

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ПАКУЛОВА ОЛЬГА КОСТЯНТИНІВНА**

УДК 612.111:577.352.462:57.043

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ОСМОТИЧНА ПОВЕДІНКА ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ПРИ ЗМІНІ  
АНІОННОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА В УМОВАХ ГІПОТЕРМІЇ**

за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ (О. К. Пакулова)

Науковий керівник (консультант):

д. б. н., проф. В. А. Бондаренко

Харків – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Пакулова О.К.* Осмотична поведінка еритроцитів людини при зміні аніонного складу середовища в умовах гіпотермії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

У дисертаційній роботі проведено дослідження впливу специфічних властивостей аніонів у середовищі на температурно–осмотичну поведінку еритроцитів людини в умовах, які моделюють фактори кріопошкодження.

Ще з середини ХХ століття кріобіологи Lovelock J., Farrant J., Morris G., Бондаренко Т. П., Поздняков В. В. звертали увагу на зміни рівня кріопошкодження клітин за умов присутності різних аніонів, які обумовлені їх розташуванням у ліотропному ряді. Однак через відсутність достатньої інформації на той час та неможливість пояснити такі ефекти дослідники втратили інтерес до цього напрямку.

Наразі вже існує велика кількість наукових досліджень впливу аніонів ліотропного ряду на різні прості об'єкти. Відомі їх ефекти на стан ліпідних шарів і білкових гелів, які є мішенями кріопошкодження у клітинах. У зв'язку з цим було доцільним відновити дослідження щодо впливу ліотропних аніонів у кріобіології.

Отже, метою нашої роботи було комплексне вивчення ефектів аніонів ліотропного ряду на адаптацію еритроцитів людини до умов, які моделюють вплив основних факторів кріопошкодження під час заморожування та розморожування, в умовах гіпотермії. Для цього використовувалися гіпертонічний лізис (ГЛ) (перенесення клітин до 4 М розчину NaCl),

постгіпертонічний лізис (ПГЛ) (перенесення з гіпертонічних до ізотонічних умов), а також холодний шок – охолодження в зоні позитивних температур – який в еритроцитах відбувається тільки у гіпертонічному середовищі (гіпертонічний криогемоліз (ГК)).

Для всебічного вивчення впливу ліотропних аніонів на температурно-осмотичну поведінку еритроцитів за таких умов змінювали осмоляльність середовища та тривалість попередньої інкубації клітин, температурні режими та показник рН середовища. Для визначення шляхів впливу ліотропного ефекту аніонів досліджували стан води у суспензіях еритроцитів, їх морфологічні та об'ємні характеристики.

У результаті проведених експериментів було встановлено, що ліотропні аніони впливають на адаптацію клітин до усіх вивчених видів температурно-осмотичних навантажень залежно від свого розташування у ліотропному ряді.

Відомо, що чутливість еритроцитів до гіпертонічного лізису змінюється нелінійно після їх часткової попередньої дегідратації в ряду середовищ помірної гіпертонії. За осмоляльності близько 800 мОсмоль/кг (для NaCl) клітини стабілізуються, а за 1400 мОсмоль/кг – сенсibiliзуються. Ці інтервали зміщуються по осі осмоляльності під впливом різних ліотропних аніонів.

Сильні хаотропні та космоотропні аніони робили клітини більш чутливими до ГЛ. Хаотропні аніони значно нівелювали вплив низької температури на клітини, а космоотропні посилювали його. Виключенням є слабо космоотропний аніон ацетату, який підвищував стабільність клітин, особливо за температури 0 °С.

Встановити природу відмінностей впливу хаотропних і космоотропних аніонів допомогли дослідження об'єму еритроцитів залежно від змін рівня ГЛ у 4 М розчині NaCl і морфологічних параметрів еритроцитів. Зі збільшенням тонічності середовища у присутності хаотропних аніонів клітини перетворюються на сильно стислі ехіноцити з великими спікулами, а у

присутності космотропних – набувають форми сильно зневоднених планоцитів без спікул.

Встановлено, що у середовищах, в яких є космотропні аніони, відбувається стабілізація мембрани еритроциту, що призводить до його крихкості, а хаотропні аніони, навпаки, руйнують мембрану, що проявляється як злипання клітини у згусток за умов посилення гіпертонічного впливу середовища передінкубації.

