектори, [186] загальний механізм дії яких є здатність впливати на воду, що в результаті призводить до уповільнення росту кристалів льоду.

Наразі в медико-біологічній та лабораторній практиці при низькотемпературному зберіганні еритроцитів людини під захистом проникних кріопротекторів досить широко використовують гліцерин [39, 186 – 189]. Гліцерин, який є проникним кріопротектором, значно зменшує рівень пошкодження еритроцитів людини при заморожуванні-відігріванні за рахунок зниження ефективної концентрації солей при субнульовій температурі [190 – 192]. Однак гліцерин може бути і потенційним агентом, що пошкоджує клітини [193].

Дослідження впливу гліцерину (у концентрації 0,1 – 1,0 моль/л) на розвиток гіпертонічного і механічного гемолізу еритроцитів людини показало, що гліцерин значно знижує рівень гіпертонічного шоку еритроцитів людини (в 4,0 моль/л NaCl) і водночас не впливає на рівень гемолітичного пошкодження цих клітин в умовах механічного стресу [194].

Для того щоб оцінити вплив гліцерину на чутливість еритроцитів до дії ПГШ, одному з головних факторів при розморожуванні біологічного матеріалу, клітини після інкубування (37°С, 20 хв) з гліцерином піддавали

дії ПГШ, тобто переносили з гіпертонічною середовища (етап дегідратації) в ізотонічне середовище (етап регідратації) при 0 або 37°С.

У зв'язку з вищезазначеним, становило інтерес вивчити вплив гліцерину на чутливість еритроцитів людини до дії ПГШ за умов варіювання температури, концентрації гліцерину та NaCl, а також тривалості інкубування клітин у середовищах дегідратації та регідратації.

4.1. Стійкість еритроцитів людини при варіюванні умов проведення постгіпертонічного шоку

Розвиток постгіпертонічного гемолізу еритроцитів спостерігається в тому випадку, коли клітини переносять в середовище регідратації з середовищ, що містять NaCl в концентраціях, які перевищують 0,8 моль/л [75]. Відомо, що визначальним у розвитку ПГГ еритроцитів є етап дегідратації клітин. З підвищенням концентрації солі (1,0 – 2,0 моль/л NaCl) на 1-му етапі ПГШ за температури 37°С спостерігається зростання ПГГ еритроцитів [11]. Виходячи з цього, концентрація солі в середовищі дегідратації була обрана 1,5 моль/л NaCl. В залежності від тривалості інкубування клітин в гіпертонічних розчинах отримані часові залежності рівня ПГГ еритроцитів вказують на те, що зі збільшенням часу інкубації гемоліз зростає [11, 195].

Представляло інтерес дослідити вплив гліцерину та тривалості інкубування клітин у середовищі дегідратації на рівень ПГГ еритроцитів людини за температури 37 і 0°С. Час інкубації клітин у середовищі регідратації було фіксованим і становило 5 хв. Отримані результати за температури 37°С подані на рис. 4.1. В якості контрольних клітин розглядаються еритроцити, які піддавали дії ПГШ (1,5 моль/л NaCl → 0,15 моль/л NaCl) без попередньої обробки гліцерином (залежність 1). Експериментальними клітинами є еритроцити, що піддавали дії ПГШ із

застосуванням гліцерину. Експеримент проводили в двох варіантах. У першому варіанті еритроцити попередньо обробляли гліцерином у кінцевій концентрації 15% (20 хв, 37°С) і далі піддавали дії ПГШ (залежність 2). У другому варіанті клітини після попередньої обробки гліцерином піддавали дії ПГШ, проте в цьому випадку гліцерин (15%) був додатково присутній і у середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl) (залежність 3).

Як видно з рис. 4.1, зі збільшенням часу інкубації контрольних клітин (від 5 до 20 хв) у середовищі дегідратації спостерігається зростання рівня гемолізу еритроцитів (залежність 1). За умов подальшого збільшення часу інкубації приріст ПГГ еритроцитів незначний. Це узгоджується з даними, представленими у роботі [11].

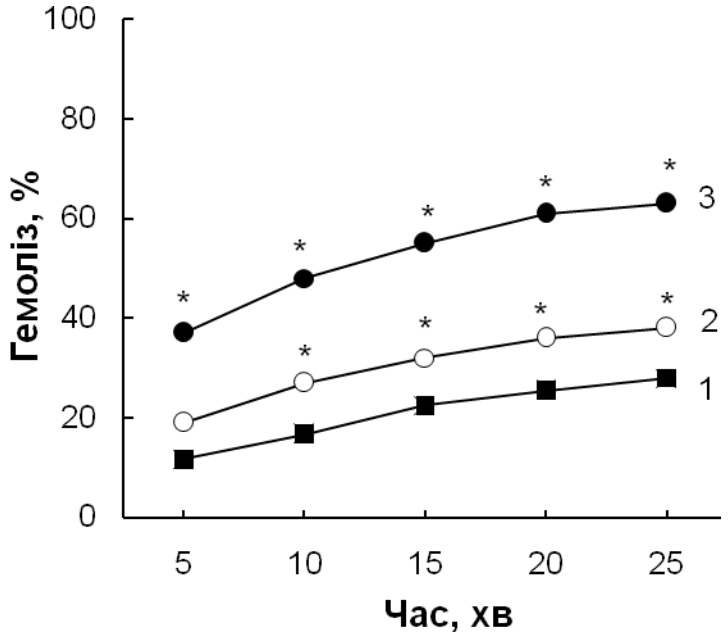


Рис. 4.1. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), від часу інкубації в середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl) за 37°С: без гліцерину (1); в присутності гліцерину на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3). (Me, n = 7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

У разі присутності гліцерину на етапі попередньої обробки клітин (рис. 4.1, залежність 2), гемоліз еритроцитів дещо вище порівняно з контролем. У тому випадку, коли клітини, попередньо оброблені гліцерином, переносили в середовище дегідратації, яке містить кріопротектор, характер залежності ПГГ еритроцитів (рис. 4.1, залежність 3) від часу інкубації схожий з контролем. У останньому випадку рівень ПГГ еритроцитів (при 20 хв інкубуванні в середовищі дегідратації) вище приблизно в 2,3 раза порівняно з контролем. У зв'язку з тим, що основний приріст пошкодження клітин із застосуванням гліцерину спостерігається при інкубуванні еритроцитів у середовищі дегідратації до 20 хв за умов ПГШ (рис.4.1), для подальших досліджень був обраний час інкубації клітин у середовищі дегідратації саме 20 хв [196, 197].

На рис. 4.2 представлені результати дослідження впливу гліцерину на ПГГ еритроцитів при варіюванні часу інкубації клітин у середовищі регідратації при фіксованій тривалості експозиції в середовищі дегідратації (20 хв). Видно, що застосування гліцерину призводить до більш високого рівня ПГГ еритроцитів порівняно з контролем, причому в разі застосування кріопротектору на двох етапах (попередня обробка клітин та на етапі дегідратації) ця особливість є більш вираженою. В останньому випадку при максимальній тривалості інкубування еритроцитів в середовищі регідратації (20 хв) рівень пошкодження клітин приблизно в 2 рази вище порівняно з контролем.

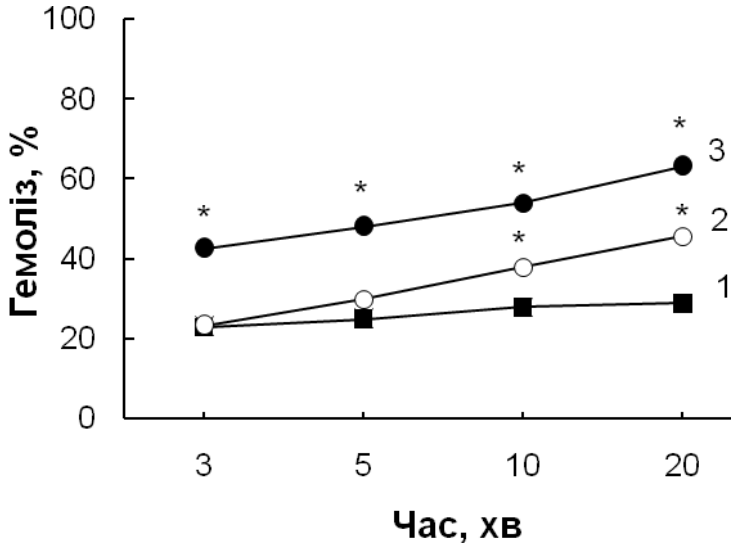


Рис. 4.2. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), від часу інкубації в середовищі регідратації (0,15 моль/л NaCl) за 37°С: без гліцерину (1); в присутності гліцерину на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3). (Me, n = 7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Для більш повної характеристики ПГГ еритроцитів у присутності гліцерину досліджували кінетику процесу гемолізу методом малокутового світлорозсіювання. Типові залежності зміни оптичної щільності суспензії еритроцитів на різних етапах ПГШ подані на рис. 4.3.

При вивченні кінетики постгіпертонічного гемолізу еритроцитів методом малокутового світлорозсіювання (рис. 4.3), показано, що основне пошкодження в середовищі регідратації відбувається за декілька секунд та потім залежності виходять на плато (рис. 4.3 залежності 3 і 4). Ці відмінності отриманих результатів (рис. 4.2 і 4.3) пояснюється тим, що в останньому випадку гематокрит був на порядок нижче (0,04%).

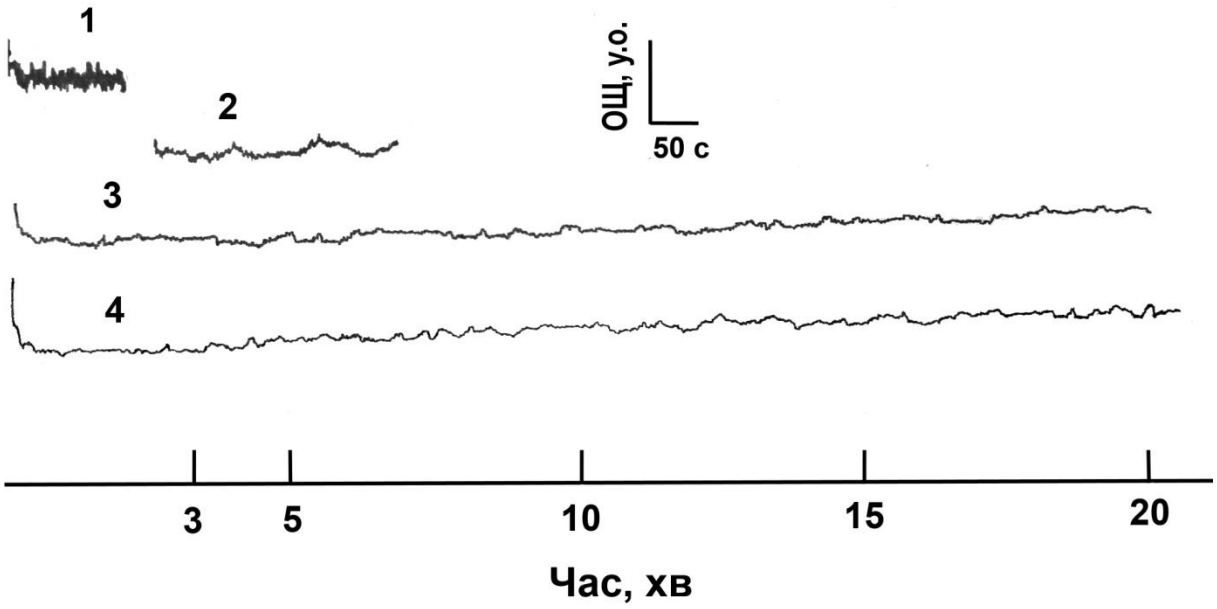


Рис. 4.3. Кінетика постгіпертонічного гемолізу еритроцитів на етапі регідратації: 1 – клітини в фізіологічному розчині; 2 – клітини у середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl); 3 – еритроцити, попередньо оброблені гліцерином (15%); 4 – еритроцити, попередньо оброблені гліцерином (15%), в середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl), яке містить гліцерин. Температура інкубації з гліцерином 37°С. Температура в кюветі – 20±2°С.

Було доцільним вивчити вплив гліцерину та тривалості експозиції клітин у середовищі дегідратації на рівень ПГГ еритроцитів людини за температури 0°С. Отримані результати представлені на рис. 4.4. Видно, що часова залежність ПГГ контрольних клітин (залежність 1) виходить на плато вже при 15 хв інкубуванні еритроцитів в середовищі дегідратації. Слід зазначити, що рівень ПГГ контрольних еритроцитів трохи нижче за температури 0°С порівняно з аналогічними даними за 37°С (рис. 4.1, 4.4 залежність 1).

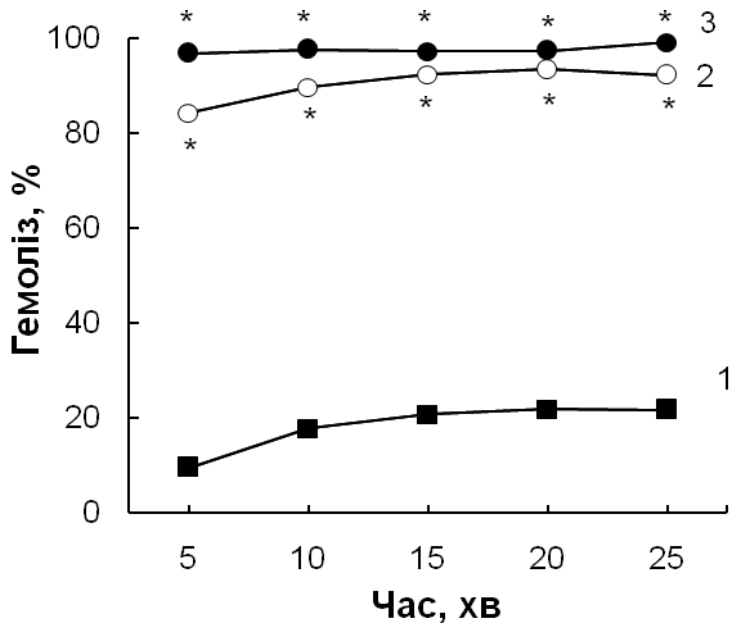


Рис. 4.4. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), від часу інкубації в середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl) за 0°С: без гліцерину (1); у присутності гліцерину на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3). (Me, n = 7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

У разі застосування гліцерину як на етапі попередньої обробки клітин, так і на 2-х етапах – попередньої обробки клітин і в середовищі дегідратації (рис. 4.4, залежності 2, 3) спостерігається значне підвищення рівня ПГГ еритроцитів (80-100 %) порівняно з відповідними контрольними значеннями. Слід зазначити, що в першому випадку (попередня обробка клітин гліцерином) спостерігається часова залежність ПГГ еритроцитів, яка виходить на плато при 15 хв інкубуванні клітин, на відміну від другого випадку.

Варіювання часу інкубування еритроцитів на етапі регідратації ПГШ еритроцитів за температури 0°С (рис. 4.5) не виявило суттєвих змін розвитку ПГГ як контрольних (залежність 1), так і експериментальних клітин (залежності 2, 3).

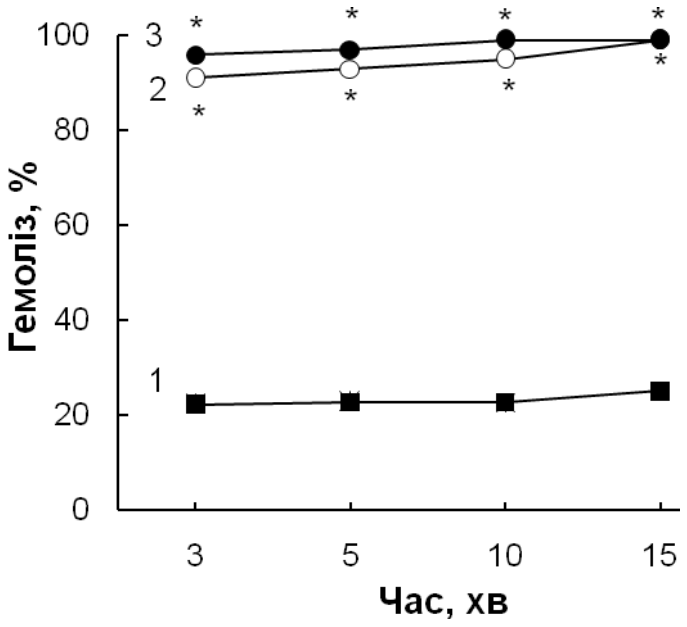


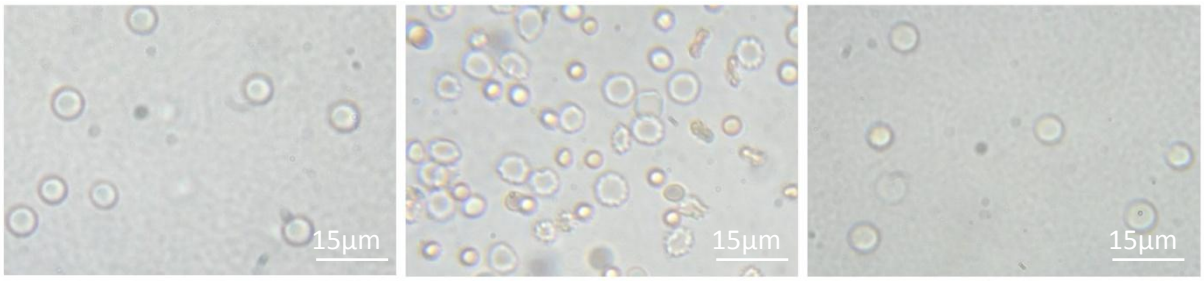
Рис. 4.5. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), від часу інкубації в середовищі регідратації (0,15 моль/л NaCl) за 0°С: без гліцерину (1); у присутності гліцерину на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3). (Me, n = 7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Порівняльний аналіз результатів (рис. 4.1, 4.2, 4.4, 4.5) свідчить про те, що час інкубації еритроцитів у середовищі дегідратації є більш значимим для розвитку ПГГ еритроцитів у присутності гліцерину, ніж на етапі регідратації.

У зв’язку з тим, що за умов ПГШ еритроцитів (37 і 0°С) із застосуванням гліцерину значний приріст пошкодження клітин спостерігається при інкубуванні в середовищі дегідратації впродовж 20 хв та у середовищі регідратації – 5 хв (рис. 4.1, 4.2, 4.4, 4.5), тому для подальших досліджень був обраний вищевказаний час інкубування клітин у зазначених середовищах. Крім того, у більшості робіт, які присвячені дослідженню розвитку ПГШ еритроцитів, використовують саме ці часові параметри інкубації [11, 195], що дозволяє під час аналізу результатів здійснювати їх порівняння.

Досліджували морфологічні особливості еритроцитів людини, які обробляли гліцерином в концентрації 15%, а потім послідовно переносили в середовища дегідратації і регідратації. Обробку клітин гліцерином (кінцева концентрація 15%) проводили за температури 37°С впродовж 20 хв. Постгіпертонічний шок здійснювали шляхом перенесення клітин із середовища дегідратації, що містить 1,5 моль/л NaCl, в середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl) за температури 37°С. Результати подані на рис. 4.6 і 4.7.

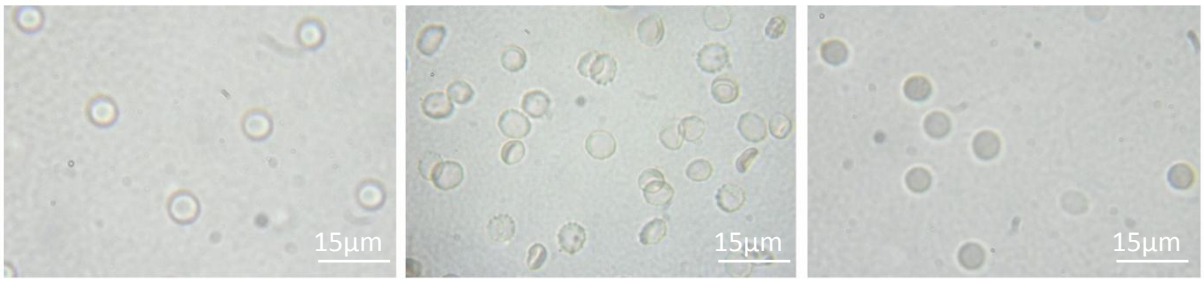


А → Б → В

Рис. 4.6. Морфологія еритроцитів, які після обробки гліцерином (15%) були піддані дії ПГШ: А – еритроцити, оброблені гліцерином; Б – еритроцити, перенесені у середовище дегідратації (1,5 моль/л NaCl); В – еритроцити, перенесені у середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl). Температура проведення експерименту з ПГШ – 37°С; мікроскопічного дослідження – 20±2°С.

З рис. 4.6, А видно, що еритроцити після інкубації з гліцерином (15%) впродовж 20 хв представлені дискоцитами. Перенесення клітин насичених гліцерином у гіпертонічне середовище (1,5 моль/л NaCl) викликає зміну форми еритроцитів (рис. 4.6, Б). Клітини в даному випадку поділяються на 2 популяції, які рівні за часткою. Так частка клітин набуває ехіноцитарних особливостей (дискоехіноцити), тоді як решта – округлої форми зі зменшеним об’ємом, імовірно, за рахунок стиснення. Подальше перенесення таких клітин у середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl) призводить до трансформації клітин у дископодібну форму та лізису більшої частини еритроцитів (рис. 4.6, В).

