**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**
**ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

**ШПАКОВА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА**

УДК 57.043:577.352.462:612.111

# ТЕМПЕРАТУРНА ТА ОСМОТИЧНА СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ РІЗНИХ ВИДІВ ССАВЦІВ

03.00.19 – кріобіологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Харків – 2014

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

**Науковий консультант** доктор біологічних наук, професор
**БОНДАРЕНКО Валерій Антонович**,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України,
завідувач відділу кріофізіології клітини, м. Харків

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор
**ЖЕГУНОВ Геннадій Федорович,**
Харківська державна зооветеринарна
академія МАП України,
завідувач кафедри хімії та біохімії, м. Харків

доктор біологічних наук, професор
**КНІГАВКО Володимир Гілярієвич,**
Харківський національний медичний
університет МОЗ України,
завідувач кафедри медичної та біологічної
фізики і медичної інформатики, м. Харків

доктор біологічних наук, професор
**ПЕРСЬКИЙ Євген Ефроїмович**,
Харківський національний університет
ім. В. Н. Каразіна МОН України,
завідувач кафедри біохімії, м. Харків

Захист відбудеться « 28 » січня 2014 року о $13^{30}$ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розіслано « 23 » грудня 2013 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор  Гордієнко Є.О.

# ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми**. Сучасний стан кріобіології характеризується підвищеним інтересом до дослідження процесів, що протікають на різних етапах низькотемпературного консервування біологічних об'єктів (Fuller B.J. et al., 2004; Wolfe J., Bryant G., 2004; Baust J.G. et al., 2009; Muldrew K. et al., 2009; Pegg D.E., 2010). Це обумовлено необхідністю розробки нових методів кріоконсервування на основі чіткого розуміння механізмів кріопошкодження і кріозахисту на відміну від емпіричного підбору середовищ і умов заморожування-відігрівання біологічного об'єкта. Тому вивчення механізмів кріопошкодження і кріозахисту є однією з актуальних проблем сучасної кріобіології.

Незважаючи на значущі досягнення у вивченні причин кріопошкодження (Scott K.L. et al., 2005; Chian R.C., 2010), питання про основні фактори, які впливають на життєздатність замороженого біологічного матеріалу, залишаються недостатньо вивченими. Це зумовлено тим, що різні процеси відбуваються фактично одночасно в біологічному матеріалі, який заморожується, і досить складно в реальних умовах виключити дію одних факторів кріопошкодження з метою вивчення дії інших екстремальних факторів. Причини та фактори пошкодження клітин при низькотемпературному консервуванні, які встановлені наразі, все ще залишаються предметом дискусій (Pegg D.E., Diaper M.P., 1988; Pegg D.E., 2007).

Багато дослідників основними фізико-хімічним факторами пошкодження при кріоконсервуванні біологічного матеріалу вважають зміну температури і концентрування позаклітинного розчину, яке пов'язане з виморожуванням вільної води (Белоус А.М. и др., 1987; Бондаренко В.А., 1988). Для визначення внеску кожного з факторів у загальне кріопошкодження клітин використовують модельні експерименти. За допомогою гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів вивчають пошкоджуючу дію осмотичного і температурного факторів (Поздняков В.В и др., 1989; Бондаренко В.А. и др., 1992).

Стійкість клітин до дії пошкоджуючих факторів кріоконсервування можна змінити при використанні хімічних сполук, що модифікують різні компоненти клітини. Виснаження еритроцитів за АТФ, обробка модифікаторами білків цитоскелета і мембрани (діамід, фенілгідразин, гемін та ін.) змінюють стійкість еритроцитів до гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу (Бондаренко Т.П., 1981; Шпакова Н.М. и др., 1991, 2008; Рамазанов В.В., Бондаренко В.А., 1996).

Відомо, що деякі амфіфільні сполуки в мікромолярних концентраціях захищають еритроцити людини при різних стресових впливах. Досить різноманітні за хімічною будовою амфіфільні сполуки знижують рівень гіпотонічного пошкодження клітин (Hagerstrand H., Isomaa B., 1991). Хлорпромазин підвищує стійкість еритроцитів до дії високого тиску (Yamaguchi T. et al., 1993) і мелітину (Rudenko S.V., Nipot E.E, 1996), які індукують гемоліз еритроцитів. Катіонні похідні фенотіазину захищають клітини від ушкодження в умовах гіпертонічного кріогемолізу і гіпертонічного стресу (Дунаевская О.Н. и др., 1995).

Наразі використання амфіфільних речовин поширюється як в кріобіологічних, так і в інших біологічних і медичних дослідженнях. Однак інформації щодо можливих механізмів дії цих сполук явно недостатньо, а це не дозволяє отримати цілісне уявлення про їх антигемолітичну активність.

Численні роботи (Белоус А.М. и др., 1987; Бондаренко В.А. и др., 1992; Дунаевская О.Н. и др., 1995) присвячені вивченню реакції еритроцитів людини на зміну осмотичних і температурних умов середовища. Зокрема, експериментально встановлено основні закономірності явища гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини на феноменологічному рівні і створена його теоретична модель (Гордієнко О.А., Коваленко С.Є., 1996, 1997; Гордієнко Є. О., Товстяк В.В., 2009). Еритроцити тварин в цьому аспекті вивчені недостатньо. Існують лише поодинокі й розрізнені дані про чутливість еритроцитів різних видів тварин до зміни температурних і осмотичних умов середовища (Betticher D.C, Geiser J., 1989; Денисова О.М., 2004). Однак цей напрямок кріобіологічних досліджень є актуальним для розробки методів низькотемпературного зберігання еритроцитів різних видів тварин у ветеринарній практиці.

Для з'ясування механізмів стійкості еритроцитів людини до дії стресових факторів широко використовується підхід, пов'язаний зі спрямованою модифікацією різних структурно-функціональних компонентів клітини. Ці зміни не є вузько специфічними, вони можуть охоплювати клітину в цілому, тобто призводити до порушення її нативності в тій чи іншій мірі. В зв’язку з цим для дослідження температурної і осмотичної чутливості клітин доцільно використовувати нативні еритроцити різних видів ссавців, які відрізняються за складом цитоплазми, здатністю до деформації, активністю транспортних шляхів, фосфоліпідним і білковим складом мембрани (Matei H. et al., 2000; Florin-Christensen J. et al., 2001; Bogner P. et al., 2002; Liu L.et al., 2011; Benga G., 2013).

Виходячи з викладеного вище, можна зробити висновок, що вивчення закономірностей температурної і осмотичної стійкості еритроцитів ссавців і розробка підходів, які забезпечують підвищення стійкості клітин до дії стресових факторів, є актуальною проблемою кріобіології.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана в рамках відомчих науково-дослідних робіт відділу кріофізіології клітини Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за темами, в яких автор був відповідальним виконавцем: «Дослідити механізми змін фізико-хімічного стану, бар'єрних властивостей мембрани і метаболічних систем регуляції зрілих та ембріональних клітин при охолодженні з метою створення технологічного процесу кріоконсервування» (номер державної реєстрації 01870065546), «Клітинні механізми контролю холодової й осмотичної чутливості» (номер державної реєстрації 01944005310); «Фактори і механізми регуляції стійкості клітини до змін температурного та осмотичного параметрів середовища» (номер державної реєстрації 0101U003472); «Механізми зміни осмотичної і температурної чутливості клітин при дії модифікаторів цитоскелет-мембранного комплексу, амфіфільних речовин і кріопротекторів» (номер державної реєстрації 0104U006437); «Дослідження стійкості еритроцитів до дії осмотичного і

температурного шоку і заморожування» (номер державної реєстрації 0109U000276).

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи є вивчення особливостей і закономірностей стійкості еритроцитів ссавців до зміни температурних й осмотичних параметрів середовища та визначення умов, які забезпечують максимальну стійкість клітин до температурно-осмотичного впливу шляхом модифікації їх вихідного стану під дією фізико-хімічних факторів середовища (температура, осмоляльність, кріопротектори) і при використанні амфіфільних сполук різної природи зі з'ясуванням механізму їх захисної дії.

У відповідності з поставленою метою передбачалося вирішити наступні задачі.

1. Дослідити умови та особливості прояву гіпертонічного шоку, гіпотонічного лізису і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців (людина, бик, кінь, кролик, собака, щур), оцінити можливі кореляції між температурно-осмотичною стійкістю еритроцитів ссавців і їх структурно-функціональними характеристиками.
2. Вивчити закономірності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів тварин (бик, кінь, кролик, собака, щур) у порівнянні з еритроцитами людини.
3. Оцінити можливість підвищення стійкості еритроцитів ссавців до дії гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу за допомогою представників різних класів амфіфільних сполук (аніонні, катіонні і неіонні).
4. Розширити уявлення про механізм дії амфіфільних речовин шляхом вивчення їх впливу на бар'єрні властивості мембран еритроцитів (по відношенню до катіонів калію), оцінки антигемолітичної активності трифторперазину в умовах гіпертонічного шоку еритроцитів людини, модифікованих за допомогою протеолітичних ферментів (проназа, трипсин, папаїн) і нейрамінідази, вивчення впливу хлорпромазину на розподіл фосфатидилсерину в мембрані еритроцитів.
5. Провести порівняльне вивчення ефективності представників гомологічного ряду глюкопіранозиду (гексил-, октил- і децил-β,D-глюкопіранозид) в умовах гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини.
6. Дослідити вплив амфіфільних сполук (додецил-β,D-мальтозид, додецилсульфат натрію, хлорпромазин) на стан ліпідного бішару мембран еритроцитів людини. Оцінити вплив різних концентрацій хлорпромазину на бар'єрні властивості мембран еритроцитів людини.
7. Визначити оптимальні початкові умови (температура і осмоляльність середовища), за яких стійкість еритроцитів різних видів ссавців до гіпертонічного шоку є максимальною. Визначити концентрації кріопротектора і температурні умови обробки еритроцитів ссавців поліетиленоксидом із молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500) для забезпечення максимальної стійкості клітин до дії гіпертонічного шоку.
8. Вивчити вплив проникаючого кріопротектора гліцерину, а також поєднаної дії гліцерину і попереднього часткового зневоднення клітин у сольових середовищах (NaCl) на стійкість еритроцитів до гіпертонічного шоку.

***Об'єкт дослідження*** – гіпертонічний шок, гіпертонічний кріогемоліз, гіпотонічний лізис еритроцитів ссавців.

***Предмет дослідження*** – осмотична і температурна стійкість еритроцитів різних видів ссавців (людина, кінь, бик, собака, кролик, щур) при використанні амфіфільних сполук, кріопротекторів і попереднього часткового зневоднення клітин.

***Методи дослідження***. У роботі використані наступні методи досліджень: спектрофотометрія для визначення вмісту гемоглобіну, який вийшов з еритроцитів у супернатант; світлова мікроскопія для реєстрації зміни форми еритроцитів у присутності амфіфільних сполук; іонометрія, атомно-абсорбційна спектрофотометрія і капілярний електрофорез для визначення вмісту іонів калію та натрію у супернатанті; мікрогематокритний метод для визначення гематокриту еритроцитів; ЕПР спектроскопія для дослідження стану ліпідного бішару і бар'єрних функцій мембран еритроцитів; проточна цитофлуориметрія для оцінки розподілу фосфатидилсерину в мембрані еритроцитів; осмометрія для визначення осмоляльності використаних розчинів; рефрактометрія для визначення коефіцієнта заломлення середовищ з метою контролю концентрації речовин у розчинах; ферментативна обробка еритроцитів з метою модифікації білкового компонента мембран еритроцитів; методи статистичної обробки результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше з використанням кореляційного аналізу виявлено статистично значущий зв'язок між температурно-осмотичною стійкістю еритроцитів ссавців (людина, бик, кінь, кролик, собака, щур) та їх структурно-функціональними характеристиками: показники гіпотонічного лізису корелюють з поверхнево-об’ємним відношенням і діаметром клітин; показники гіпертонічного шоку – з параметрами водного транспорту, вмістом води і гідрофобністю гемоглобіну; показники гіпертонічного кріогемолізу – з ліпідним складом мембран. Отримані результати принципово доповняють існуючі уявлення про механізми пошкодження еритроцитів ссавців при зміні температурно-осмотичних умов середовища.

Вперше на основі всебічного аналізу експериментально отриманих результатів щодо вивчення кріогемолізу еритроцитів різних видів ссавців виявлено і сформульовано основні закономірності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів тварин.

В дисертації вперше здійснено комплексний науковий аналіз антигемолітичної дії амфіфільних сполук різних класів при гіпертонічному шоці і гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів ссавців. Вперше на основі експериментальних даних розкрито механізм захисної дії амфіфільних сполук. Встановлено, що захисний ефект амфіфілів проявляється в момент дії стресового фактора на еритроцити і реалізується, в першу чергу, на рівні ліпідного компоненту їх мембран. Отримана інформація щодо механізму дії амфіфільних сполук дозволяє теоретично обґрунтувати використання цих речовин при тестуванні стану мембран клітин і прогнозувати ефективність амфіфільних сполук в умовах дії на клітини несприятливих факторів середовища.

Вперше отримано дані щодо оптимальних температурно-осмотичних умов інкубування клітин із непроникаючими речовинами (кріопротектор ПЕО-1500 або

NaCl), які забезпечують максимальну стійкість еритроцитів ссавців до подальшої дії гіпертонічного шоку – одного з головних факторів кріопошкодження клітин. Вперше встановлено, що захисний ефект проникаючого кріопротектора (гліцерин) в умовах гіпертонічного шоку еритроцитів ссавців залежить як від експериментальних умов (температура та концентрація кріопротектора), так і від видової приналежності клітин. Вперше в умовах модельного експерименту (гіпертонічний шок) показана ефективність поєднаного використання гліцерину і NaCl (в помірно гіпертонічних концентраціях). Отримані експериментальні дані теоретично обґрунтовують оптимальні умови додавання кріопротектора до клітин на етапі, який передує їх заморожуванню.

**Практичне значення одержаних результатів**. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при розробці загальної теорії кріопошкодження і кріозахисту біологічних об'єктів в умовах низькотемпературного консервування.

Розроблені та захищені патентами підходи спрямованої корекції чутливості еритроцитів до температурного і осмотичного стресу (гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу) із застосуванням амфіфільних сполук (Патенти України № 37514 і № 38944) можуть бути використані для підвищення стійкості клітин в екстремальних умовах.

Використання гіпертонічного шоку як експериментальної моделі одного з факторів кріопошкодження клітин (Патент України № 50069) дозволяє проводити скринінг умов додавання непроникаючого кріопротектора на етапі, що передує заморожуванню, і виявляти оптимальну їх комбінацію (температура, концентрація кріопротектора, тривалість експозиції з кріопротектором).

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі кафедр Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, Харківської зооветеринарної академії МАП України, Харківського педагогічного університету імені Г.С. Сковороди.

Результати дисертаційної роботи можуть бути рекомендовані для використання в навчальному процесі при підготовці фахівців у кріобіології, мембранології, фармакології і ветеринарії.

**Особистий внесок здобувача.** Вибір теми дисертаційного дослідження, планування мети і завдань, визначення методологічних основ виконання роботи належать автору. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані під керівництвом автора та за його безпосередньої участі. Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, висунута основна концепція роботи, здійснено аналіз отриманих результатів, написані всі розділи дисертації, сформульовані висновки.

