ХОЛОД У БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ: СУЧАСНИЙ СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ

ХОЛОД У БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ: сучасний стан і перспективи

ДО ЮВІЛЕЮ ІНСТИТУТУ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАН УКРАЇНИ

За редакцією доктора біологічних наук, професора О.Ю. ПЕТРЕНКА

ПРОЄКТ «НАУКОВА КНИГА»

КИЇВ • НАУКОВА ДУМКА • 2024

https://doi.org/10.15407/978-966-00-1867-9
УДК 57.043+615.832.9

У монографії висвітлено основні етапи становлення та розвитку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, обговорено найважливіші досягнення у кріобіології і кріомедицині, результати фундаментальних та прикладних досліджень, які мають пріоритетне значення. Розглянуто певні наукові напрями, які сформувалися за цей час і перетворилися на окремі наукові школи. Особливу увагу приділено базовим аспектам кріоконсервування біологічних об'єктів, механізмам холодової адаптації біологічних систем, сучасним методичним підходам щодо кріоконсервування генетичних ресурсів і стовбурових клітин різного походження, розвитку низькотемпературних технологій у сучасній біології та регенеративно-відновлювальній медицині.

Для фахівців біологічного й медичного профілів, студентів біологічних і медичних вишів, які цікавляться сучасними кріотехнологіями у біології та медицині.

The monograph highlights the main development stages of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. It provides an information about the major achievements in cryobiology and cryomedicine, fundamental and applied researches being of a priority value. Certain scientific directions formed during this time and coined as the separate scientific schools have been specially empasized. Particular attention is paid to the basic aspects of cryopreservation of biological objects, mechanisms of cold adaptation of biological systems, modern methodical approaches to cryopreservation of genetic resources and stem cells of various origins, development of low-temperature techniques in modern biology and regenerative medicine.

The monograph is intended to biologists and medical specialists, biology and medicine students, those having an interest in modern cryotechniques in biology and medicine.

Р е ц е н з е н т и:
доктор медичних наук, професор *О.С. Проценко*,
доктор біологічних наук, професор *Д.В. Колибо*,
доктор біологічних наук, професор *Н.Г. Малова*

Рекомендовано до друку вченою радою
Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
(протокол № 14 від 27.09.2021)

Видання здійснено за сприяння Благодійного фонду
«Підтримка науковців України і Харкова»

Науково-видавничий відділ природничо-технічної літератури
Редактори *Н.А. Серебрякова, К.С. Потійчук*

ISBN 978-966-00-1867-9

© Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2024
© НВП «Видавництво "Наукова думка" НАН України», дизайн, 2024

4. На моделі ранової поверхні моношару фібробластів виявлено, що холодовий стрес пригнічує проліферацію і міграцію клітин. Додавання даларгіну сприяє збереженню проліферативної і міграційної активності клітин, що прискорює відновлення площі ушкодженого моношару в умовах холодового стресу.

Перспективним для подальших досліджень у практичному плані може бути використання нейропептидів для захисту деяких органів (нирки, печінка, серце) в умовах їхнього гіпотермічного зберігання.

5.3. ЗАСТОСУВАННЯ АМФІФІЛЬНИХ РЕЧОВИН У ДОСЛІДЖЕННІ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

Н.М. Шпакова, О.О. Чабаненко, Н.В. Орлова, Н.А. Єршова, О.Є. Ніпот, О.О. Шапкіна, С.С. Єршов

Нині в Україні запаси донорської крові людини істотно обмежені через скорочення кількості донорів, поширення захворювань, що передаються з кров'ю, та збільшення попиту на неї за умов надзвичайних ситуацій і проведення бойових дій. Кріоконсервування забезпечує тривале зберігання компонентів крові з подальшим відновленням їхніх функцій після розморожування.

На сьогодні в кріобіології актуальним є дослідження процесів, що відбуваються на різних етапах низькотемпературного консервування біологічних об'єктів [55]. Для вивчення впливу чинників кріопошкоджень, які діють на етапі розморожування еритроцитів, а також при перенесенні в кровоносне русло клітин, кріоконсервованих під захистом проникного кріопротектора, використовують модель постгіпертонічного шоку (ПГШ) еритроцитів.

При розморожуванні кріоконсервованих еритроцитів у міру танення льоду позаклітинне гіпертонічне середовище змінюється на ізотонічне [103], унаслідок чого розвивається постгіпертонічний гемоліз (ПГГ) клітин.

Модель ПГШ передбачає вивчення розвитку ПГГ еритроцитів перенесенням їх із гіпертонічних умов в ізотонічні.

Механізм пошкодження клітин за умов ПГШ еритроцитів людини пов'язують із проникненням іонів натрію з позаклітинного середовища та їх зв'язуванням із внутрішньоклітинними білковими молекулами на етапі дегідратації, що призводить до додаткового входження води в клітини на етапі регідратації. Як наслідок, об'єм еритроцитів збільшується і за перевищення значення критичного гемолітичного об'єму клітини руйнуються, тобто розвивається ПГГ еритроцитів [72]. Спроби застосування підходів, спрямовані на зниження пошкодження еритроцитів за умов ПГШ [77], не мали успіху, і питання спрямованої корекції ПГГ еритроцитів залишається відкритим.