На рис 4.7 представлені еритроцити, які після попередньої обробки гліцерином (рис. 4.7, А) переносили у середовище дегідратації, що містило гліцерин (рис. 4.7, Б), а потім додавали у середовище регідратації (В). У разі присутності гліцерину в середовищі дегідратації (Б) також спостерігається поділ клітин на 2 популяції, які майже рівні за часткою.



А → Б → В

Рис. 4.7. Вплив гліцерину і ПГШ на морфологію еритроцитів людини: А – еритроцити, оброблені гліцерином; Б – еритроцити, перенесені у середовище дегідратації (1,5 моль/л NaCl), що містить гліцерин (15%); В – еритроцити, перенесені у середовище регідратації (0,15 моль/л NaCl). Температура проведення експерименту з ПГШ – 37°С; мікроскопічного дослідження – 20±2°С.

Але як видно, частка еритроцитів набуває інвагінованих, стоматоцитарних форм, а інша представлена ехіноцитами. Подальше перенесення цих клітин у середовище регідратації (В) призводить до появи тіней.

Представлені вище результати отримані при використанні гліцерину в концентрації 15%. Для того, щоб більш ретельно вивчити ефект даного кріопротектору (гліцерину) на розвиток ПГГ еритроцитів варіювали його концентрацію при різних температурних режимах. В усіх випадках насичення клітин гліцерином здійснювали за температури 37°С впродовж 20 хв.

Після інкубації еритроцитів з різними концентраціями гліцерину (5, 10, 15%) їх піддавали дії ПГШ за температури 37 або 0°С. Результати представлені в табл. 4.1. Видно, що з підвищенням концентрації гліцерину рівень гемолізу еритроцитів зростає як за температури 37°С, так і за 0°С.

У разі використання гліцерину в концентраціях 5 і 10% за 37°С рівень ПГГ еритроцитів знаходиться в межах гемолізу контрольних клітин, які не були оброблені кріопротектором. Ймовірно, гліцерин повністю виходить з клітин на етапі дегідратації, тому рівень ПГГ не змінюється. У високій концентрації гліцерину (15%), можливо, тільки частина гліцерину виходить з клітин у середовищі дегідратації, тому на етапі регідратації води в клітини має увійти більше, тому рівень пошкодження еритроцитів зростає. За температури 0°С гліцерин, незважаючи на використання його в найменшій концентрації (5%), призводить до досить високого значення рівня ПГГ клітин (84%). Це може вказувати на те, що на етапі дегідратації гліцерин не встигає вийти з клітин, оскільки зі зниженням температури швидкість перенесення речовин через клітинну мембрану падає відповідно до закону Арреніуса [198].

Таблиця 4.1.

Вплив попередньої обробки гліцерином на рівень гемолізу (%) еритроцитів, перенесених із 1,5 в 0,15 моль/л NaCl (Me, n = 7)

Температура	Концентрація гліцерину, %			
	0	5	10	15
37°C	25	25	25	38*
0°C	22	84*	92*	93*

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Виходячи з цього, становило інтерес дослідити, що буде відбуватися з еритроцитами, обробленими гліцерином, за умов ПГШ, якщо додати кріопротектор на етапі дегідратації. Результати, отримані за температур 37 та 0°C подані в табл. 4.2.

Таблиця 4.2.

Вплив гліцерину в середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl) на рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (%) (Me, n = 7)

Температура	Концентрація гліцерину, %			
	0	5	10	15
37°C	25	27	37*	62*
0°C	22	79*	96*	97*

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Як видно з табл. 4.2, додавання гліцерину (у відповідній концентрації) в гіпертонічне середовище призводить до додаткового

збільшення ПГГ еритроцитів порівняно з клітинами за умов відсутності гліцерину на етапі дегідратації (див. табл. 4.1). Збільшення концентрації гліцерину (на кожні 5%) призводить до приросту рівня ПГГ клітин приблизно в 1,5 раза за температури 37°С. Отже, додаткове пошкодження клітин спостерігається за умов ПГШ при використанні гліцерину в високих концентраціях при 37°С, а при 0°С – в усьому концентраційному діапазоні кріопротектору.

Присутність гліцерину в гіпертонічному середовищі може приводити до додаткового збільшення внутрішньоклітинного вмісту гліцерину на етапі дегідратації. Внаслідок цього на етапі регідратації в клітини має увійти більше води, що і проявляється у високому рівні постгіпертонічного гемолізу клітин. Високий рівень ПГГ еритроцитів у всьому використовуваному концентраційному діапазоні гліцерину спостерігається за 0°С. Можна припустити, що за 0°С гліцерин, присутній на етапі дегідратації, не входить в клітини, а як непроникна речовина вносить додатковий внесок у підвищення осмотичного тиску зовнішнього середовища.

Оскільки рівні ПГГ еритроцитів в присутності гліцерину за температур 0 та 37°С суттєво відрізняються (табл. 4.1 і 4.2), тому було доцільним детальніше дослідити температурну залежність ПГГ цих клітин. Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали ізотермічним перенесенням клітин із середовища дегідратації (1,5 моль/л NaCl) в середовище регідратації, при цьому температуру експерименту варіювали з кроком 5°С (від 0 до 37°С). При цьому попередню обробку клітин гліцерином (15%) здійснювали за 37°С впродовж 20 хв.

З представлених результатів (рис. 4.8, залежність 1) видно, що підвищення температури в діапазоні від 5 до 25°С практично не змінює рівень гемолізу еритроцитів і знаходиться в межах 10–20%. При подальшому підвищенні температури рівень ПГГ еритроцитів зростає та за

37°С становить близько 30%. Температурна залежність 2, отримана для клітин, попередньо оброблених гліцерином, має деякі такі особливості. Видно, що за температури 0°С значення гемолізу клітин перевищують аналогічні показники для необроблених гліцерином еритроцитів приблизно в 4 рази. В діапазоні температур від 5 до 30°С спостерігається рівномірне зниження рівня гемолізу еритроцитів від 90 до 25%. Таким чином, зміна температури на кожні 5°С (у діапазоні від 5 до 30°С) відбувається падіння даного показника приблизно у 1,35 раза. Слід зазначити, що значення ПГГ клітин, не оброблених і оброблених гліцерином, збігаються за температури 30°С.

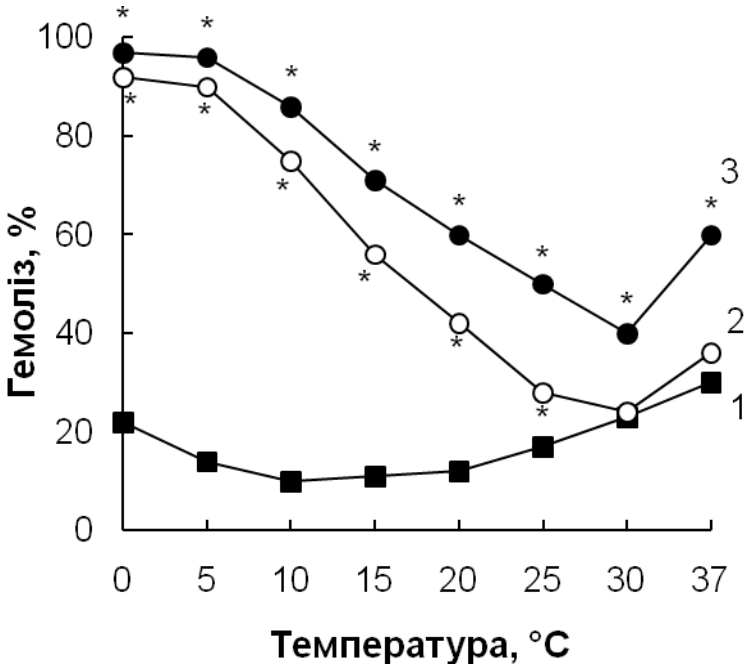


Рис. 4.8. Температурна залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів: без гліцерину (1); в присутності гліцерину (15%) на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3). Концентрація NaCl у середовищі дегідратації 1,5 моль/л. (Me, n = 7).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Присутність гліцерину додатково і в середовищі дегідратації (рис. 4.8, залежність 3) не змінює характер температурної залежності ПГГ еритроцитів, попередньо оброблених кріопротектором (рис. 4.8, залежність 2). Однак, у разі присутності гліцерину і в середовищі дегідратації рівень пошкодження клітин вище, особливо у температурному діапазоні від 15 до 37°С. Слід зазначити, що зниження гемолізу еритроцитів у разі використання гліцерину більш виражено за високих температур (15–37°С), це обумовлено особливостями температурної залежності проникності еритроцитарних мембран для гліцерину [198, 199].

При аналізі ПГГ еритроцитів ссавців авторами роботи [11] було показано, що підвищення концентрації солі (в діапазоні 1,0– 2,0 моль/л NaCl) на етапі дегідратації супроводжується зростанням гемолізу еритроцитів, що реєструється в середовищі регідратації. Вивчення часових залежностей різних етапів ПГШ еритроцитів різних видів ссавців показало важливість етапу дегідратації [11]. Аналіз часових залежностей на етапах дегідратації і регідратації при використанні гліцерину (рис. 4.1, 4.2, 4.4, 4.5) вказують на особливу роль першого етапу в розвитку ПГГ еритроцитів. Таким чином, етап дегідратації вивчений достатньо на відміну від етапу регідратації. Вивченню ролі середовища регідратації в розвитку ПГГ еритроцитів присвячена робота [84]. Автори, вивчаючи, вплив якісного (аніонного) складу середовища регідратації на ПГГ еритроцитів, роблять висновок про те, що рівень ПГГ еритроцитів визначається надходженням в клітину проникних аніонів в момент регідратації, при цьому в регуляції стійкості еритроцитів до ПГШ бере участь цитоскелет.

У роботі варіювали умови етапу регідратації ПГШ еритроцитів за рахунок зміни концентрації солі в середовищі (при незмінному середовищі дегідратації 1,5 моль/л NaCl) і оцінювали рівень ПГГ клітин при 0 і 37°С. Щоб оцінити внесок гліцерину, як одного з факторів пошкодження, що діє

на етапі відмивання розморожених клітин, еритроцити, оброблені гліцерином, піддавали дії ПГШ. Концентрацію NaCl у середовищі регідратації варіювали від 0,15 до 0,6 моль/л (рис. 4.9 і 4.10).

На рис. 4.9 наведені значення ПГГ еритроцитів при варіюванні концентрації солі у середовищі регідратації за температури 0°С. Для контрольних клітин, які піддавали до дії ПГШ у відсутності гліцерину спостерігається незначне зниження рівня ПГГ еритроцитів при збільшенні концентрації солі в середовищі регідратації. Присутність гліцерину на етапі попередньої обробки клітин обумовлює високий рівень ПГГ

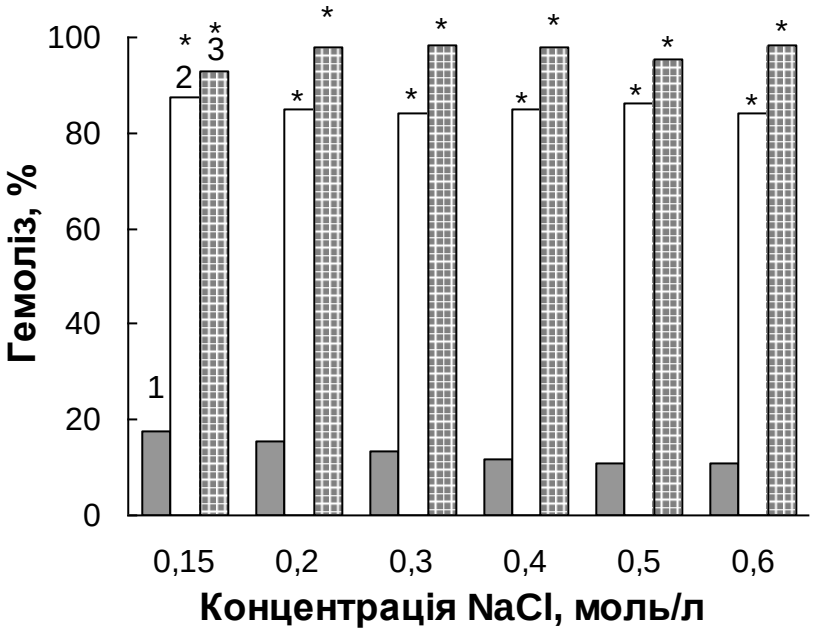


Рис. 4.9. Вплив гліцерину (15%) на рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів при варіюванні концентрації NaCl в середовищі регідратації за температури 0°С: контроль (1), в присутності гліцерину (15%) на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

еритроцитів (приблизно 90%), який не залежить від осмоляльності середовища регідратації. Слід зазначити, що додаткова присутність гліцерину в середовищі дегідратації призводить до зростання гемолізу еритроцитів.

При зміні температурних умов проведення експерименту, тобто при 37°С, з отриманих результатів, які представлені на рис. 4.10, видно, що з підвищенням концентрації NaCl у середовищі регідратації рівень ПГГ еритроцитів поступово знижується як для контрольних еритроцитів, так і для експериментальних клітин. Виявлена особливість вказує на те, що завдяки збільшенню концентрації солі у середовищі регідратації знижується ризик осмотичного шоку клітин внаслідок зменшення осмотичного градієнта на мембрані. Присутність гліцерину в середовищі дегідратації призводить до додаткового гемолітичного пошкодження еритроцитів, особливо у фізіологічному розчині (0,15 моль/л NaCl). Слід зазначити, що за температури 37°С (рис. 4.10) зменшення ПГГ контрольних клітин виражено більшою мірою, ніж при низький (рис. 4.9).

Аналіз результатів (рис. 4.10) показує, що при підвищенні концентрації NaCl від 0,15 до 0,6 моль/л в середовищі регідратації (при постійному вмісті солі в середовищі дегідратації – 1,5 моль/л NaCl) спостерігається зниження рівня ПГГ контрольних еритроцитів в 4,1 раза, а експериментальних клітин (з використанням гліцерину) приблизно в 3,5 раза.

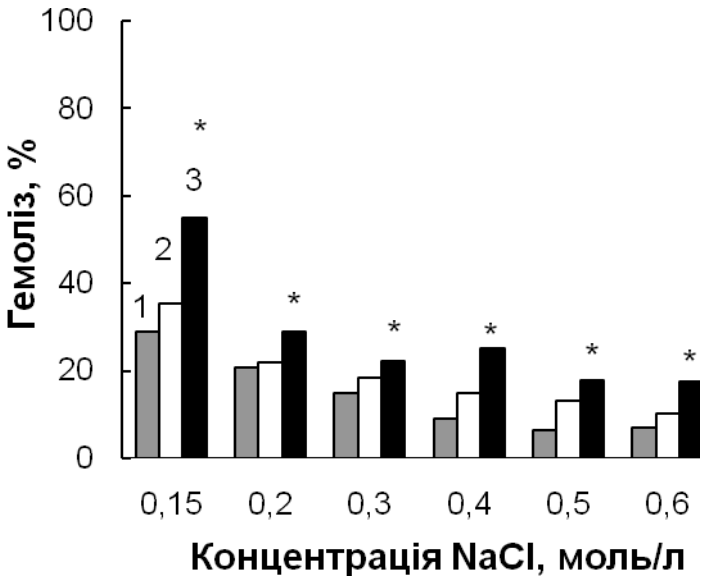


Рис. 4.10. Вплив гліцерину (15%) на рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів при варіюванні концентрації NaCl у середовищі регідратації за температури 37°С: контроль (1), в присутності гліцерину (15%) на етапі попередньої обробки клітин (2), на етапі попередньої обробки і в середовищі дегідратації (3).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Для дослідження впливу гліцерину на розвиток ПГГ еритроцитів вивчали часову залежність рівня ПГГ еритроцитів методом малокутового світлорозсіювання. На рис. 4.11 представлена кінетика ПГГ еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), в залежності від концентрації NaCl у середовищі регідратації.

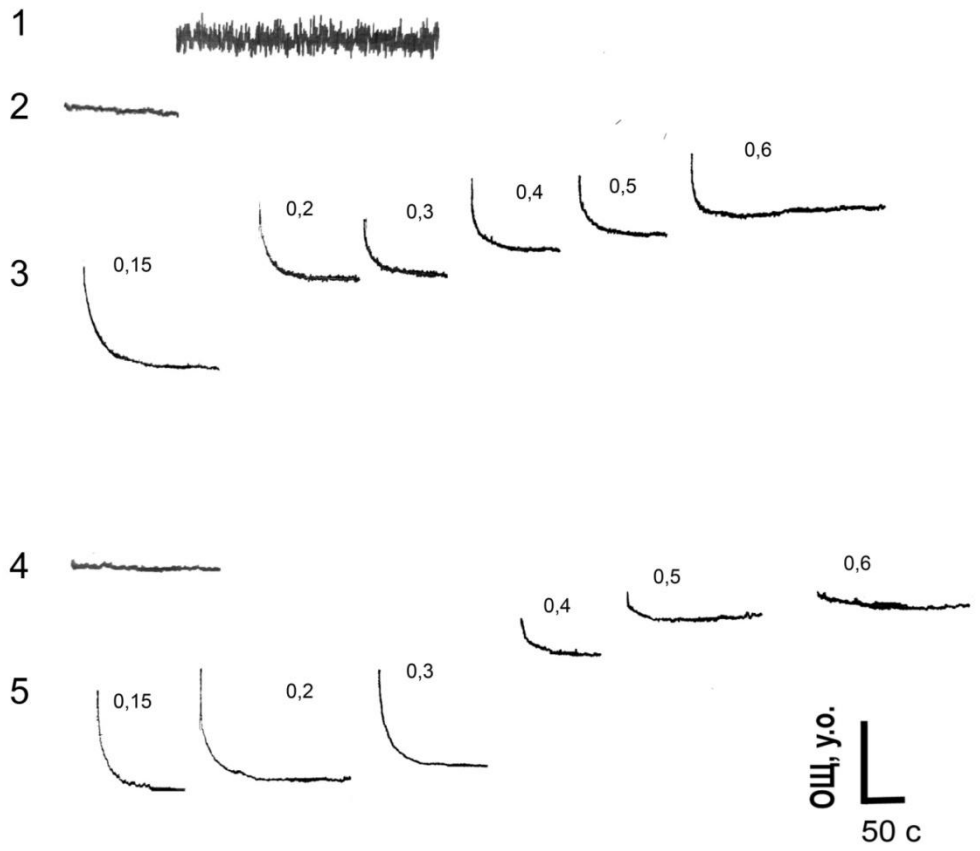


Рис. 4.11. Кінетика постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%): 1 – еритроцити в фізіологічному розчині (у відсутності гліцерину); 2 – еритроцити в середовищі дегідратації; 3 – клітини, піддані дії ПГШ; 4 – еритроцити в середовищі дегідратації, що містить гліцерин; 5 – клітини, піддані дії ПГШ за умов присутності гліцерину у середовищі дегідратації.
Температура – 37°С; середовище дегідратації – 1,5 моль/л NaCl. На рисунку вказані концентрації NaCl (моль/л) в середовищі регідратації.

Залежність 1 відображає поведінку еритроцитів, які знаходяться в фізіологічному розчині. Дана залежність відзначається досить широким розмахом флуктуацій оптичної щільності. Оскільки клітини мають дискоїдну дводвігнуту форму, то в кожен момент часу розсіювання світла, а отже і оптична щільність буде визначатися розташуванням клітин. Це і визначає наявність флуктуацій оптичної щільності. Залежність 2 являє

собою оптичну щільність еритроцитів, які були попередньо оброблені гліцерином, у середовищі дегідратації (1,5 моль/л NaCl). Видно, що ширина «шумової» доріжки стає меншою за розмахом тому, що більша кількість клітин приймає форму, близьку до сферичної та орієнтація клітини в просторі більше не впливає на розмах флуктуацій оптичної щільності. Крім того, слід зазначити, що оптична щільність суспензії еритроцитів у цьому випадку буде меншою. Це не є наслідком гемолітичного пошкодження клітин, а внаслідок зменшення об’єму в гіпертонічному середовищі. Залежності 3 відображають кінетику ПГГ еритроцитів за умов зміни концентрації NaCl у середовищі регідратації. Видно, що при збільшенні концентрації солі в середовищі регідратації спостерігається зниження пошкодження клітин. Так, різке зменшення пошкодження клітин спостерігається в середовищі, що містить NaCl в концентрації 0,2 моль/л, при цьому подальша зміна рівня ПГГ еритроцитів несуттєва. Залежність 4 демонструє оптичну щільність клітин, які були попередньо оброблені гліцерином та піддані дії ПГШ за умов присутності кріопротектору у середовищі дегідратації. Слід відзначити, що залежності 2 та 4 за рівнем оптичної щільності однакові. Як видно з залежностей 5, високий рівень ПГГ еритроцитів (~ 99–92%) спостерігається в середовищах регідратації, що містять 0,15–0,3 моль/л NaCl, у той час як в середовищах NaCl (0,4–0,6 моль/л) рівень ПГГ еритроцитів різко знижується і знаходиться в межах 55–40%. Слід зазначити відмінності в кінетиці зниження оптичної щільності клітин, проінкубованих в середовищі дегідратації, що містить гліцерин (залежності 5) та еритроцитів, які були попередньо оброблені гліцерином (15%) та піддані дії ПГШ (залежності 3). Слід зазначити, що всі залежності постгіпертонічного гемолізу еритроцитів мають типову форму. Видно, що лізис клітин відбувається за 5 –10 сек та криві виходять на плато.