Автор висловлює щиру подяку колективу відділу кріофізіології ІПКіК НАН України, науковому консультанту д.б.н., проф. Бондаренку В.А., 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 із співавторами публікаціях особистий внесок пошукача полягає в наступному: у роботах [1, 4, 22, 23, 27, 33, 41, 42, 46, 59, 62, 63, 77, 82, 92] у плануванні експериментів, проведенні експериментальних досліджень по

визначенню особливостей гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини і тварин, статистичній обробці, аналізі, узагальненні результатів, участі в їх обговоренні; у роботах [15, 20, 26, 44, 45] в обгрунтуванні постановки задачі, плануванні роботи, участі в експериментальних дослідженнях по визначенню особливостей гіпертонічного шоку ссавців, аналізі та обговоренні отриманих результатів, формулюванні висновків; у роботах [56, 91] у формулюванні ідеї, плануванні дослідження, проведенні експериментальних досліджень кінетики осмотичного лізису еритроцитів ссавців, статистичній обробці, аналізі та обговоренні результатів, формулюванні висновків; у роботах [11, 14, 21, 52, 53, 57, 74, 76, 78, 83, 84] в обгрунтуванні постановки задачі, плануванні експериментів, участі у ЕПР спектроскопічних дослідженнях еритроцитарних мембран, аналізі, узагальненні та інтерпретації результатів; у роботах [2, 12, 49, 85] в обгрунтуванні постановки задачі, експериментальному обґрунтуванні використаних концентрацій амфіфільних сполук і гематокриту для мікроскопічних досліджень, участі в обговоренні отриманих результатів та формулюванні висновків; у роботах [7, 8] в обгрунтуванні методології експериментів і проведенні експериментальних досліджень впливу катіонних амфіфільних сполук, що додавалися на різних етапах, на температурно-осмотичний шок еритроцитів людини, обробці, аналізі, узагальненні результатів та формулюванні остаточних висновків; у роботах [3, 5, 6, 9, 10, 13, 17, 19, 50, 58, 60, 64, 71, 73] в обгрунтуванні постановки задачі, плануванні дослідження, експериментальному вивченні впливу катіонних і неіонних амфіфільних сполук на температурно-осмотичний шок еритроцитів людини, обробці, аналізі, узагальненні та інтерпретації результатів та формулюванні висновків; у роботах [16, 18, 24, 29, 31, 32, 35, 36, 40, 43, 51, 54, 55, 66, 67, 69, 70, 75, 79, 80, 88] у формулюванні ідеї та плануванні досліджень, експериментальному вивченні ефективності амфіфілів різних класів в умовах гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців, обробці, узагальненні та інтерпретації результатів, формулюванні висновків; у роботах [25, 28, 30, 61, 65, 81] у формулюванні ідеї та плануванні роботи, участі в експериментальних дослідженнях гіпертонічного шоку попередньо зневоднених еритроцитів ссавців, аналізі та інтерпретації результатів, формулюванні висновків; у роботах [37, 48, 87, 90, 93–95] у формулюванні ідеї та плануванні досліджень, участі в експериментальному вивченні впливу кріопротекторів на гіпертонічний шок еритроцитів ссавців, аналізі та інтерпретації результатів, формулюванні висновків; у роботах [47, 68, 86, 89] у формулюванні ідеї та плануванні роботи, участі в експериментальних дослідженнях механічного стресу еритроцитів ссавців, аналізі та інтерпретації результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи представлено на наступних наукових форумах: II Міжнародній конференції ЮНЕСКО «Успіхи сучасної кріобіології» (Харків, 1992); VI, IX Українському біохімічному з'їздах (Київ, 1992; Харків, 2006); I–IV з'їздах Українського біофізичного товариства (Київ, 1994; Харків, 1998; Львів,2002; Донецьк, 2006); 31, 32, 34 щорічних нарадах Міжнародного товариства кріобіології «CRYO-94» (Кіото, Японія, 1994); «CRYO-95» (Медісон, США, 1995); «CRYO-97» (Барселона, Іспанія, 1997); I з'їзді Українського товариства кріобіології і кріомедицини (Харків, 1995); XI, XIV, XVII конгресах Європейської асоціації дослідження еритроцитів

(Гозд Мартулек, Словенія, 1997; Роскоф, Франція, 2004, Мілан, Італія, 2009); ІІ з'їзді трансплантологів України (Київ, 2000); конференції молодих вчених з молекулярної біології та генетики (Київ, 2001); І Українській науковій конференції «Проблеми біологічної і медичної фізики» (Харків, 2004); IV, VI з'їздах Білоруського громадського об'єднання фотобіологів і біофізиків «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»; (Мінськ, Білорусь, 2004, 2006); Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини. Структурна і функціональна організація стовбурових клітин в умовах дії низьких температур» (Харків, 2005); ІІІ, IV Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2007, 2008); Міжнародній науково-практичній конференції «Новые технологии в експериментальной биологии и медицине» (Ростов-на-Дону, Росія, 2007); 2 з'їзді Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007); І Міжнародній конференції «Состояние воды в биологических и модельных системах» (Твер, Росія, 2007); Міжнародній науковій конференції, присвяченій 70-річчю О.А. Гойди «Біофізичні механізми функціонування живих систем» (Львів, 2008); науковій конференції з міжнародною участю «Нові кріобіотехнології для розв'язання фундаментальних і прикладних задач медицини» (Харків, 2008); конференції «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пущино, Росія, 2008); конференції «Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини» (Харків, 2009); І Міжнародній науково-практичній конференції «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, Росія, 2010); 15 Міжнародній Пущинській школі-конференції молодих учених (Пущино, Росія, 2011); VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ–2012» (Севастополь, 2012); 3 з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, 2012); научній конференції з міжнародним представництвом, присвяченій 40-річчю ІПКіК НАН України «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (Харків, 2012).

**Публікації**. Основні положення та наукові результати дисертаційної роботи опубліковано в 95 наукових працях, серед яких 44 статті у наукових фахових виданнях (9 з них цитуються у міжнародній базі Scopus) та 9 статей у інших наукових виданнях, 4 деклараційні патенти України, 38 тез доповідей міжнародних і національних наукових конференцій, а також у розділі колективної монографії.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення результатів, висновків, списку використаної літератури та додатків. Вона містить 392 сторінки, з них – 308 сторінок основного тексту. Робота проілюстрована 63 рисунками, 5 мікрофотографіями, 18 таблицями, з яких 7 рисунків, 2 мікрофотографії та 1 таблиця розташовані на окремих 8 сторінках. Список літератури включає 532 найменування на 63 сторінках. Додатки представлені на 15 сторінках.

**Перелік умовних скорочень**. ГШ – гіпертонічний шок, ГК – гіпертонічний кріогемоліз, ГЛ – гіпотонічний лізис, С10 – децилсульфат натрію, ПЕО-1500 –

поліетиленоксид із молекулярною масою 1500, С12 – додецилсульфат натрію, ДМ – додецил-β,D-мальтозид, ХПР – хлорпромазин, ТФП – трифторперазин, ГГП – гексил-β,D-глюкопіранозид, ОГП – октил-β,D-глюкопіранозид, ДГП – децил-β,D-глюкопіранозид, АПК – амід пальмітинової кислоти, 5-ДС – 5-доксилстеаринова кислота, 16-ДС – 16-доксилстеаринова кислота, ТЕМПОН – 2,2,6,6 -тетраметил-4-оксопіперидин-1-оксил, $АГ_{макс}$ – максимальна антигемолітична активність, С – ефективна концентрація.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Огляд літератури

В огляді літератури розглядаються сучасні уявлення про структуру та динамічні характеристики еритроцита, представлено аналітичний огляд існуючих експериментальних і теоретичних даних щодо механізмів кріопошкодження біологічних об'єктів і ролі основних факторів пошкодження клітин при заморожуванні. Узагальнення цих даних стало основою для формулювання задач, реалізація яких спрямована на досягнення мети дисертаційної роботи.

### Матеріали та методи досліджень

Робота виконана на еритроцитах, які були отримані з донорської крові людини (Homo sapiens), бика (Bos taurus), коня (Equus caballus), собаки (Canus familiaris), кролика (Oryctolagus cuniculus) та щура (Rattus norvegicus), заготовленої на консерванті «Глюгіцир». Кров чоловіків А $(II)^+$ групи була надана обласним центром переливання крові м. Харкова, кров бика, коня та собаки – Харківською державною зооветеринарною академією МАП України, кролика і щура – віварієм Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Заготовка крові тварин та усі маніпуляції проводилися у відповідності з вітчизняними і міжнародними біоетичними нормами, матеріалами IV Європейської Конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей (ETS 123) (Страсбург, 1986), і законодавчими документами України по проведенню експериментів на тваринах.

Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали протягом 3 хв шляхом центрифугування при 3000 об/хв (центрифуга ОПн-3У4.2) у 10-кратному об’ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, pH 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 годин при температурі 0ºС. Всі середовища, які використовували в роботі, готували на 0,01 моль/л фосфатному буфері, pH 7,4.

Вихідну суспензію еритроцитів отримували після додавання осаду клітин до фізіологічного розчину у відношенні 1:10. Для здійснення гіпотонічного лізису (ГЛ) аліквоти вихідної суспензії клітин (50 мкл) вносили в 1,0 мл розчину NaCl (40–120 ммоль/л) при температурі 37 або 0°С на 5 хв (кінцевий гематокрит 0,4%). Для здійснення гіпертонічного шоку (ГШ) аліквоти вихідної суспензії клітин (50 мкл) вносили в 1,0 мл розчину NaCl (1,0–4,0 моль/л) при температурі 37 або 0°С на 5 хв (кінцевий гематокрит 0,4%). Для здійснення гіпертонічного кріогемолізу (ГК) 50 мкл клітинного осаду переносили в 0,5 мл розчину з різними

концентраціями NaCl (0,15–2,00 моль/л) на 10 хв при температурі 37°С, потім з цієї проби 50 мкл суспензії еритроцитів переносили в 1,0 мл розчину NaCl тієї ж концентрації, охолодженого до температури 0°С, на 10 хв. Кінцевий гематокрит складав 0,4%.

Вміст гемоглобіну у супернатанті визначали спектрофотометричним методом на СФ-4А з проточною кюветою при довжині хвилі 543 нм і виражали у відсотках по відношенню до 100%-го гемолізу еритроцитів. За 100% приймали поглинання проб, в які додавали детергент тритон Х-100 у концентрації 0,1%. Динаміку гіпертонічного гемолізу еритроцитів реєстрували на установці для вимірювання розсіювання світла клітинними суспензіями при довжині хвилі 720 нм.

У роботі використано амфіфільні сполуки різних класів: катіонні (хлорпромазин (ХПР) і трифторперазин (ТФП)), аніонні (децил- і додецилсульфат натрію (С10 і С12 відповідно)), неіонні (додецил-β,D-мальтозид (ДМ), гексил-, октил- і децил-β,D-глюкопіранозиди (ГГП, ОГП і ДГП відповідно)).

Для оцінки і порівняння ефективності дії досліджуваних амфіфільних сполук за умов ГШ і ГК еритроцитів ссавців використовували поняття максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$), яку обчислювали за формулою:

$$АГ_{макс} = \frac{к - a}{к} \times 100\,\%$$, де $к$ – величина гемолізу еритроцитів за відсутності амфіфільної речовини; $a$ – мінімальна величина гемолізу еритроцитів у присутності амфіфільної речовини.

Ефективну концентрацію амфіфільної речовини визначали з концентраційних залежностей ГШ і ГК як концентрацію речовини, що відповідає середині діапазону концентрацій амфіфільних сполук, в межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів. Частину концентраційної залежності ГШ або ГК із мінімальним значенням гемолізу еритроцитів характеризували як плато.

Кількість іонів калію, які вийшли з еритроцитів, визначали методом іонометрії за допомогою іоноселективного електрода ЕЛІС-121К і електрода порівняння ЕВЛ-1М3.1 на універсальному іономірі ЕВ-74 (Никольский Б.П., Матерова Е.А., 1980) або методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі С-115-М1 у режимі емісії при довжині хвилі 766,5 нм, полум'я пропан-повітря (Прайс В., 1967).

Визначення внутрішньоклітинного вмісту катіонів $Na^+$ проводили методом капілярного електрофорезу на установці «Капель-103Р» (НВФ «Люмекс», Санкт-Петербург, Росія) з фотометричним детектором (254 нм) і кварцевим капіляром (Полякова Е.В. и др., 2005; Комарова Н.В., Каменцев Я.З, 2006).

Стан ліпідного бішару мембран еритроцитів досліджували методом ЕПР спінових зондів за допомогою аміду пальмітинової кислоти (АПК), 5-доксилстеаринової кислоти (5-ДС) і 16-доксилстеаринової кислоти (16-ДС). Спін мічена суспензія еритроцитів ($10^9$ кл/мл) містила $5 \times 10^{-5}$ моль/л зонда. Для контролю бар'єрної функції мембран використовували водорозчинний зонд 2,2,6,6 тетраметил-4-оксопіперидин-1-оксил (ТЕМПОН) у комбінації з фериціанідом калію (кінцеві концентрації 0,001 і 0,1 моль/л відповідно)

(Лихтенштейн Г.И., 1974; Morse P.D., 1977). Спектри ЕПР реєстрували на спектрометрі «Bruker» ER 100D (Німеччина) зі стандартним термопристроєм.

Оцінку розподілу фосфатидилсерину в мембрані еритроцитів проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням набору Annexin V-FITC-kit («Becton Dickinson», США). Аналіз зразків клітинних суспензій проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur («Becton Dickinson», США) з використанням програмного забезпечення CELLQuest Pro.

Морфологічні особливості еритроцитів ссавців у присутності амфіфільних сполук вивчали методом світлової мікроскопії на мікроскопі STUDAR E (Польща) з фотографічною реєстрацією морфологічної картини крові цифровою фотокамерою CANON PowerShot A510.

Величину гематокриту суспензії еритроцитів визначали мікрогематокритним методом (Кондрахін І.П., 2004) на мікрогематокритній центрифузі МГЦ-8 із використанням гематокритних капілярів («Radiometer», Данія) та лічильної лінійки («Janetsky», Німеччина).

Механічний шок еритроцитів ссавців здійснювали за методом (Шпакова Н.М. та ін., 2010) перемішуванням на магнітній мішалці ММ-5 (швидкість 1200 об/хв) клітинної суспензії в ємкості, яка заповнена пластиковими кульками діаметром 5 мм, при температурі 22°С.

Осмоляльність розчинів речовини визначали кріоскопічним методом з використанням осмометра ОМКА-1Ц-01 («Медлабортехніка», Україна). Концентрації речовин у розчинах контролювали за допомогою методу рефрактометрії (Краснов Е.А., 2002).

З метою модифікації білкового компонента мембрани еритроцити людини обробляли папаїном (Jennings M. L., Adams M. F., 1981), трипсином або проназою (Hsu L., Morrison M., 1983). Для модифікації глікокалікса клітини інкубували з нейрамінідазою за методом (Maeda N. et al., 1990). Виснаження еритроцитів ссавців за АТФ проводили інкубуванням клітин із 2-дезоксиглюкозою за методом (Aharonovitz O. et al., 1999).

При оцінці результатів дослідження використовували методи статистичного аналізу медико-біологічних даних і рекомендації, викладені у роботах (Реброва О., 2002; Гланц С., 1999; Сидоренко О. В., 2003). Статистичну обробку отриманих числових даних і всі види аналізу результатів проводили за допомогою програми «Statistica» (версія 6.0). Експериментальні дані представлені як середнє арифметичне значення кількісних показників (M) ± стандартна похибка середнього арифметичного (m) або як медіана результатів (Me) і ступінь розсіювання у вигляді інтерквартильного інтервалу (Q1–Q3). Кількість повторень у серії експериментів була не менше 6 у двох паралельних пробах. Для перевірки збігу розподілу досліджуваних кількісних показників у групах з нормальним розподілом використовували критерій Шапіро-Уїлка. При розподілі досліджуваних числових показників, відмінному від нормального, для перевірки статистичної значущості відмінностей застосовували критерії Манна-Уїтні. При нормальному розподілі досліджуваних числових показників статистичну значущість відмінностей перевіряли за допомогою непарного критерію Стьюдента або однофакторного дисперсійного аналізу. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$

або $p < 0,01$. Кореляційний аналіз з використанням непараметричного коефіцієнта рангової кореляції Спірмена ($r_s$) застосовували для аналізу зв'язків між досліджуваними показниками. Критичний рівень значущості складав 0,05.

У роботі використано наступні реактиви: децилсульфат натрію, додецилсульфат натрію («СинтезПАВ», Росія), трифторперазин, 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопіперидин-1-оксил, 5-доксилстеаринова кислота, 16-доксилстеаринова кислота, 2-дезоксиглюкоза («Sigma», США), хлорпромазин гідрохлорид**,** додецил-β,D-мальтозид, гексил-β,D-глюкопіранозид, октил-β,D-глюкопіранозид, децил-β,D-глюкопіранозид, проназа, трипсин («Calbiochem», США), амід пальмітинової кислоти («Reanal», Угорщина); тритон X-100, папаїн («Merck», Німеччина), нейрамінідаза («Serva», Німеччина) і реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» і «чда».

## Основні результати досліджень

**Гіпертонічний шок і гіпотонічний лізис еритроцитів ссавців.** При вивченні явища ГШ еритроцитів ссавців клітини переносили в середовища з різними концентраціями NaCl при 37°С (рис. 1). Найбільш стійкими до гіпертонічних розчинів є клітини кролика, в той час як еритроцити людини і бика є найбільш чутливими до дії висококонцентрованих сольових середовищ.

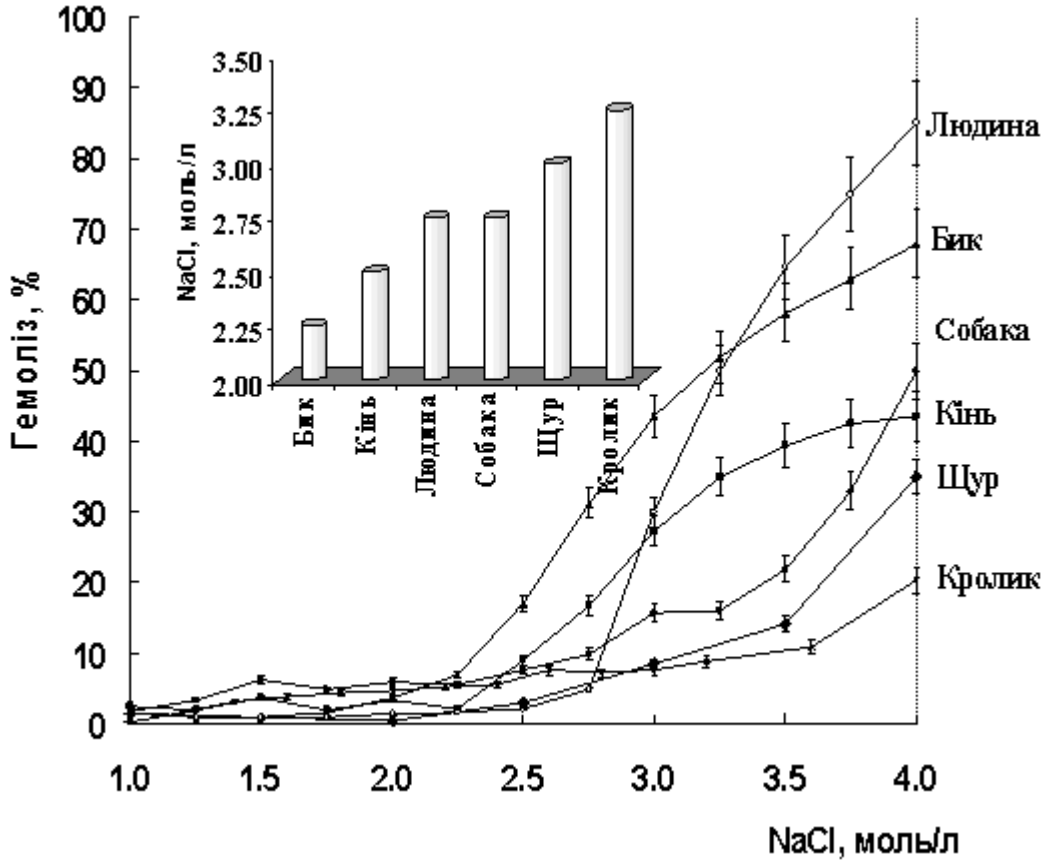



Рис. 1. Залежність рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі при температурі 37°С; тривалість експозиції 5 хв. Вставка. Порогові концентрації NaCl при гіпертонічному шоці еритроцитів ссавців.