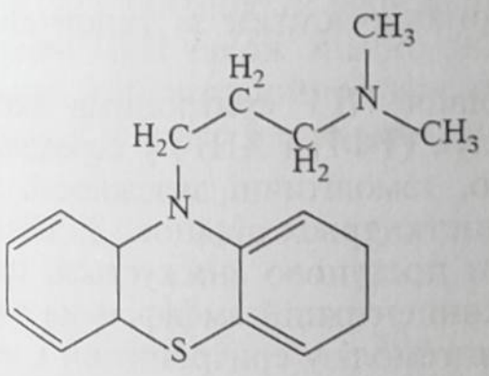
За використання амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, виявлено їхню антигемолітичну активність в умовах гіпертонічного шоку [102] і гіпертонічного кріогемолізу [14, 91], які моделюють вплив на клітини кріопошкоджувальних чинників, що діють на етапі заморожування. У зв'язку з цим доцільно дослідити розвиток ПГГ еритроцитів за наявності амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, які різняться за фізико-хімічними властивостями.

Ми в порівняльному аспекті вивчили вплив представників різних класів амфіфільних сполук (аніонний децилсульфат натрію, неіонний децил-β,*D*-

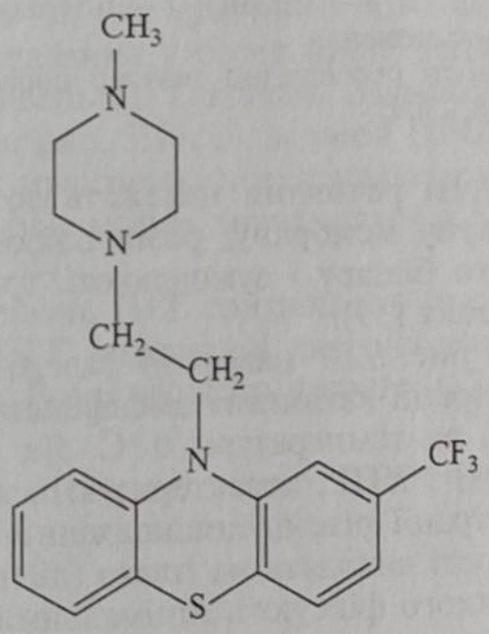
глюкопіранозид (ДГП), катіонні трифторперазин (ТФП) і хлорпромазин (ХПР)) на чутливість еритроцитів до постгіпертонічного шоку.

Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали ізотермічним перенесенням клітин із розчину, що містив 1,65 моль/л NaCl (середовище дегідратації), в розчин, що містив 0,15 моль/л NaCl (середовище регідратації), за температури 37 або 0 °С. Тривалість інкубування еритроцитів у середовищі дегідратації становила 20 хв, регідратації — 5 хв. Використання як середовища дегідратації 1,65 моль/л NaCl пов'язане з необхідністю отримати ПГГ еритроцитів на рівні 60—70 %. Амфіфільні речовини добавляли в середовище регідратації перед внесенням у нього клітин [88].

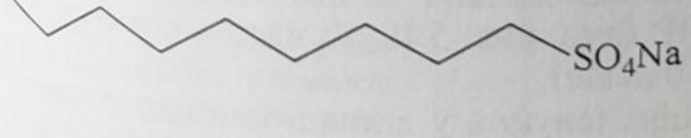
ТФП і ХПР належать до групи нейролептичних лікарських засобів, вони є похідними фенотіазину. Амфіфільність їхніх молекул обумовлена наявністю у них гідрофільної і гідрофобної частин. Гідрофобна частина молекул ХПР і ТФП представлена структурою трициклічного кільця, гідрофільна — відповідно четвертинним пропіламіном і бічним ланцюгом, що містить піперазин, заміщений біля атома азоту в положенні 4 на групу $-CH_3$. Гідрофільна частина молекул має позитивний заряд біля атома азоту. Структурні формули амфіфільних сполук наведено нижче.



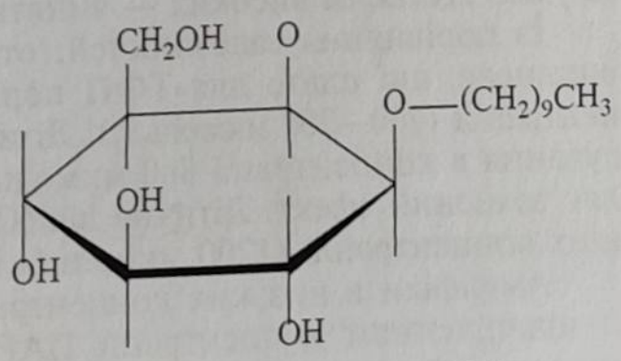
Хлорпромазин (ХПР)



Трифторперазин (ТФП)



Децилсульфат натрію (С10)



Децил-β,*D*-глюкопіранозид (ДГП)