Проведені дослідження значення осмоляльності середовища регідратації в розвитку ПГГ контрольних і насичених гліцерином еритроцитів показали різке зниження рівня пошкодження клітин з ростом концентрації солі на етапі регідратації (рис. 4.10). Це обумовлено зменшенням ризику осмотичного шоку клітин внаслідок зменшення осмотичного градієнта на мембрані.

Розморожування кріоконсервованих клітин під захистом проникних кріопротекторів (зокрема гліцерину) нерозривно пов’язане з подальшим видаленням його молекул із клітин для запобігання гемолізу клітин під час трансфузії. Слід зазначити, що для видалення проникного кріопротектору – гліцерину з розморожених еритроцитів використовують метод триразового серійного центрифугування суспензії із застосуванням концентрацій сольових розчинів, що знижуються до ізотонії. Зазвичай перше відмивання розморожених еритроцитів від гліцерину проводять за допомогою гіпертонічного розчину, який містить 0,6 моль/л NaCl, причому в цьому середовищі, як правило, гемоліз еритроцитів практично не реєструється. Таким чином, результати, отримані нами з використанням моделі ПГШ еритроцитів досить близькі з результатами дегліцеринізації розморожених еритроцитів з використанням 0,6 моль/л NaCl на першому етапі [40].

У гіпертонічних розчинах еритроцити, оброблені гліцерином, стискаються в результаті виходу з них води. У плазматичних мембранах таких клітин утворюються дефекти, через які можуть входити позаклітинні речовини (катіони Na^+) і виходити гліцерин. Потім при перенесенні клітин в середовище регідратації вони набухають в результаті входу води. Якщо еритроцити досягають значень критичного гемолітичного об’єму, то відбувається розтягнення їх плазматичних мембран до механічного руйнування [87]. Таким чином, етап регідратації дозволяє лише проявити зміни в плазматичній мембрані, які відбулися на етапі дегідратації клітин.

У разі присутності гліцерину в середовищі дегідратації, мабуть, сумарний вміст внутрішньоклітинних речовин стає вище за рахунок входу позаклітинного гліцерину. Тому на етапі регідратації в еритроцити має увійти більше води, в результаті чого значна кількість клітин досягає критичного гемолітичного об’єму, що і проявляється в більш високому рівні ПГГ еритроцитів порівняно з контрольними клітинами (рис 4.10).

4.2. Вплив сумісної дії проникного (гліцерин) і непроникного (хлорид натрію) компонентів середовища на розвиток постгіпертонічного гемолізу еритроцитів

При вивченні впливу різних концентрацій гліцерину на ПГШ еритроцитів людини (табл. 4.1 і 4.2) показано, що рівень пошкодження залежить від концентрації гліцерину, його присутності на різних етапах і температури. За умов проведення зазначених експериментів враховували концентрації проникного кріопротектору, без урахування сумарної осмоляльності середовищ, зокрема на етапі дегідратації, коли до складу середовища були додані проникний гліцерин і непроникна в клітину сіль. У табл. 4.3 представлена зведена інформація щодо використання середовищ на етапі попередньої обробки еритроцитів гліцерином та на етапі дегідратації еритроцитів, яка виражена у вигляді концентраційних величин (%, моль/л) і відповідних їм значень осмоляльності (мОсм/л).

Таблиця 4.3

Значення концентрацій речовин і величини осмоляльності використаних розчинів

Етап обробки клітин гліцерином		Етап дегідратації з додаванням гліцерину		
Концентрація гліцерину, %	Осмоляльність, мОсм/л	Концентрація		Осмоляльність, мОсм/л
		NaCl, моль/л	Гліцерин, %	
		1,5	0	3000
5	956		5	3656
10	1670		10	4370
15	2370		15	5070

Примітка: Гліцерин готували на фізіологічному розчині. Осмоляльність на етапі регідратації була фіксована і становила ~300 мОсм/л, що відповідає концентрації NaCl – 0,15 моль/л.

Для вивчення впливу проникного кріопротектору гліцерину на ПГГ еритроцитів проводили їх інкубацію в фізіологічних середовищах з різною концентрацією гліцерину (2-15%) за 37°С впродовж 20 хв, потім клітини ізотермічно переносили в фізіологічний розчин (0,15 моль/л NaCl) (рис. 4.12). Видно, що рівень гемолізу еритроцитів різко збільшується при використанні гліцерину в концентраціях, що перевищують 2%. Якщо кріопротектор у концентрації 5% викликає пошкодження клітин на рівні 70%, то подальше її підвищення призводить практично до повного лізису.

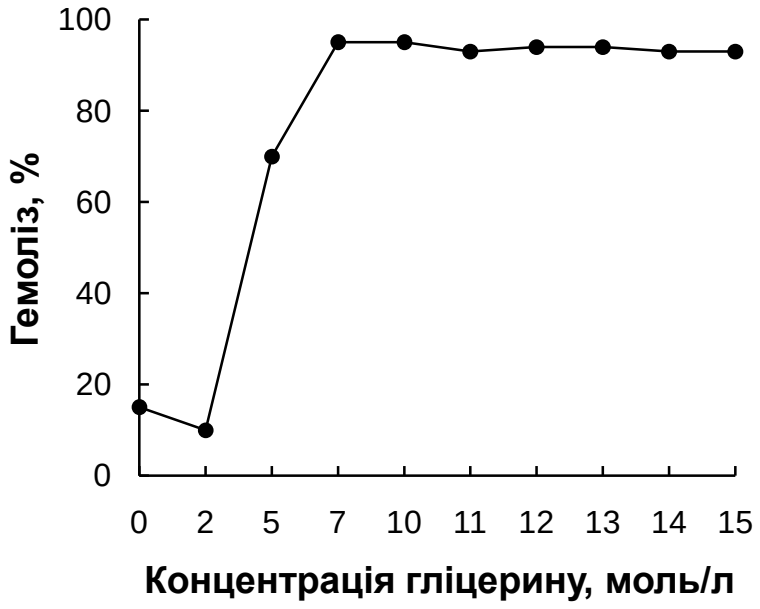


Рис. 4.12. Гемоліз еритроцитів, перенесених у середовище 0,15 моль/л NaCl з фізіологічного розчину, який містить гліцерин у різних концентраціях (37°C). (Me, n = 7).

Для визначення впливу складу середовища дегідратації на ПГГ еритроцитів проводили їх інкубацію в комбінованих середовищах (етап дегідратації) і потім переносили в фізіологічний розчин (етап регідратації). У комбінованих середовищах вміст гліцерину та NaCl варіювали таким чином, щоб сумарна осмоляльність розчину була незмінною і відповідала осмоляльності розчину, що містить 7% NaCl (2370 мОсм/л). Склад використовуваних у роботі комбінованих середовищ із заданою осмоляльністю наведено в табл. 2.1 (див.розділ 2).

З представлених на рис. 4.13 даних видно, що рівень ПГГ еритроцитів у середовищі, яке містить 7% NaCl (середовище 1, контроль), становить приблизно 15%, а гліцерин у низьких концентраціях (середовища 2 – 5) практично не впливає на рівень гемолізу еритроцитів, але в концентрації 11% (середовище 6) призводить до їх різкого пошкодження.

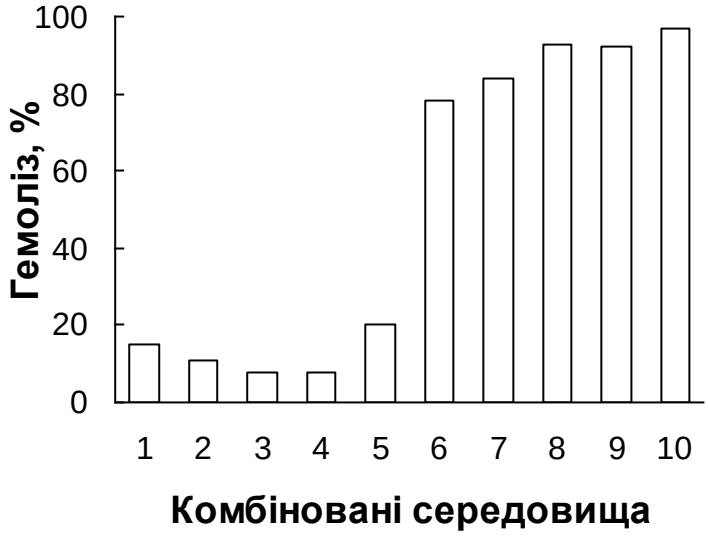


Рис. 4.13. Гемоліз еритроцитів, перенесених у розчин 0,15 моль/л NaCl із комбінованих середовищ, які містять гліцерин і NaCl у різних концентраціях (37°C). (Me, n = 7).

Отже, рівень ПГГ еритроцитів при використанні комбінованих середовищ на етапі дегідратації залежить від концентрації кріопротектору, а не від загальної осмоляльності середовища дегідратації.

Порівняльний аналіз даних, поданих на рис. 4.12 і 4.13, показав, що пошкоджувальна дія гліцерину (у складі комбінованих середовищ) проявляється при його високих концентраціях (11% і вище), а при концентрації 5–10% (при відповідних концентраціях солі у середовищах 3 – 5) він практично не викликає додаткового ПГГ еритроцитів порівняно з контролем. Виникає питання, чому в складі комбінованих середовищ 3 – 5 (гліцерин в концентрації 5–10%) не пошкоджує клітини за умов ПГШ порівняно з використанням гліцерину, який готували на фізіологічному розчині. Можна припустити, що присутність на етапі дегідратації сольового компонента у складі комбінованих середовищ впливає на процес насичення клітин гліцерином.

Для перевірки цього припущення клітини попередньо насичували упродовж 20 хв гліцерином за 37°С, а потім піддавали дії ПГШ із використанням комбінованих середовищ на етапі дегідратації (рис. 4.14).

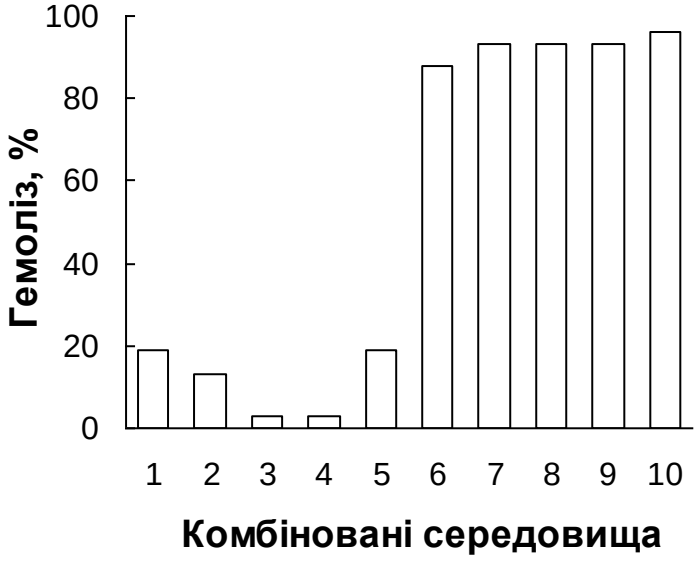


Рис. 4.14. Вплив попередньої обробки клітин гліцерином на рівень гемолізу еритроцитів, перенесених у розчин 0,15 моль/л NaCl, із комбінованих середовищ (37°С). (Me, n = 7).

Видно, що характер розвитку ПГГ еритроцитів за вказаних умов не відрізняється від такого після використання гліцерину в складі комбінованих середовищ тільки на етапі дегідратації (див. рис. 4.14).

Залишається відкритим питання стосовно того, чому при використанні гліцерину в діапазоні концентрацій 5 –10% (середовища 3–5) ПГГ еритроцитів залишається на рівні контролю. Можливо, що цей ефект пов’язаний зі зміною стану еритроцитарної мембрани в присутності солі та гліцерину. Для спрямованої зміни стану мембрани експеримент за умов ПГШ еритроцитів із використанням комбінованих середовищ проводили при 0°С (попереднє насичення гліцерином здійснювали за 37°С).

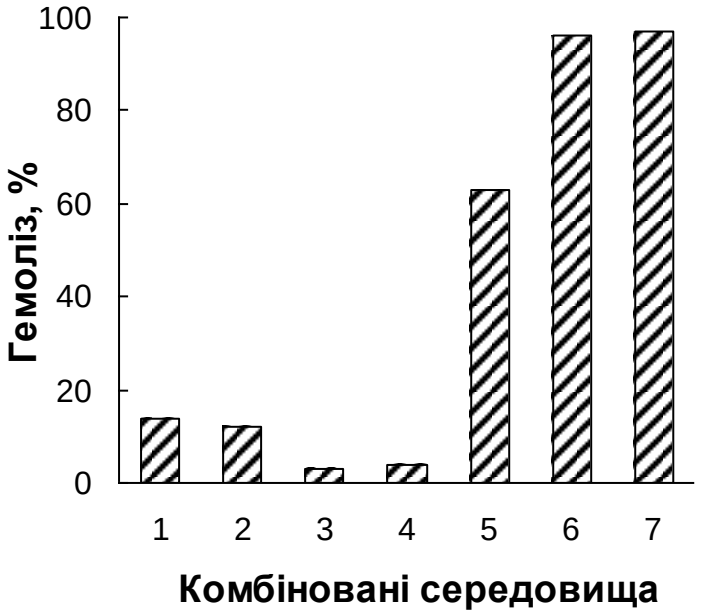


Рис. 4.15. Гемоліз еритроцитів, перенесених у розчин 0,15 моль/л NaCl із комбінованих середовищ, які містять гліцерин і NaCl у різних концентраціях (0°С). Попередня обробка гліцерином за 37°С. (Me, n = 7).

З рис. 4.15 видно, що характер розвитку ПГЛ еритроцитів за 0°С аналогічний такому, що і за 37°С (рис. 4.14). Гліцерин у концентрації 2-7% не викликає додаткового пошкодження еритроцитів за умов ПГШ (середовища 2–4) при 0°С, що характерно і для температурного режиму 37°С . При різних температурних режимах відмінності результатів за умов ПГШ еритроцитів спостерігається після використання гліцерину в концентрації 10% (середовище 5). У цьому випадку при низькій температурі рівень ПГГ еритроцитів вище в 3 рази.

Осмотичне пошкодження еритроцитів відбувається в тому випадку, коли об’єм клітин досягає критичного значення. Характер таких змін залежить від проникності еритроцитарної мембрани для речовин: води та проникних кріопротекторів. Тому для розробки ефективних протоколів кріоконсервування конкретних видів клітин необхідні дані щодо проникності клітинної мембрани для води та розчинених речовин [200].

Відомо, що проникність еритроцитарної мембрани для води залежить не тільки від індивідуальних особливостей донора, методів отримання еритроцитів, але і від терміну зберігання клітин перед процедурою заморожування [201, 202]. Транспорт води через еритроцитарну мембрану є складним процесом і може відбуватися декількома шляхами: через ліпідний бішар, UT-B, AQP1 і AQP 3 [203]. Інформація відносно часткового внеску кожного з вище описаних шляхів є досить суперечливою, проте переважна більшість дослідників вважають, що близько 90% транспорту води здійснюється через AQP1, а біля 10% – іншими шляхами [204].

У процесі перенесення гліцерину через еритроцитарну мембрану бере участь AQP3 [203], який на рівні 2% є проникним і для молекул води, але в цілому можна вважати, що більшість потоків води та гліцерину не буде взаємодіяти, оскільки вони перетинають мембрану переважно різними шляхами. Вода проникає через мембрану швидше всіх відомих кріопротекторів. Причиною виникнення потоків води всередину та з клітини є градієнт осмотичного тиску на мембрані, який, у свою чергу, визначається сумарною концентрацією розчинених речовин у позаклітинному середовищі та в клітині. Врівноваження цих концентрацій призводить до припинення потоків.

Осмотичну реакцію еритроцитів можна розділити на два етапи: перенесення води та проникного кріопротектору. Спочатку, внаслідок трансмембранного переносу води, врівноважуються концентрації розчинених речовин зовні та всередині клітини, а потім шляхом дифузії вирівнюються поза- і внутрішньоклітинні концентрації гліцерину. Це обумовлено відмінностями проникності еритроцитарної мембрани для цих речовин. Дані авторів [205] свідчать, що осмотична проникність води для еритроцитів набагато вища ніж гліцерину. Для води за температури 23°C

вона становить $2.89 \pm 0.37 \times 10^{-2}$ см/с$^{-1}$, у той час як для гліцерину показник проникності нижче та становить $1.37 \pm 0.26 \times 10^{-5}$ см/с$^{-1}$.

При вивченні транспорту води через AQP1 і гліцерину через AQP3 були визначені константи швидкості, які становили 5,3 х 10^{-13} см^3/с і 12,9 $\times 10^{-13}$ см^3/с відповідно. З цих даних видно, що канальний транспорт води відбувається у 4 рази швидше, ніж транспорт гліцерину [206]. Виявлений у нашій роботі ефект розвитку ПГГ еритроцитів після використання гліцерину в концентрації 5% і вище (рис. 4.12) пов’язаний зі значним входом води в клітини на етапі регідратації (через градієнт осмотичного тиску на мембрані, обумовлений внутрішньоклітинним вмістом гліцерину) і, як наслідок, досягненням критичного гемолітичного об’єму еритроцитів.

Використання кріопротектору на етапі дегідратації в складі комбінованих середовищ 3–5, що містять (5-10% гліцерину і 5- 2,9% NaCl) (рис. 4.13), практично не викликає ПГГ еритроцитів на відміну від гліцерину (5-10%), приготованому на фізіологічному розчині (рис. 4.12). Це може бути пов’язано з тим, що в зневоднені (за рахунок непроникної солі) еритроцити входить менше гліцерину (внаслідок зменшення кількості внутрішньоклітинного розчинника). На наступному етапі регідратації клітини будуть набухати (через вхід до них води), але їх об’єм не буде перевищувати значень критичного гемолітичного об’єму. Крім того, існує така точка зору, що зниження вмісту гліцерину у зневоднених клітинах пов’язане з впливом внутрішньоклітинної концентрації білка (переважно представленого гемоглобіном) на проникність еритроцитарної мембрани для кріопротектору[207].

Після попередньої обробки клітин гліцерином (5-10%) у разі використання комбінованих середовищ 3–5, що містять гліцерин (5-10%) і NaCl (5-2,9%) рівень ПГГ клітин не збільшується (див. рис. 4.14). Цей ефект, ймовірно, зумовлений виходом гліцерину з клітин услід за водою на

етапі дегідратації, в результаті сумарний вміст внутрішньоклітинних компонентів практично сумірний з таким без попередньої обробки клітин. Саме тому в обох варіантах експерименту з ПГШ відсутні статистично значущі відмінності рівня ПГГ еритроцитів.

Порівняльне вивчення ПГГ еритроцитів за температур 37 і 0°С (рис 4.14 і 4.15) показало, що в останньому випадку пошкодження розвивається за умов використання гліцерину в більш низькій концентрації – 10% (середовище 5). Відомо, що проникність плазматичної мембрани клітин при низькій температурі знижується як для води, так і для гліцерину, при чому для останнього більшою мірою [198, 208, 209]. За даними роботи [154] дифузійна проникність води для еритроцитів людини за температури 37°С вища у 1,5 раза, ніж за 25°С.

В огляді [203] наведено численні дані щодо проникності еритроцитарної мембрани для води і гліцерину. Проникність води для еритроцитів людини слабко залежить від температури та енергія активації для транспортування води знаходиться на рівні 14 – 20 кДж/моль. Значення енергії активації транспорту гліцерину через ліпідний бішар становить від 50 до 80 кДж/моль, а через еритроцитарну мембрану – від 15 до 40 кДж/моль [203]. Зниження енергетичного бар’єру в останньому випадку дозволяє припустити наявність гідрофільного шляху транспорту гліцерину в еритроцитах людини.

Високий рівень ПГГ еритроцитів (0°С) за умов використання комбінованого середовища 5 (10% гліцерину і 2,9% NaCl), ймовірно, зумовлений значною різницею в швидкостях транспорту води і кріопротектору через еритроцитарну мембрану. На етапі регідратації ці клітини (порівняно з 37°С) зазнають більш значних змін і досягають значень критичного гемолітичного об’єму, внаслідок чого вони піддаються лізису.

Наразі представлені численні дані щодо залежності проникності еритроцитарної мембрани для води і гліцерину від концентрації розчиненої речовини [210 – 213]. Carlsen A. та співавт. [210] встановили суттєве зниження (більш ніж в 5 разів) проникності еритроцитарної мембрани для гліцерину в концентрації до 4 моль/л. Проте результати, отримані для кріопротекторів у концентрації менше за 2 моль/л (що відповідає умовам нашої роботи), досить суперечливі [211, 212]. В роботі [214] показано, що збільшення осмоляльності середовища до 3,3 осмоль/л за рахунок додавання гліцерину призводить до зменшення дифузійної водної проникності еритроцитарної мембрани на 10-20%.

Отримані в роботі результати свідчать про негативний вплив гліцерину на ПГШ еритроцитів людини, який більшою мірою є залежним від концентрації кріопротектору та температури проведення експерименту. Так, гліцерин при використанні в концентраціях 5, 10, 15% призводить до підвищення рівня ПГГ еритроцитів за температури 0°С, тоді як за температури 37°С – тільки у разі використання кріопротектору в високій концентрації (15%). Детальніше дослідження температурної залежності ПГГ еритроцитів, показало різке зниження рівня пошкодження клітин, попередньо оброблених гліцерином (15%), при підвищенні температури від 5 до 25°С.