При 0ºС спостерігається зниження рівня гемолізу еритроцитів всіх досліджуваних ссавців у 4,0 моль/л NaCl в порівнянні з 37ºС (рис. 2). При 0ºС мінімальний рівень гемолізу характерний для еритроцитів бика, коня і кролика, максимальний – для клітин людини. Таким чином, незалежно від температури інкубаційного середовища найбільш чутливими до гіпертонічного шоку є клітини людини, найменш чутливими – еритроцити кролика.

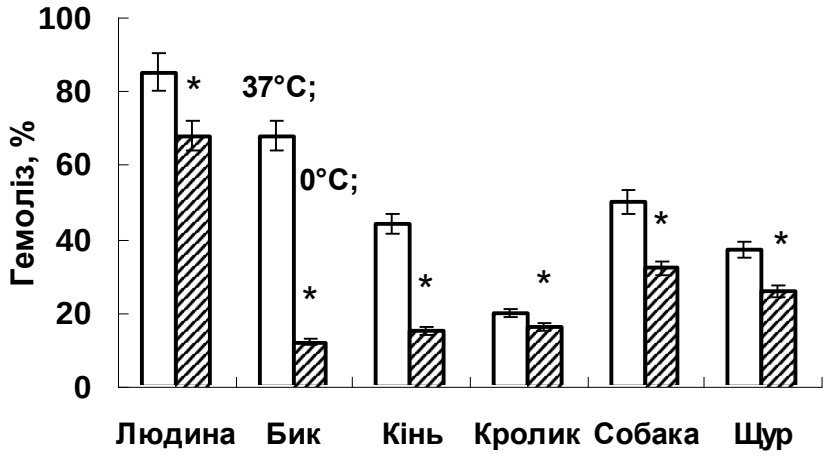



Рис. 2. Гіпертонічний гемоліз еритроцитів ссавців у середовищі, яке містить 4,0 моль/л NaCl, при температурі 37 і 0°С.
Примітка. * – статистично значущі відмінності порівняно з показниками гемолізу клітин, інкубованих при 37°С ($p < 0,05$), кількість спостережень у всіх групах – 9.

До дії гіпотонічних середовищ більшу стійкість мають еритроцити людини, собаки, щура, меншу – клітини бика, коня і кролика при обох температурних режимах (37 і 0°С) (рис. 3). Слід зазначити, що клітини різних видів ссавців легше переносять гіпотонічне навантаження при 37ºС.

Результати, отримані при вивченні реакції еритроцитів різних видів ссавців на різку зміну тонічності середовища, свідчать, що ті клітини, які чутливі до дії ГЛ, є стійкими в умовах ГШ.

За допомогою кореляційного аналізу оцінювали взаємозв'язок між показниками температурно-осмотичної чутливості еритроцитів різних видів ссавців і загальновідомими структурно-функціональними характеристиками цих клітин.

В якості реперних точок ГЛ еритроцитів ссавців використовували так звані порогові концентрації NaCl, тобто максимальні концентрації сольового розчину, при яких рівень гемолізу еритроцитів ссавців не перевищує 10%, і індекси осмотичної крихкості (концентрації NaCl, при яких реєструється 50% пошкодження клітин) при 37 і 0°С, а в якості реперних точок ГШ – порогові концентрації NaCl при 37°С і рівень гемолізу в 4,0 моль/л NaCl при 0 і 37°С.

Структурно-функціональні характеристики досліджуваних еритроцитів можна умовно розподілити на 4 групи. Геометричні відмінності між ними виявляються в їх розмірах: діаметр (d) і поверхнево-об'ємне відношення (S/V). Цитоплазматичні показники характеризуються вмістом одно- і двовалентних

катіонів, АТФ, води, гемоглобіну і його гідрофобністю, мембранні показники – ліпідним складу і білками цитоскелета. До функціональних показників відносяться показники швидкості трансмембранного водного транспорту в еритроцитах і величини гемолізу, індукованого α-токсином.

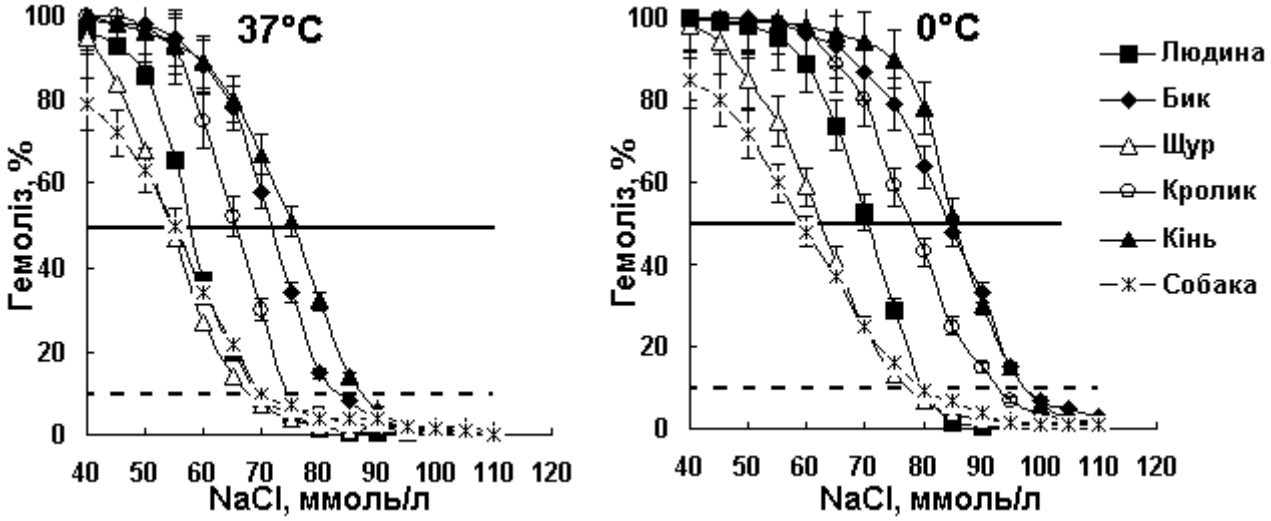



Рис. 3. Гіпотонічний гемоліз еритроцитів ссавців при температурі 37 і 0°C, тривалість експозиції 5 хв ( – – – – 10% гемоліз; ——— – 50% гемоліз).

Аналіз сили зв'язку між параметрами ГЛ еритроцитів ссавців і їх розмірами (Jones D.A., 1979; Schmidt-Nielsen K., 1984; Kowluru R. et al., 1989; Комарова Н.К. и др., 2003) показав значущу кореляцію між пороговими концентраціями і геометричними характеристиками еритроцитів – d і S/V (рис. 4, 5). Як при 37°C, так й при 0°C більш високі значення порогових концентрацій NaCl в умовах ГЛ мають невеликі клітини і еритроцити, які характеризуються високими значеннями S/V.

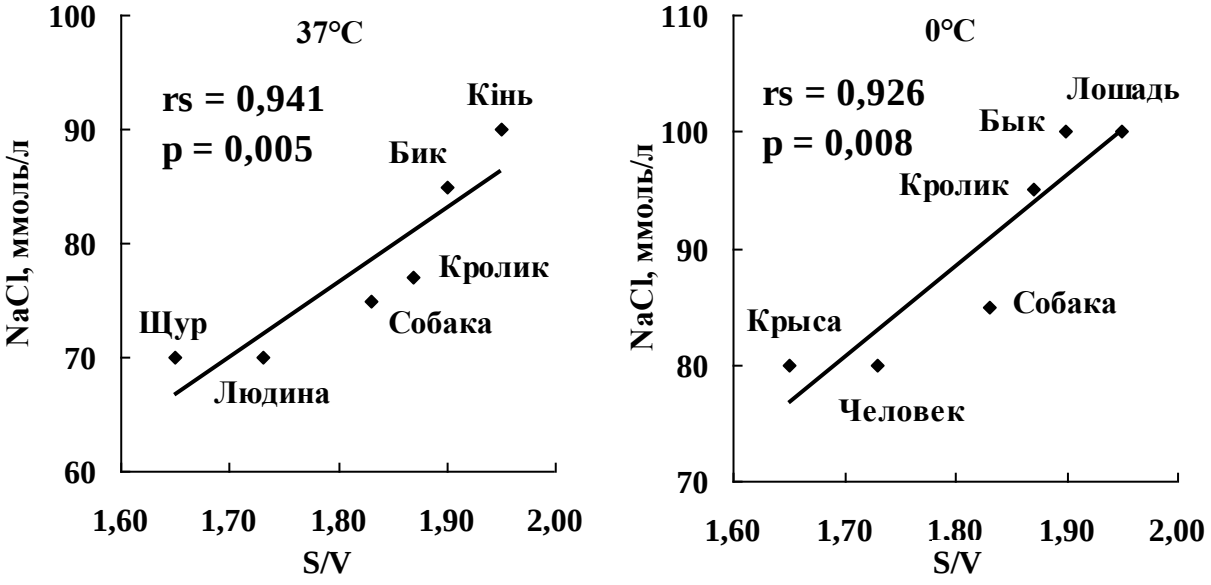



Рис. 4. Взаємозв'язок між пороговою концентрацією NaCl при гіпотонічному лізисі еритроцитів ссавців (37 і 0°C) та їх поверхнево-об'ємним відношенням (S/V).

Значення індексу осмотичної крихкості еритроцитів при 37ºС негативно корелює з діаметром ($r_s$ = −0,975, p = 0,005) і позитивно – з поверхнево-об'ємним відношенням ($r_s$ = 0,986, p = 0,0003).

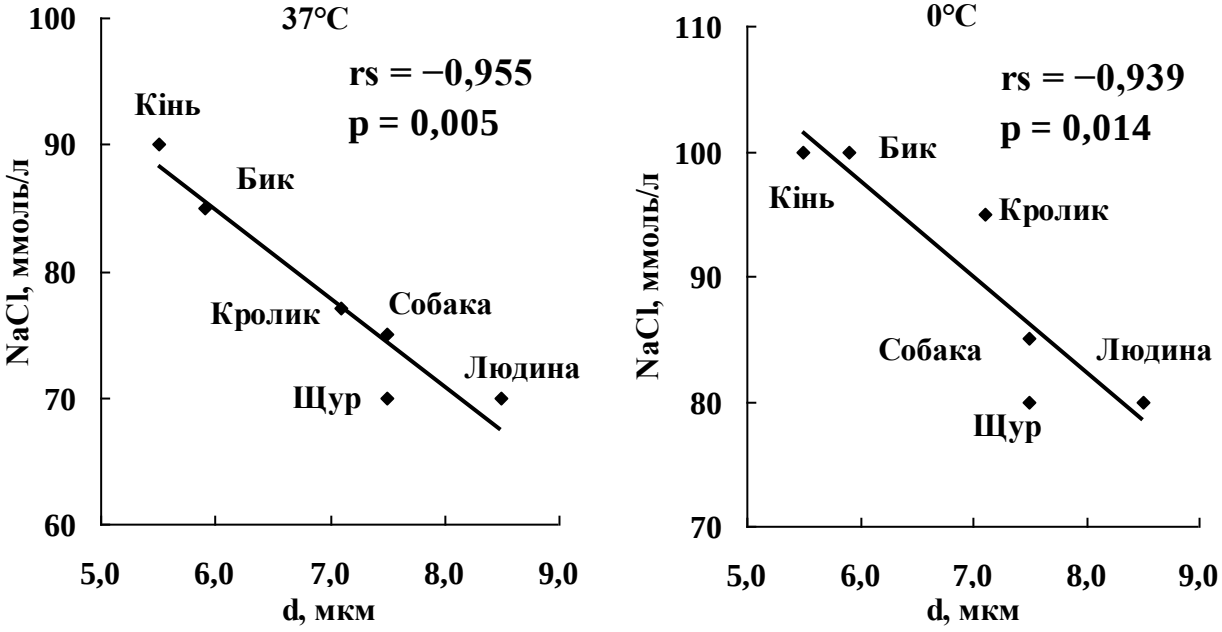



Рис. 5. Взаємозв'язок між пороговою концентрацією NaCl при гіпотонічному лізисі еритроцитів ссавців (37 і 0°C) та їх діаметром (d).

В умовах ГШ еритроцитів ссавців величини порогових концентрацій солі позитивно корелюють зі значеннями коефіцієнта дифузійного водного транспорту (Benga G., Borza T., 1995; Benga G. et al., 2000, 2010) (рис. 6). Крім того, встановлена позитивна кореляція між вмістом внутрішньоклітинної води, визначеним для еритроцитів ссавців у роботі (Miseta A. et al., 1993), і величинами порогових концентрацій солі в умовах ГШ клітин, які досліджували ($r_s$ = 0,841, p = 0,036).

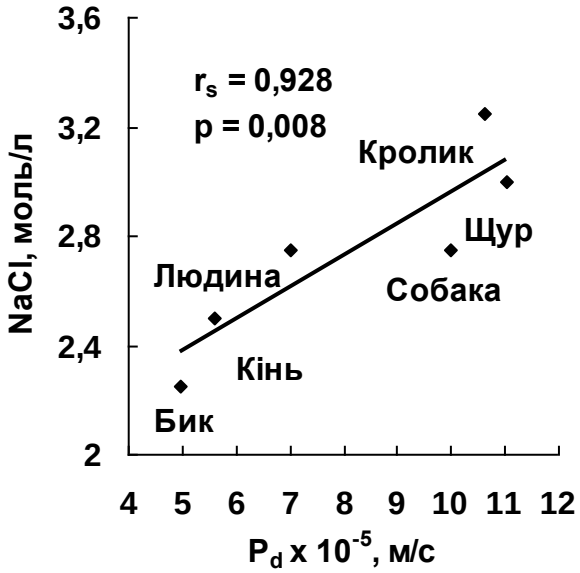



Рис. 6. Взаємозв'язок між пороговими концентраціями NaCl при гіпертонічному шоці еритроцитів ссавців і коефіцієнтом дифузійного водного транспорту ($P_d$) при 37°C.

Встановлена кореляція між значенням гідрофобності гемоглобіну (Cowan R., Whittaker R.G., 1990) і отриманими даними щодо рівня гемолізу еритроцитів ссавців у 4,0 моль/л NaCl ($r_s$ = 0,829, p = 0,042).

**Особливості та закономірності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців.** Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів є різновидом холодового шоку і являє собою пошкодження клітин при охолодженні від 37 до 0°С у гіпертонічному розчині (рис. 7). Еритроцити ссавців, які знаходяться в ізотонічному середовищі, не пошкоджуються при охолодженні в області позитивних температур. Еритроцити коня, щура, собаки гемолізують при охолодженні в сольових середовищах, осмоляльність яких перевищує 800 мосмоль/кг, ГК клітин бика, кролика, як і еритроцитів людини, розвивається в середовищах із осмоляльністю вище 1170 мосмоль/кг).

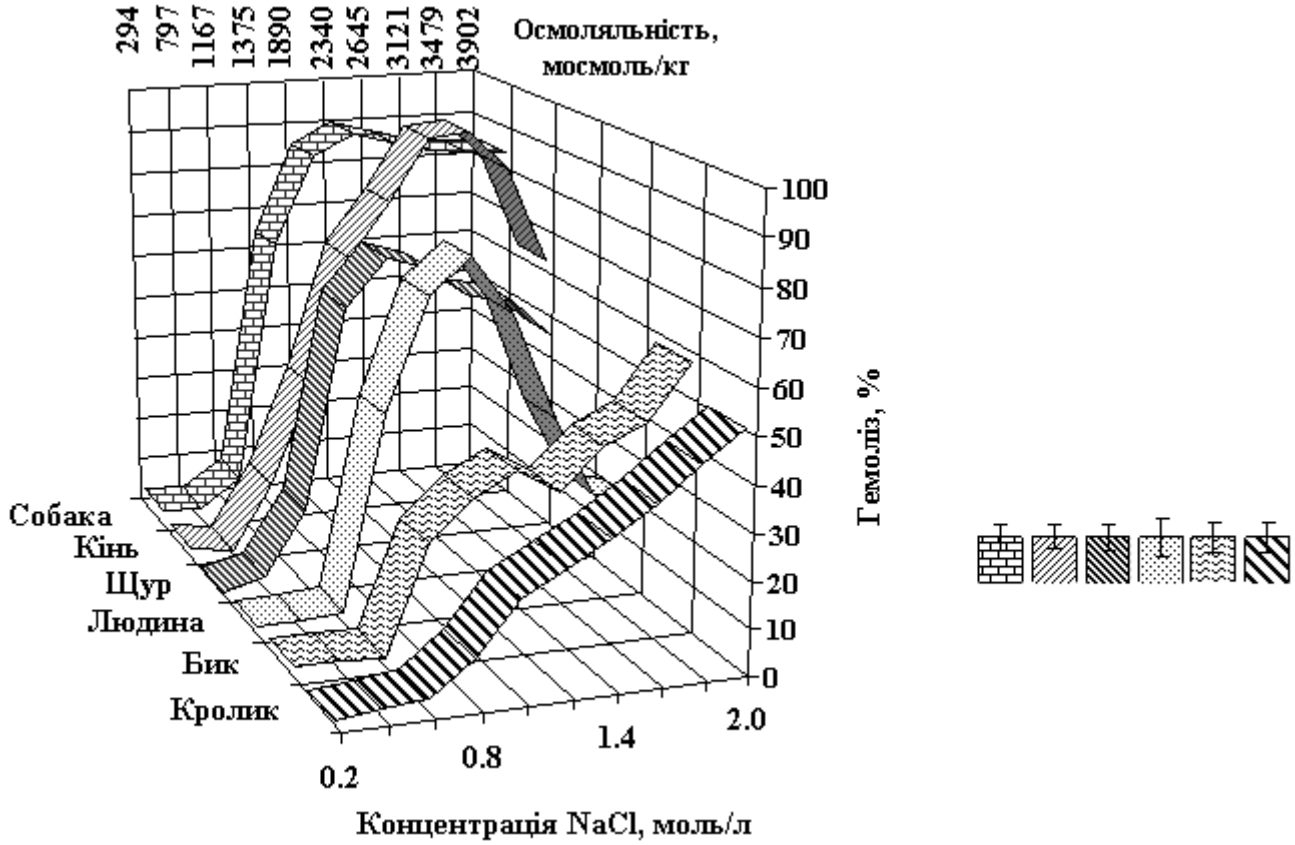



Рис. 7. Залежність рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі.