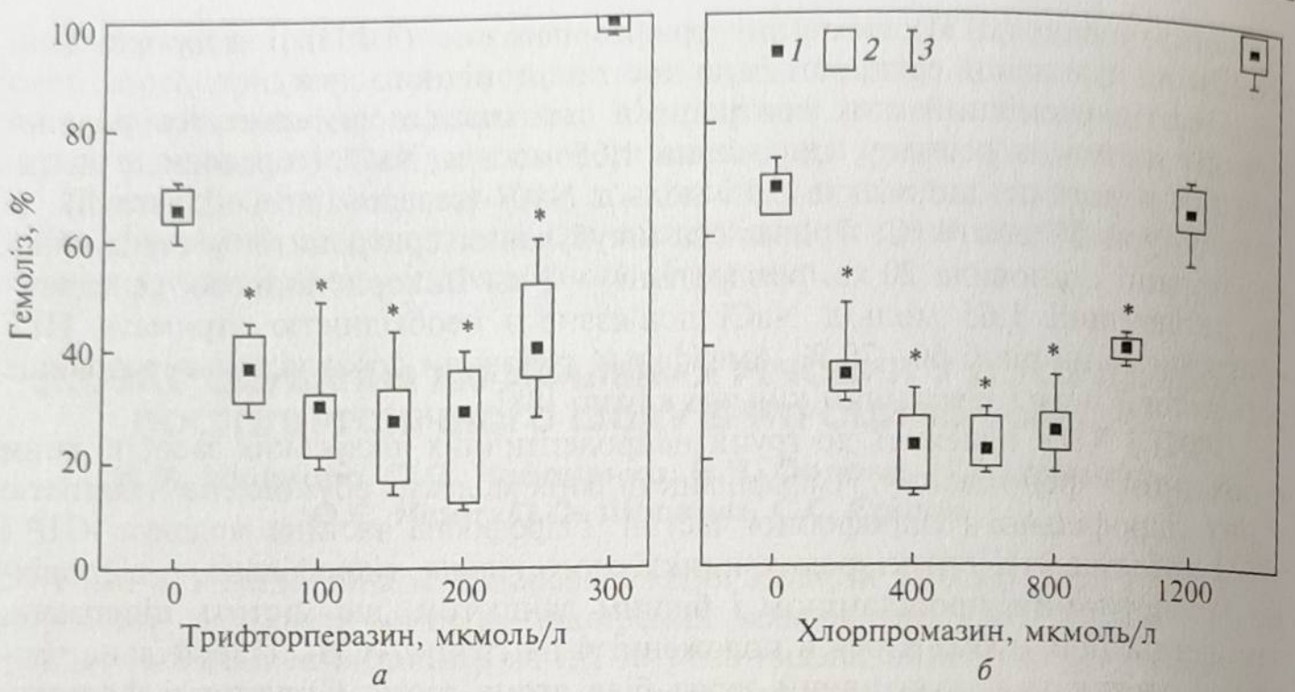


Рис. 5.10. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрацій трифторперазину (*а*) і хлорпромазину (*б*) у середовищі регідратації (0 °С). Тут і на рис. 5.11, 5.12: *1* — медіана; *2* — інтерквартильний інтервал (Q1—Q3); *3* — максимальне та мінімальне значення.

* Відмінності статистично значущі порівняно з результатами за відсутності амфіфільних сполук ($p < 0,05$)

Обидві речовини належать до катіонних ПАР, які вбудовуються в еритроцитарну мембрану, розподіляються переважно у внутрішньому моношарі ліпідного бішару і зумовлюють трансформацію клітин за типом дискоцит—стоматоцит [39].

На рис. 5.10 наведено залежності рівня ПГГ еритроцитів людини від концентрації катіонних амфіфільних сполук (ТФП і ХПР) у середовищі регідратації за температури 0 °С. Як бачимо, гемолітичні залежності, отримані для ТФП і ХПР, характеризуються наявністю трьох ділянок. Зі збільшенням концентрації рівень пошкодження клітин поступово знижується, після чого залежності виходять на плато (діапазон концентрацій амфіфільної сполуки, в межах якого фіксують мінімальний рівень гемолізу еритроцитів), і за подальшого підвищення концентрації амфіфілів ПГГ еритроцитів зростає. Отже, за низьких концентрацій ТФП і ХПР захищають еритроцити від пошкодження за умов ПГШ, за високих — чинять літичну дію на клітини.

Із порівняння залежностей, отриманих для ТФП і ХПР (див. рис. 5.10), випливає, що плато для ТФП порівняно з ХПР зміщене у бік нижчих концентрацій (100—200 мкмоль/л). Літична дія ТФП спостерігається за його застосування в концентрації 300 мкмоль/л, тоді як ХПР за цієї концентрації виявляє захисний ефект. Літична дія ХПР (див. рис. 5.10, *б*) настає за значно вищих концентрацій (1200 мкмоль/л і більше).