Із використанням на етапі дегідратації комбінованих середовищ, на основі гліцерину і хлориду натрію із сумарною осмоляльністю 2370 мОсм/л, встановлена залежність ПГГ еритроцитів від концентрації кріопротектору, (тобто рівень ПГГ еритроцитів не визначається загальною осмоляльністю середовища дегідратації), характер якої не залежить від попереднього насичення клітин гліцерином. Таким чином, кріопротектор, захисна дія якого реалізується при кріоконсервуванні еритроцитів, в модельному експерименті ПГШ, який дозволяє вивчати вплив на клітини

факторів, що діють на етапі розморожування, викликає додаткове пошкодження клітин.

За матеріалами розділу 4 опубліковані роботи [196, 197, 199, 200, 215 –219].

РОЗДІЛ 5

ЗАСТОСУВАННЯ АМФІФІЛЬНИХ СПОЛУК НА ЕТАПІ ВИДАЛЕННЯ ГЛІЦЕРИНУ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ

Зберігання крові за позитивних значеннях температури (+2 ÷ +6°C) обмежує строк її придатності для трансфузії до 5–6 тижнів [4]. Термін зберігання компонентів крові в залежності від використання консервуючого розчину може варіюватись. Так, застосування розчину CPDA-1 забезпечує зберігання консервованої донорської крові або еритроцитовмісних компонентів продовж 35 діб, у той час як використання розчинів «Глюгіцир» та CPD (ЦФД) – продовж 21 доби [220]. Під час зберігання клітин крові за гіпотермічних умов відбувається втрата вмісту ферментів, АТФ та ін., що супроводжується зниженням функціональної активності та зміною здатності до деформації та агрегації клітин тощо [4, 55, 189].

Для підтримки метаболічних процесів та забезпечення функціонування еритроцитів можуть бути використанні додаткові розчини (ADSOL, AS-2, SAGM), до складу яких зокрема входять метаболіти вуглеводно-фосфорного обміну та ін. Застосування цих розчинів подовжує строк зберігання клітин до 42 діб [220], але перевищити цей термін за гіпотермічних умов неможливо.

Єдиним можливим підходом для довгострокового зберігання біологічних об’єктів є кріоконсервування. При зберіганні за наднизьких температур клітини не пошкоджуються, тому що загальмовується їх метаболізм і, як наслідок, не відбувається втрата метаболітів [189]. Оскільки клітини перебувають у стабільному стані, то їх можна зберігати

впродовж багатьох років. Відкриття гліцерину як кріопротектору стало основою для кріоконсервування клітин за допомогою кріозахисних середовищ. Зокрема, застосування проникного кріопротектору гліцерину для кріоконсервування компонентів крові дозволяє підтримувати запаси аутологічних клітин та донорських еритроцитів з рідкісними фенотипами [8, 189]. Це важливо для забезпечення наявності доз крові в ситуаціях вкрай необхідних для людини.

В банках низькотемпературного консервування крові використовують 2 методи заморожування під захистом гліцерину: метод швидкого заморожування під захистом 15 – 20% гліцерину при наднизький температурі (–196°С) в рідкому азоті і метод повільного заморожування під захистом 20 – 40% гліцерину при помірно низьких (–40°С) і низьких (– 80°С) температурах в електрохолодильниках [6, 39, 50].

Для здійснення методу швидкого заморожування еритроцитів затверджено наступні кріоконсерванти: ЦНДІГПК 11_4 та ЦНДІГПК 11_5 , у складі яких об’ємна частка гліцерину становить 30 і 40% відповідно. На відміну від ЦНДІГПК $11_{4,}$ метод із застосуванням ЦНДІГПК 11_5 дозволяє заморожувати більший об’єм еритроцитів в одному кріоконтейнері (кінцевий об’єм 500 мл). Заморожену еритромасу зберігають у рідкому азоті (–196°С), при цьому термін зберігання становить до 10 років.

Високі концентрації гліцерину у складі кріоконсервуючих розчинів застосовують при повільному заморожуванні еритроцитів. При зберіганні еритромаси при –80°С використовують 57% розчин гліцерину, який додають до еритроцитів (250 мл) у співвідношенні 1:1,6 (за вагою) для досягнення остаточної концентрації гліцерину 40% (мас./об.) [8, 46, 50]. Кріоконсервант для повільного заморожування еритроцитів при помірно низькій температурі –40°С містить гліцерин 791 г в/на 1 л розчині. При цьому кінцева концентрація гліцерину з еритроцитами становить 39,6%.

Зберігання заморожених еритроцитів цим методом не повинен перевищувати 2 роки [40].

Оскільки гліцерин є проникним кріопротектором, тому після розморожування еритроцитів є необхідним етап, пов’язаний з видаленням його з клітин. Порівняно з гіпотермічним зберіганням еритроцитів, перевага кріоконсервування клітин під захистом гліцерину (невід’ємним етапом якого є процедура дегліцеринізації) полягає у видаленні пошкоджених клітин, вільного гемоглобіну, калію та/або білка перед трансфузією [221]. Але з іншого боку, процедура дегліцеринизації еритроцитів є рутинною та займає багато часу, що ускладнює надання допомоги в надзвичайних ситуаціях.

В залежності від кріоконсервуючих розчинів та температури зберігання еритроцитів підходи до відмивання еритроцитів можуть відрізнятися. Для відмивання еритроцитів від внутрішньоклітинного гліцерину розроблені та застосовуються декілька методик, але наразі продовжуються роботи, спрямовані на їх удосконалення [45, 48, 49, 51, 56].

В роботі кріоконсервування еритроцитів здійснювали за наступною схемою. Після насичення та врівноваження еритроцитів із кріоконсервантом ЦНДІГПК 11_4 суспензію еритроцитів заморожували швидко шляхом занурення в рідкий азот (–196°С). Слід зазначити, що після розморожування рівень гемолізу еритроцитів не перевищував 5%. Розморожування еритроцитів проводили у водяній ванні (+40 ÷ +42°С), після чого здійснювали процедуру поетапного видалення гліцерину з клітин.

В якості середовищ для відмивання застосовували сольові розчини, які додавали до еритроцитів у співвідношенні 1:1 і після ретельного перемішування суспензію центрифугували. На першому етапі застосовували розчин NaCl в концентрації 0,6 моль/л (середовище 1). На

другому і третьому етапі видалення гліцерину застосовували 0,15 моль/л NaCl (середовище 2 і 3 відповідно).

На рис. 5.1 наведено значення гемолізу еритроцитів після процедури відмивання розморожених клітин сольовими середовищами. Видно, що після відмивання у разі використання середовищ 1 (0,6 моль/л NaCl) і 3 (0,15 моль/л NaCl) рівень гемолізу еритроцитів не перевищував ~ 7%. На другому етапі відмивання (середовище 2) спостерігається пошкодження еритроцитів.

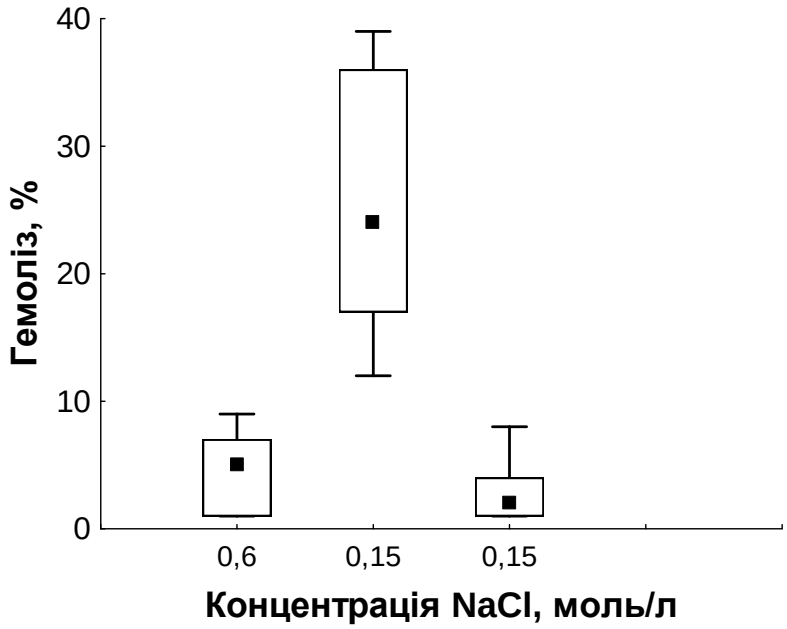
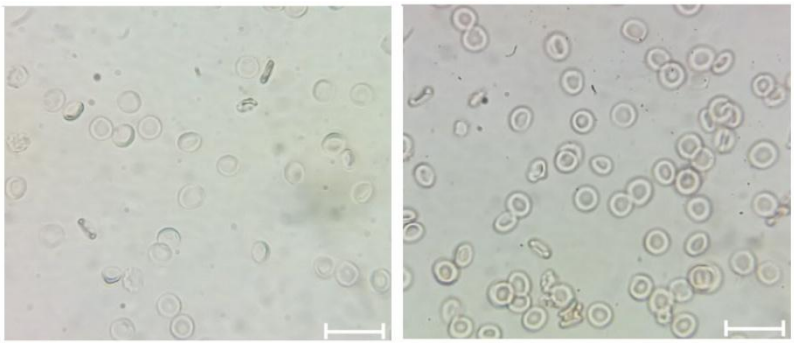


Рис. 5.1. Рівень гемолізу розморожених еритроцитів при видаленні з них гліцерину (15%) методом серійного центрифугування за допомогою сольових розчинів за температури 20 – 22°С. ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Методом світлової мікроскопії досліджували морфологічні особливості еритроцитів на різних етапах процесу кріоконсервування.

Отримані дані щодо насичення еритроцитів гліцерином та після заморожування-розморожування клітин подані на рис. 5.2.



А Б

Рис. 5.2. Морфологічні особливості еритроцитів людини до та після заморожування з кріоконсервантом ЦНДІГПК 11_4 (–196°С): А – клітини після інкубування у розчині ЦНДІГПК 11_4 за температури 20 – 22°С продовж 20 хв; Б – клітини після заморожування-відігріву.
├──┤ – шкала 15 мкм.

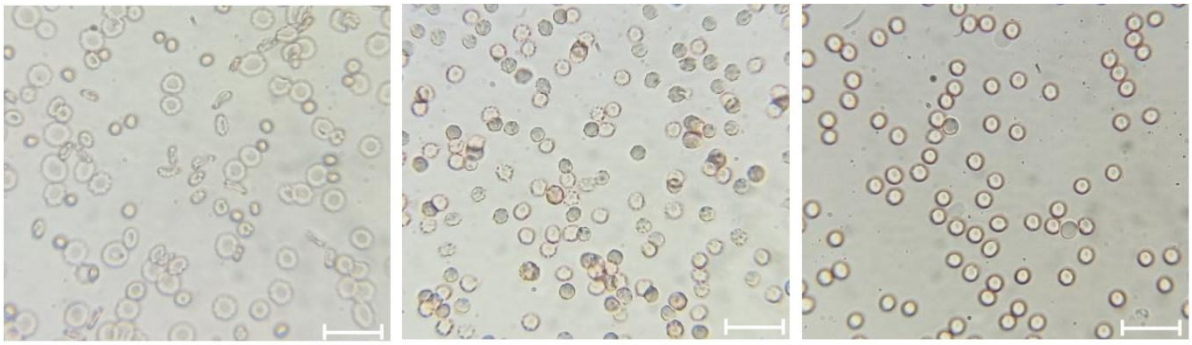
На рис. 5.2, А наведені еритроцити, які були оброблені кріоконсервантом ЦНДІГПК 11_4. В зразку присутні переважно дискоцити, але зустрічаються поодинокі клітини з ознаками ехіноцитозу та стоматоцитозу. Еритроцити, які були піддані циклу заморожування-відігріву (рис. 5.2, Б), представлені дискоцитами та клітинами з початковими ознаками стоматоцитозу.

При отриманні еритроцитів з цільної крові вони набувають форму ехіноцитів внаслідок видалення плазми [10]. Додавання до еритроцитів гліцерину, який є стоматоцитогенним агентом [222], призводить до появи у зразку дискоцитів, що може пояснюватися компенсуючою дією двох протилежно спрямованих ефектів. В результаті тривалого інкубування еритроцитів з кріопротектором (20 хв) клітини переходять у стаціонарний

стан після завершення входу гліцерину та врівноваження осмотичного градієнту на мембрані.

У роботі [223] показано, що форма еритроцитів значною мірою залежить від концентрації гліцерину та тривалості інкубування з ним. Так, обробка еритроцитів розчинами гліцерину (5–30%) викликає сфероехіноцитоз клітин (через 90 сек). При застосуванні гліцерину у більш високих концентраціях (30–40%) після 13 хв експозиції клітини повертались до форми, близької до нормоцитів, яка зберігалась продовж тривалого часу. Ці дані узгоджуються з отриманими результатами в нашій роботі (рис. 5.2, А).

На рис. 5.3 представлені розморожені еритроцити при видаленні з них глицерину (15%) методом серійного центрифугування за допомогою сольових розчинів (за температури 20–22°С). Інкубація розморожених еритроцитів у першому гіпертонічному середовищі (0,6 моль/л NaCl) призводить до трансформації клітин (рис. 5.3, А). У цьому випадку частина клітин набуває ехіноцитарних особливостей (дискоехіноцити), тоді як решта – округлої форми зі зменшеним розміром. Слід зазначити, що аналогічні морфологічні особливості спостерігалися за умов проведення модельного експерименту ПГШ, а саме у разі попередньої обробки клітин гліцерином (15%) з подальшим їх перенесенням у гіпертонічний розчин 1,5 моль/л NaCl (див. рис. 4.6, Б). Перенесення в перший фізіологічний розчин (середовище 2) клітин, які попередньо були в 0,6 моль/л NaCl, обумовлює появу сфероехіноцитів (рис. 5.3, Б). У разі подальшого інкубування еритроцитів у середовищі 3 клітини перебувають на стадії відновлення дискоцитарної форми (рис. 5.3, В).



А Б В

Рис. 5.3. Морфологічні особливості розморожених еритроцитів за умов поетапного видалення внутріклітинного гліцерину за допомогою сольових розчинів: 0,6 моль/л NaCl (А), 0,15 моль/л NaCl (Б), 0,15 моль/л NaCl (В). Температура – 20 – 22°С. ├──┤ – шкала 15 мкм.

У роботі [224] за допомогою методу атомно-силової мікроскопії досліджували структуру еритроцитів, які пройшли технологічний цикл кріоконсервування (–80°С) під захистом високої концентрації гліцерину (40%). Було показано, що в еритроцитарних суспензіях на різних етапах відмивання кріопротектору виявляються дві субпопуляції клітин: еритроцити з відносно гладкою поверхнею та еритроцити, які мають на своїй поверхні агрегати. На думку авторів, агрегати, розміри яких досягають 1,5 мкм, являють собою скупчення частинок гліцерину.

Результати щодо дослідження еритроцитів на різних етапах процесу кріоконсервування під захистом гліцерину із застосуванням методів світлової мікроскопії та спектрофотометрії (див. рис. 5.1 – 5.3) дозволяють зробити висновок, що істотна зміна форми та втрата клітин відбувається саме на етапі відмивання еритроцитів від кріопротектору.

Нещодавно було показано, що ХПР здатен знижувати гемоліз еритроцитів за умов ПГШ і при видаленні гліцерину з розморожених клітин. При цьому $АГ_{макс}$ активність ХПР була ~73% в обох випадках [12]. Оскільки всі досліджувані в нашій роботі амфіфільні сполуки, що

належать до різних класів ПАР, проявляли антигемолітичну активність за умов модельного експерименту (ПГШ), тому становило інтерес дослідити чи будуть ці речовини впливати на рівень гемолізу розморожених еритроцитів за умов видалення гліцерину з них. Оскільки значне пошкодження клітин під час дегліцеринізації спостерігається у середовищі 2 (див. рис. 5.1), тому у наступних експериментах амфіфільні сполуки вносили саме в це середовище відмивання перед додаванням в нього клітин.

Результати, отримані при використанні досліджувальних амфіфільних сполук на етапі другого відмивання еритроцитів від гліцерину, подані на рис. 5.4.

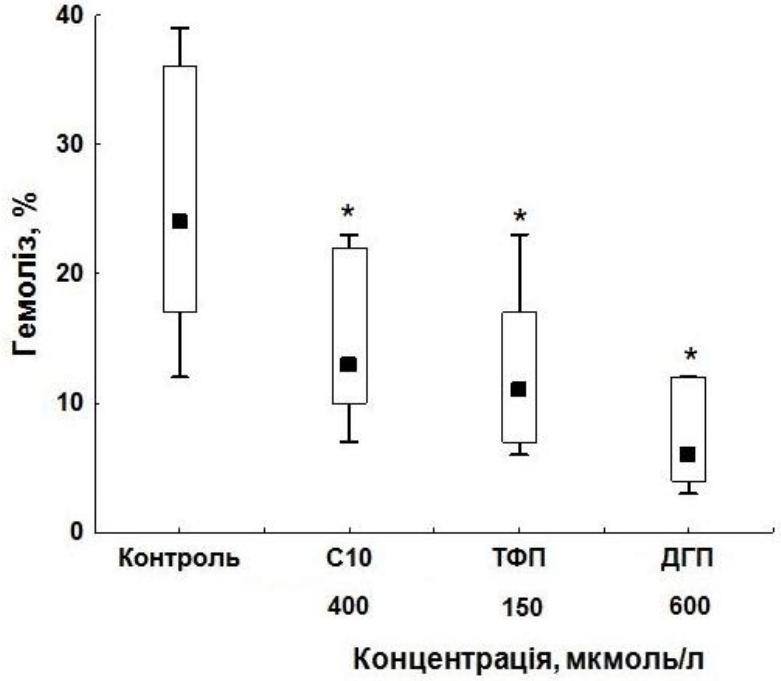


Рис. 5.4. Вплив амфіфільних сполук в ефективних концентраціях на рівень гемолізу еритроцитів при видаленні гліцерину із розморожених клітин за умов використання середовища 2 (0,15 моль/л NaCl). Температура 20 – 22°С. ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Амфіфільні сполуки використовували в наступних концентраціях (мкмоль/л): С10 – 400, ТФП – 150, ДГП – 600. Так, додавання С10 і ТФП дозволило знизити рівень гемолізу еритроцитів в 2 рази, в той час як ДГП був більш ефективним і знижував рівень пошкодження клітин в 4 рази

Ґрунтуючись на результатах, наведених на рис. 5.4, були розраховані величини максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$) амфіфільних сполук, що подані в табл. 5.1. Видно, що в процесі дегліцеринізації еритроцитів амфіфільні сполуки проявляють досить високу ефективність, однак найбільш ефективним є ДГП.

Таблиця 5. 1

Величини максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$) амфіфільних сполук при видаленні гліцерину із кріоконсервованих еритроцитів за умов використання середовища 2 (0,15 моль/л NaCl). Температура 20 – 22°С.

Речовина	С10	ТФП	ДГП
Концентрація, мкмоль/л	400	150	600
$АГ_{макс}$, %	42 (41 – 50)	52 (42 – 63)	74 (50 – 83)

Примітка: Дані максимальної антигемолітичної активності представлені в вигляді медіани (Me) та інтерквартильного інтервалу (Q1 – Q3), n=7.

У наступних експериментах використовували С10, ТФП і ДГП в концентраціях, які відповідали початку плато концентраційних залежностей (див рис. 3.2, 3.5 і 3.7). Це зумовлено тим, що застосування низьких концентрацій амфіфілу порівняно з високими ефективними дозволяє знизити риск підвищення рівня гемолізу еритроцитів при подальшому нагріванні (див. рис. 3.14 – 3.16). Амфіфільні сполуки

додавали у друге середовище відмивання (0,15 моль/л NaCl) в наступних концентраціях (мкмоль/л): С10 – 180, ТФП – 50, ДГП – 200.

Результати впливу амфіфільних сполук (при використанні у вищезазначених концентраціях) на гемоліз еритроцитів у середовищі другого відмивання представлені на рис. 5.5.

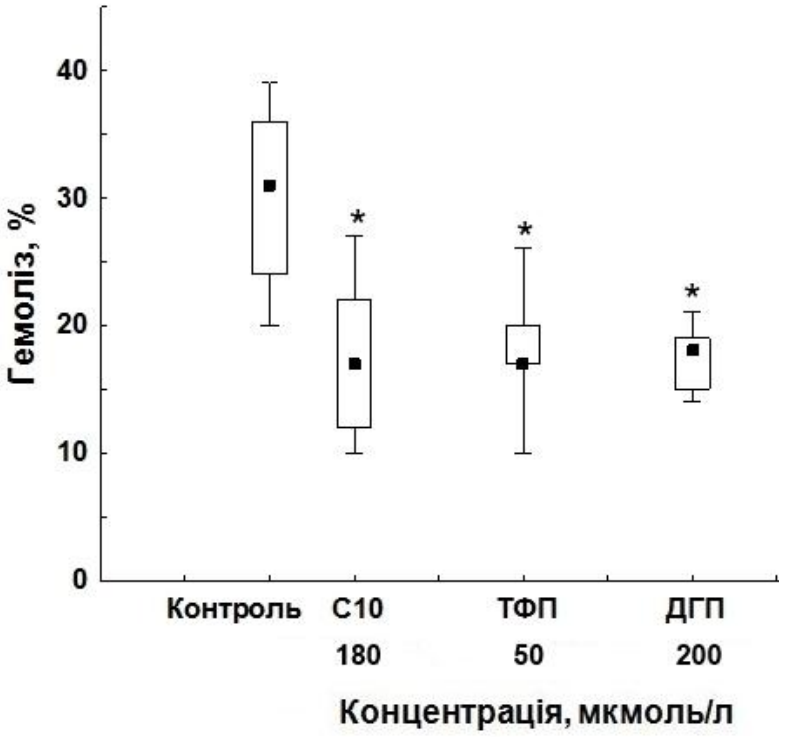


Рис. 5.5. Вплив амфіфільних сполук в низьких концентраціях на рівень гемолізу еритроцитів при видаленні гліцерину із розморожених клітин за умов використання середовища 2 (0,15 моль/л NaCl). Температура 20 – 22°С. ■ – медіана, ▯ – інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), ⌶ – максимальне та мінімальне значення.