За характером залежностей кріогемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі клітини можна віднести до двох груп (рис. 7). Перша група представлена еритроцитами людини, коня, собаки і щура, залежності

гемолізу яких від концентрації солі характеризуються певним максимумом з подальшим зниженням цього показника. До другої групи належать клітини бика і кролика, аналогічні залежності яких мають практично монотонний характер.

Проведений кореляційний аналіз виявив значущі зв'язки показників ГК еритроцитів (порогові концентрації солі і значення гемолітичного пошкодження клітин у середовищі, яке містить 0,8 моль/л NaCl), із ліпідним складом мембрани (табл. 1).

Очевидно, що порогові концентрації солі позитивно корелюють із вмістом сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну, сфінгозину і негативно – із вмістом фосфатидилхоліну в різних комбінаціях. Рівень гемолізу еритроцитів у 0,8 моль/л NaCl позитивно корелює з холін-вмісними фосфоліпідами і негативно – з вмістом фосфатидилетаноламіну і холестерину. Таким чином, еритроцити, які характеризуються високим вмістом холестерину, фосфатидилетаноламіну і низьким вмістом фосфатидилхолінів, тобто клітини бика і кролика, є більш стійкими до пошкоджуючої дії ГК.

*Таблиця 1*

**Кореляції між показниками гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців і ліпідним складом їх плазматичних мембран**

| Ліпіди мембран еритроцитів [#] | Порогові концентрації NaCl, моль/л | | Гемоліз у 0,8 моль/л NaCl, % | |
|---|---|---|---|---|
| | $r_s$ | p | $r_s$ | p |
| Холестерин, % від загальних ліпідів | 0,866 | 0,058 | −0,900** | 0,037 |
| Лізофосфатидилхолін* | −0,891** | 0,017 | 0,609 | 0,200 |
| Сфінгомієлін* | 0,878** | 0,021 | −0,714 | 0,111 |
| Фосфатидилхолін | −0,878** | 0,021 | 0,657 | 0,156 |
| Сфінгомієлін + Фосфатидилхолін * | −0,878** | 0,021 | 0,829** | 0,042 |
| Лізофосфатидилхолін + Сфінгомієлін + Фосфатидилхолін * | −0,878** | 0,021 | 0,829** | 0,042 |
| Фосфатидилетаноламін* | 0,878** | 0,021 | −0,886** | 0,019 |
| Сфінгозин* | 0,878** | 0,021 | −0,714 | 0,111 |

Примітка: [#]- ліпідний склад мембран еритроцитів ссавців (Nelson G.J., 1967; Wessels J.M.C., Veerkamp J.H., 1973);

* - у відсотках від загальної кількості фосфоліпідів еритроцитарних мембран;

** - статистично значущі кореляції ($p < 0,05$).

Результати, отримані при вимірюванні виходу іонів $K^+$ з еритроцитів людини і тварин у гіпертонічних середовищах при 37°С методом іонометрії, порівнювали з даними гемолітичного пошкодження клітин після їх охолодження до 0°С (рис. 8). Залежності виходу іонів $K^+$ з клітин людини, коня і кролика від концентрації солі в середовищі є досить схожими на відміну від гемолітичних залежностей для цих

клітин, отриманих при їх наступному охолодженні до 0°С. Це свідчить про різний характер розвитку мікродефектів, які утворилися під дією підвищеної осмоляльності середовища і доступні для катіонів $K^+$, до розміру гемолітичної пори на етапі охолодження клітин різних видів ссавців. Еритроцити коня, кролика, як і клітини людини (Белоус А.М. и др., 1987), лізують у гіпертонічних умовах при охолодженні до 0°С лише в тому випадку, коли охолодженню передує втрата клітинами катіонів калію.

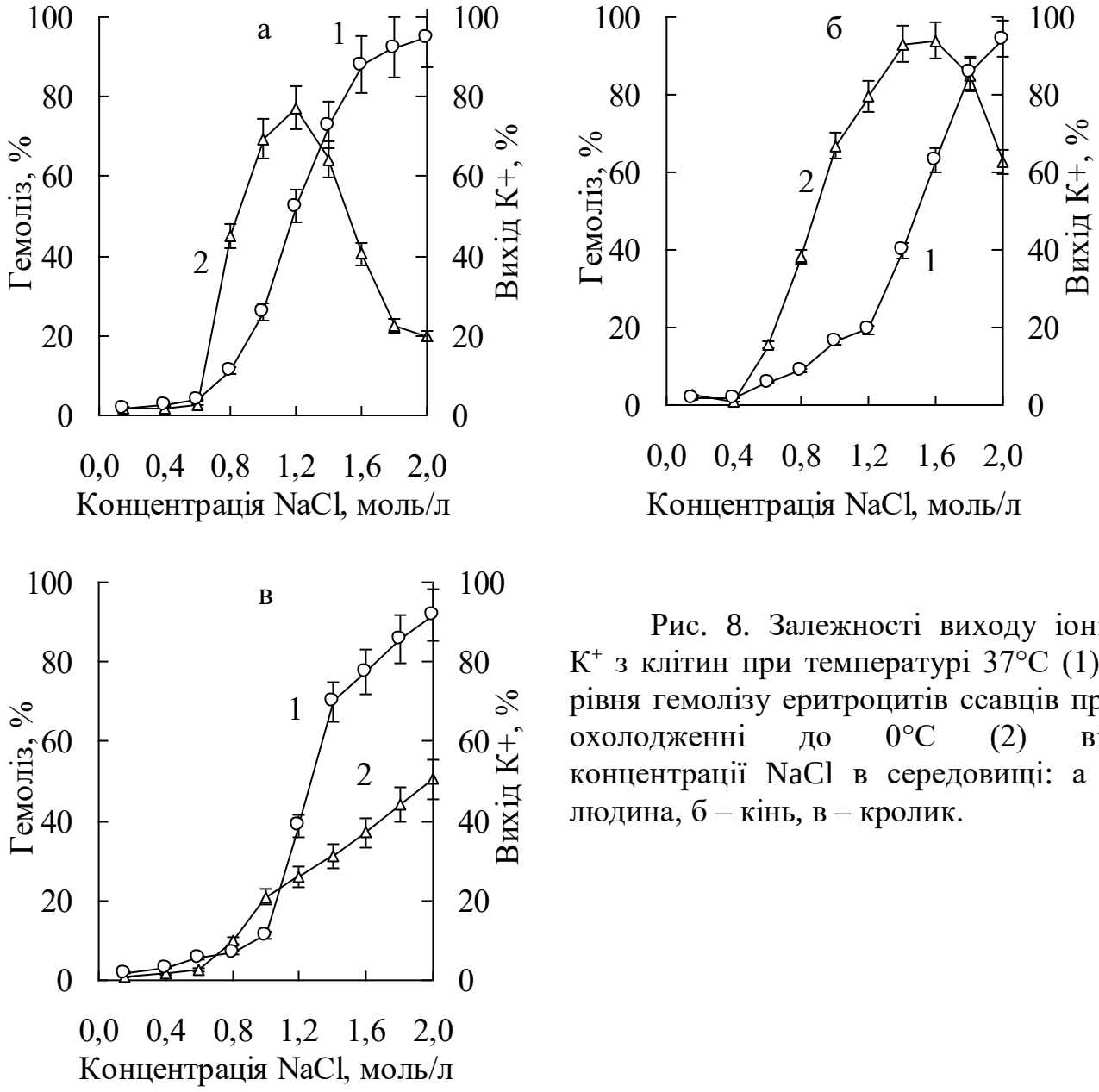



Рис. 8. Залежності виходу іонів $K^+$ з клітин при температурі 37°С (1) і рівня гемолізу еритроцитів ссавців при охолодженні до 0°С (2) від концентрації NaCl в середовищі: а – людина, б – кінь, в – кролик.

При дослідженні впливу температурного режиму на розвиток ГК еритроцитів різних видів ссавців визначали температуру, при охолодженні до якої від 37°С, або температуру, при охолодженні від якої до 0°С, спостерігається пошкодження клітин (рис. 9). Початком лізису клітин вважали перевищення 10%-го рівня

гемолізу; темним кольором позначено діапазон температур, де спостерігається ГК еритроцитів.

При охолодженні клітин від 37°С до значень температури, рівних і нижче 15°С, спостерігається ГК еритроцитів людини, щура, собаки і коня, а до значень температури, рівних і нижче 10°С – клітин бика і кролика. У тому випадку, коли клітини охолоджували від різних значень температури до 0°С, спостерігається наступна картина: еритроцити щура лізують при охолодженні від температур з діапазону 10–37°С, людини і собаки –15–37°С, коня – 20–37°С, бика – 25–37°С, кролика – 25–37°С. Таким чином, найбільш стійкими до варіації температури в умовах ГК є еритроцити бика і кролика. Клітини коня, собаки, щура за цим показником схожі з еритроцитами людини.

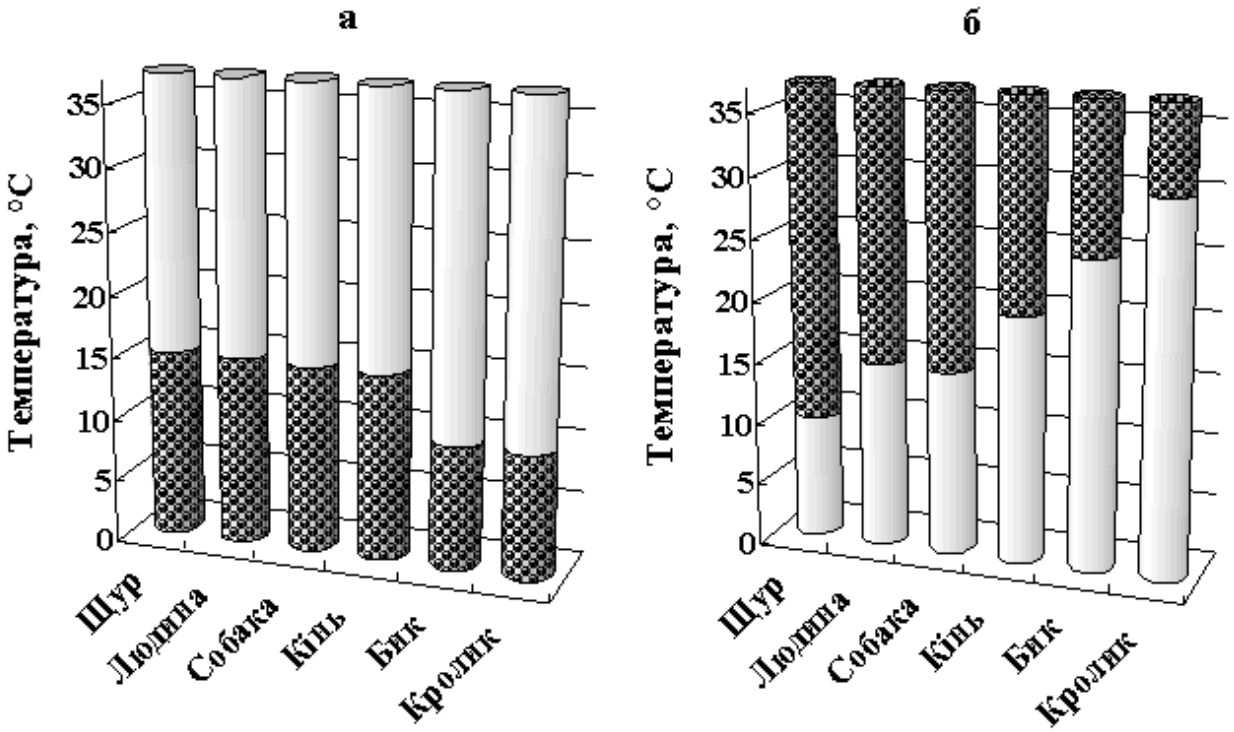



Рис. 9. Вплив режиму охолодження на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців у середовищі, яке містить 1,2 моль/л NaCl: а – від 37°С до різних значень температури; б – від різних значень температури до 0°С ( ☐ – відсутність гемолізу; ⚄ – гемоліз еритроцитів вище 10%).

Збільшення тривалості експозиції клітин у гіпертонічному середовищі при 37ºС до 120 хв призводить до зниження рівня ГК еритроцитів людини і не впливає на рівень гемолізу клітин коня, при цьому рівень гемолітичного пошкодження еритроцитів кролика і бика підвищується (рис. 10). З рис. 11 видно, що незважаючи на різний рівень виходу катіонів $K^+$ з клітин людини, коня, кролика і бика при 10-хвилинній експозиції в гіпертонічному сольовому розчині, спостерігається істотне збільшення цього показника при 120-хвилинній експозиції еритроцитів всіх досліджуваних видів ссавців.

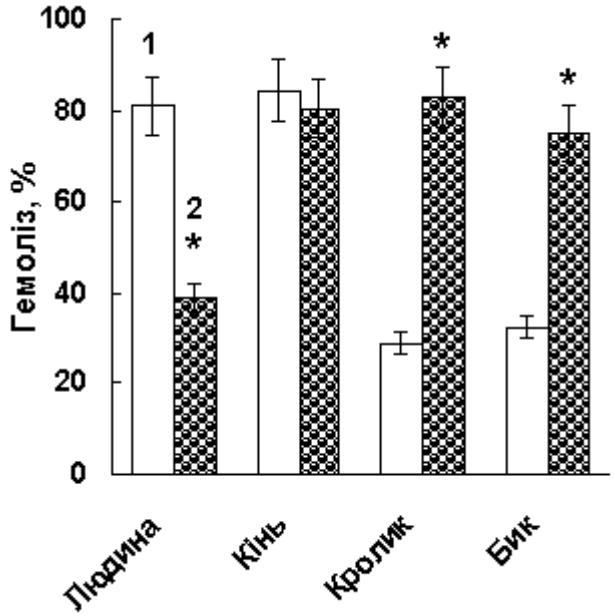



Рис. 10. Вплив тривалості експозиції еритроцитів ссавців у середовищі, яке містить 1,2 моль/л NaCl, при 37°С (1 – 10 хв, 2 – 120 хв) на рівень гемолізу клітин при їх наступному охолодженні до 0°С. Примітка. * – статистично значущі відмінності порівняно з показниками гемолізу клітин, інкубованих 10 хв ($p < 0,05$), кількість спостережень у всіх групах – 7.

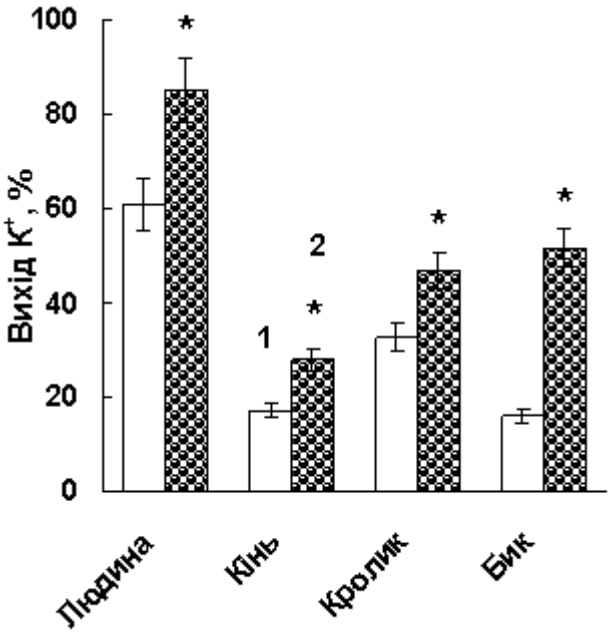



Рис. 11. Вплив тривалості експозиції еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl, при 37°С на вихід катіонів $K^+$ з клітин: 1 – 10 хв, 2 – 120 хв. Примітка. * – статистично значущі відмінності порівняно з показниками гемолізу клітин, інкубованих 10 хв ($p < 0,05$), кількість спостережень у всіх групах – 7.