Амфіфіли в низьких концентраціях існують у вигляді істинних розчинів. З підвищенням концентрації ПАР їхні амфіфільні молекули або іони асоціюються й утворюють міцели. Концентрацію ПАР, за якої в розчині виникає велика кількість міцел і змінюються властивості розчину, називають критич-

ною концентрацією міцелоутворення (ККМ). Катіонні сполуки, що їх застосовували в дослідженні, розрізняються за структурою та фізико-хімічними властивостями. Так, величина ККМ для ТФП становить 42 мкмоль/л [66], для ХПР — 22 ммоль/л [39]. Слід зазначити, що концентрації ТФП, за яких фіксують мінімальний рівень ПГГ еритроцитів, перевищують значення його ККМ (42 мкмоль/л). Логічно припустити, що механізм захисної дії цієї амфіфільної сполуки пов'язаний з її здатністю до міцелоутворення.

Під час здійснення ПГШ еритроцитів за температури 37 °С ТФП і ХПР не тільки не знижують рівень ПГГ, а й спричинюють додаткові пошкодження клітин (результати не наведено).

На відміну від катіонних сполук (ТФП і ХПР) молекули аніонних і неіонних амфіфільних сполук вбудовуються і розподіляються в зовнішньому моношарі ліпідного бішару, про що свідчить зміна форми еритроцитів від дискоцитів до ехіноцитів [67]. Як аніонну ПАР було обрано гомолог алкілсульфату натрію з довжиною алкільного ланцюга 10 атомів вуглецю — децилсульфат натрію (С10). Молекули цієї аніонної сполуки мають гідрофобну частину – насичений аліфатичний ланцюг і гідрофільну частину — сульфатну групу, яка несе негативний заряд. Як неіонну ПАР використано похідне алкіл-β,*D*-глюкопіранозиду з довжиною ланцюга С10—децил-β,*D*-глюкопіранозид.

Проведення ПГШ еритроцитів людини (за температури 0 °С) з використанням С10 (рис. 5.11) показало, що за додавання в середовище регідратації амфіфільної сполуки значно знижується рівень ПГГ клітин. Зазначимо, що концентраційні залежності С10 і ХПР (див. рис. 5.10, *б*) за умов ПГШ еритроцитів людини подібні. Плато цих сполук практично перекриваються (200—800 мкмоль/л). Можливо, це пов'язано з близькими значеннями ККМ для ХПР і С10 (22 і 33 ммоль/л відповідно) [39, 44].

Неіонний ДГП також значно знижує рівень ПГГ еритроцитів (рис. 5.12). Особливістю концентраційної залежності ПГГ, отриманої для цієї амфіфільної сполуки, є широке плато концентрацій. Воно набагато ширше (у 3 рази) і

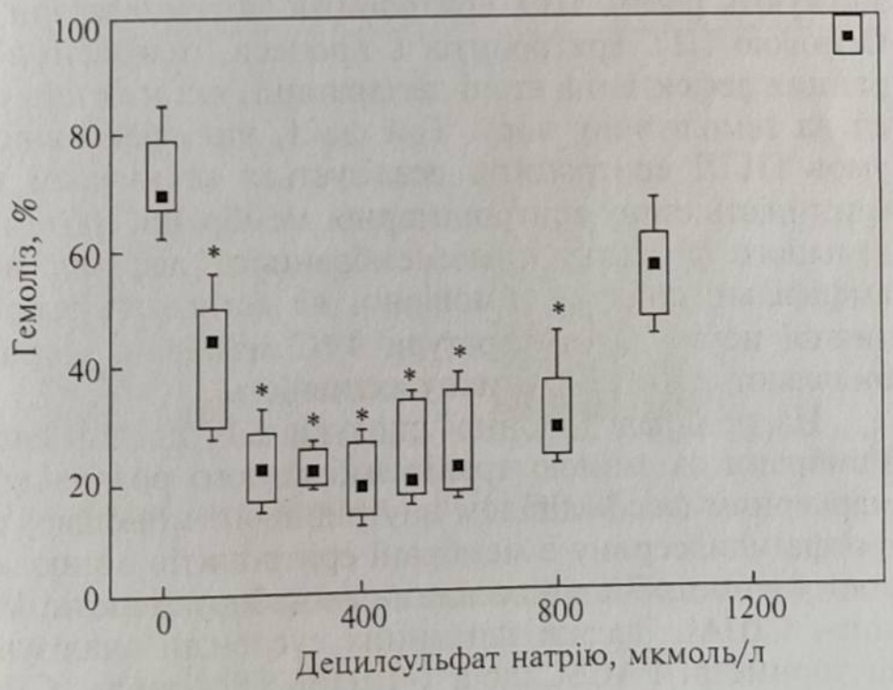


Рис. 5.11. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації децилсульфат натрію в середовищі регідратації (0 °С)