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

З рис. 5.5 видно, що всі амфіфільних речовини в низьких концентраціях, які відповідають початку плато концентраційних залежностей за умов ПГШ еритроцитів, практично однаково знижують рівень гемолізу клітин на етапі другого відмивання. З цих результатів були

розраховані величини антигемолітичної активності амфіфільних сполук і подані в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Величини антигемолітичної активності (АГ) амфіфільних сполук при видаленні гліцерину із кріоконсервованих еритроцитів за умов використання середовища 2 (0,15 моль/л NaCl). Температура 20 – 22°С.

Речовина	С10	ТФП	ДГП
Концентрація, мкмоль/л	180	50	200
АГ, %	45	33	39

Примітка: Дані антигемолітичної активності представлені в вигляді медіани (Me), n=5.

Видно, що значення антигемолітичної активності С10, ТФП і ДГП знаходяться в діапазоні від 30 до 45%. Слід зазначити, що на відміну від С10 величини антигемолітичної активності ТФП і ДГП при застосуванні в низьких концентраціях в ~1,6 і 1,9 раза нижчі, ніж при використанні цих амфіфілів в їх ефективних концентраціях відповідно (див. табл. 5.1).

Дослідження концентраційної залежності АГ активності амфіфільних сполук при дегліцеринізації кріоконсервованих еритроцитів показало, що максимальна ефективність речовин спостерігається при їх використанні в ефективних концентраціях, які були визначені за умов ПГШ.

За умов дегліцеринізації розморожених еритроцитів амфіфільні речовини можна розташувати в ряду за збільшенням їх $АГ_{макс}$ активності: С10 < ТФП < ДГП. Різна ефективність амфіфільних сполук, що виявлена за умов дегліцеринізації розморожених клітин, ймовірно, обумовлена особливостями фізико-хімічних властивостей речовин, які

використовували. Мабуть, відсутність заряду і гідрофільно-гідрофобний баланс амфіфільних молекул ДГП, а також особливості його хімічної структури дозволяють більш успішно запобігати розвитку мембранних дефектів до розміру гемолітичних пор при видаленні гліцерину з розморожених клітин.

При дослідженні ефективності катіонного похідного фенотіазіну – ТФП були отримані досить близькі значення $АГ_{макс}$ активності за умов ПГШ і на етапі дегліцеринізаціі розморожених клітин (60 і 52% відповідно) (табл. 5.1 і 3.3). Це узгоджується з даними роботи [12], в якій при вивченні ефективності позитивно зарядженої амфіфільної сполуки ХПР (в ефективній концентрації 600 мкмоль/л) в модельному експерименті за умов ПГШ і при видаленні гліцерину з розморожених еритроцитів були отримані сумірні величини $АГ_{макс}$ активності (~ 73%) в обох випадках.

На відміну від катіонних похідних фенотіазіну (ХПР і ТФП), при дослідженні неіонного ДГП і аніонного С10 виявлені відмінності в значеннях $АГ_{макс}$ активності (в ефективності) за умов ПГШ і на етапі видалення гліцерину з розморожених клітин: 62 і 74% для неіонного ДГП, 74 і 42% для аніонного С10.

Це може бути пов’язано з різним трансмембранним розподілом амфіфільних сполук. Для катіонних амфіфільних сполук, які вбудовуються і розподіляються у внутрішньому моношарі ліпідного бішару (що на клітинному рівні проявляється в трансформації клітин за типом дискоцит – стоматоцит) прояв антигемолітичної активності речовин не залежить від характеру проведення експерименту (ПГШ або процедура дегліцерінізації). Для неіонного і аніонного амфіфільних сполук, які вбудовуються і розподіляються в зовнішньому моношарі ліпідного бішару (що на клітинному рівні проявляється в трансформації еритроцитів за типом дискоцит – ехіноцит) прояв антигемолітичної активності істотно залежить від характеру проведення експерименту. Ймовірно, що

ефективність стоматоцитогенних речовин, фізико-хімічні характеристики яких визначають їх мембранотропну дію, не є чутливими до зміни стану еритроцитарної мембрани, що відбувається в циклі заморожування-розморожування клітин.

Порівняльний аналіз ефективності амфіфільних сполук при застосуванні в ефективних концентраціях за умов ПГШ еритроцитів та при видаленні гліцерину виявив деякі особливості у прояві їх антигемолітичної активності. Так найбільш ефективним при видаленні гліцерину є неіонний ДГП, а за умов ПГШ – аніонний С10. Використання амфіфільних сполук в якості детекторів стану еритроцитарної мембрани доводить, що клітини відрізняються за умов їх кріоконсервування під захистом проникного кріопротектору гліцерину та дії на них модельного експерименту ПГШ. Під час кріоконсервування еритроцитів на клітини діють ряд кріопошкоджуючих факторів, таких як формування кристалів льоду, зміна температури, pH, тонічності середовища та ін. Водночас як ПГШ еритроцитів моделює вплив на клітини одного з факторів кріопошкодження, який діє на етапі розморожування.

Виходячи з вищевикладеного доцільно було змінити умови проведення ПГШ шляхом долучення гліцерину. У цій постановці до дії ПГШ за температури 0°С піддавали клітини, які попередньо обробляли гліцерином (20 хв, 37°С). В якості детектора стану мембрани використовували амфіфільні сполуки в ефективних концентраціях, які додавали в середовище регідратації перед внесенням до нього клітин. Концентрація NaCl у середовищі дегідратації становила 1,65 моль/л, у регідратації 0,15 моль/л. Отримані результати подані на рис. 5.6.

З рис. 5.6 видно, що всі досліджувальні амфіфільні сполуки знижують ПГГ еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином, практично однаково (приблизно у 5 разів). При цьому $АГ_{макс}$ активність

амфіфільних сполук становить близько 80%, що дещо вище ніж за умов ПГШ клітин, необроблених гліцерином.

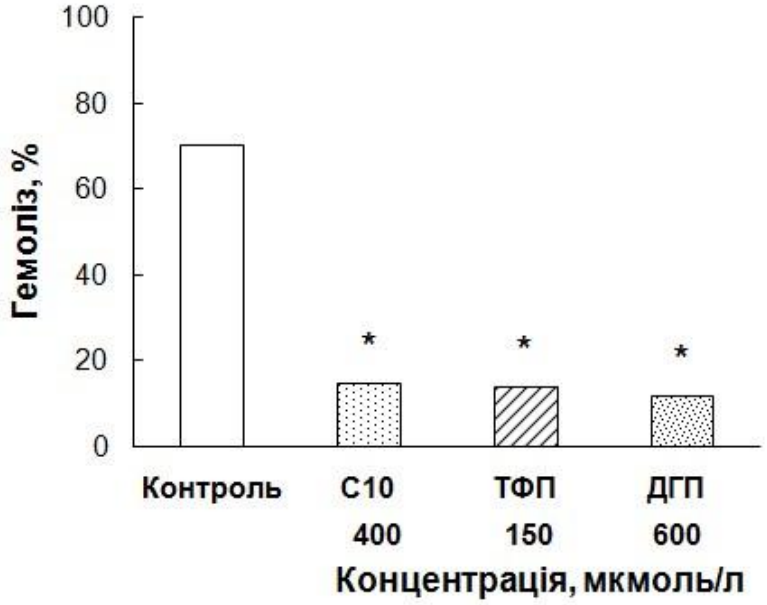


Рис. 5.6. Гемоліз еритроцитів людини, попередньо оброблених гліцерином (37°С), підданих дії ПГШ у присутності амфіфільних сполук у середовищі регідратації при 0°С. (Me, n =5).

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Таким чином, використання амфіфільних сполук дозволило значно знизити рівень ПГГ еритроцитів людини, попередньо оброблених гліцерином. Слід зазначити, що за цих умов практично нівелюються відмінності між значеннями $АГ_{макс}$ активності амфіфільних сполук, які належать до різних класів ПАР. Це дозволяє припустити, що модель ПГШ еритроцитів потребує удосконалення та подальшої модифікації.

Різниця прояву антигемолітичної активності амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів та при видаленні гліцерину може бути пов’язана з впливом гліцерину на еритроцитарну мембрану. Гліцерин здатен проникати в середину клітин за допомогою білків та через ліпідний бішар [198, 203]. У роботі [198] визначено коефіцієнти проникності мембран

еритроцитів людини для гліцерину в широкому температурному діапазоні (37...4°С). Розраховані величини енергії активації проникнення молекул гліцерину в еритроцити (за ареніусовими залежностями), а також її різке збільшення в діапазоні температур, нижчих за 12°С, свідчить про можливість проникання молекул гліцерину крізь ліпідний бішар.

Автори роботи [225] методом ЕПР спектроскопії досліджували вплив водних розчинів гліцерину на модельні мембрани, що складаються з молекул фосфоліпідів. У присутності гліцерину спостерігалося збільшення рухливості поверхневого шару, що свідчить на користь впливу гліцерину на полярну область бішару.

В роботі [226] з використанням набору флуорофорів, що мають різну локалізацію в ліпідному бішарі, досліджували вплив проникних кріопротекторів (гліцерин, диметилсульфоксид, 1,2-пропандіол) на мембрани еритроцитів людини. Показано, що дія кріопротекторів реалізується в полярній області ліпідного бішару еритроцита, що проявляється в збільшенні її гідратації, і не зачіпає найбільш гідрофобну область. При порівняльному дослідженні ефективності кріопротекторів показано, що гліцерин викликає початкові зміни в мембрані при використанні в більш низькій концентрації порівняно з диметилсульфоксидом і 1,2- пропандіолом.

В роботі [227] досліджували вплив гліцерину на параметри обертальної рухливості зонда в ліпосомах та в мембрані еритроцитів людини. Так, додавання гліцерину до суспензії ліпосом призводило спочатку до зменшення текучості ліпідів (іммобілізації мембран ліпосом), а при перевищенні 15% концентрації – до руйнування мембран ліпосом. Зазначена залежність спостерігалась і на еритроцитарних мембранах.

Кріопротектори здатні впливати як на ліпіди, так і на білки [228, 229]. В роботі [228] за допомогою методу термічної діелектроскопії вивчали вплив проникних кріопротекторів (в концентраціях, що

використовуються при кріоконсервуванні) на цитоскелет-мембранний комплекс еритроцитів людини. Показано, що ці речовини специфічно пригнічують гамма-або бета-релаксацію на спектрині, причому ефект усувається в разі попереднього відмивання клітин від кріопротектору. На підставі отриманих результатів і аналізу літератури автори роботи роблять висновок про можливість проникних кріопротекторів послаблювати вертикальні зв'язки між мембраною та цитоскелетом, що призводить до порушення стабільності плазматичних мембран і клітин.

Так, авторами роботи [229] було виявлено, що гліцерин (2,0 моль/л) призводить до зниження кількості CD44-позитивних клітин, що можливо відбувається за рахунок зміни в структурі мембрани і цитоскелету еритроцитів. Кількість CD44–позитивних еритроцитів, кріоконсервуванних (–196°C) під захистом гліцерину (2,0 моль/л) і в подальшому інкубованих при 37°C знижувалась.

В роботі [230] показано, що саме кріоконсервування еритроцитів (при –80°C) із застосуванням високих концентрацій гліцерину (40% (ваг./об.)) не викликає мікровезикуляцію, експозицію ФС і втрату експресії CD47 в мембранах еритроцитів. Однак тривале гіпотермічне зберігання клітин перед заморожуванням (13–14 днів) і після відігріву (24 години) призводить до значного збільшення експозиції ФС на поверхні еритроцитів і мікровезикуляції клітин. При цьому ніяких значних змін в експресії CD47 не було виявлено.

Таким чином, в циклі кріоконсервування еритроцитів під захистом 15% гліцерину основне пошкодження спостерігається на етапі видалення гліцерину з розморожених клітин з використанням сольових середовищ. Застосування амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, дозволило знизити пошкодження клітин при використанні середовища 2.

Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить про те, що за умов моделі ПГШ і при видалені гліцерину з розморожених еритроцитів

усі амфіфільні сполуки (С10, ТФП, ДГП) незалежно від характеру їх трансмембранного розподілу знижують рівень гемолізу еритроцитів та проявляють високу антигемолітичну активність.

За матеріалами розділу 5 опубліковані роботи [231 – 234].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Явище постгіпертонічного шоку являє собою пошкодження клітин в результаті різкої зміни осмоляльності середовища від високих до низьких (ізоосмотичних) значень. Воно реалізується на етапі розморожування біологічного матеріалу, коли в результаті танення льоду відбувається зниження гіпертонічності позаклітинного середовища. Вплив на клітини різкого зниження осмоляльності середовища як одного з факторів кріопошкоджень, які реалізуються на етапі відігріву розморожених еритроцитів, вивчають з використанням моделі ПГШ. Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали шляхом ізотермічного перенесення еритроцитів із середовища дегідратації у середовище регідратації за температури 37 або 0°С. Для вивчення впливу амфіфільних сполук на розвиток ПГГ еритроцитів були використані наступні речовини: аніонний децилсульфат натрію, неіонний децил-β,D-глюкопіранозид та катіонні трифторперазин і хлорпромазин, які додавали на етапі регідратації.

Проведені дослідження показали, що вищевказані амфіфільні сполуки знижують рівень ПГГ еритроцитів за температури 0°С на відміну від 37°С. В основі ПГГ еритроцитів полягають процеси, пов’язані з формуванням трансмембранних дефектів на етапі дегідратації, які на етапі регідратації перетворюються в гемолітичну пору. Той факт, що ефективність амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів реалізується при низькій температурі, свідчить про важливість стану еритроцитарної мембрани. За температури 37°С процес подальшого розвитку трансмембранного дефекту відбувається швидко, тому ймовірно амфіфільні сполуки не встигають запобігти формуванню гемолітичної пори. За температури 0°С мембрана менш лабільна, тому амфіфіли здатні проявляти антигемолітичну активність.

Використовувані в роботі амфіфільні сполуки характеризуються різним трансбішаровим розподілом в мембрані. Якщо неіонний ДГП та аніонний С10 вбудовуються в зовнішній моношар ліпідного бішару і викликають трансформацію клітин за типом дискоцит-ехіноцит, то катіонні ТФП и ХПР вбудовуються і розподіляються у внутрішньому моношарі з супутньою зміною форми клітин за типом дискоцит-стоматоцит. Той факт, що амфіфільні сполуки, що належать до різних класів ПАР, проявляють АГ активність за умов ПГШ еритроцитів, дозволяє вважати, що для запобігання розвитку гемолітичної пори на етапі регідратації важливим є не наявність заряду або його відсутність, а саме амфіфільність їх молекул.

Порівняльний аналіз ефективності амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів різних видів ссавців (людина, кролик, щур) виявив ряд особливостей. Так, для еритроцитів людини величини максимальної антигемолітичної активності усіх амфіфільних сполук сумірні і знаходяться в діапазоні 60–70%. Для клітин кролика більш ефективними виявились аніонний децилсульфат натрію та неіонний децил-β,D-глюкопіранозид ($АГ_{макс}$ активність становила 71 та 72% відповідно), в той час як катіонні сполуки проявляли $АГ_{макс}$ активність на рівні 55%. На відміну від клітин кролика і людини еритроцити щура найбільш ефективно захищали катіонні сполуки ТФП і ХПР ($АГ_{макс}$ – 81% і 84% відповідно).

Вищезазначені відмінності в прояві ефективності амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів різних видів ссавців можуть бути пов’язані з особливостями складу їх цитоскелет-мембранного комплексу, які впливають на формування трансмембранного дефекту і розвиток гемолітичної пори. Так, еритроцитарна мембрана щура відрізняється високим вмістом ФХ, у той час як цитоскелет-мембраний комплекс еритроцитів кролика характеризується високим вмістом ФЕА, ХС та відсутністю глікофорину А.

Для оцінки стану клітин, які збереглися після сумісної дії ПГШ і амфіфільних сполук (при 0°С), використовували тест, пов'язаний з нагріванням еритроцитів до 37°С. Отримані результати свідчать, що еритроцити людини, які збереглися після сумісної дії ПГШ (0°С) і С10 (400 мкмоль/л), стійкі до подальшого нагрівання (до 37°С), а при застосуванні ТФП (150 мкмоль/л) і ДГП (600 мкмоль/л) – чутливі до підвищення температури. При цьому в присутності ТФП розвиток гемолізу еритроцитів спостерігається за температури 20°С і вище, а при використанні ДГП – тільки за 37°С. Мікроскопічні дослідження, що дозволяють простежити за поведінкою окремо взятих еритроцитів, підтвердили вище представлені результати щодо стійкості клітин.

Оцінка розподілу фосфатидилсерину в мембрані еритроцитів методом проточної цитофлуориметрії показала додаткове експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні мембрани в присутності С10 (180 и 400 мкмоль/л), яке визначалося концентрацією амфіфілу. У разі інкубування еритроцитів у фізіологічному розчині в присутності С10 в концентраціях 180 і 400 мкмоль/л кількість позитивно мічених клітин становив 4,32 та 22,6% відповідно. Отримані результати свідчать про те, що з діапазону концентрацій речовини, при яких реєструється мінімальний рівень ПГГ еритроцитів (див. рис. 3.5), можна вибрати концентрацію амфіфілу, використання якої не буде приводити до значного експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні мембрани.

При порівнянні здатності амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, знижувати гемоліз еритроцитів ссавців за умов ПГШ з їх ефективністю при дії інших видів стресу (гіпертонічний шок і гіпертонічний кріогемоліз), виявлено деякі відмінності. Так, за умов ПГШ еритроцитів ссавців амфіфільні речовини проявляють $АГ_{макс}$ активність за температури 0°С, в той час як при інших видах стресу їх ефективність

вище при 37°С, ніж при 0°С, при цьому значення ефективних концентрацій речовин значно вище, ніж при ГШ і ГК.

За умов ГШ і ГК еритроцитів механізм дії амфіфільних сполук пов’язують з тимчасовим розупорядкуванням мембрани, що запобігає росту трансмембранних дефектів до розміру гемолітичних пор [3 10, 65, 144, 146, 150]. Викликаючи пертурбацію в бішарі мембрани в момент дії стресового фактора, амфіфіли дозволяють мембрані адаптуватися і не руйнуватися за умов ГШ і ГК еритроцитів. Ця точка зору підтверджується даними про те, що будь-який стабілізуючій вплив на мембрану (0°С, зшивання діамідом) призводить до зниження $АГ_{макс}$ активності досліджуваних амфіфільних сполук в зазначених умовах [9, 235].

Той факт що, за умов ПГШ еритроцитів антигемолітична активність амфіфільних сполук спостерігалася тільки за температури 0°С та ефективні концентрації вищі аналогічних показників за умов ГШ і ГК (в 5–10 разів) [150], дозволяє припустити наявність іншого механізму АГ дії амфіфілів.

Вивчення чутливості еритроцитів людини, попередньо насичених гліцерином, до дії ПГШ показало, що ПГГ клітин залежить від використовуваної концентрації кріопротектору і температури експерименту. Застосування гліцерину (у концентраціях 5, 10, 15%) показало, що за температури 37°С підвищення рівня ПГГ еритроцитів спостерігається тільки у разі використання високої концентрації (15%) кріопротектору, тоді як за температури 0°С гліцерин викликає підвищення ПГГ в усьому концентраційному діапазоні. Останнє може вказувати на те, що на етапі дегідратації гліцерин не встигає вийти з клітин, оскільки зі зниженням температури швидкість перенесення речовин через клітинну мембрану падає [198].

Рівні ПГГ еритроцитів в присутності гліцерину (15%) за температур 0 та 37°С суттєво відрізняються (38 та 93% відповідно) на відміну від контрольних клітин (табл. 4.1). Результати вивчення температурної

залежності ПГГ еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), показали різке зниження рівня гемолізу еритроцитів (приблизно в 3 рази) в температурному діапазоні від 5 до 25°С.

Проведені дослідження щодо значення осмоляльності середовища регідратації в розвитку ПГГ контрольних і насичених гліцерином еритроцитів показали різке зниження рівня пошкодження клітин з ростом концентрації солі на етапі регідратації (37°С) (див. рис. 4.10). Це обумовлено зменшенням ризику осмотичного шоку клітин внаслідок зменшення осмотичного градієнта на мембрані.

У гіпертонічних розчинах еритроцити, оброблені гліцерином, стискаються в результаті виходу з них води. У плазматичних мембранах таких клітин утворюються дефекти, через які можуть входити позаклітинні речовини (катіони Na^+) і виходити гліцерин. Потім при перенесенні клітин в середовище регідратації (фізіологічний розчин) вони набухають в результаті входу води. Якщо еритроцити досягають значень критичного гемолітичного об’єму, то відбувається розтягнення їх плазматичних мембран до механічного руйнування [87]. Таким чином, етап регідратації дозволяє лише проявити зміни в плазматичній мембрані, які відбулися на етапі дегідратації клітин.