Таким чином, характерне для людини і тварин часозалежне збільшення виходу катіонів $K^+$ з клітин у гіпертонічних умовах при 37°С супроводжується різним характером розвитку гемолітичного пошкодження еритроцитів при їх охолодженні. Пригнічення ГК еритроцитів людини при тривалому інкубуванні в гіпертонічних умовах при 37°С може бути обумовлено зниженням концентраційного градієнта катіонів $Na^+$ через еритроцитарну мембрану, оскільки показано статистично значуще збільшення внутрішньоклітинної концентрації катіонів $Na^+$ в результаті тривалої експозиції інкубування клітин у розчині 1,2 моль/л NaCl, яке передує охолодженню.

**Ефективність амфіфільних сполук при гіпертонічному шоці та гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів ссавців.** В умовах ГШ еритроцитів ссавців при 37°С всі амфіфіли виявляють високу антигемолітичну активність (табл. 2). При 0°С для еритроцитів людини ефективними є всі речовини, в той час

як для клітин коня – тільки катіонні. Слід зазначити, що антигемолітична активність амфіфільних сполук при 0°С нижча, ніж при 37°С.

*Таблиця 2*

**Значення максимальної антигемолітичної активності (%) амфіфільних сполук при гіпертонічному шоці еритроцитів ссавців у середовищі, яке містить 4,0 моль/л NaCl, при 37 і 0°С (M ± m, n = 6)**

| Речовина | Людина | Бик | Кінь | Людина | Кінь |
|---|---|---|---|---|---|
| | 37°С | | | 0°С | |
| С10 | 86 ± 3 | 83 ± 5 | 84 ± 3 | 51 ± 3 | 0 |
| С12 | 76 ± 4 | 31 ± 7 | 42 ± 8 | 33 ± 6 | 0 |
| ТФП | 87 ± 3 | 80 ± 7 | 77 ± 6 | 42 ± 6 | 60 ± 4 |
| ХПР | 77 ± 2 | 76 ± 7 | 86 ± 8 | 60 ± 6 | 38 ± 4 |
| ДМ | 76 ± 4 | 65 ± 5 | 71 ± 4 | 47 ± 3 | 0 |

В умовах ГК еритроцитів людини і тварин високу захисну активність виявляють катіонні сполуки (табл. 3). Аніонний С10 досить ефективний по відношенню до еритроцитів бика та коня.

*Таблиця 3*

**Значення максимальної антигемолітичної активності (%) амфіфільних сполук при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів ссавців у середовищі, яке містить 1,2 моль/л NaCl (M ± m, n = 6)**

| Речовина | Людина | Бик | Кінь | Кролик |
|---|---|---|---|---|
| С10 | 46 ± 3 | 68 ± 7 | 75 ± 8 | 66 ± 5 |
| С12 | 12 ± 5 | 55 ± 8 | 27 ± 6 | 51 ± 6 |
| ТФП | 80 ± 6 | 65 ± 6 | 64 ± 7 | 85 ± 4 |
| ХПР | 70 ± 3 | 70 ± 4 | 76 ± 2 | 70 ± 3 |
| ДМ | 0 | 30 ± 4 | 24 ± 6 | 36 ± 2 |

Встановлено, що амфіфіли при використанні в ефективних концентраціях не змінюють проникність мембран еритроцитів ссавців по відношенню до катіонів $K^+$ в ізотонічних умовах і не впливають на їх вихід з клітин у гіпертонічних середовищах (4,0 моль/л NaCl). Отже, антигемолітична активність амфіфільних сполук реалізується на етапі збільшення трансмембранного дефекту до розміру гемолітичної пори.

Оцінка ефективності катіонного ТФП в умовах ГШ після обробки клітин протеолітичними ферментами (папаїн, трипсин, проназа), які, в першу чергу, діють на білок смуги 3, і нейрамінідазою, яка викликає деструкцію глікокаліксу, не виявила зміни антигемолітичної активності амфіфілу (рис. 12).

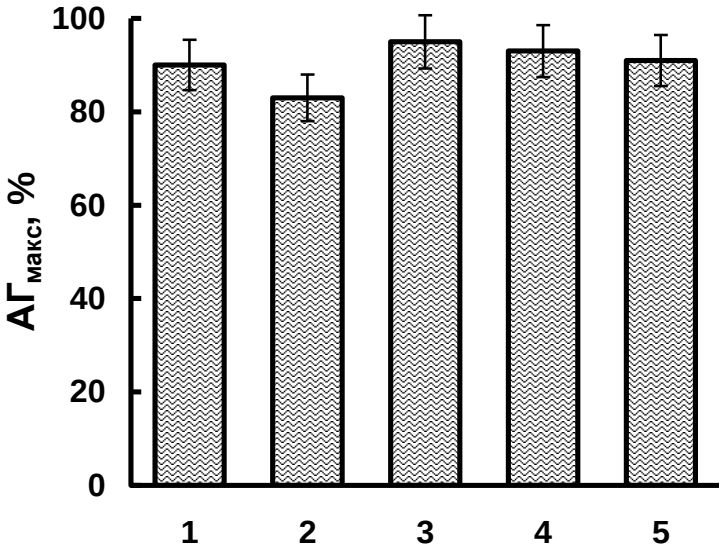



Рис. 12**.** Вплив протеолітичних ферментів і нейрамінідази на значення антигемолітичної активності трифторперазину ($4{,}5 \times 10^{-5}$ моль/л) в умовах гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl, 37°С) еритроцитів людини: 1–контроль, 2–проназа, 3–трипсин, 4–папаїн, 5–нейрамінідаза.

Оцінка розподілу фосфатидилсерину в мембрані еритроцитів методом проточної цитофлуориметрії не показала додаткового експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні мембрани в присутності ХПР (50–300 мкмоль/л) при 10-хвилинній обробці**.** На рис. 13 наведено результати щодо використання ХПР у максимальній концентрації.

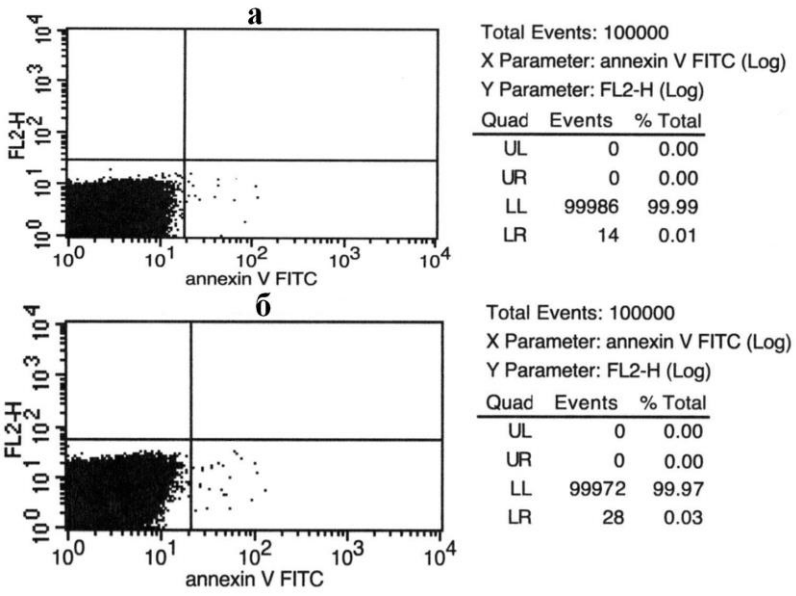



Рис. 13. Цитограма еритроцитів людини після обробки хлорпромазином (по осі абсцис – інтенсивність флуоресценції аннексин V-ФІТЦ у відносних одиницях): а – контроль, б – хлорпромазин (300 мкмоль/л).

Стан ліпідного бішару мембрани еритроцитів людини у присутності амфіфільних сполук в ефективних концентраціях вивчали методом ЕПР спектроскопії з використанням спін-мічених зондів, що містять нітроксильний радикал у різних положеннях уздовж жирнокислотного ланцюга.

Неіонний ДМ, аніонний С12 і катіонний ХПР зменшують частоту обертальної рухливості спінового зонда АПК (табл. 4), що свідчить про збільшення мікров'язкості водно-ліпідної поверхні мембрани. В анізотропній зоні мембрани ефект на рівні тенденції виявляє тільки ДМ. Величини частоти обертальної рухливості нітроксильного радикала зонда 16-ДС свідчать про збільшення мікров'язкості гідрофобної зони мембрани під дією ДМ і С12 і про її зменшення в присутності ХПР. Таким чином, всі досліджувані амфіфільні сполуки впливають на мікров'язкість мембрани, але трансмембранна локалізація зазначеного ефекту для них різна.

*Таблиця 4*

**Параметри обертальної рухливості зондів АПК і 16-ДС ($\nu_+$) і зонда 5-ДС ($\Delta H_o$) у мембрані еритроцитів, оброблених амфіфільними речовинами (Me, Q1–Q3, n = 7)**

| Зонд / Параметр | | Амфіфільні речовини | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Контроль | ДМ | С12 | ХПР |
| АПК | $\nu_+ \times 10^{-8}$, $c^{-1}$ | 7,92 (7,65–8,32) | 5,66 * (5,34–6,10) | 6,76 * (6,11–7,05) | 6,02 * (5,61–7,00) |
| 5-ДС | $\Delta H_o$, G | 3,51 (3,32–3,85) | 3,77 (3,57–3,94) | 3,38 (3,26–4,05) | 3,64 (3,35–4,25) |
| 16-ДС | $\nu_+ \times 10^{-8}$, $c^{-1}$ | 4,98 (4,40–5,93) | 4,18 * (3,68–4,78) | 4,52 * (3,95–5,12) | 5,38 * (5,06–6,12) |

Примітка. * – статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольних клітин ($p < 0,05$).

Бар'єрні властивості мембран еритроцитів людини у присутності ХПР у широкому концентраційному діапазоні досліджували за допомогою ЕПР спектроскопії. На рис. 14 представлені залежності параметрів, що характеризують інтенсивність $\ln (h_К/h_{ХПР})$ і ширину $\ln (\Delta Ho_К/\Delta Ho_{ХПР})$ центральної компоненти спектра ЕПР зонда ТЕМПОН у цитоплазмі еритроцитів людини, від концентрації ХПР.

Характер зміни зазначених параметрів дозволяє виділити два концентраційних діапазони ХПР: 50–200 мкмоль/л і 300–700 мкмоль/л. У першому діапазоні концентрацій ХПР не реєструється зміна величин вищезазначених параметрів, тоді як у другому – спостерігається різка зміна параметра інтенсивності при параметрі ширини, який змінюється поступово. Це свідчить про порушення проникності еритроцитарних мембран по відношенню до позаклітинних іонів фериціаниду.

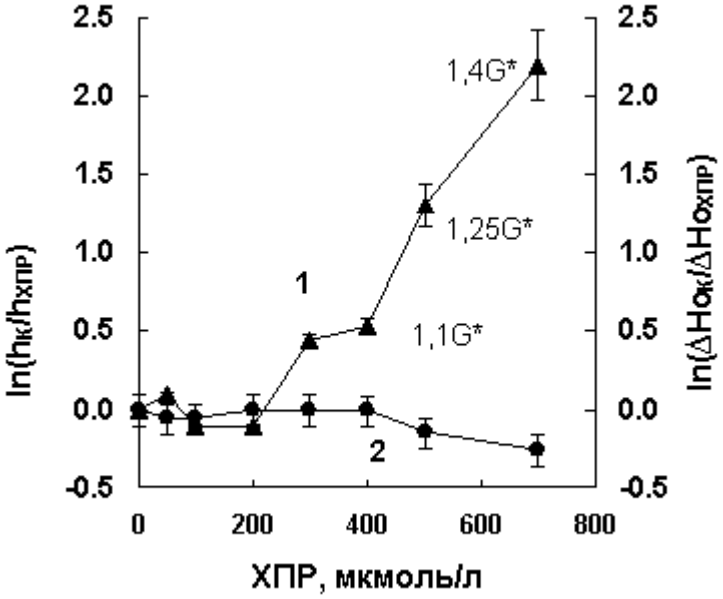



Рис. 14. Відносні зміни інтенсивності $h_К$ /$h_{ХПР}$ (1) і ширини $\Delta H_{оК}$ /$\Delta H_{оХПР}$ (2) центральної компоненти спектра ЕПР зонда ТЕМПОН (1 ммоль/л) у цитоплазмі еритроцитів ($10^9$ кл/мл) у присутності іонів фериціаниду калію (0,1 моль/л) залежно від концентрації хлорпромазину при температурі 37°С.

Оскільки амфіфільні речовини впливають на стан ліпідного компонента мембрани, доцільно було оцінити ефективність амфіфільних сполук при варіюванні довжини гидрофобної частини їх молекул. Для представників гомологічного ряду глюкопіранозиду (ГГП, ОГП і ДГП) були визначені величини максимальної антигемолітичної активності та значення ефективних концентрацій в умовах ГШ та ГК еритроцитів людини (табл. 5).

*Таблиця 5*

**Величини максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$) і значення ефективних концентрацій алкіл-β,D-глюкопіранозидів, які відповідають середині (С) і початку плато ($С_1$) в умовах гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl, 37ºС) і гіпертонічного кріогемолізу (1,2 моль/л NaCl, 37 → 0ºС) еритроцитів людини (M ± m, n = 16)**

| Речовина | Гіпертонічний шок | | | Гіпертонічний кріогемоліз | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $АГ_{макс}$, % | С, ммоль/л | $С_1$, ммоль/л | $АГ_{макс}$, % | С, ммоль/л | $С_1$, ммоль/л |
| ГГП | 90 ± 7* | 13 | 10 | 91 ± 7** | 42 | 36 |
| ОГП | 94 ± 5* | 1 | 0,85 | 90 ± 8** | 2,63 | 2,15 |
| ДГП | 94 ± 5* | 0,1 | 0,08 | 94 ± 5** | – | 0,132 |

Примітка: * – відмінності між величинами статистично незначущі (p > 0,01) при гіпертонічному шоці; ** – відмінності між величинами статистично незначущі (p > 0,01) при гіпертонічному кріогемолізі.

Оскільки із концентраційної залежності ГК еритроцитів не представлялося можливим визначити ефективну концентрацію ДГП, яка відповідає середині плато (С), через розвиток процесу міцелоутворення, визначали ефективні концентрації гомологів, які відповідають початку плато при обох видах стресу ($C_1$).

Концентрації гомологів глюкопіранозиду, при яких спостерігається максимальний захист клітин від гіпертонічного лізису і гіпертонічного кріогемолізу, з подовженням алкільного ланцюга на кожні дві $CH_2$-групи знижуються більш, ніж в 10 і 15 разів відповідно (табл. 5).

Амфіфільні речовини при концентраціях, які значно відрізняються, характеризуються сумірними величинами антигемолітичної активності в умовах стресу еритроцитів (табл. 5), тому виникає питання про внутрішньомембранну концентрацію цих сполук.

Оцінка кількості молекул ліпіду, що припадає на 1 молекулу амфіфілу (табл. 6), свідчить про те, що при використанні алкіл-β,D-глюкопіранозидів у концентраціях, при яких проявляється максимальний захист (90–94%) в умовах ГШ і ГК еритроцитів людини, величина співвідношення ліпід/амфіфіл практично не залежить від довжини алкільного ланцюга.

*Таблиця 6*

**Відношення ліпід/амфіфіл в еритроцитарній мембрані при максимальній ($АГ_{макс}$) протекції еритроцитів в умовах гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl, 37ºС) і гіпертонічного кріогемолізу (1,2 моль/л NaCl, 37 → 0ºС)**

| Речовини | Гіпертонічний шок | | Гіпертонічний кріогемоліз | |
|---|---|---|---|---|
| | С | $C_1$ | С | $C_1$ |
| ГГП | 21,2 | 27,6 | 6,6 | 7,7 |
| ОГП | 24,1 | 28,4 | 9,2 | 9,7 |
| ДГП | 21,0 | 26,3 | – | 15,8 |

Таким чином, можна вважати, що антигемолітична активність глюкопіранозидів визначається значною мірою внутрішньомембранною концентрацією амфіфілу.

**Вихідний стан еритроцитів ссавців як чинник, що визначає чутливість клітин до гіпертонічного шоку.** Корекція гіпертонічної чутливості еритроцитів людини можлива в результаті модифікації вихідного стану клітин на етапах, які передують гіпертонічному впливу. Попереднє часткове зневоднення еритроцитів людини істотно підвищує їх стійкість до подальшої дії висококонцентрованих середовищ і заморожування (Поздняков В.В. та ін., 1989; Pegg D.E, Diaper M.P., 1991).