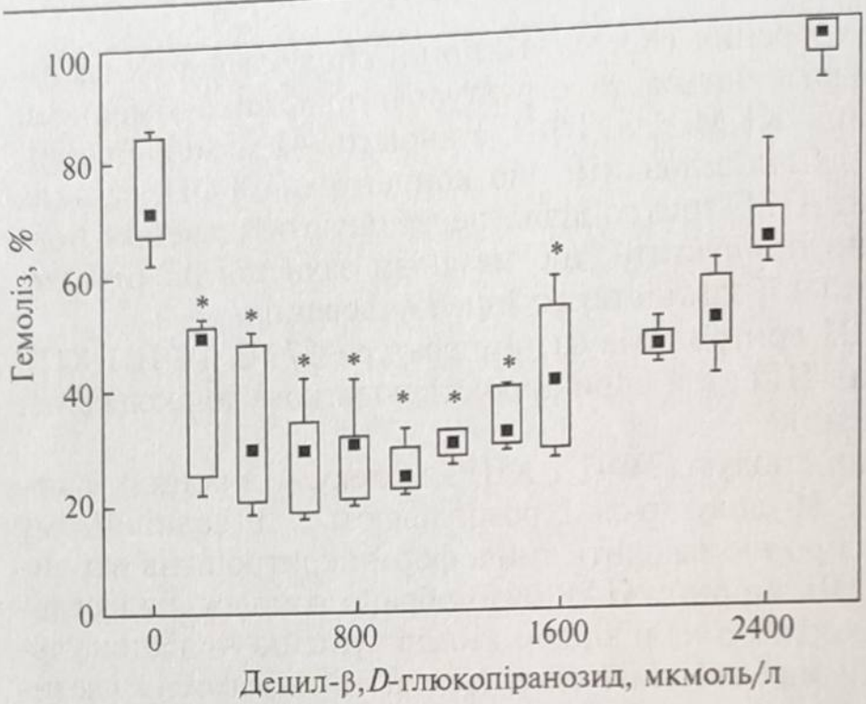


Рис. 5.12. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації децил-β,*D*-глюкопіранозиду в середовищі регідратації (0 °С)

зміщується вправо у бік вищих концентрацій ДГП порівняно з плато ХПР (див. рис. 5.10, *б*) і С10 (див. рис. 5.11). Незважаючи на зазначені відмінності в розмірах плато для досліджуваних речовин, існують ділянки, які перекриваються, тобто є спільними (400—600 мкмоль/л) для всіх досліджуваних амфіфілів, окрім ТФП (див. рис. 5.10, *а*).

За температури 37 °С С10 і ДГП практично не знижували рівень ПГГ еритроцитів людини (результати не наведено).

Згідно з аналізом отриманих даних, використовувані в роботі амфіфільні сполуки (ТФП, ХПР, С10, ДГП), що належать до різних класів ПАР, знижують рівень ПГГ еритроцитів людини приблизно в 2,5—3,5 раза, тобто виявляють високу ефективність в умовах ПГШ за 0 °С. Отже, захисний ефект амфіфілів не залежить від трансмембранної локалізації їхніх молекул.

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

На прикладі аніонної сполуки С10 досліджено вплив амфіфілів на стан мембрани за зміною трансмембранного розподілу фосфатидилсерину, що є маркерним фосфоліпідом внутрішнього моношару ліпідного бішару. Розподіл фосфатидилсерину в мембрані еритроцитів оцінювали методом проточної цитофлуориметрії з використанням набору Annexin V-FITC-kit («Becton Dickinson», США). Зразки клітинних суспензій аналізували на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur («Becton Dickinson», США) з використанням про-

грамного забезпечення CELLQuest Pro. Еритроцити людини інкубували (20 хв) у фізіологічному розчині, який містив С10 у концентраціях 180 і 400 мкмоль/л, за 0 °С. Контролем слугували еритроцити, які інкубували у середовищах за відсутності амфіфільної речовини.

Згідно з результатами досліджень еритроцитів людини методом проточної цитофлуориметрії, вміст контрольних еритроцитів (за відсутності амфіфілу), що зв'язали анексин V, становив 0,34 % (рис. 5.13, *а*). За інкубування еритроцитів у фізіологічному розчині за наявності С10 у концентраціях 180 і 400 мкмоль/л кількості позитивно мічених клітин становили 4,32 і 22,6 % відповідно (див. рис. 5.13).

Згідно з отриманими даними, зі збільшенням концентрації аніонного С10 відсоток позитивно мічених клітин зростає, що свідчить про трансбішаровий перерозподіл фосфатидилсерину на зовнішній моношар у плазматичних мембранах еритроцитів людини.

Відповідно у межах плато концентраційної залежності ПГГ еритроцитів (див. рис. 5.11) можна обрати такі концентрації С10, які б запобігали руйнуванню й пошкодженню мембрани еритроцитів людини.

Амфіфільні сполуки чинять мембранотропну дію через здатність їхніх молекул вбудовуватися й розподілятися в еритроцитарній мембрані. Вияв їх ефективності залежить як від використаної речовини, так і особливостей цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів. Еритроцити ссавців характеризуються загальним планом будови плазматичної мембрани, але мають деякі видові особливості її складу [69, 100, 101]. Це дає підставу припустити відмінність у вияві ефективності амфіфільних сполук за умов ПГШ таких клітин.