Зважаючи на те що, рівень ПГГ еритроцитів визначається значною мірою умовами середовища дегідратації, тому вивчали чутливість еритроцитів до дії ПГШ за умов використання комбінованих середовищ, що містять проникний гліцерин і непроникний хлорид натрію в різних співвідношеннях (загальна осмоляльність 2370 мОсм/л) на етапі дегідратації. У вищевказаних умовах гліцерин в концентрації 2-7% у складі комбінованих середовищ не викликає додаткового пошкодження еритроцитів порівняно з контролем (середовище дегідратації 7% NaCl), тоді як гліцерин в концентрації (11-15%) призводить до підвищення ПГГ еритроцитів за температури 37 і 0°С. Це свідчить про те, що розвиток ПГГ

еритроцитів людини не визначається загальною осмоляльністю комбінованого середовища на етапі дегідратації.

Слід зазначити, що використання амфіфільних речовин за умов ПГШ еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), дозволяє нівелювати раніше виявлену пошкоджувальну дію кріопротектору (див. рис. 5.6).

Для довгострокового зберігання еритроцитів людини широко застосовується метод кріоконсервування під захистом гліцерину. Оскільки гліцерин є проникним кріопротектором, тому після розморожування еритроцитів є необхідним етап, пов'язаний з видаленням його з клітин. В нашій роботі після насичення і врівноваження еритроцитів із кріоконсервантом на основі гліцерину (ЦНДІГПК 11_4) суспензію еритроцитів швидко заморожували шляхом занурення в рідкий азот (–196°С), з подальшим зберіганням; після розморожування здійснювали процедуру видалення кріопротектору з клітин способом трикратного серійного центрифугування. Амфіфільні речовини додавали в фізіологічний розчин на другому етапі видалення гліцерину з розморожених клітин, оскільки саме на цьому етапі спостерігається пошкодження клітин (див. рис. 5.1). За умов дегліцеринізаціі еритроцитів людини С10, ТФП та ДГП знижували рівень гемолізу клітин і проявляли при цьому високу антигемолітичну активність, яка дорівнює 42, 52 і 74% відповідно.

Порівняльний аналіз отриманих в роботі результатів свідчить про те, що як за умов моделі ПГШ, так і при видалені гліцерину з розморожених еритроцитів усі амфіфільні сполуки (С10, ТФП, ДГП) незалежно від характеру їх трансмембранного розподілу знижують рівень гемолізу та проявляють високу антигемолітичну активність. Оскільки захисний ефект амфіфільних сполук виявлено у модельному експерименті та за умов заморожування- розморожування еритроцитів людини, можна підтвердити

доцільність застосування моделі ПГШ для вивчення дії факторів кріопошкоджень на клітини.

На підставі отриманих результатів і аналізу літературних даних можна припустити, що як за умов ПГШ еритроцитів, так і при дегліцеринізаціі клітин ефективність амфіфільних речовин, швидше за все, обумовлена їх здатністю вбудовуватися в мембрану в місця формування дефектів, і у такий спосіб значно збільшувати критичний гемолітичний об’єм клітин і, як наслідок, запобігати їх руйнуванню.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені теоретичне й експериментальне узагальнення та нове рішення наукового завдання, спрямованого на вивчення дії основних факторів кріопошкодження на еритроцити при розморожуванні та на етапі їх дегліцеринізації, а також розробку підходів, що дозволяють підвищити стійкість клітин із залученням амфіфільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин. Виявлена висока антигемолітична активність амфіфільних сполук із різними фізико-хімічними властивостями як за умов моделі постгіпертонічного шоку, так і при видаленні гліцерину з еритроцитів людини, підданих заморожуванню до –196°С.

1. Виявлено, що за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців амфіфільні сполуки, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, проявляють високу антигемолітичну активність за температури 0°С, на відміну від 37°С. При цьому для еритроцитів людини величини максимальної антигемолітичної активності усіх амфіфільних сполук сумірні і знаходяться в діапазоні 60–70%, для клітин кролика більш ефективними є аніонний децилсульфат натрію і неіонний децил-β,D-глюкопіранозид, а для клітин щура – катіонні хлорпромазин і трифторперазин.

2. Із залученням спектрофотометричного і мікроскопічного методів показано, що еритроцити людини, які збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку і децилсульфату натрію (400 мкмоль/л) (0°С), стійкі до подальшого нагрівання (до 37°С), а при застосуванні трифторперазину (150 мкмоль/л) і децил-β,D-глюкопіранозиду (600 мкмоль/л), – чутливі до підвищення температури. При цьому в присутності трифторперазину розвиток гемолізу еритроцитів

спостерігається за температури 20°С і вище, а при використанні децил-β,D-глюкопіранозиду – тільки за 37°С.

3. Встановлено, що чутливість еритроцитів людини, попередньо насичених гліцерином, до дії ПГШ залежить від концентрації кріопротектору і температури. Гліцерин при використанні в концентраціях 5, 10, 15% призводить до підвищення рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів за температури 0°С, тоді як за температури 37°С – тільки у разі використання кріопротектору в концентрації 15%. Вивчення температурної залежності ПГГ еритроцитів, попередньо оброблених гліцерином (15%), показало різке зниження рівня гемолізу еритроцитів (приблизно в 3 рази) в температурному діапазоні від 5 до 25°С.

4. Розвиток постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини не визначається загальною осмоляльністю (2370 мОсм/л) комбінованого середовища, що містить проникний гліцерин і непроникний хлорид натрію в різних співвідношеннях (на етапі дегідратації). Показано, що гліцерин в концентрації 2–7% у складі комбінованих середовищ не викликає пошкодження еритроцитів порівняно з контролем (середовище дегідратації 1,2 моль/л NaCl), тоді як гліцерин в концентрації (11–15%) призводить до підвищення постгіпертонічного гемолізу еритроцитів за температури 37 і 0°С.

5. Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить, що за умов дегліцеринізації еритроцитів людини, заморожених до –196°С під захистом гліцерину (15%), трифторперазин, децилсульфат натрію та децил-β,D-глюкопіранозид здатні знижувати рівень гемолізу клітин і проявляти високу антигемолітичну активність, при цьому більш ефективним був неіонний децил-β,D-глюкопіранозид.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Любич ВВ. Виробництво препаратів донорської крові в Україні та контроль їхньої якості. Гематологія і переливання крові. міжвідомчий збірник – К. : МПБП «Гордон», 2017. Вип. 39: 121 – 8.

2. Тимченко АС. Сучасні напрями фундаментальних та прикладних досліджень в гематології та трансфузіології України. Гематологія і переливання крові. Гематологія і переливання крові: 2015. Вип. 38: 15 – 23.

3. Jones JM, Sapiano MRP, Savinkina AA, Haass KA, Baker ML, Henry, RA, Berger JJ, Basavaraju SV. Slowing decline in blood collection and transfusion in the United States – 2017. Transfusion. 2017; 60 (2). doi: 10.1111/trf.15604.

4. Henkelman S, Lagerberg JWM, Graaff R, et al. The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties. Transfusion. 2010; 50 (11): 2393 – 401. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02730.x.

5. Белоус АМ, Гордиенко ЕА, Розанов ЛФ. Замораживание и криопротекция. В кн. «Биохимия мембран». Болдырева АА, ред. М.: Высшая школа; 1987. 80 с.

6. Henkelman S, Noorman F, Badloe JF, Lagerberg JWM. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. 2015; 108 (2):103 – 12. doi: 10.1111/vox.12218.

7. Fuller BJ, Benson EE, editors. Life in the frozen state. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press; 2004. 672 p.

8. Lagerberg JW. Frozen blood reserves. Methods Mol Biol. 2021; 2180: 523 – 38. doi: 10.1007/978-1-0716-0783-1_26.

9. Шпакова НМ. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців. [автореф. дис. доктора биол. наук]. Харків: ІПКіК; 2014. 44 с.

10. Shpakova NM, Iershova NA, Orlova NV, Iershov SS, Synchykova OP. Application of alkyl sulfates and heat treated erythrocytes in hypertonic cryohemolysis. Biotechologia Acta. 2015; 8 (3): 126 − 36.

11. Семионова ЕА, Ершова НА, Ершов СС, Орлова НВ, Шпакова НМ. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26 (1): 73 – 83.
doi: https://doi.org/10.15407/cryo26.01.073.

12. Семионова ЕА, Землянских НГ, Орлова НВ, Шпакова НМ. Антигемолитическая эффективность хлорпромазина в условиях постгипертонического шока и при удалении глицерина из эритроцитов после размораживания. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27 (1): 51 – 60. doi: https://doi.org/10.15407/cryo27.01.051

13. Virtanen JA, Cheng KH, Somerharju P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 95: 4964 – 9.
doi: http://doi.org/10.1073/pnas.95.9.4964.

14. Matei H, Frentescu L, Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. J Cell Mol Med. 2000; 4 (4): 270 – 6. doi: 10.1111/j.1582-4934.2000.tb00126.x.

15. Мороз ММ, Голубев АМ, Афанасьев АВ, Кузовлев АН, Сергунова ВА, Гудкова ОЕ и др.. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. Общая реаниматология. 2012; 8 (1): 52 – 60. doi: https://doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-52.

16. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. Blood. 2008; 112 (10): 3939 – 48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166

17. Гильмутдинов РЯ, Ильязов РГ, Иванов АВ. Сравнительная гематология животных. Казань: Фэн; 2005. 288 с.

18. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L , van Wijk R. Squeezing for Life – Properties of Red Blood Cell Deformability Front Physiol. 2018 Jun 1;9:656. doi: 10.3389/fphys.2018.00656. eCollection 2018.

19. Ипатова ОМ. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. Наука; 2005. 318 с.

20. Остапченко ЛІ, Синельник ТБ, Компанець ІВ. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти: навч. посіб. /Київ: ВПЦ «Київський університет»; 2016. 639 с.

21. Aoki T. A comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. Membranes (Basel). 2017; 7 (4): 56. doi: 10.3390/membranes7040056.

22. Burton NM, Bruce LJ. Modelling the structure of the red cell membrane. Biochem. Cell Biol. 2011; 89: 200 – 15. doi: 10.1139/o10-154.

23. Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. Int J Lab Hematol. 2017; 39 (1):47 – 52. doi: 10.1111/ijlh.12657.

24. Лігоненко ОВ, Зубаха АБ, Чорна ІО, Шумейко ІА, Дігтяр ІІ, Стороженко ОВ. Клінічна трансфузіологія: навчально-методичний посібник для студентів медичних факультетів вищих навчальних закладів ІІІ–IV рівня акредитації. Полтава; 2013. 123 с.

25. Микитюк ОМ, Грицайчук ВВ, Злотін ОЗ, Маркіна ТЮ. Основи екології:Навчальний посібник. 2-е вид. стереотипне. Харків: «ОВС»; 2004. 144 с.

26. Storey KB, Storey JM. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. Physiol Rev. 2017; 97 (2): 623 – 65.

doi: 10.1152/physrev.00016.2016.

27. Costanzo JP, do Amaral MCF, Rosendale AJ, Lee RE. Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. J Exp Biol. 2013; 216 (18): 3461 – 73. doi: 10.1242/jeb.089342.

28. Holmstrup M. The ins and outs of water dynamics in cold tolerant soil invertebrates. J Therm Biol 2014; 45: 117 – 23. doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.09.001.

29. Storey KB, Storey JM. Molecular biology of freezing tolerance. Comp Physiol. 2013; 3 (3): 1283 – 308. doi: 10.1002/cphy.c130007.

30. Strimbeck GR, Schaberg PG, Fossdal CG, Schröder WP, Kjellsen TD. Extreme low temperature tolerance in woody plants. Front Plant Sci. 2015; 6: 884. doi: 10.3389/fpls.2015.00884. eCollection 2015.

31. Berman D, Meshcheryakova E. Is the western boundary of the Siberian salamander (Salamandrella keyserlingii, Amphibia, Caudata, Hynobiidae), range determined by the specific features of its wintering? Dokl Biol Sci. 2012; 443: 97 – 100. doi: 10.1134/S0012496612020068.

32. Berman DI, Leirikh AN, Meshcheryakova EN. The Schrenck newt (Salamandrella schrenckii, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) is the second amphibian that withstands extremely low temperatures. Dokl Biol Sci. 2010; 431: 131 – 4. doi: 10.1134/s0012496610020171.

33. Storey KB, Storey JM. Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation. Can J Zool. 2012; 90 (4): 456 – 75. doi: 10.1139/z2012-011.

34. Irwin JT, Lee RE. Geographic variation in energy storage and physiological responses to freezing in the gray treefrogs Hyla versicolor and H. chrysoscelis. J Exp Biol 2003; 206 (16): 2859 – 67. doi: 10.1242/jeb.00500.

35. Layne JR, Stapleton MG. Annual variation in glycerol mobilization and effect of freeze rigor on post-thaw locomotion in the freeze-tolerant frog Hyla versicolor. J Comp Physiol B. 2009; 179 (2): 215 – 21.

doi: 10.1007/s00360-008-0304-6.

36. Hachez C, Chaumont F. Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. Adv Exp Med Biol. 2010; 679: 1 – 17. doi: 10.1007/978-1-4419-6315-4_1.

37. Hirota A, Takiya Y, Sakamoto J, Shiojiri N, Suzuki M, Tanaka S, et.al. Molecular cloning of cDNA encoding an aquaglyceroporin, AQP-h9, in the Japanese tree frog, Hyla japonica: possible roles of AQP-h9 in freeze tolerance. Zoolog Sci. 2015; 32 (3): 296 – 306. doi: 10.2108/zs140246.

38. Reynolds AM, Lee RE, Costanzo JP. Membrane adaptation in phospholipids and cholesterol in the widely distributed, freeze-tolerant wood frog, Rana sylvatica. J Comp Physiol B. 2014; 184 (3): 371 – 83. doi: 10.1007/s00360-014-0805-4.

39. Жегунов ГФ, Нардид ОА. редактори. Основы криобиологии и криомедицины : учеб. для студентов-биологов и медиков. Харьков: ФЛП Бровин АВ.; 2019. 616 с.

40. Гольцев АМ, Новак ВЛ, Компанієць АМ, Нардід ОА, Пахомова ЮС, Чеканова ВВ та ін. Кріоконсервування клітин донорської крові та їх довгострокове зберігання у низькотемпературних банках:методичні рекомендації. Харків. 2016. 35с.

41. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. Москва: Изд-во иностранной литературы; 1963. 503 с.

42. Ластухін ЮО. Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості. Навч. посібник. Львів: Центр Європи; 2009. 836 с.

43. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000; 27 (4): 313 – 9. doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03240.x.

44. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. Transfus Med Rev. 2005; 19 (2): 127 – 42. doi: 10.1016/j.tmrv.2004.11.004.

45. Lahmann JM, Sanchez CC, Benson JD, Acker JP, Higgins AZ. Implications of variability in cell membrane permeability for design of methods to remove glycerol from frozen-thawed erythrocytes. Cryobiology. 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.006

46. Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, Cassidy GP, Srey R, Hansson-Wicher M, et al. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at –80 degrees C for up to 37 years. Vox Sang. 2000; 79 (3): 168 – 74.

47. Holey A, Marks DC, Johnson L, Reade MC, Badloe JF, Noorman F. Frozen blood products: clinically effective and potentially ideal for remote Australia. Anaesth. Intensive Care. 2013; 41 (1): 10 – 9. doi: 10.1177/0310057X1304100104.

48. Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. J Blood Transfusion. 2016; :4860284: 28. doi: http://dx.doi.org/10.1155/2016/4860284.

49. Lelkens CCM, de Korte D, Lagerberg JWM. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. Vox Sang. 2015; 108 (3): 219 – 25. doi: 10.1111/vox.12219.

50. Wagner CT, Burnett MB, Livesey SA, Connor J. Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation. Cryobiology. 2000; 41: 178 – 94. doi:10.1006/cryo.2000.2279.

51. Lusianti RE, Benson JD, Acker JP, Higgins AZ. Rapid removal of glycerol from frozen-thawed red blood cells. Biotechnol Prog. 2013; 29 (3); 609 – 20. doi: http://dx.doi.org/10.1002/btpr.1710.

52. Zhao Y, Luo G, Luo H, Ye X, Rong X, Huang K. Modify washing solutions in the process of deglycerolization in ACP 215 and storage at 4°C in 0.9% sodium chloride in 24h. Transfus Apher Sci. 2010; 43 (2): 163 – 5. doi:10.1016/j.transci.2010.07.009.

53. Zhou X-L, He H, Liu B-L, Hua T-C, Chen Y. Effects of glycerol pretreatment on recovery and antioxidant enzyme activities of lyophilized red blood cells. Cryo Letters. 2008; 29 (4): 285 – 92.

54. Rogers SC, Dosier LB, McMahon TJ, Zhu H, Timm D, Zhang H, et.al. Red blood cell phenotype fidelity following glycerol cryopreservation optimized for research purposes. PLoS One. 2018; 13 (12):e0209201 doi:10.1371/journal.pone.0209201. eCollection 2018.

55. Chang AL, Hoehn RS, Jernigan P, Cox Dl, Schreiber M, Pritts TA. Previous cryopreservation alters the natural history of the red blood cell storage lesion. Shock. 2016; 46 (3 Suppl. 1): 89 – 95. doi:10.1097/SHK.0000000000000668.

56. Briard JG, Poisson JS, Turner TR, Capicciotti CJ, Acker JP, Ben RN, et al. Small molecule ice recrystallization inhibitors mitigate red blood cell lysis during freezing, transient warming and thawing. Sci. Rep. 2016; 6: 23619; doi:10.1038/srep23619.

57. Capicciotti CJ, Kurach JDR, Turner TR, Mancini RS, Acker JP, Ben RN. Small molecule ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations. Sci Rep. 2015; 5: 9692. doi:10.1038/srep09692.

58. Poisson JS, Acker JP, Briard JG, Meyer JE, Ben RN. Modulating intracellular ice growth with cell-permeating small-molecule ice recrystallization inhibitors. Langmuir. 2018; 35 (23): 7452 – 8. doi:10.1021/acs.langmuir.8b02126.

59. Poisson JS, Briard JG, Turner TR, Acker JP, Ben RN. Hydroxyethyl starch supplemented with ice recrystallization inhibitors greatly improves cryopreservation of human red blood cells. BioProcess J, 2017; 15 (4): 16 – 21. doi: https://doi.org/10.12665/J154.Ben.

60. Воротилин АМ, Гучок ВМ, Луговой ВИ, Моисеев ВА. Особенности основных этапов технологического процесса

криоконсервирования эритроцитов с новым консервантом «Пропандиосахароль». Сборник научных трудов. Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. 1990: 25 – 9.

61. Бабийчук ЛА, Землянских НГ. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500. Проблемы криобиологии. 2001; 1: 35 – 41.

62. Schmid P, Huvard MJ, Lee-Stroka AH, Lee JY, Byrne KM, Flegel WA. Red blood cell preservation by droplet freezing with polyvinylpyrrolidone or sucrose-dextrose and by bulk freezing with glycerol. Transfusion. 2011; 51 (12): 2703 – 8. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03258.x.

63. Ulizko PYu, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Kovalenko IF, Kuchkov VM et. al. Cryopreservation of equine and bovine erythrocytes using combined protective media. Probl Cryobiol Cryomed. 2019; 29 (3): 255 – 65. doi: 10.15407/cryo29.03.255.

64. Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, Hofmann N, Glasmacher B, Zhegunov G. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. PloS One [Internet]. 2017 Jan 10. 12 (1):e0169689. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28072844/.

65. Ершова НА, Шпакова НМ, Орлова НВ. Влияние фенилгидразина и алкилсульфатов на осмотическую чувствительность эритроцитов млекопитающих. Доповіді Національної академії наук України. 2012; (6): 129 – 33.

66. Ершова НА, Нипот ЕЕ, Шпакова НМ, Ершов СС. Орлова НВ. Влияние трифторперазина и додецил β,D-мальтозида на гипертонический стресс эритроцитов млекопитающих. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014; 24 (3) :231 – 37.
doi:https://doi.org/10.15407/cryo24.03.231

67. Єршова НА, Шпакова НМ, Орлова НВ, Єршов СС. Амфіфіли як інструмент для вивчення гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців. Біологія тварин. 2014; 16 (2): 26 – 34.

68. Zade-Oppen AMM. Posthypertonic hemolysis in a sucrose system. Experientia. 1970; 26 (10):1087 – 8. doi: 10.1007/BF02112690.

69. Woolgar AE, Morris CJ. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic haemolysis of human red blood cells. Cryobiology. 1973; 10: 82 – 6. doi: 10.1016/0011-2240(73)90011-4.

70. Пателарос СВ, Сынчикова ОП. Осмотическое поведение эритроцитов при постгипертоническом лизисе. Проблемы криобиологии. 1994; 3: 35 – 40.

71. Нипот ЕЕ. Роль температуры как факторы, определяющего чувствительность эритроцитов к гипертоническому и постгипертоническому лизису. Проблемы криобиологии. 1997. (1 – 2): 87 – 90.