Для еритроцитів тварин також характерне формування стійкого стану до дії ГШ в результаті попереднього часткового зневоднення клітин (рис. 15). Мінімальне гемолітичне пошкодження в 4,0 моль/л NaCl при 37°С спостерігається після експозиції еритроцитів щура в середовищах, які містять 0,3–0,4 моль/л NaCl (550–700 мосмоль/кг), еритроцитів коня, як і клітин людини, – в 0,4 моль/л NaCl

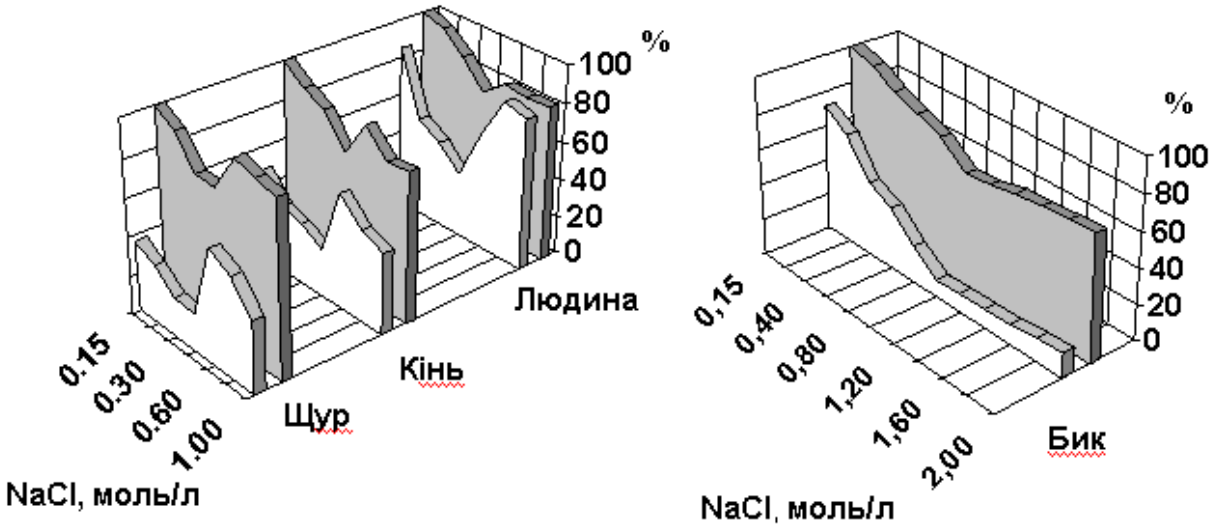



Рис. 15. Значення гематокриту еритроцитів ссавців ( ■ ) у середовищах з різною концентрацією NaCl і величини гемолізу клітин ( □ ) при подальшому перенесенні в 4,0 моль/л NaCl при температурі 37°С. Гематокрит клітин у 0,15 моль/л NaCl при 37°С прийнято за 100%.

(700 мосмоль/кг) і еритроцитів бика – в середовищах із більш високою концентрацією солі (1,0 моль/л NaCl, 1760 мосмоль/кг). Цікаво, що зміна гематокриту клітин у середовищах попередньої експозиції фактично відповідає характеру динаміки гемолізу цих клітин у розчині 4,0 моль/л NaCl. Таким чином, стійкими до гіпертонічного шоку є ті клітини, які мають мінімальне значення гематокриту.

Еритроцити людини, бика і коня після нетривалої експозиції (2 хв) з гліцерином піддавали дії 4,0 моль/л NaCl при 37 і 0°С (рис. 16). Якщо при 37°С гліцерин викликає істотне зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини і бика (для еритроцитів коня ефект даного кріопротектора слабко виражений), то при 0°С захисна дія гліцерину характерна тільки для клітин людини.

При комбінованій дії гліцерину і NaCl на етапі попередньої обробки еритроцитів людини вдається істотно знизити рівень пошкодження клітин в розчині 4,0 моль/л NaCl (рис. 17, 18).

При 0°С у присутності гліцерину спостерігається зниження гіпертонічного лізису еритроцитів, попередньо експонованих у середовищах, які містять 0,15 і 0,7 моль/л NaCl. Слід зазначити, що рівень гіпертонічного гемолізу не залежить від концентрації гліцерину (рис. 17).

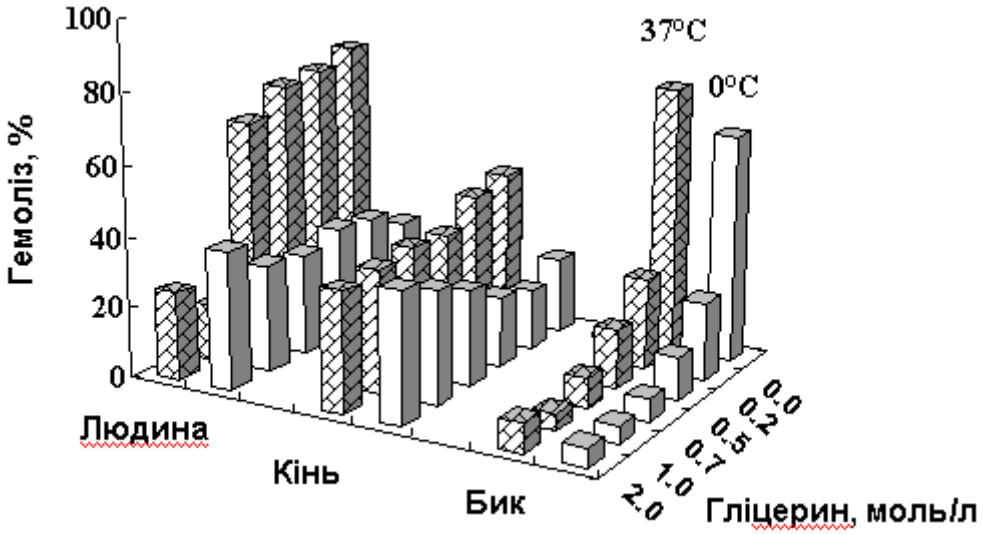



Рис. 16. Вплив гліцерину на рівень гемолізу еритроцитів людини в розчині 4,0 моль/л NaCl при температурі 37 і 0°C. Тривалість експозиції в розчинах гліцерину – 2 хв.

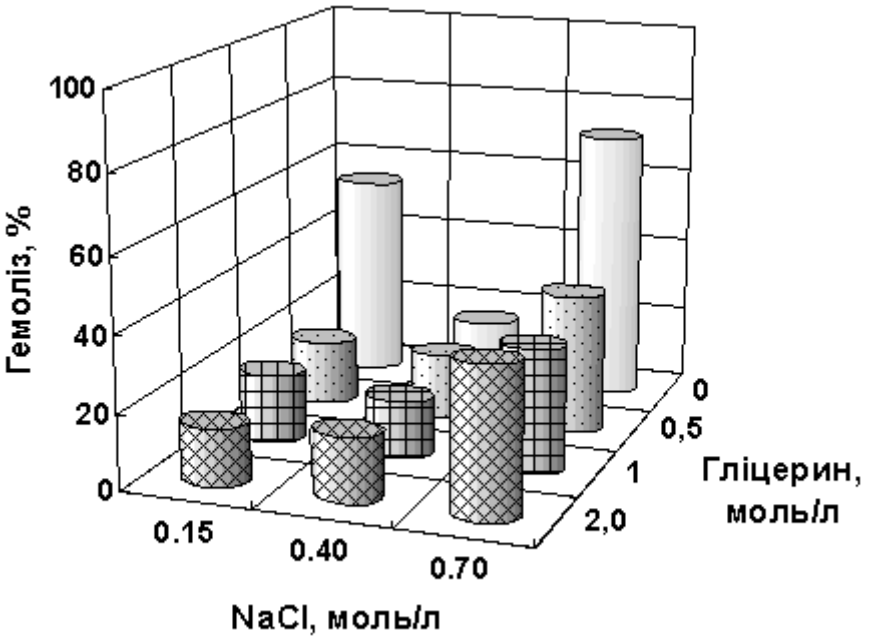



Рис. 17. Вплив гліцерину і середовищ попередньої експозиції на рівень гемолізу еритроцитів у середовищі, яке містить 4,0 моль/л NaCl, при 0°C.

При 37°C гліцерин сприяє формуванню стабільного стану еритроцитів, проекспонованих у всіх середовищах попередньої експозиції (0,15, 0,4 і 0,7 моль/л

NaCl), що проявляється у зниженні рівня гіпертонічного пошкодження еритроцитів у розчині 4,0 моль/л NaCl (рис. 18). В основі захисної дії гліцерину лежить його здатність обмежувати швидкість стиснення і амплітуду «об'ємного зсуву» клітин при різкій зміні тонічності середовища.

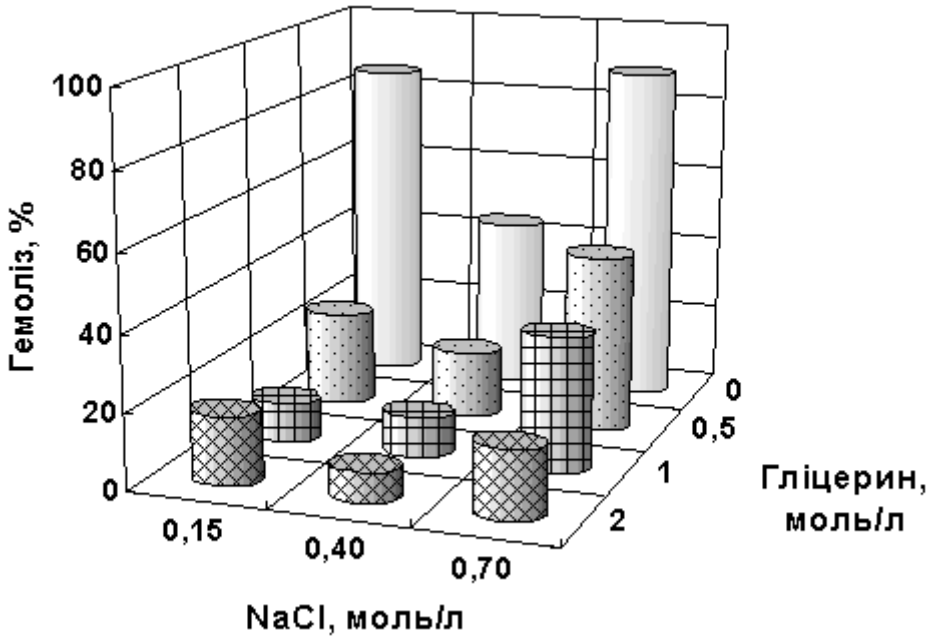



Рис. 18. Вплив гліцерину і середовищ попередньої експозиції на рівень гемолізу еритроцитів у середовищі, яке містить 4,0 моль/л NaCl, при 37°С.

Таким чином, сумісне використання гліцерину як проникаючої речовини і гіпертонічного NaCl як непроникаючої речовини на попередньому етапі дозволяє значно знизити рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини в розчині 4,0 моль/л NaCl.

Успіх кріоконсервування біологічного об'єкта в значній мірі залежить від вибору ефективного кріопротектора та умов його додавання до клітинної суспензії. Звичайно пошук умов здійснюється безпосередньо з використанням процедури заморожування, що є досить трудомістким і коштовним. У зв'язку з цим виникла необхідність розробки підходів, які дозволяють проводити скринінг оптимальних умов додавання кріопротекторів до клітинної суспензії, що підлягає заморожуванню, не здійснюючи саме процедуру заморожування-відігрівання біологічного матеріалу.

Еритроцити ссавців експонували з розчином не проникаючого в клітини кріопротектора ПЕО-1500 (приготовленому на фізіологічному розчині), після чого переносили в середовище, яке містить 4,0 моль/л NaCl (рис. 19). Рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців знижується по мірі збільшення концентрації ПЕО-1500 на попередньому етапі ГШ. Якщо при 37°С мінімальне значення гемолізу спостерігається у присутності 20% ПЕО-1500, то при 0°С захисні концентрації кріопротектора знижуються до 10–15%.

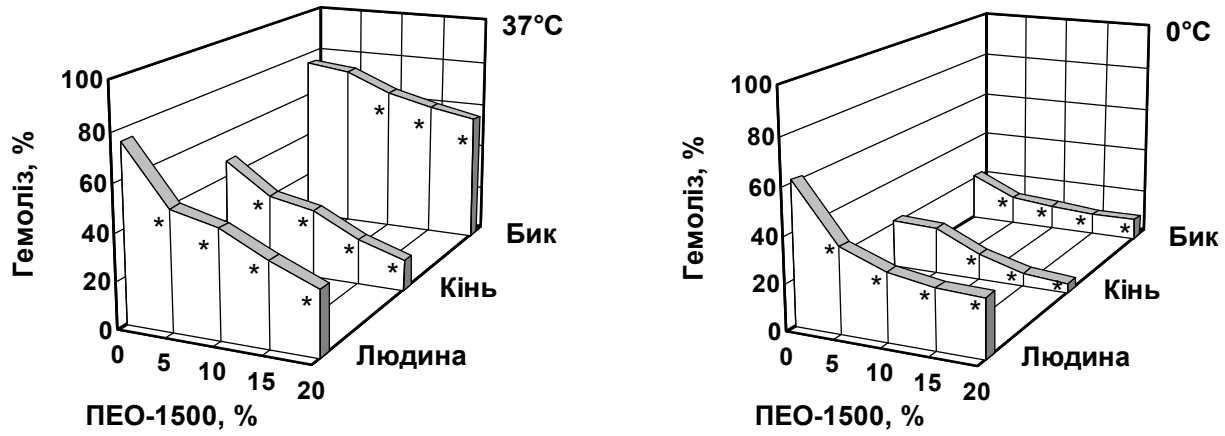



Рис. 19. Вплив ПЕО-1500 на гемоліз еритроцитів ссавців у 4,0 моль/л NaCl при 37 і 0°С.
Примітка. * – статистично значущі відмінності порівняно з показниками гемолізу контрольних клітин ($p < 0,05$).

Для еритроцитів всіх видів ссавців рівень гіпертонічного гемолізу в присутності ПЕО-1500 є більш низьким при 0°С, ніж при 37°С. При 0°С максимальна стійкість еритроцитів людини і коня до гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl) формується у тому кріопротекторному (15% ПЕО-1500) середовищі, осмоляльність якого відповідає значенням осмоляльності сольових середовищ, в яких відбувалося формування стійкого стану клітин до дії ГШ (див. рис. 15).

Збереження еритроцитів ссавців в результаті швидкого заморожування до −196ºС є вищим у тому випадку, коли кріопротектор додавали до клітинної суспензії при близьконульовій температурі (Бабійчук Л.О., 2002; Денисова О.М., 2006). Аналіз отриманих нами експериментальних даних щодо гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців при використанні кріопротектора в концентрації 15% також свідчить про те, що пошкодження клітин менше, якщо кріопротектор вводили в середовище при більш низькій температурі (0ºС).

Таким чином, використання модельного експерименту (ГШ) дозволяє проводити скринінг умов додавання непроникаючого кріопротектора на етапі, який передує заморожуванню клітин, і виявляти їх оптимальну комбінацію (температура, концентрація кріопротектора, тривалість еквілібрації з кріопротектором).

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне, експериментальне узагальнення й нове вирішення проблеми розкриття механізмів підвищення стійкості клітин до осмотичного і температурного впливу. Встановлено закономірності температурно-осмотичної стійкості еритроцитів різних видів ссавців та визначено умови, що забезпечують максимальну стійкість еритроцитів до температурно-осмотичного впливу, шляхом зміни вихідного стану клітин в

результаті комбінованої дії температури, осмоляльності, кріопротекторів і додавання до клітинної суспензії амфіфільних сполук.

1. Встановлено, що порогові концентрації NaCl при гіпотонічному лізисі еритроцитів ссавців (людина, бик, кінь, кролик, собака, щур) при 37 і 0ºС негативно корелюють із діаметром клітини ($r_s = -0,955$ і $-0,939$ відповідно, $p < 0,05$) і позитивно – зі значеннями поверхнево-об'ємного відношення ($r_s = 0,941$ і $0,926$ відповідно, $p < 0,05$). Значення індексу осмотичної крихкості еритроцитів при 37ºС негативно корелює з діаметром ($r_s = -0,975$, $p < 0,05$) і позитивно – з поверхнево-об'ємним відношенням ($r_s = 0,986$, $p < 0,05$). Більш стійкими до дії гіпотонічного лізису є еритроцити ссавців з великим діаметром і низьким значенням поверхнево-об'ємного відношення.

2. Виявлено, що порогові концентрації NaCl при гіпертонічному шоці еритроцитів ссавців позитивно корелюють з коефіцієнтом трансмембранної дифузії води ($r_s = 0,928$, $p < 0,05$) та вмістом внутрішньоклітинної води ($r_s = 0,841$, $p < 0,05$). Рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів в 4,0 моль/л NaCl позитивно корелює з гідрофобністю гемоглобіну ($r_s = 0,829$, $p < 0,05$). Більш стійкими до дії гіпертонічного шоку є еритроцити ссавців з високими значеннями дифузійної водної проникності мембрани, вмісту внутрішньоклітинної води та з низьким значенням гідрофобності гемоглобіну.

3. Встановлено, що порогові концентрації NaCl при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів ссавців позитивно корелюють з мембранним вмістом сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну, сфінгозину ($r_s = 0,878$, $p < 0,05$) і негативно – з вмістом фосфатидилхоліну ($r_s = -0,878$, $p < 0,05$). Рівень гемолізу в 0,8 моль/л NaCl при охолодженні еритроцитів ссавців від 37 до 0°С позитивно корелює з вмістом фосфоліпідів, які містять холін ($r_s = 0,829$, $p < 0,05$), і негативно – з вмістом холестерину і фосфатидилетаноламіну ($r_s = -0,900$ і $-0,886$ відповідно, $p < 0,05$). Більш стійкими до дії гіпертонічного кріогемолізу є еритроцити ссавців, мембрани яких характеризуються високим вмістом холестерину, сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну і низьким вмістом фосфатидилхолінів.

4. Показано, що еритроцити різних видів тварин (бик, кролик, щур, кінь, собака) і людини починають гемолізувати в умовах гіпертонічного кріогемолізу при експозиції в розчинах хлориду натрію, осмоляльність яких перевищує 800–1170 мосмоль/кг. Значення осмоляльності, за яких спостерігається вихід катіонів калію з клітин ссавців при 37°С, є пороговими для розвитку гемолітичного пошкодження еритроцитів при наступному охолодженні.