У працях з дослідження чутливості еритроцитів ссавців до дії стресових чинників виявлено різну стійкість цих клітин [32, 33, 92, 93]. Зокрема, еритроцити кролика були стійкими, щура — достатньо чутливими [32, 33, 92, 93]. У зв'язку з цим доцільно дослідити в порівняльному аспекті реакцію еритроцитів людини, щура і кролика на дію ПГШ за температури 37 або 0 °С.

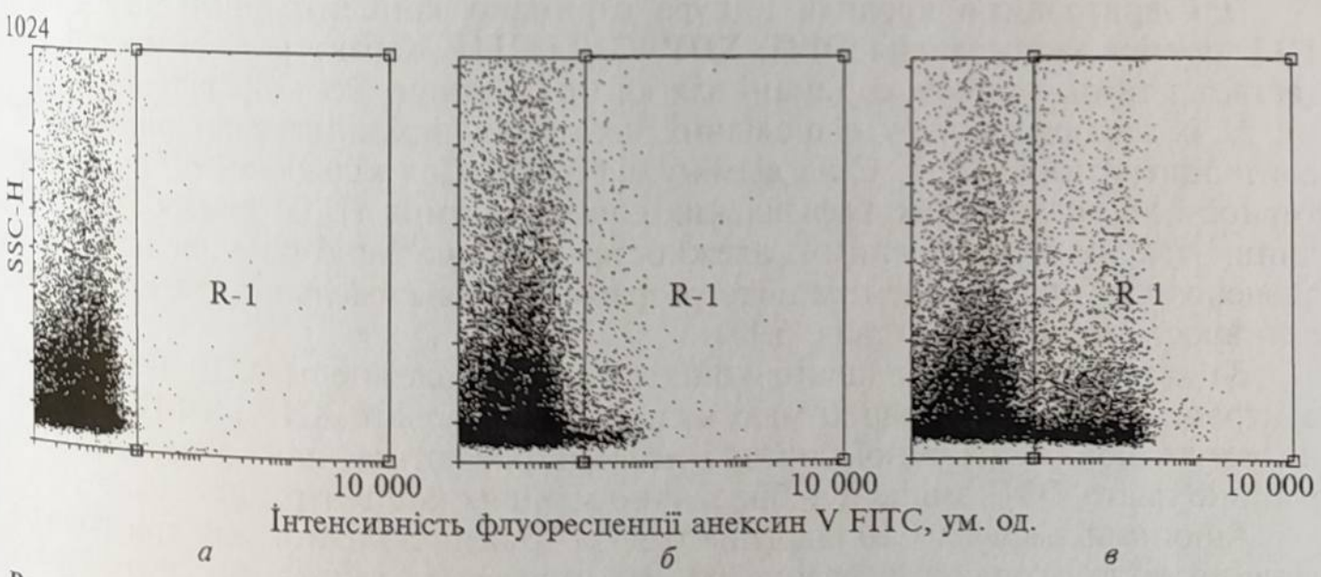


Рис. 5.13. Цитограми еритроцитів людини після обробки децилсульфатом натрію у фізіологічному розчині за 0 °С:
а — контроль; *б* — 180 мкмоль/л С10; *в* — 400 мкмоль/л С10

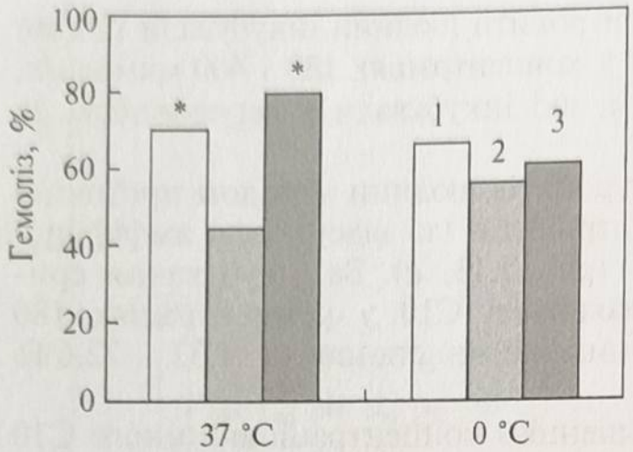


Рис. 5.14. Вплив температури на рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (1) кролика (2) і щура (3); концентрація NaCl у середовищі дегідратації 1,65 моль/л, регідратації — 0,15 моль/л.
* Відмінності статистично значущі порівняно з еритроцитами кролика ($p < 0,05$, Me, $n = 7$)

Результати експериментів із ПГШ еритроцитів ссавців (людини, кролика і щура) за різних температур (рис. 5.14) дали змогу встановити деякі видові особливості вияву ПГГ. Як бачимо, за температури 0 °С еритроцити людини і тварин не відрізняються за рівнем ПГГ, а за 37 °С отримано статистично значущі відмінності: еритроцити кролика стійкіші порівняно з клітинами людини і щура.

Стійкі до дії ПГШ еритроцити кролика характеризуються високим внутрішньомембранним вмістом фосфатидилетаноламіну (ФЕА) (34,4 %) [100] і холестерину (28,9 %) порівняно з клітинами людини і щура [101]. Саме на важливість цих показників еритроцитарної мембрани (вміст неламелярного ФЕА і холестерину) в прояві стійкості еритроцитів ссавців до дії іншого виду стресу — гіпертонічного кріогемолізу вказують результати кореляційного аналізу [93].