72. Söderström N. Hemolysis by hypertonic solutions of neutral salts. Acta Physiologica Scandinavica. 1944; 7: 56 – 68. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1944.tb03013.x

73. Олейник ОА, Рамазанов ВВ, Бондаренко ВА. Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде. Проблемы криобиологии. 2003; (3): 21 – 9.

74. Zade-Oppen AM. Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems. Acta Physiologica Scandinavica. 1968; 73 (3): 341 – 64. doi: 10.1111/j.1748-1716.1968.tb04113.x.

75. Lovelock JE. Tne hemolysis of the human red blood cells by frezing and thawing. Biochim Biophys Acta. 1953; 10: 414 – 26.

76. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. Cryobiology. 1971; 8 (5): 439 – 500. doi: 10.1016/0011-2240(71)90040-x.

77. Нипот ЕЕ, Мелихова СВ, Бондаренко ВА. Влияние инкубации эритроцитов в гипертонических неэлектролитных средах на их осмотическую устойчивость. Проблемы криобиологии. 2006; 16 (4): 363–9.

78. Farrant J, Morris GJ. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury. Cryobiology. 1973; 10 (2): 134 – 40. doi: 10.1016/0011-2240(73)90019-9.

79. Zade-Oppen AMM. The effect of mannitol, sucrose, raffinose and dextran on posthypertonic hemolysis. Acta physiol. scand. 1968; 74: 195 – 206. doi: 10.1111/j.1748-1716.1968.tb04228.x.

80. Белоус АМ, Бондаренко ВА, Бабийчук ЛА, Бондаренко ТП, Бойко НМ. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе. Проблемы криобиологии. 1985; (2) : 25 – 32.

81. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. К. Наукова думка. 1994. 142 с.

82. Пателарос СВ. Влияние моновалентных катионов Na^+, K^+, H^+ на развитие осмотических мембранных повреждений эритроцитов, активируемых ионами Ca^{++} и Zn^{++} . Проблемы криобиологии. 1998; (4): 26 – 31.

83. Олейник ОА, Рамазанов ВВ, Бондаренко ВА. Постгипертонический лизис эритроцитов при изменении pH и состава регидратирующей среды. Проблемы криобиологии. 2002; (3) : 30 – 6.

84. Олейник ОА, Абу-Аль Асаль Ф, Рамазанов ВВ, Бондаренко ВА. Влияние различных анионов на постгипертонический лизис эритроцитов. Проблемы криобиологии. 2003; (2) : 22 – 30.

85. Шпакова НМ, Єршов СС, Ніпот ОЄ. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів K^+ і розвитком гемолітичного пошкодження

еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного кріогемолізу. Біологія тварин. 2008; 10 (1 – 2): 164 – 70.

86. Алексєєва ЛІ, Коваленко СЄ, Холодний ВС, Гордієнко ОІ. Витік калію і щільність розподілу за індексом сферичності в популяціях еритроцитів при експозиції в гіпертонічних розчинах хлориду натрію. Проблеми кріобіології. 2005; 15 (2): 159 – 72.

87. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. Cryobiology. 2008; 57 (3): 251 – 6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.09.007.

88. Семіонова КА, Ніпот ОЄ, Єршова НА, Шапкіна ОО, Шпакова НМ. Температура, осмоляльність і глюкоза як фактори, що визначають стійкість еритроцитів до постгіпертонічного шоку. Доповіді Національної академії наук України. 2020. № 4: 99 – 106. doi.org/10.15407/dopovidi2020.04.099

89. Семионова ЕА, Чабаненко ЕА, Орлова НВ, Зубов ПМ, Шпакова НМ. К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27 (3): 219 – 29. doi: 10.15407/cryo27.03.219

90. Mishra M, Muthuprasanna P, Surya prabha K, Sobhita rani P, Satih babu IA, Sarath Chandiran I, et.al. Basics and potential applications of surfactants – a review. International Journal of PharmTech Research. 2009; 1(4):1354 – 65.

91. Babajanzadeh B, Sherizadeh S, Ranji H. Detergents and surfactants: a brief review. Open Access J Sci. 2019; 3 (3): 94 – 9. doi:10.15406/oajs.2019.03.00138.

92. Ланге КР. Зайченко ЛП, редактор. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение. СПб: Профессия, 2004. 240 с.

93. Холмберг К, Йёнссон Б, Кронберг Б, Линдман Б. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах [Пер. с англ.]. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2007. 528 с.

94. Otzen DE. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? Biochim Biophys Acta Biomembranes. 2017; 1859 (4): 639 – 49. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.09.024.

95. Пирог ТП, Конон АД, Скочко АБ. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині. Біотехнологія, 2011. 4 (2): 24 – 38.

96. Heerklotz H. Interection of surfactants with lipid membrane Q Rev Biophys. 2008; 41 (3 – 4): 205 – 64. doi: 10.1017/S0033583508004721.

97. Nikunj D, Tejas J. A concise review on surfactants and its significance. International Journal of Applied Chemistry. 2017; 13 (3): 663 – 72.

98. 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. doi: 10.1016/0005-2736(68)90078-3.

99. Isomaa B, Hägerstrand H, Paatero G. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. Biochim Biophys Acta. 1987; 899 (1): 93 – 103. doi: 10.1016/0005-2736(87)90243-4.

100. Коваленко СЄ, Алексєєва ЛІ, Кулєшова ЛГ, Коваленко ІФ, Холодний ВС, Гордієнко ЄО та ін. Можливі механізми антигемолітичної дії хлорпромазину. Проблеми кріобіології. 2006; 16 (2): 137 – 46.

101. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cheri A, Pougnas J-L, Perrin C. Hemolysis by surfactant – a review. Advances in Colloid and Interface Science. 2015; 228: 1 – 16. doi: 10.1016/j.cis.2015.10.011.

102. Isomaa B, Hägerstrand H, Paatero G, Engblom AC. Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes.

Biochim Biophys Acta. 1986; 860 (3): 510 – 24. doi: 10.1016/0005-2736(86)90548-1.

103. Chen JY, Brunauer LS, Chu FC, Helsel CM, Gedde MM, Huestis WH. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers. Biochim Biophys Acta. 2003; 1616 (1): 95 – 105. doi: 10.1016/s0005-2736(03)00229-3.

104. Ficarra S, Russo A, Barreca D, Giunta E, Galtieri A, Tellon E. Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality: activation of metabolism and membrane perturbation. Oxid. Med. Cell Longev. 2016; 2394130. doi: 10.1155/2016/2394130.

105. Schmidt A, Alsop RJ, Rimal R, Lenzig P, Joussen S, Gervasi NN, et. al. Modulation of DEG/ENaCs by amphiphiles suggests sensitivity to membrane alterations. Biophys J. 2018; 114 (6): 1321 – 35. doi: 10.1016/j.bpj.2018.01.028. 20.

106. Tacheva B, Paarvanova B, Ivanov IT, Tenchov B, Georgieva R, Karabaliev M. Drug exchange between albumin nanoparticles and erythrocyte membranes. Nanomaterials (Basel), 2019; 9 (1): 47 – 61. doi: https://doi.org/10.3390/nano9010047

107. Jiang YW, Gao G, Chen Z, Wu FG. Fluorescence studies on the interaction between chlorpromazine and model cell membranes. New J. Chem. 2017; 41 (10): 4048 – 57.

108. Gjerde AU, Holmsen H, Nerdal W. Chlorpromazine interaction with phosphatidylserines: A 13C and 31P solid-state NMR study. Biochim Biophys Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids. 2004; 1682 (1–3): 28 – 37. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.01.004.

109. Martins PT, Velazquez-Campoy A, Vaz WLC, Cardoso RMS, Valério J, Moreno MJ. Kinetics and thermodynamics of chlorpromazine interaction with lipid bilayers: effect of charge and cholesterol. J Am Chem Soc. 2012; 134 (9): 4184 – 95. doi: 10.1021/ja209917q.

110. Lange Y, Ye J, Duban M-E, Steck TL. Activation of membrane cholesterol by 63 amphipaths. Biochemistry. 2009; 48 (36): 8505 – 15. doi:10.1021/bi900951r.

111. Gruber HJ. Interaction of amphiphiles with integral membrane proteins. II. A simple, minimal model for the nonspecific interaction of amphiphiles with the anion exchanger of the erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta. 1988; 944 (3): 425 – 36. doi:10.1016/0005-2736(88)90513-5.

112. Enomoto A, Takakuwa Y, Manno S, Tanaka A, Mohandas N. Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine. Biochim Biophys Acta. 2001; 1512: 285 – 90. doi: 10.1016/s0005-2736(01)00329-7.

113. Guevara EAC, De Lourdes Barriviera M, Hasson-Voloch A, Louro SRW. Chlorpromazine binding to Na^+,K^+-ATPase and photolabeling: involvement of the ouabain site monitored by fluorescence. 2007; 83: 914 – 9. doi:https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00077.x

114. Isomaa B, Engblom AC. Is calmodulin inhibition involved in shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes? Biochim Biophys Acta. 1988; 940 (1): 121 – 6. doi: 10.1016/0005-2736(88)90015-6.

115. Plenge-Tellechea F, Domínguez-Solís CA, Díaz-Sánchez AG, Meléndez-Martínez D, Vargas-Medrano J, Sierra-Fonseca JA. Chlorpromazine and dimethyl sulfoxide modulate the catalytic activity of the plasma membrane Ca^{2+-}ATPase from human erythrocyte. J Bioenerg Biomembranes. 2018; 50 (1): 59 – 69. doi: 10.1007/s10863-017-9741-9.

116. Lubker C, Seifert R. Effects of 39 compounds on calmodulinregulated adenylyl cyclases AC1 and bacillus anthracis edemafactor. PLoS One. 2015; 10 (5): e0124017. doi: 10.1371/journal.pone.0124017.

117. Ahyayauch H, Goni FM, Bennouna M. pH-dependent effects of chlorpromazine on liposomes and erythrocyte membranes. J Liposome Res. 2003; 13 (2): 147 – 55. doi: 10.1081/lpr-120020317.

118. Tehrani S, Brandstater N, Saito YD, Dea P. Studies on the size and stability of chlorpromazine hydrochloride nanostructures in aqueous solution. Biophys Chem. 2001; 94 (1 – 2): 87 – 96. doi: 10.1016/s0301-4622(01)00226-5.

119. Michalak K, Wesolowska O, Motohashi N, Molnar J, Hendrich AB. Interactions of phenothiazines with lipid bilayer and their role in multidrug resistance reversal. Current Drug Targets. 2006; 7 (9): 1095 – 105. doi: 10.2174/138945006778226570.

120. Hendrich AB, Wesolowska O, Michalak K. Trifuoperazine induces domain formation in zwitterionic phosphatidylcholine but not in charged phosphatidylglycerol bilayers. Biochim Biophys Acta. 2001; 1510 (1 – 2): 414 – 25. doi: 10.1016/s0005-2736(00)00373-4.

121. Malheiros SVP, Meirelles NC, de Paula E. Pathway involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis. Biophys. Chem. 2000; 83 (2): 89 – 100. doi: 10.1016/s0301-4622(99)00125-8.

122. Hidalgo AA, Caetano W, Tabak M, Oliveira Jr ON. Interaction of two phenothiazine derivatives with phospholipid monolayers. Biophysical Chemistry. 2004; 109 (1): 85 – 104. doi: 10.1016/j.bpc.2003.10.020.

123. Walter A, Kuehl G, Barnes K, VanderWaerdt G. The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea. Biochim Biophys Acta. 2000; 1508 (1 – 2): 20 – 33. doi: 10.1016/s0304-4157(00)00005-8.

124. da Graca Miguel M, Eidelman O, Ollivon M, Walter A. Temperature dependence of the vesicle-micelle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. Biochemistry. 1989; 28 (22): 8921 – 8. doi:10.1021/bi00448a035.

125. Meier M, Seelig J. Lipid and peptide dynamics in membranes upon insertion of n-alkyl-beta-D-glucopyranosides. Biophys J. 2010; 98 (8): 1529 – 38. doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4286.

126. Wasylewski Z, Kozik A. Protein – non-ionic detergent interaction. interaction of bovine serum albumin with alkyl glucosides studied by equilibrium dialysis and infrared spectroscopy. Eur. J. Biochem. 1979; 95 (1): 121 – 6. doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb12946.x.

127. Giuseppe DR, D'Errico G, Ortona O, Vitagliano V. Evaluation of alkyl sulfate and sulfonate micellar structure at the water-surfactant interphase with simple geometrical calculations. J Colloid Interface Sci. 2010; 349 (1): 230 – 5. doi: 10.1016/j.jcis.2010.05.023.

128. Malheiros SVP, de Paula E, Meirelles NC. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. Biochim Biophys Acta. 1998; 1373 (2): 332 – 40.doi: https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00090-x.

129. Rosso J, Zachowski A, Devaux PF. Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes. Biochim Biophys Acta. 1988; 942 (2): 271 − 9. doi:10.1016/0005-2736(88)90029-6.

130. Schrier SL, Zachowski A, Devaux PF. Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes. Blood. 1992; 79 (3): 782 – 6.

131. Hägerstrand H, Isomaa B. Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. Biochim Biophys Acta. 1989; 982 (2): 179 – 86. doi:10.1016/0005-2736(89)90053-9.

132. Oberwagner W, Sauer T, Hermann A, Prohaska R, Müllner EW, Salzer U. Drug-induced endovesiculation of erythrocytes is modulated by the dynamics in the cytoskeleton/membrane interaction. Blood Cells Mol Dis. 2017; 64: 15 – 22. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.03.004.

133. Seeman P. The membrane action of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol. Rev. 1972; 24 (4): 583 − 655.

134. Шпакова НМ, Орлова НВ. До питання щодо механізму осмотичної стійкості еритроцитів ссавців. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020. 30 (4): 331 – 42.
doi: https://doi.org/10.15407/cryo30.04.331.

135. Sobotka H, Stewart CP. Advanced in clinical chemistry Vol.8. London, New York, Academic Press, 1965, 335 p.

136. Дегтярев АВ, Руденко СВ, Бондаренко ТП, винахідники; Устройство для определения оптической плотности биологических суспензий: А.с. 907436 СССР, МКИ4 601 N33/48. (СССР). – опубл. 23.06.90, Бюл. № 40.

137. Bessis M. Red cell shapes: An illustrated classification and its rationale. Nouv Rev Fr Hematol. 1972; 12 (6): 721 – 46. PubMed PMID: 4268780.

138. vanGenderen HO, Kenis H, Hofstra L. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. Biochim Biophys Acta. 2008; 1783 (6): 953 – 63.
doi: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.030.

139. Кучков ВН. Зинченко ВД. Криоскопический осмометр для исследования криобиологических жидкостей. Проблемы криобиологии. 2011; 21 (1): 104 – 12.

140. Краснов ЕА, редактор. Рефрактометрический метод анализа: учебно – методическое пособие. Томск; 2002. 36 с.

141. Ніпот ОЄ. Вивчення механізмів пошкодження еритроцитів при дегідратації-регідратації і дії деяких літичних пептидів [автореф.дис. к.б.н.:03.00.22.]. Харків: ІПКіК; 1997. 24 с.

142. Чабаненко ЕА, Шпакова НМ, Орлова НВ. Влияние хлорпромазина на устойчивость эритроцитов млекопитающих в условиях гипотонического шока. LXXI Международная научно-практическая

конференция студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017»; 2017. с. 220.

143. Semionova EA, Iershova NA, Orlova NV, Shpakova NM. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. Eastern European Scientific Journal. 2016; (2): 7 – 17.

144. Шпакова НМ, Дунаевская ОН, Сынчикова ОП, Бондаренко ВА. Действие трифторперазина на гемолиз эритроцитов в гипертонических растворах электролитов. Проблемы криобиологии. 2002; (3): 7 – 15.

145. Писаренко НА, Шпакова НМ, Орлова НВ. Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих, модифицированных фенилгидразином. Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Сер.: Біологія. 2009. 856(9): 167 – 73.

146. Єршов СС, Писаренко НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив катіонних та аніонних амфіфільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців. Фізіологічний журнал. 2007; 53 (6): 78 – 84.

147. Riske KA. Domingues CC, Casadei BR, Mattei B, Carita AC, Lira RB, et al. Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. Biophys Rev. 2017; 9:649 – 67 doi: 10.1007/s12551-017-0310-6.

148. Attwood D, Mosquera V, Pérez-Villar V. Thermodynamic properties of amphiphilic drugs in aqueous solution. J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 1989; (85): 3011 – 17.

149. Castro E, Taboada P, Barbosa S, Mosquera V. Size control of styrene oxide- ethylene oxide diblock copolymer aggregates with classical surfactants: DLS, TEM, and ITC study. Biomacromolecules. 2005; 6: 1438 – 47.

150. Шпакова НМ. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью

алкил-β,D-глюкопиранозидов. Проблемы криобиологии. 2009;19 (4): 449 – 60.

151. Heerklotz H, Seelig J. Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. Biophysical Journal. 2000; 78: 2435 – 40.

152. Чабаненко ЕА, Ершова НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние амфифильных соединений на постгипертонический шок эритроцитов человека. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2019; 33: 84 – 90. doi: 10.26565/2075-5457-2019-33-11

153. Wessels JMC, Veerkamp JH. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. Biochim Biophys Acta. 1973; 291: 190 – 6.

154. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. European Biophysics Journal. 2013; 42: 33 – 46. doi: 10.1007/s00249-012-0868-7.

155. Тараховский ЮС. Интелектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М. ЛКИ, 2011. 280 с.

156. Tan Y, Sun D, Wang J, Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. IEEE Trans. Biomedical Engineering. 2010; 57 (7): 1816 – 25.

157. Yeagle PL, Albert AD, Boesze-Battaglia K, Young J, Frye J. Cholesterol dynamics in membranes. Biophys. J. 1990; 57 (3): 413 – 24. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82558-3.

158. Okubo K, Yokoyama N, Takabatake N, Okamura M, Igarashi I. Amount of cholesterol in host membrane affects erythrocyte invasion and replication by Babesia bovis. Parasitology. 2007; 134 (5): 625 – 30. doi: 10.1017/S0031182006001910.

159. López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M. Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to t-BuOOH. Biochim Biophys Acta. 2005; 1734 (1): 74 – 85. doi: 10.1016/j.bbalip.2005.02.004.

160. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. Chem Phys Lipids. 2005; 134 (2): 183 – 9. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2004.12.011.

161. Ligi F, Ciacci C, Palma F, Palma F. Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes. Comp. Biochem. Physiol. B. 1998; 121 (3): 265 – 71. doi: 10.1016/s0305-0491(98)10099-8.

162. Rauenbuehler PB, Cordes KA, Salhany JM. Identification of the haemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta. 1982; 692 (3): 361 – 70.

163. Комарова НК, Свиридова ТГ, Степовик ЛВ, Хайруллина АБ. Физико-химические свойства эритроцитов крови человека и животных в норме и при некоторых эндогенных и экзогенных воздействиях на организм. Оренбург: Издательство Оренбургского государственного аграрного университета; 2003. 20 с.

164. Еникеев ДА, Хисамов ЭН, Еникеева СА, Идрисова ЛТ, Мочалов КС. Коррекция гематологических сдвигов у кроликов под действием ионола. Современные проблемы науки и образования. 2013. 6. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=11551

165. Монгалёв НП, Рубцова ЛЮ, Шадрина ВД, Черных АА, Вахнина НА, Макарова ИА, и др. Реактивность эритроцитов крыс в

условиях физической нагрузки разной интенсивности. В мире научных открытий. 2018; 10 (2): 74 – 92. doi: 10.12731/wsd-2018-2-74-92.

166. Александрова ДІ. Вплив початкових осмотичних та температурних умов на стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку [автореф. дис. к.б.н.:03.00.19]. Харків: ІПКіК; 2011. 20 с.

167. Synchykova OP, Shpakova NM, Bondarenko VA. Effect of alkyl-β,D-glucopyranosides on hypertonic haemolysis of erythrocytes. Bioelectrochemistry. 2004; 62: 163 – 7.

168. Nicolson GL. The fluid — mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. Biochim Biophys Acta – Biomembranes, 2014; 1838 (6):1451 – 66. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019.

169. Sheetz MP, Painter RG, Singer SJ. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. J Cell Biol. 1976; 70 (1):193–203. doi: 10.1083/jcb.70.1.193.

170. Чабаненко ОО, Єршова НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив децилсульфату натрію та хлорпромазину на постгіпертонічний шок еритроцитів ссавців. Біологія тварин, 2019; 21 (4): 84 – 90.
doi: https://doi.org/10.15407/animbiol21.04.084

171. Nelson GJ. Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals. J. Lipid Research. 1967; 8 (4): 374–9.

172. Kucerka N, Nieh MP, Katsaras J. Asymmetric distribution of cholesterol in unilamellar vesicles of monounsaturated phospholipids. Langmuir. 2009; 25 (23): 13522 – 7.

173. Wood WG, Igbavboa U, Müller WE, Eckert GP. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes. J. Neurochem. 2011; 116 (5): 684 – 9.

174. Mondal M, Mesmin B, Mukherjee S, Maxfield FR. Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells. Mol. Biol. Cell. 2009; 20 (2): 581 – 8.

175. Schroeder F, Nemecz G, Wood WG, Joiner C, Morrot G, Ayraut-Jarrier M, et al. Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. Biochim Biophys Acta. 1991; 1066 (2): 183 – 92.

176. Seibert CS, Shinohara EMG, Sano-Martins IS. In vitro hemolytic activity of *Lonomia oblique* caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes. Toxicon. 2003; 41: 831 – 9. doi: 10.1016/s0041-0101(03)00040-0.