5. Виявлено, що в умовах тривалої експозиції еритроцитів людини, коня, кролика і бика у гіпертонічних розчинах (1,2 моль/л NaCl) при 37°С спостерігається збільшення виходу $K^+$ з клітин, у той час як характер розвитку гемолітичного пошкодження на етапі наступного охолодження клітин до 0°С залежить від виду ссавця.

6. При охолодженні від 37°С гемолітичне пошкодження еритроцитів бика і кролика починається при досягненні більш низької температури (10°С), ніж для еритроцитів людини, щура, собаки і коня (15°С). Для прояви пошкодження еритроцитів при охолодженні до 0°С температура, від якої має починатися

охолодження, знижується в ряду: кролик (30°С) > бик (25°С) > кінь (20°С) > людина, собака (15°С) > щур (10°С).

7. Амфіфільні сполуки різних класів (катіонні, аніонні та неіонні) проявляють антигемолітичну активність при гіпертонічному кріогемолізі і гіпертонічному шоці еритроцитів ссавців. При всіх типах стресу більш ефективні катіонні сполуки. Ефективність амфіфільних сполук залежить від видової приналежності еритроцитів і, як правило, підвищується в ряду: гіпертонічний шок (0°С), гіпертонічний кріогемоліз, гіпертонічний шок (37°С).

8. Показано, що використання амфіфілів різних класів в антигемолітичних концентраціях не призводить до зміни бар'єрної функції мембран еритроцитів (по відношенню до катіонів $K^+$). Ефективність катіонного трифторперазину в умовах гіпертонічного шоку еритроцитів людини не залежить від стану білкових компонентів мембрани, модифікованих протеолітичними ферментами (проназа, трипсин, папаїн) і нейрамінідазою. Катіонний хлорпромазин (50–300 мкмоль/л) не впливає на розподіл фосфатидилсерину в мембрані.

9. Встановлено, що величини максимальної антигемолітичної активності гомологів глюкопіранозиду (гексил-, октил- і децил-β,D-глюкопіранозид) складають 90–94% при гіпертонічному шоці і гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів людини. Значення ефективних концентрацій алкіл-β,D-глюкопіранозидів знижуються в 10–15 разів при подовженні алкільного ланцюга молекули на кожні 2 вуглецевих атома. Розраховані величини відношення ліпід/амфіфіл у мембрані мають близькі значення і складають 26,3–28,4 при гіпертонічному шоці та 7,7–15,8 при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів людини.

10. Дія амфіфільних сполук (додецил-β,D-мальтозид, додецилсульфат натрію, хлорпромазин) проявляється в зміні мікров'язкості мембран еритроцитів, при цьому трансмембранна локалізація ефекту визначається фізико-хімічними властивостями амфіфільних молекул. Високі концентрації хлорпромазину (300−700 мкмоль/л) викликають порушення бар'єрних властивостей мембран еритроцитів (по відношенню до іонів фериціаніду), а у присутності низьких концентрацій речовини (50−200 мкмоль/л) бар'єрна функція мембрани зберігається.

11. Показано, що вихідний стан еритроцитів ссавців значною мірою визначає їх стійкість до гіпертонічного шоку. Для еритроцитів кожного виду ссавців визначено осмотичні умови, за яких формується початковий стан клітин, який забезпечує їх максимальну стійкість до подальшої дії гіпертонічного шоку: осмоляльність середовищ для клітин щура становить 550–700; коня – 700, бика – 1760 мосмоль/кг при 37°С.

12. Визначені оптимальні концентраційні (15%, 700 мосмоль/кг) і температурні (0°С) умови обробки еритроцитів людини, коня та бика непроникаючим кріопротектором (поліетиленоксид із середньою молекулярною масою 1500), які забезпечують максимальну стійкість клітин до гіпертонічного шоку.

13. Захисний ефект гліцерину залежить як від експериментальних умов, так і від видової приналежності клітин. При 37°С попередня експозиція клітин з гліцерином викликає істотне зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів

людини і бика, для еритроцитів коня ефект даного кріопротектора є слабко вираженим. При 0°С захисна дія гліцерину спостерігається тільки для клітин людини. Показано, що при комбінованій дії гліцерину (0,5–2,0 моль/л) і NaCl (0,15–0,7 моль/л) на етапі попередньої обробки еритроцитів людини спостерігається значне зниження гіпертонічного лізису еритроцитів: до 10 разів при 37°С і до 4 разів при 0°С.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шпакова Н. М. Модифицирующий эффект конканавалина А и диамида на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку / Н. М. Шпакова, А. Ю. Семенченко, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 5. – С. 923–929.

2. Шпакова Н. М. Механизм криогемолиза эритроцитов, индуцированного катионными амфипатами: синергизм индукции перехода "дискоцит-стоматоцит III" при действии хлорпромазина и тоничности среды / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Украинский биохимический журнал. – 1991. – Т. 63, № 6. – С. 83–88.

3. Шпакова Н. М. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 12. – С. 2125–2130.

4. Шпакова Н. М. Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 3. – С. 15–20.

5. Шпакова Н. М. Чувствительность модифицированных хлорпромазином эритроцитов к холодовому шоку / Н. М. Шпакова, Л. В. Шеремет // Украинский биохимический журнал. – 1993. – Т. 65, № 1. – С. 69–74.

6. Дунаевская О. Н. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействиям при использовании катионных амфипатов / О. Н. Дунаевська, Е. Р. Панталер, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 1. – С. 21–27.

7. Шпакова Н. М. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов / Н. М. Шпакова, Е. Р. Панталер, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 10. – С. 1624–1631.

8. Дунаевская О. Н. Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов / О. Н. Дунаевская, Н. М. Шпакова // Украинский биохимический журнал. – 1997. – Т. 69, № 2. – С. 30–35.

9. Дунаевская О. Н. Гипертонический стресс эритроцитов и антигемолитическая активность трифторперазина / О. Н. Дунаевская, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 4. – С. 28-32.

10. Шпакова Н. М. Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку / Н. М. Шпакова, Е. Р. Панталер, Н. В. Орлова // Проблемы криобиологии. – 1999. – № 3. – С. 10–15.

11. Орлова Н. В. Действие хлорпромазина на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов / Н. В. Орлова, Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова // Биологический. вестник. – 1999. – Т. 3, № 1–2. – С. 71–75.

12. Кулешова Л. Г. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений / Л. Г. Кулешова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 8–14.

13. Сынчикова О. П. Влияние алкил-β,D-глюкопиранозидов на температурозависимый гипертонический гемолиз эритроцитов, модифицированных фенилгидразином / О. П. Сынчикова, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биологический вестник. – 2001. – Т. 5, № 1–2. – С. 81–86.

14. Цымбал Л. В. Влияние антигемолитических агентов на структурно-динамическое состояние мембран эритроцитов / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Вісник Харківського університету. Біофізичний вісник. − 2002. − Вип. 1 (10), № 560. − С. 68–72.

15. Сынчикова О. П. Физическая модель гипертонического гемолиза / О. П. Сынчикова, Н. М. Шпакова, Т. А. Стрелкова, В. А. Бондаренко // Вісник Харківського університету. Біофізичний вісник. − 2002. − Вип. 1 (10), № 560. − С. 78−81.

16. Матвиенко Е. А. Возрастные особенности устойчивости эритроцитов крыс к гипертоническому воздействию под влиянием хлорпромазина / Е. А. Матвиенко, Л. В. Коба, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 19–23.

17. Шпакова Н. М. Действие трифторперазина на гемолиз эритроцитов в гипертонических растворах электролитов / Н. М., Шпакова, О. Н. Дунаевская, О. П. Сынчикова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 3. – С. 7–15.

18. Орлова Н. В. Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 59–64.

19. Synchykova O. P. Effect of alkyl-β,D-glucopyranosides on hypertonic haemolysis of erythrocytes / O. P. Synchykova, N. M. Shpakova, V. A. Bondarenko // Bioelectrochemistry. – 2004. – Vol. 62, № 2. – P. 163–167.

20. Ершов С. С. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51–57.

21. Цымбал Л. В. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Биологические мембраны. – 2005. – Т. 22, № 4. – С. 327–335.

22. Єршов С. С. Порівняльний аналіз гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища / С. С. Єршов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Біологія тварин. – 2006. – Т. 8, № 1-2. – С. 123–129.

23. Шпакова Н. М. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова, С. С. Ершов // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 3. – С. 286–291.

24. Орлова Н. В. Механізм захисної дії амфіфільних сполук в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т. 52, № 5. – С. 55–61.

25. Александрова Д. И. Влияние предварительного обезвоживания эритроцитов человека и быка на устойчивость к гипертоническому шоку при разных температурах / Д. И. Александрова, Н. М. Шпакова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 1. – С. 73–77.

26. Шпакова Н. М. Реакция эритроцитов человека, быка и кроля на изменение осмотических и температурных параметров среды / Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Н. В. Орлова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 4. – С. 81–85.

27. Ершов С. С. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих в средах с различним катионным составом / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 243–250.

28. Александрова Д. І. Сравнительное исследование чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу / Д. І. Александрова, Н. В. Орлова., Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 4. – С. 327–334.

29. Писаренко Н. А. Влияние амфифильных соединений на гипертонический стресс эритроцитов человека и быка / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Вісник Харківського університету. Серія : біологія. – 2007. – Вип. 5, № 768. – С. 145–149.

30. Александрова Д. І. Влияние прединкубации эритроцитов человека и быка в растворах сахарозы на устойчивость клеток к гипертоническому шоку / Д. І. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Вісник Харківського університету. Серія: біологія. – 2007. – Вип. 6, № 788. – С. 110–115.

31. Єршов С. С. Вплив катіонних та аніонних амфіфільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 78–84.

32. Шпакова Н. М. Корекція гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини і бика за допомогою аніонних амфіфільних сполук / Н. М. Шпакова, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова, В. М. Хмельков // Біологія тварин. – 2007. – Т. 9, № 1–2. – С. 146–151.

33. Шпакова Н. М. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів $K^+$ і розвитком гемолітичного пошкодження еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного кріогемолізу / Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Ніпот // Біологія тварин. – 2008. – Т. 10, № 1–2. – С. 164–170.

34. Шпакова Н. М. Роль глицерина в коррекции гипертонической чувствительности эритроцитов человека / Н. М. Шпакова // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – № 1. – С. 43–47.

35. Шпакова Н. М. Влияние инкубации эритроцитов лошади при 49°С на эффективность амфифильных веществ в условиях гипертонического стресса / Н. М. Шпакова, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова // Проблемы криобиологии. – 2009. – № 1. – С. 49–55.

36. Писаренко Н. А. Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих, модифицированных фенилгидразином / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Вісник Харківського університету. Серія : біологія. – 2009. – Вип. 9, № 856. – С. 166–172.

37. Александрова Д. И. Исходное состояние эритроцитов – фактор, определяющий их чувствительность к гипертоническому стрессу: Роль ПЭО-1500 и температуры / Д. И. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2009. – № 4. – С. 406–412.

38. Шпакова Н. М. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью алкил-β,D-глюкопиранозидов / Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, № 4. – С. 449–460.

39. Шпакова Н. М. Осмотичний і температурний стрес еритроцитів різних видів ссавців / Н. М. Шпакова // Біологія тварин – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 382–391.

40. Писаренко Н. А. Влияние амфифильных веществ на гипертонический гемолиз эритроцитов, модифицированных температурой 49°С / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 388–395.

41. Шпакова Н. М. Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців в електролітному та неелектролітному середовищі / Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Ніпот // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 498–504.

42. Shpakova N. M. Hypertonic cryohemolysis in bovine, equine, canine and human erythrocytes: osmotic and temperature peculiarities / N. M. Shpakova, S. S. Ershov, N. V. Orlova // Біологія тварин. – 2011.– Т. 13, № 1–2. – С. 320–328.

43. Ершова Н. А. Влияние фенилгидразина и алкилсульфатов на осмотическую чувствительность эритроцитов млекопитающих / Н. А. Ершова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Доповіді Національної академії наук України. – 2012. – № 6. – С.129–133.

44. Шпакова Н. М. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих после их истощения по АТФ / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, Н. В. Орлова, Д. И Александрова, О. А. Шапкина // Доповіді Національної академії наук України. – 2013. – № 1. – С.151–156.

45. Пат. 37514 Україна, МПК [8] G 01 N 33/49. Спосіб зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, В. А Бондаренко; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № u 2008 09235; заявл. 15.07.2008; опубл. 25.11.2008, Бюл. № 22.

46. Пат. 38944 Україна, МПК [8] A 01 N 1/00. Спосіб зниження холодового шоку еритроцитів людини / Н. М.Шпакова , Н. В. Орлова, В. А. Бондаренко; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Національної академії наук України. – № u 2008 10779; заявл. 01.09.2008 опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.

47. Пат. 52701 Україна, МПК [8] G 01 N 33/48. Спосіб деструкції еритроцитів / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова , Д. І. Александрова ; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № u 2010 00983; заявл. 01.02.2010; опубл. 10.09.2010, Бюл. № 17.

48. Пат. 50069 Україна, МПК [8] G 01 N 33/48. Спосіб визначення температурних умов інкубування еритроцитів з ПЕО-1500 / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Д. І. Александрова, О. М. Денисова; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № u 2009 11892; заявл. 20.11.2009; опубл. 25.05.2010, Бюл. № 10.

49. Воинова М. В. Катионные амфипаты: электростатический контроль формы эритроцитов / М. В. Воинова, Н. М. Шпакова // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии [сб. науч. трудов / отв. ред. М. И. Шраго]. – Киев : Наук. думка, 1989. – С. 3–6.

50. Шпакова Н. М. Модифицирующее влияние хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биохимические аспекты холодовой адаптации [сб. науч. трудов / отв. ред. Гулевский А. К.]. . – К.: Наук. думка, 1991. – С. 152–158.

51. Орлова Н. В. Влияние температуры на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Актуальные проблемы медицины и биологии, № 1. Киев, 2004. – С. 181–184.

52. Цымбал Л. В. Возможная роль полиморфизма биологических мембран в реакции клеток на физико-химические воздействия / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова, Я. О. Нардид // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : международная научная конференция, IV съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 6–8 октября 2004 г. : сборник статей. – Минск, 2004. – С. 281–283.

53. Ершов С. С. Связь явления холодового шока со структурными переходами в мембране эритроцитов собаки / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова, Л. В. Цымбал // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : международная научная конференция, VII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 21–23 июня 2006 г. : сборник статей. – Минск, 2006. – Т. 1. – С. 241–243.

54. Шпакова Н. М. Влияние алкилсульфатов на гипертонический гемолиз эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова., Н. А. Писаренко, Е. Е. Нипот // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – 2010. – Вип. 21, Ч. 2, Т. *2*. – С. 89–96.

55. Шпакова Н. М. Влияние амфифильных соединений на гипертонический криогемолиз эритроцитов, модифицированных фенилгидразином / Н. М. Шпакова, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова, С. С. Ершов, Е. Е. Нипот, Д. И. Александрова // Высокие технологии, фундаментальне и прикладные исследования в физиологии и медицине : I международная научно-практическая конференциия, 23–26 ноября

2010 г. : [сб. трудов / ред. А. П. Кудинов, Б. В. Крылов]. – Санкт-Петербург, Розсип, 2010. – С. 235–240.

56. Шпакова Н. М. Влияние хлорида ртути на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот., Н. В. Орлова // Актуальные проблемы ветеринарной биологии. – 2012. – 3 (15). – С. 8–12.

57. Шпакова Н. М. Влияние хлорпромазина на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов и на структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, С. С. Ершов, В. А. Бондаренко. // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / ред А. Н. Гольцев. – Харьков : Издательский дом «Райдер», 2012. – С. 207–228.

58. Воинова М. В. Влияние хлорпромазина на устойчивость и деформацию мембран эритроцитов в условиях температурного и осмотического стресса / М. В. Воинова, Н. М. Шпакова. // Успехи современной криобиологии : II Международная конференция, 21–25 апреля 1992 г. : тезисы докл. – Харьков, 1992. – С. 31–32.

59. Шпакова Н. М. Модификация плазматической мембраны и устойчивость эритроцитов к холодовому шоку / Н. М. Шпакова // Успехи современной криобиологии : II Международная конференция, 21–25 апреля 1992 г. : тезисы докл. – Харьков, 1992. – С. 205–206.

60. Дунаєвська О. М. Можливості управління стійкістю еритроцитів до гіперосмотичного стресу: роль початкового стану клітин та катіонних амфіпатів / О. М. Дунаєвська, О. Р. Панталер, Н. М. Шпакова // І з'їзд Українського біофізичного товариства, 21–24 червня 1994 р. : тези доповід. – Київ, 1994. – С. 93.

61. Панталер О. Р. Вплив початкового ступеню дегідратації цитоматриксу та температури на кінетичні параметри гіперосмотичного лізису еритроцитів / О. Р. Панталер, М. В. Воїнова, Н. М. Шпакова // І з'їзд Українського біофізичного товариства, 21–24 червня 1994 р. : тези доповід. – Київ, 1994. – С. 184–185.

62. Bondarenko V. Alternative principle of cryobiology: elaboration of cellular mechanisms of cold and osmotic stability / V. Bondarenko, T. Bondarenko, N. Shpakova, N. Pesina, E Kudokotseva, E. Pantaler //31st Annual Meeting of Society for Cryobiology «CRYO-94», August, 21–26, 1994 : Abstracts. – Kyoto (Japan), 1994. – P. 27.