Неламелярні фосфоліпіди забезпечують стійкість клітин до дії стресового фактора, ймовірно, внаслідок утворення гексагональної структури в ламелярній упаковці ліпідів мембрани, що може запобігати розвитку трансмембранних пор [98]. Холестерин сприяє модулюванню фізико-хімічних властивостей клітинних мембран. Численні експериментальні дані підтвердили залежність стійкості еритроцитарних мембран до дії різних чинників від вмісту в них холестерину [64, 76, 79].

Для еритроцитів кролика і щура отримано концентраційні залежності ПГГ за умов застосування ТФП, ХПР, С10 і ДГП. Характер залежностей збігається з тими, які були отримані для клітин людини. Всі амфіфільні речовини за їх використання у відповідних концентраціях знижували рівень ПГГ еритроцитів тварин за 0 °С на відміну від 37 °С. Для кількісної оцінки ефективності дії досліджених амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів людини і тварин за отриманими залежностями встановлено розміри плато, визначено ефективні концентрації та розраховано максимальні антигемолітичні активності речовин [93] (табл. 5.11).

За характеристиками плато концентраційні залежності ХПР і ТФП для еритроцитів людини і тварин мають спільні риси: плато ХПР і ТФП рознесені вздовж концентраційної шкали і не перекриваються, при цьому концентраційне плато ТФП зміщене в бік значно менших концентрацій.

Аніонний амфіфіл С10 відрізняється за довжиною плато: для еритроцитів людини воно охоплює діапазон 200—600 мкмоль/л, для клітин щура характерне вужче плато — 200—400 мкмоль/л.

Значення ефективних концентрацій відповідають середині плато, тому вони визначають його розмірами (шириною) і положенням на осі абсцис. Так,

ефективна концентрація ДГП для еритроцитів людини і кролика становить 1000 мкмоль/л, щура — 800 мкмоль/л. Ці показники перевищують значення ефективних концентрацій ХПР, С10 і ТФП в 2, 2,5 і 6 разів відповідно.

Аналізом значень антигемолітичної активності амфіфільних сполук, які належать до різних класів ПАР, за умов ПГШ еритроцитів різних видів ссавців виявлено видові особливості прояву їхньої ефективності. Для еритроцитів людини всі досліджувані амфіфільні сполуки незалежно від їхніх фізико-хімічних властивостей виявляють досить високу антигемолітичну активність (60—70 %).

Водночас для еритроцитів кролика вираженіший захисний ефект за умов ПГШ демонструють аніонний С10 і неіонний ДГП. Для еритроцитів щура, навпаки, катіонні амфіфільні сполуки (ХПР, ТФП) виявилися найефективнішими порівняно з іншими видами ссавців. Слід зазначити, що для еритроцитів усіх досліджуваних видів ссавців неіонний ДГП виявляє приблизно однакову протективну дію (на рівні 60—70 %). За ПГШ еритроцитів тварин амфіфільні сполуки за зменшенням їхньої антигемолітичної активності можна розмістити так: для клітин кролика — ДГП ≥ С10 > ХПР > ТФП; для еритроцитів щура — ТФП ≥ ХПР > ДГП > С10.

Отже, антигемолітична активність досліджуваних амфіфільних речовин дуже відрізняється для еритроцитів тварин (кролика і щура), тоді як для клі-

Таблиця 5.11. **Значення максимальної антигемолітичної активності ($АГ_{макс}$), ефективних концентрацій ($C_{еф}$) амфіфільних сполук за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців за температури 0 °С**

Еритроцити ссавців	Показник	Амфіфільна сполука			
		ХПР	ТФП	С10	ДГП
Людина	$АГ_{макс}$, %	70 (64—74)	60 (45—77)	74 (66—78)	62 (61—70)
	Розмір плато, мкмоль/л	400—800	100—200	200—600	400—1600
	$C_{еф}$, мкмоль/л	600	150	400	1000
Кролик	$АГ_{макс}$, %	55* (51—59) $p = 0{,}017961$	55 (50—58)	71 (68—74)	72 (72—75)
	Розмір плато, мкмоль/л	300—700	100—200	200—800	600—1400
	$C_{еф}$, мкмоль/л	500	150	500	1000
Щур	$АГ_{макс}$, %	81*§ (73—84) $p = 0{,}017961$	84*§ (81—89) $p = 0{,}027709$	56*§ (50—59) $p = 0{,}027709$	66 (63—75)
	Розмір плато, мкмоль/л	300—700	150—200	200—400	400—1200
	$C_{еф}$, мкмоль/л	500	175	300	800

* Відмінності статистично значущі порівняно з еритроцитами людини; § кролика ($p < 0{,}05$).
Значення максимальної антигемолітичної активності представлені як Me — медіана, Q1—Q3 — інтерквартильний інтервал.

тин людини вона сумірна і становить близько 60—70 %. Це може бути зумовлено відмінностями фосфоліпідного складу еритроцитарних мембран цих видів ссавців [100, 101].