177. Муравлёва ЛЕ, Молотов-Лучанский ВБ, Клюев ДА, Понамарева ОА, Калина АС, Колебаева ГТ. Белки эритроцитов. Миниобзор. Успехи современного естествознания. 2013. 4: 28 – 31.

178. Шпакова НМ, Сєміонова КА, Коваленко ІФ, Єршова НА, Орлова НВ. Морфологічні особливості температурної та осмотичної реакції еритроцитів за наявності хлорпромазину. Фізіологічний журнал. 2017; 63 (5): 62 – 9.

179. Чабаненко ЕА**,** Семионова ЕА, Шпакова НМ. Эритроцит как объект криобиологических исследований. Матеріали ІІ міжнародної. науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії»; 2015 Листоп 12-13. Харків: НФаУ «Наука»; 2015, с. 383 – 4.

180. Чабаненко ОО, Шпакова НМ, Орлова НВ. Антигемолітична ефективність хлорпромазину та його влив на структурно-динамічний стан мембран еритроцитів. Матеріали Тематичного VII з’їзду Українського біофізичного товариства; 2018 Жовт 29–31; Київ; 2018, с. 22.

181. Чабаненко ОО, Єршова НА, Ніпот ОЄ, Єршов СС, Шапкіна ОО, Орлова НВ, та ін. Вивчення постгіпертонічного пошкодження еритроцитів людини у модельному експерименті з

використанням амфіфільних сполук. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю від дня народження академіка Л.Т. Малої «Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: Досвід та нові напрямки розвитку», 2019 Квіт 11–12; Харків, 2019, с. 266.

182. Чабаненко ЕА, Ершова НА, Орлова НВ, Ершов СС, Шпакова НМ. Коррекция чувствительности эритроцитов млекопитающих к постгипертоническому шоку в присутствии децилсульфата натрия. Природничі науки: історія, сучасність, майбутнє, досвід ЄС: матеріали. міжнародної наукуво-практичної конференції. м. Влоцлавек, Республіка Польща, Вересень 27–28.09. 2019 м. Влоцлавек, 2019. с. 143 – 6.

183. Chabanenko O, Yershova N, Orlova N, Shpakova N. Antihemolytic activity of amphiphilic compounds under conditions of posthypertonic shock of human red blood cells. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine, p. 42.

184. Chabanenko OO, Yershova NA, Shpakova NM. Effect of amphiphilic compounds on posthypertonic lysis of erythrocytes. Probl Cryobiol Cryomed. 2020; 30 (3): 286. doi: https://doi.org/10.15407/cryo30.03.286

185. Fuller B, Gonzalez-Molina J, Erro E, Mendonca da Silva Joana, Chalmers S, Awan M, et al. Applications and optimization of cryopreservation technologies to cellular therapeutics. Cell and Gene Therapy Insights. 2017; 3: 359 – 78. doi: 10.18609/cgti.2017.038.

186. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation. An emerging paradigm change. Organogenesis. 2009; 5 (3): 90 – 6.
doi: 10.4161/org.5.3.10021.

187. Белоус АМ. Грищенко ВИ. Криобиология. Киев: Наукова думка, 1994. 432 с.

188. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. CryoLetters. 2004; 25 (6): 375 – 88.

189. Chang A, Kim Y, Hoehn R, Jernigan P, Pritts T. Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. Blood Transfus. 2017; 15 (4): 341 – 7. doi: 10.2450/2016.0083-16. Epub 2016 Sep 8.

190. Kim H, Tanaka S, Une S, Nakaichi M, Sumida S, Taura Y. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation. J. Vet. Med. Sci. 2004; 66 (12): 1543 – 7. doi: 10.1292/jvms.66.1543.

191. Pegg DE. Red cell volume in glycerol/sodium chloride/water mixtures. Cryobiology. 1984; 21 (2): 234 – 9. doi: 10.1016/0011-2240(84)90214-1.

192. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol. Biol. 2007; 368: 39 – 57. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_3.

193. Rall WF, Mazur P, Souzu H. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. Biophys. J. 1978; 23 (1):101 – 20. doi: 10.1016/S0006-3495(78)85436-8.

194. Шпакова НМ, Орлова НВ, Нипот ЕЕ, Шапкина ОА, Семионова ЕА. Влияние глицерина на устойчивость эритроцитов человека к гипертоническому и механическому стрессу. Вісник проблем біології і медицини. 2013; Вып 3. 2 (103): 352 – 5. doi: 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-379-382.

195. Patelaros SV. Influence of divalent cations Ca^{2+} and Zn^{2+} on the activation of posthypertonic hemolysis of human erythrocytes. Biopolym. Cell. 1999; 15 (1): 43 – 8. doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.000504.

196. Чабаненко ЕА, Шапкина ОА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние глицерина на постгипертонический шок эритроцитов. Вісник проблем біології і медицини. 2018; 2 (143): 379 – 82. doi: 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-379-382

197. Chabanenko OO, Shapkina OO, Orlova NV, Shpakova NM. Glycerol-based improvement of erythrocytes posthypertonic shock model.

Modern methodologies, innovations and operational experience in the field of biological sciences; 2017 Dec 28; Lublin, Republic of Poland; 2017. p. 205 – 8.

198. Гордієнко ОІ, Коваленко СЄ, Коваленко ІФ. Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини Проблемы криобиологии. 2012; 22 (4): 389 – 97.

199. Чабаненко ЕА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Реакция эритроцитов на изменение температурно-осмотических условий среды в присутствии глицерина. Доповіді Національної академії наук України. 2019; (2): 84 – 9. doi: https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.084

200. Чабаненко ОО, Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив сумісної дії проникального і непроникального компонентів середовища на розвиток постгіпертонічного лізису еритроцитів людини. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (3): 236 – 46.
doi: https://doi.org/10.15407/cryo30.03.236

201. Alshalani A, Acker JP. Red blood cell membrane water permeability increases with length of ex vivo storage. Cryobiology. 2017; 76: 51 – 8. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.009.

202. Alshalani A, Howell A, Acker JP. Impact of blood manufacturing and donor characteristics on membrane water permeability and in vitro quality parameters during hypothermic storage of red blood cells. Cryobiology. 2018; 80: 30 – 7. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.12.008.

203. Lahmann JM, Benson JD, Higgins AZ. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for postthaw washing of human erythrocytes. Cryobiology. 2018; 80: 1 – 11.
doi: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.003.

204. Mathai JC, Mori S, Smith BL, Preston GM, Mohandas N, Collins M, et al. Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. The Colton-null phenotype. J Biol Chem. 1996; 271 (3): 1309 – 13.

doi: 10.1074/jbc.271.3.1309.

205. Campos E, Moura TF, Oliva A, Leandro P, Soveral G. Lack of Aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation. Biochem Biophys Res Commun. 2011; 408 (3): 477 – 81. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.057.

206. Rodriguez RA, Liang H, Chen LY, Plascencia-Villa G, Perry G. Single-channel permeability and glycerol affinity of human aquaglyceroporin AQP3. Biochim Biophys Acta – Biomembranes. 2019; 1861 (4): 768 – 75. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.01.008.

207. Межидов СХ, Моисеев ВА. Влияние концентрации внутриклеточного гемоглобина на проницаемость эритроцитов. Проблемы криобиологии. 1995; (4): 50 – 1.

208. Benga G, Borza T. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells. Comp Biochem Physiol B. 1995; 112 (4): 653 – 9.
doi: 10.1016/0305-0491(95)00116-6.

209. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. Biol. Reproduction. 1995; 53 (5): 985 – 95.
doi:https://doi.org/10.1095/biolreprod53.5.985.

210. Carlsen A, Wieth JO. Glycerol transport in human red cells. Acta Physiol Scand. 1976; 97 (4): 501 – 13.
doi: 10.1111/j.1748-1716.1976.tb10290.x.

211. Elmoazzen HY, Elliott JA, McGann E. Osmotic transport across cell membranes in nondilute solutions: a new nondilute solute transport equation. Biophys J. 2009; 96 (7) 2559 – 71. doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3929.

212. Unhale SA. Cryobiology of Cell and Tissue Cryopreservation: Experimental and Theoretical Analysis: thesis for the degree of Ph.D [dissertation on the internet]. Tucson: University of Arizona, 2011, 207 p. (cited 7.10.2019) Available from:

https://repository.arizona.edu/bitstream/handle/10150/202974/azu_etd_11821_sip1_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y

213. Гордиенко ОИ, Емец БГ, Жилякова ТА, Шейкин ВИ. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой. Биологические мембраны. 1985; 2 (3): 309 – 14.

214. Brahm J. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts. J Gen Physiol. 1982; 79 (5): 791 – 819. doi: 10.1085/jgp.79.5.791.

215. Чабаненко ЕА, Ковалев ГА. Перспективы применения глицерина для профилактики контактных отморожений. Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики; 2018 Квіт 20; Харків; 2018, с. 247.

216. Чабаненко ЕА, Шпакова НМ, Орлова НВ. Чувствительность эритроцитов человека к постгипертоническому шоку в присутствии глицерина. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 183. doi:https://doi.org/10.15407/cryo28.02.183

217. Chabanenko OO, Orlova NV, Shpakova NM. Glycerol and posthypertonic shock of erythrocytes when varing medium temperature and osmolality. Cryobiology. 2018 Dec; 85: 179.

218. Чабаненко О, Єршова Н, Орлова Н, Шпакова Н. Роль гліцерину в розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів людини. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine, p. 61.

219. Чабаненко ЕА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Постгипертонический лизис эритроцитов в комбинированных средах. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29 (2): 154. doi:https://doi.org/10.15407/cryo29.02.154

220. Національне керівництво з виробничої трансфузіології для закладів, підрозділів та лабораторій служби крові/ДУ «Інститут гематології

та трансфузіології НАМН України»; ХМАПО МОЗ України; Харків. обл. центр служби крові. Харків: Золоті сторінки, 2015. 336 с.

221. Wong KA, Nsier N, Acker JP. Use of supernatant refractive index and supernatant hemoglobin concentration to assess residual glycerol concentration in cryopreserved red blood cells. Clin Chim Acta. 2009; 408 (1-2):83 – 6. doi: 10.1016/j.cca.2009.07.015.

222. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. Biochim Biophys Acta. 1996; 1280 (1):73 – 80. doi: 10.1016/0005-2736(95)00279-0

223. Розанов ЛФ, Розанова ЕД, Некоз ИА. Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2–пропандиола. Криобиология. 1989; №4: 30 – 5.

224. Багаутдинов ШМ, Вильянинов ВН, Ващенко ВИ, Гайдаш АА, Попова НН, Левичев ВВ. Влияние глубокого замораживания на клеточную структуру эритроцитов человека. Холод: Техника и технологии.2014; 2: 41– 7.

225. Конов КБ. Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны. автореф.дисс. Казань, 2016. 20с.

226. Korniyenko Y, Posokhov Y. A set of fluorescent probes to study the influence of low molecular weight cryoprotectants on human erythrocyte membranes. Kharkov University Bulletin. Chemical Series. 2016; 26 (49): 5 – 11.

227. Иванов ЛВ, Картель НТ. Характеризация реологических свойств поверхности нанобиообъектов методом спиновых зондов. Поверхность. 2012; 4 (19): 334 – 48.

228. Иванов ИТ, Първанова БК. Влияние проникающих криопротекторов на мембранный скелет эритроцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29 (3): 237 – 45.

doi: https://doi.org/10.15407/cryo29.03.237.

229. Землянских НГ, Бабийчук ЛА. Влияние стрессовых условий криоконсервирования на поверхностный маркер CD44 эритроцитов. 2014; 31 (6): 416 – 26. doi: 10.7868/S0233475514050107

230. Holovati JL, Wong KA, Webster JM, Acker JP. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. Transfusion. 2008; 48 (8): 1658 – 68. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01735.x

231. Чабаненко ОО, Сєміонова КА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Ефективність хлорпромазину в модельних експериментах і при видаленні гліцерину з кріоконсервованих еритроцитів. Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції. «Біологічні дослідження – 2017», 2017 Березня 14–16; Житомир:ЖДУ ім. Івана Франка; 2017, с. 348 – 50.

232. Чабаненко ОО, Сєміонова КА, Шапкіна ОО, Орлова НВ. Стійкість кріоконсервованих еритроцитів при видаленні гліцерину. Science and life: Proceedings of article the international scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary - Kiev, Ukraine; 2017, с. 674 – 8.

233. Чабаненко ЕА, Семионова ЕА, Шпакова НМ. Хлорпромазин и постгипертонический шок как модель повреждения криоконсервированных клеток при их отогреве. Проблемы криобиологии и криомедицины; 2017; 27 (2): 161. doi: https://doi.org/10.15407/cryo27.02.161

234. Chabanenko O, Yershova N, Shpakova N. Adequacy of posthypertonic shock model to real cryopreservation conditions during deglycerolization of erythrocytes. Cryobiology. 2020; 97: 276.

235. Орлова НВ, Цымбал ЛВ, Шпакова НМ. Влияние диамида на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений при гипертоническом гемолизе эритроцитов. Проблемы криобиологии. 2005; 15 (3): 536 – 7.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Семионова ЕА, **Чабаненко ЕА**, Орлова НВ, Зубов ПМ, Шпакова НМ. К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27 (3): 219 – 29. (Scopus)

2. **Чабаненко ЕА,** Шапкина ОА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние глицерина на постгипертонический шок эритроцитов. Вісник проблем біології і медицини. 2018; 2 (143): 379 – 82.

3. **Чабаненко ЕА,** Орлова НВ, Шпакова НМ. Реакция эритроцитов на изменение температурно-осмотических условий среды в присутствии глицерина. Доповіді Національної академії наук України. 2019; (2): 84 – 9.

4. **Чабаненко ЕА**, Ершова НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние амфифильных соединений на постгипертонический шок эритроцитов человека. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2019; 33: 84 – 90.

5. **Чабаненко ОО,** Єршова НА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив децилсульфату натрію та хлорпромазину на постгіпертонічний шок еритроцитів ссавців. Біологія тварин, 2019; 21 (4): 84 – 90.

6. **Чабаненко ОО,** Орлова НВ, Шпакова НМ. Вплив сумісної дії проникального і непроникального компонентів середовища на розвиток постгіпертонічного лізису еритроцитів людини. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (3):236 – 46. (Scopus)

2. Наукові праці, які засвічують апробацію матеріалів дисертації:

Статті в збірках матеріалів конференцій

7. **Чабаненко ОО**, Сєміонова КА, Шапкіна ОО, Орлова НВ. Стійкість кріоконсервованих еритроцитів при видаленні гліцерину. Science and life: Proceedings of article the international scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary - Kiev, Ukraine; 2017, с. 674 – 8.

8. **Chabanenko OO**, Shapkina OO, Orlova NV, Shpakova NM. Glycerol-based improvement of erythrocytes posthypertonic shock model. Modern methodologies, innovations and operational experience in the field of biological sciences; 2017 Dec 28; Lublin, Republic of Poland; 2017. p. 205 – 8.

9. **Чабаненко ЕА**, Ершова НА, Орлова НВ, Ершов СС, Шпакова НМ. Коррекция чувствительности эритроцитов млекопитающих к постгипертоническому шоку в присутствии децилсульфата натрия. Природничі науки: історія, сучасність, майбутнє, досвід ЄС: матеріали. міжнародної наукуво-практичної конференції. м. Влоцлавек, Республіка Польща, Вересень 27–28.09. 2019 м. Влоцлавек, 2019. с. 143 – 6.

Тези наукових доповідей конференцій

10. **Чабаненко ЕА,** Семионова ЕА, Шпакова НМ. Эритроцит как объект криобиологических исследований. Матеріали ІІ міжнародної. науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії»; 2015 Листоп 12-13. Харків: НФаУ «Наука»; 2015, с. 383 – 4.

11. **Чабаненко ОО,** Сєміонова КА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Ефективність хлорпромазину в модельних експериментах і при видаленні гліцерину з кріоконсервованих еритроцитів. Матеріали VIII Всеукраїнської

науково-практичної конференції. «Біологічні дослідження – 2017», 2017 Березня 14–16; Житомир:ЖДУ ім. Івана Франка; 2017, с. 348 – 50.

12. **Чабаненко ЕА**, Шпакова НМ, Орлова НВ. Влияние хлорпромазина на устойчивость эритроцитов млекопитающих в условиях гипотонического шока. LXXI Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017»; 2017. с. 220.

13. **Чабаненко ЕА**, Семионова ЕА, Шпакова НМ. Хлорпромазин и постгипертонический шок как модель повреждения криоконсервированных клеток при их отогреве. Проблемы криобиологии и криомедицины; 2017; 27 (2): 161. (Scopus)

14. **Чабаненко ЕА**, Ковалев ГА. Перспективы применения глицерина для профилактики контактных отморожений. Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики; 2018 Квіт 20; Харків; 2018, с. 247.

15. **Чабаненко ЕА**, Шпакова НМ, Орлова НВ. Чувствительность эритроцитов человека к постгипертоническому шоку в присутствии глицерина. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 183. (Scopus)

16. **Чабаненко ОО**, Шпакова НМ, Орлова НВ. Антигемолітична ефективність хлорпромазину та його влив на структурно-динамічний стан мембран еритроцитів. Матеріали Тематичного VII з’їзду Українського біофізичного товариства; 2018 Жовт 29–31; Київ; 2018, с. 22.

17. **Chabanenko OO**, Orlova NV, Shpakova NM. Glycerol and posthypertonic shock of erythrocytes when varing medium temperature and osmolality. Cryobiology. 2018 Dec; 85: 179.

18. **Чабаненко ОО**, Єршова НА, Ніпот ОЄ, Єршов СС, Шапкіна ОО, Орлова НВ, та ін. Вивчення постгіпертонічного пошкодження еритроцитів людини у модельному експерименті з

використанням амфіфільних сполук. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю від дня народження академіка Л.Т. Малої «Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: Досвід та нові напрямки розвитку», 2019 Квіт 11–12; Харків, 2019, с. 266.

19. **Chabanenko O**, Yershova N, Orlova N, Shpakova N. Antihemolytic activity of amphiphilic compounds under conditions of posthypertonic shock of human red blood cells. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine, p. 42.

20. **Чабаненко О,** Єршова Н, Орлова Н, Шпакова Н. Роль гліцерину в розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів людини. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine, p. 61.

21. **Чабаненко ЕА**, Орлова НВ, Шпакова НМ. Постгипертонический лизис эритроцитов в комбинированных средах. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29 (2): 154. (Scopus)

22. **Chabanenko OO**, Yershova NA, Shpakova NM. Effect of amphiphilic compounds on posthypertonic lysis of erythrocytes. Probl Cryobiol Cryomed. 2020; 30 (3): 286. (Scopus)

23. **Chabanenko O**, Yershova N, Shpakova N. Adequacy of posthypertonic shock model to real cryopreservation conditions during deglycerolization of erythrocytes. Cryobiology. 2020; 97: 276. (Scopus)

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

– II міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (12–13.11. 2015 р., Україна, Харків) заочна участь;

– VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біологічні дослідження – 2017», ЖДУ ім. Івана Франка (14–16.03.2017 р., Україна, Житомир) заочна участь;

– LXXI Міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених. «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017» (2017 р., Беларусь, Минск) заочна участь;

– 41-ій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2017. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (24–25.05.2017 р., Україна, Харків) особиста участь;

– міжнародній науковій конференції «Science and life: Proceedings of article the international scientific conference» (22.12.2017 р., Чеська Республіка, Карлові Вари, Україна, Київ) заочна участь;

– міжнародній науковій конференції «Modern methodologies, innovations and operational experience in the field of biological sciences» (28.12.2017 р., Люблін, Республіка Польща) заочна участь;

– науково-практичній конференції з міжнародною участю «Щорічні терапевтичні читання. Профілактика неінфекційних захворювань – пріоритет сучасної науки та практики» (20.04.2018 р., Україна, Харків) заочна участь;

– 42-ій щорічній конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2018. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (23 – 24.05.2018 р., Україна, Харків) особиста участь;

– 55-му щорічному зібранні Товариства кріобіології «CRYO 2018» (10– 13.07.2018 р., Іспанія, Мадрид) особиста участь;

– VII з'їзді Українського біофізичного товариства (29–31.09.2018 р., Україна, Київ) заочна участь;

– науково-практичній конференції з міжнародною участю, яка присвячена 100-річчю від дня народження академіка Л.Т. Малої «Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: Досвід та нові напрямки розвитку» (11 – 12.04.2019 р., Україна, Харків) заочна участь;

– міжнародній науковій конференції «6th Ukrainian congress for cell biology with international representation» (18 –21.06. 2019 р., Україна, Яремче) заочна участь;

– 43-ій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2019. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (27–29.05.2019 р., Україна, Харків) особиста участь;

– міжнародній науково-практичній конференції «Природничі науки: історія, сучасність, майбутнє, досвід ЄС» (27–28.09.2019 р., Влоцлавек, Республіка Польща) заочна участь;

– 44-ій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2020. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (19–21.05.2020 р., Україна, Харків) особиста участь;

– 57-му щорічному зібранні Товариства кріобіології «CRYO 2020» (21– 23.07.2020 р., Чикаго, США) особиста – online участь;

– 56-ій щорічній зустрічі Товариства з низьких температур у біології «SLTB 2020» (7–9.10.2020 р., Бельгія, Брюссель) особиста – online участь.