63. Bondarenko V. The formation and development of a transmembrane pore as a decisive event in the thermal and osmotic effect / V. Bondarenko, E. Pantaler, T. Bondarenko, N. Shpakova, N. Pesina, E. Kudokotseva // 32nd Annual Meeting of Society for Cryobiology «CRYO-95», July, 6–11, 1995 : Abstracts. – Madison Wisconsin (USA), 1995. – P. 54.

64. Панталер О. Р. Температурная и фармакологическая коррекция эволюции трансмембранной поры в условиях гиперосмотического шока / О. Р. Панталер, Н. М. Шпакова., В. А. Бондаренко // І з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини, 18–20 жовтня 1995 р : тези доповід. – Харків, 1995. – С. 191–193.

65. Pantaler E. R. Preconditioning effects on cells' structural reactivity under hyperosmotic stress / E. R. Pantaler, N. M. Shpakova., T. P. Bondarenko, E. V. Kudokotseva, V. A. Bondarenko // 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO-97», June, 8-12, 1997 : Abstracts book. – Barselona (Spain), 1997. – P. 119.

66. Shpakova N. M. Amphiphilic substances increase the stability of erythrocytes to the action of cold and hyperosmotic stress / N. M. Shpakova, L. V. Koba, V. A. Bondarenko, A. S. Kozlov, N. V. Orlova, E. R. Pantaler // 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO-97», June, 8–12, 1997 : Abstracts book. – Barselona (Spain), 1997. – P. 160.

67. Shpakova N. M. Antihemolytic effect of amphiphilic compounds at cold and hyperosmotic stress of erythrocytes / N. M. Shpakova, E. R. Pantaler, O. N. Dunayevskaya, V. A. Bondarenko // XI Meeting of the European Association for Red Cell Research, 17–21 April 1997 : Abstracts. – Gozd Martuljek (Slovenia), 1997. – P. 62.

68. Pantaler E. R. Mechanical stress and hemin pretreatment effects on kinetic parameters of erythrocytes responce to hyperosmotic shock / E. R. Pantaler, N. M. Shpakova // Cellular & Molecular Biology Letters. – 1998. – Vol. 3, № 2. – P. 193.

69. Шпакова Н. М. Ефекти катіонних і неіонних амфіфільних сполук при холодовому та гіперосмотичному стресі еритроцитів / Н. М. Шпакова, О. Р. Панталер, Н. В. Орлова // ІІ з'їзд Українського біофізичного товариства, 29 червня – 3 липня 1998 р. : тези доповід. – Харків, 1998. – С. 198.

70. Бондаренко В. А. До питання про механізми захисної дії катіонних та неіонних сполук в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів / В. А. Бондаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, О. М. Дунаєвська, О. П. Синчикова // ІІ з'їзд трансплантологів України, 18–20 жовтня 2000 р. : тези доповід. – Київ, 2000. – Трансплантологія. – 2000. – Т. 1, № 1. – С. 298–299.

71. Shpakova N. M. Antihemolytic activity of trifluoperazine during hypertonic shock of erythrocytes / N. M. Shpakova, O. N. Dunayevskaya, O. P. Synchykova // On molecular biology and genetics : conference for students, PhD students and young scientists, September 20–22, 2001 : abstracts. – Kyiv (Ukraine), 2001. – P. 170.

72. Synchykova O. P. Structural and functional state of erythrocyte membranes under the effect of amphiphilic compounds / O. P. Synchykova., N. V. Orlova, L. V. Tsymbal, N. M. Shpakova., O. A. Kophanova // ІІІ з їзд Українського біофізичного товариства, 8–11 жовтня 2002. – тези доповід. – Львів, 2002. – С. 92.

73. Synchykova O. P. Correction of the temperature-dependent hypertonic haemolysis of erythrocytes by alkyl-β,D-glucopyranosides / O. P. Synchykova, N. M. Shpakova, V. A. Bondarenko // 14th Meeting of the European Association for Red Cell Research, April 24–28 2003 : Thesises. – Roscoff (France), 2003. – P. 47–48.

74. Цымбал Л. В. Влияние температуры и хлорпромазина на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблеми біологічної і медичної фізики : І Українська наукова конференція, 20–22 вересня 2004 : тези доповід. – Харків, 2004. – С. 114.

75. Єршов С. С. Вплив хлорпромазину на чутливість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку / С. С. Єршов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 25–28 квітня 2004 р. : тези доповід. – Львів, 2004. – С. 63.

76. Орлова Н. В. Влияние диамида на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений при гипертоническом гемолизе эритроцитов

/ Н. В. Орлова, Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова // Актуальні проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини. Структурна і морфофункціональна організація стовбурових клітин за умов дії низьких температур : міжнародна конференція, 22–24 листопада 2005 р. : тези доповідей. – Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 536–537.

77. Ершов С. С. Участие ионтранспортных систем в развитии чувствительности эритроцитов млекопитающих к холодовому шоку / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // IX Український біохімічний з'їзд, 24–27 жовтня 2006 р. : тези доповід. – Харків, 2006. – Т. 2. – С. 54.

78. Ершов С. С. Особенности динамической структуры цитоплазмы эритроцитов различных видов животных / С. С. Ершов, Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // IV з'їзд Українського біофізичного товариства, 19–21 грудня 2006 р.: тези доповід. – Донецьк, 2006. – С. 49–50.

79. Писаренко Н. А. Вплив амфіфільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів кроля / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Молодь та поступ біології: міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 23–27 квітня 2007 р.: тези допов. – Львів, 2007. – С. 483–484.

80. Писаренко Н. А. Влияние додецил-β,D-мальтозида и хлорпромазина на гипертонический стресс эритроцитов лошади и кроля / Н. А. Писаренко, С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине : междунар. науч.-практ. конф., 10-12 октября 2007 г. : тезисы докл. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 32–33.

81. Александрова Д. І. Гиперосмотический шок эритроцитов лошади / Д. І. Александрова, О. А. Олейник, Н. М. Шпакова // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине: междунар. науч.-практ. конф., 10–12 октября 2007 г. : тезисы докл. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 47.

82. Єршов С. С. Вплив попередньої інкубації при температурі 49°С та обробки фенілгідразіном на рівень гіпертонічного шоку та гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. М. Шпакова // 2 з'їзд Українського товариства клітинної біології, 23–26 жовтня 2007 р. : тези доповід. – Київ, 2007. – С. 62.

83. Цымбал Л. В. Влияние хлорида натрия на динамическую структуру водно-белковой матрицы цитоплазмы эритроцитов быка / Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Н. В. Орлова // Состояние воды в биологических и модельных системах : мат. 1 междунар. конф., Тверь, 20–21 декабря 2007 г. – С. 72–73.

84. Шпакова Н. М. К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина при изменении осмотических и температурных параметров среды / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Л. В. Цымбал // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 180.

85. Єршов С. С. Вплив амфіфілів різних класів на морфологію еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Молодь та поступ біології : IV міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 7–10 квітня 2008 р. : тези доповід. – Львів, 2008. – С. 28–29.

86. Александрова Д. І. Механічний стрес еритроцитів людини, щура, кроля / Д. І. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Біофізичні механізми функціонування живих систем : міжнар. наук. конф., присвячена 70-річчю від народження О.А. Гойди, 16–18 жовтня 2008 р.: тези доповід. – Львів, 2008. – С. 29–30.

87. Александрова Д. И. Влияние криопротекторов на гипертоническую устойчивость эритроцитов млекопитающих / Д. И. Александрова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия : междунар. конф., Пущино, 28–30 октября 2008 г.: материалы конф. – Биофизика живой клетки. – 2009. – Т. 9. – С. 9–10.

88. Писаренко Н. А. Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих, модифицированных фенилгидразином / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: междунар. конф., Пущино, 28–30 октября 2008 г.: материалы конф. – Биофизика живой клетки. – 2009. – Т. 9. – С. 103.

89. Shpakova N. Comparative analysis of mammalian erythrocyte resistance to mechanical stress / N. Shpakova, D. Alexandrova, N. Orlova // 17 International Symposium of the European Association for Red Cell Research, 23–27 April 2009. – Milano (Italy), 2009. – P. 67.

90. Александрова Д. И. Влияние предварительной инкубации в растворах глицерина на гипертонический гемолиз эритроцитов быка / Д. И. Александрова., Н. А. Писаренко, Е. Е. Нипот, С. С. Ершов, Н. М. Шпакова // Биология – наука XXI века : 15 международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 18–22 апреля 2011, тезисы докл. – Пущино, 2011. – С. 62–63.

91. Шпакова Н М. Особенности динамики развития гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих в присутствии хлорида ртути / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, Н. В. Орлова // Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ – 2012 : VIII Міжнар. наук.-техн. конф., 23–27 квітня 2012 р. : тези доповід. – Севастополь, 2012. – С. 27–28.

92. Ершов С. С. Связь между выходом ионов $K^+$ и гипертоническим криогемолизом эритроцитов разных видов млекопитающих / С. С. Ершов, Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, Н. В. Орлова, Н. А. Ершова // Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ – 2012 : VIII Міжнар. наук.-техн. конф., 23–27 квітня 2012 р. : тези доповід. – Севастополь, 2012. – С. 28–30.

93. Шпакова Н. М. Вплив гліцерину на гіпертонічний стрес еритроцитів людини і коня / Н. М. Шпакова, О. Є. Ніпот, Д. І. Александрова, Н. В. Орлова, О. О. Шапкіна // 3 з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р. : тези доповід. – Ялта, 2012. – С. 47.

94. Шпакова Н. М. Оптимізація етапу обробки еритроцитів ПЕО-1500 перед заморожуванням / Н. М. Шпакова, Д. І. Александрова, О. М. Денисова, Н. В. Орлова // 3 з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р. : тези доповід. — Ялта, 2012. – С. 48.

95. Шпакова Н. М. Сочетанное действие глицерина и предварительного обезвоживания на гипертонический шок эритроцитов человека / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Е. Е. Нипот, Д. И. Александрова, С. С. Ершов, О. А. Шапкина // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины : научная конференция с международным участием, посвященная 40-летию создания Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 18–19 октября 2012 г. : тезисы докладов. – Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 344.

## АНОТАЦІЯ

**Шпакова Н.М Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків. – 2014.

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей і закономірностей стійкості еритроцитів ссавців до зміни температурних і осмотичних параметрів середовища, а також визначенню умов, які забезпечують максимальну стійкість клітин до температурно-осмотичного впливу шляхом модифікації вихідного стану під дією фізико-хімічних факторів середовища (температура, осмоляльність, кріопротектори) і при додаванні до клітинної суспензії амфіфільних сполук різної природи.

За допомогою кореляційного аналізу встановлено, що показники гіпотонічного лізису еритроцитів ссавців (людина, бик, кролик, щур, кінь і собака) корелюють з геометричними характеристиками клітин, гіпертонічного шоку – зі швидкістю водного транспорту, вмістом внутрішньоклітинної води, гідрофобністю гемоглобіну, а показники гіпертонічного кріогемолізу – з ліпідним складом еритроцитарної мембрани. Виявлено закономірності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців. Встановлено, що підвищення стійкості еритроцитів ссавців до температурно-осмотичного шоку при використанні амфіфільних сполук обумовлено зміною стану ліпідного бішару клітинної мембрани. Показано, що вихідний стан еритроцитів ссавців, який сформований за комбінованої дії температури, осмоляльності і кріопротекторів, визначає стійкість клітин до подальшого температурно-осмотичного шоку. Виявлено, що проникаючі і непроникаючі кріопротектори сприяють підвищенню стійкості еритроцитів різних видів ссавців до дії гіпертонічного шоку. Показана ефективність поєднаного використання гліцерину і NaCl (у помірно гіпертонічних концентраціях) при гіпертонічному шоці еритроцитів людини.

**Ключові слова:** еритроцити ссавців, температура та осмоляльність середовища, гіпертонічний шок, гіпертонічний кріогемоліз, гіпотонічний лізис, амфіфільні сполуки**,** кріопротектори.

# АННОТАЦИЯ

**Шпакова Н.М. Температурная и осмотическая устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих. – Рукопись**.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2014.

Диссертационная работа посвящена изучению особенностей и закономерностей устойчивости эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических параметров среды, а также определению условий, обеспечивающих максимальную устойчивость клеток к температурно-осмотическому воздействию путем модификации исходного состояния под действием физико-химических факторов среды (температура, осмоляльность, криопротекторы) и при использовании амфифильных соединений различной природы.

Исследованы условия и особенности проявления гипертонического шока, гипотонического лизиса и гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (человек, бык, кролик, крыса, лошадь, собака). С помощью корреляционного анализа выявлена статистически значимая связь между температурно-осмотической устойчивостью эритроцитов млекопитающих и их структурно-функциональными характеристиками. Установлено, что показатели гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих (человек, бык, кролик, крыса, лошадь и собака) коррелируют с поверхностно-объемным отношением и диаметром клеток, гипертонического шока – с водным транспортом, содержанием внутриклеточной воды, гидрофобностью гемоглобина; гипертонического криогемолиза – с липидным составом эритроцитарной мембраны. К действию гипотонического лизиса более устойчивы клетки с большим диаметром и низким значением поверхностно-объемного отношения. Показано, что к действию гипертонического шока большую устойчивость проявляют эритроциты млекопитающих, характеризующиеся высоким значением диффузионного водного транспорта, содержания внутриклеточной воды и низким значением гидрофобности гемоглобина. Эритроциты млекопитающих, мембраны которых характеризуются высоким содержанием холестерина, фосфатидилэтаноламина и низким содержанием фосфатидилхолинов, более устойчивыми к действию гипертонического криогемолиза.

На основе всестороннего анализа экспериментально полученных результатов по изучению криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих выявлены и сформулированы основные закономерности гипертонического криогемолиза эритроцитов животных.

Анализ экспериментальных данных, полученных при изучении устойчивости эритроцитов человека и животных к изменению температурно-осмотических условий среды, показал зависимость устойчивости не только от видовых особенностей исследуемых эритроцитов, но и от исходного состояния клеток. Таким образом, совокупность эндогенных и экзогенных факторов могут влиять прямо или опосредованно на устойчивость клеток к действию стресса.

В диссертации проведен комплексный анализ антигемолитической активности амфифильных соединений разных классов при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолизе. При всех типах стресса более эффективны катионные соединения. Установлено, что эффективность амфифильных соединений зависит от видовой принадлежности эритроцитов и повышается, как правило, в ряду: гипертонический шок (0°С), гипертонический криогемолиза, гипертонический шок (37°С).

Модификация белкового компонента мембраны в результате обработки эритроцитов протеолитическими ферментами и нейраминидазой не приводит к снижению эффективности амфифила в условиях температурно-осмотического стресса. Показано, что амфифильные соединения при использовании в концентрациях, соответствующих эффективным в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза, не оказывает влияния на барьерные свойства мембраны. Действие амфифильных соединений разных классов (додецил-β,D-мальтозид, додецилсульфат натрия, хлорпромазин) проявляется в изменении микровязкости мембран эритроцитов, причем трансмембранная локализация эффекта определяется физико-химическими свойствами амфифильных молекул. Показано, что величины максимальной антигемолитической активности гомологов глюкопиранозида при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолизе эритроцитов человека определяются внутримембранным содержанием амфифилов.

Показано, что исходное состояние эритроцитов млекопитающих, сформированное в результате комбинированного действия температуры, осмоляльности и криопротекторов, определяет устойчивость клеток к последующему температурно-осмотическому шоку. Выявлено, что проникающие и непроникающие криопротекторы способствуют повышению устойчивости эритроцитов разных видов млекопитающих к гипертоническому шоку. Показана эффективность сочетанного использования глицерина и NaCl (в умеренно гипертонических концентрациях) при гипертоническом шоке эритроцитов человека.

**Ключевые слова:** эритроциты млекопитающих, температура и осмоляльность среды, гипертонический шок, гипертонический криогемолиз, гипотонический лизис, амфифильные соединения**,** криопротекторы.

## ANNOTATION

**Shpakova N.M. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species. – A manuscript**.

Dissertation for the doctor of biological science degree in specialty 03.00.19 – Cryobiology. – Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2014.

The thesis covers the study of peculiarities and regularities of mammalian erythrocyte resistance to change in temperature and osmotic parameters of medium; as well as the determination of conditions providing the maximum cell resistance to temperature and osmotic effects via modifying an initial state under the effect of physical

and chemical factors of medium (temperature, osmolality, cryoprotectants) and when adding amphiphilic compounds of different origin into cellular suspension.

Using the correlation analysis we established the fact, that the indices of hypotonic lysis of mammalian (human, bovine, rabbit, rat, equine and canine) erythrocytes correlated with geometrical characteristics of cells, those of hypertonic shock did with water transport rate, the content of intracellular water, hemoglobin hydrophobicity and those of hypertonic cryohemolysis did with a lipid composition of erythrocyte membrane. The regularities of hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes were revealed. An increased resistance of mammalian erythrocytes to temperature and osmotic shock when using amphiphilic compounds was established to be stipulated by a change in state of lipid bilayer of erythrocyte membrane. The initial state of mammalian erythrocytes, formed as a result of a combined effect of temperature, osmolality and cryoprotectants was shown to determine the resistance of cells to the following temperature and osmotic shock. It was revealed that the penetrative and non-penetrative cryoprotectants contributed to an increase in resistance of erythrocytes of different mammalian species to hypertonic shock. The efficiency of combined usage of glycerol and NaCl (in moderately hypertonic concentrations) under hypertonic shock of human erythrocytes was demonstrated.

**Key words**: mammalian erythrocytes, temperature and osmolality of medium, hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis, hypotonic lysis, amphiphilic compounds, cryoprotectants.

**Відповідальний за випуск д.б.н., проф. Бабійчук Г. О.**