При вбудовуванні катіонних ТФП і ХПР в еритроцитарну мембрану клітини трансформуються за типом дискоцит—стоматоцит, що свідчить про переважний розподіл цих амфіфільних молекул у внутрішньому моношарі мембрани. Аніонний С10 і неіонний ДГП зумовлюють зміну форми еритроцитів за типом дискоцит—ехіноцит, що може бути пов'язане з розподілом молекул у зовнішньому моношарі ліпідного бішару [93].

За умов ПГШ еритроцитів катіонні ТФП і ХПР максимально протектують клітини щура. Виявлений ефект може обумовлюватись здатністю еритроцитарних мембран щура зв'язувати значну кількість молекул ТФП і ХПР. Позитивно заряджені амфіфільні молекули при вбудовуванні в мембрану взаємодіють з негативно зарядженими фосфоліпідами, які розміщені переважно у внутрішньому моношарі мембрани. Однак, за даними праці [100], за загальним вмістом аніонних фосфоліпідів еритроцитарна мембрана щура не відрізняється від клітин людини. Логічно припустити, що місця зв'язування катіонних амфіфільних сполук не обмежуються тільки негативно зарядженими фосфоліпідами. На цю роль можуть претендувати холіновмісні фосфоліпіди внутрішнього моношару мембрани. На користь цього припущення свідчать дані праці [54], в якій показано, що ТФП може взаємодіяти з ліпосомами, які містять фосфатидилхолін, з утворенням доменів. За даними праці [100], фосфатидилхолін, який в основному знаходиться у зовнішньому моношарі мембрани, частково представлений і у внутрішньому, ця частина фосфатидилхоліну у внутрішньому моношарі мембрани еритроцитів щура в 1,2—1,4 раза більша, ніж у клітинах людини і кролика. Це може визначати вищу ефективність цих речовин (ХПР і ТФП) за умов ПГШ еритроцитів щура.

Для еритроцитів щура аніонний С10 менш ефективний порівняно з іншими амфіфілами. У праці [70] показано, що монокарбонові кислоти (які є аніонними амфіфілами) збільшують осмотичну крихкість еритроцитів щурів на відміну від клітин інших тварин. Автори пов'язали відсутність захисного ефекту монокарбонових кислот із високим вмістом арахідонової кислоти в мембранах еритроцитів щура. Можливо, відносно низька ефективність С10 для клітин щура (див. табл. 5.11) зумовлена вищим вмістом цього компонента в їхніх мембранах порівняно з еритроцитами кролика і людини [40].

Катіонні ХПР і ТФП вбудовуються й розподіляються переважно у внутрішньому моношарі мембран, який в еритроцитах кролика збагачений холестерином через його високий вміст [73] та переважний розподіл у цьому моношарі [71]. Логічно припустити, що менш виражений антигемолітичний ефект катіонних амфіфілів для еритроцитів кролика за умов ПГШ (порівняно з клітинами людини і щура) зумовлений впливом холестерину на характер вбудовування та розподілу молекул катіонних амфіфілів у внутрішньому моношарі.

Особливість вияву протекторної дії амфіфільних сполук може визначатися не тільки різним фосфоліпідним складом, а й білковими компонентами мембран еритроцитів ссавців. Цитоскелет еритроцитів, який розміщений з цитоплазматичного боку мембрани, взаємодіє з мембраною і забезпечує ста-

більність її структури. Ця взаємодія здійснюється за допомогою спеціальних (якірних) білків — анкірину та білка смуги 4.1 [24]. Слід зазначити, що білок смуги 4.1 поділяється на дві суб-смуги в мембрані еритроцитів кролика, тоді як у клітинах щура білки 4.1 і 4.2 мігрують разом [87]. Порівняно з клітинами людини в еритроцитах кролика і щура кількість білків смуги 2.1 + 2.3 (анкірин) зменшена приблизно в 2 рази [69].

Загалом порівняльним аналізом білкових компонентів у складі цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів людини, кролика і щура не виявлено істотних відмінностей, однак наявність деяких особливостей може впливати на здатність еритроцитів ссавців протистояти дії температурно-осмотичного стресу.

Отже, аналіз експериментальних результатів, отриманих при вивченні впливу амфіфільних сполук, що належать до різних класів ПАР, щодо чутливості еритроцитів ссавців до дії ПГШ, показав, що сукупність ендогенних і екзогенних чинників може впливати прямо або опосередковано на стійкість клітин до дії температурно-осмотичного стресу.

Розроблений підхід спрямованої корекції чутливості еритроцитів до ПГШ із застосуванням амфіфільних сполук може бути використаний для підвищення стійкості клітин за екстремальних умов. Наукові результати щодо ефективності представників катіонних, аніонних і неіонних амфіфільних сполук під час ПГШ еритроцитів ссавців значно розширюють базу для подальшого пошуку мембранотропних сполук природного походження, здатних виявляти антигемолітичну активність за умови впливу на клітини чинників кріопошкодження, які діють на етапі розморожування кріоконсервованого матеріалу.