З метою з'ясування ролі цитоскелета як мішені впливу ліотропних аніонів (ЛА) на еритроцит досліджували перебіг ГЛ у діапазоні рН 5,5–8,5. Значні зміни відбувалися в присутності хаотропних аніонів. У кислому середовищі за температури 37 °С практично була відсутня стабілізація еритроцитів. Такий ефект можна пояснити поєднаним впливом екранування протонами заряджених груп спектрину цитоскелета, що приводить до релаксації структури останнього та дестабілізації ліпідного бішару (ЛБ). Космотропні аніони зберігають клітину від руйнування як в кислому, так і в лужному середовищах.

Отже, усі отримані дані віддзеркалюють вплив аніонів ліотропного ряду на адаптацію еритроцитів до осмотичного типу пошкодження. Вплив аніонів ліотропного ряду на перебіг гіпертонічного кріогемолізу мав схожі закономірності. Ми припустили, що це відбувається через зміну стану мембранних структур.

На відміну від осмотичного гемолізу розвиток гіпертонічного кріогемолізу (ГК) характеризується розгортанням процесів у часі. Етапи ГК відповідають процесам, які відбуваються на мембрані еритроцитів після їх переміщення в гіпертонічні умови і до початку охолодження: етап 1 – підвищення рівня пошкодження, обумовленого перебудовою компонентів у площі мембрани, а етап 2 – зниження рівню ГК, який спостерігається тільки в іонному середовищі й викликаний підвищенням проникності мембрани для

іонів. Це дає можливість вивчити особливості впливу ЛА на функціонування мембрани еритроцитів.

Характерні криві розвитку ГК у часі спостерігаються тільки за певної осмоляльності середовищ із ліотропними аніонами, а саме за тих значень тонічності, які співвідносяться з максимальною сенсibiliзацією еритроцитів. Заслужовує на увагу той факт, що ці осмоляльності індивідуальні для кожного аніона та відповідають рівню осмоляльності середовищ передінкубації, за яких клітини «переходили» у сенсibiliзацію до ГЛ. Отже, основна умова ГК (наявність надкритичної концентрації гіпертонічного середовища) специфічна для кожного з ліотропних аніонів.

Аналіз етапу 1 ГК показав, що сильні хаотропні аніони  $\text{SCN}^-$  та  $\text{ClO}_4^-$  прискорюють процес адаптації з подальшим значним збільшенням стійкості клітин на етапі 2 до 10-20 % на 20-40 хв передінкубації. Останнє може означати полегшене досягнення іонної рівноваги на мембрані через підвищення її проникності для іонів. Однак, у середовищах цими аніонами після 40–60 хвилинної гіпертонічної передінкубації за температури 37 °C розпочинається монотонне зростання рівня гемолізу, обумовленого руйнуванням клітин навіть без охолодження. Вони мають властивість накопичуватися на поверхнях ліпідних шарів зменшуючи гідрофобні взаємодії та здатні проникати між молекулами фосфоліпідів в зону жирнокислотних залишків ліпідних шарів, порушуючи їх розташування, що може привести до ліофілізації ЛБ.

Переваги хаотропного ефекту, який прискорює адаптивні процеси в еритроцитах, проявляються у присутності слабохаотропного  $\text{Br}^-$ , який не призводить до руйнування мембрани клітин навіть під час 120-хвилинної передінкубації, де рівень гемолізу знижувався до 26 %.

Космотропні аніони, уповільнювали обидва етапи ГК та спричиняли спад рівня пошкодження на етапі 2 до рівня 40 % на 120-й хвилині передінкубації. Такі явища можуть означати ускладнення перерозподілу

ліпідів у площі ЛБ та іонів через мембрану з підвищенням космотропності аніонів. Отже, у нашій роботі були уточнені раніше отримані дані щодо негативного впливу аніона сульфату на еритроцити під час ГК, а також виявлені можливості застосування цих аніонів для захисту клітин за умов цього виду гемолізу при тривалих термінах передінкубації.

Зниження рН сприяє дестабілізації клітин при ГЛ та ГК у присутності хаотропних аніонів. Такий ефект можна пояснити порушенням ними пакування ліпідів, що у поєднанні із релаксацією зв'язків як всередині цитоскелетної мережі, так й між нею та ЛБ не сприяє стійкості клітин до осмотичних навантажень.

Блокування аніонного обміну за допомогою 4,4'-диізотіоціанат-стильбен-2,2'-дисульфонової кислоти (ДІДС) не мало істотного впливу на рівень ГК. Це підтверджує роль ЛА саме як структурних модифікаторів компонентів мембрани.

Ефект стабілізації ліпідів мембрани шляхом попереднього 10-хвилинного охолодження клітин перед початком попередньої інкубації за температури 37 °С був найбільш помітним у присутності космотропних аніонів, які нівелювали різницю між двома етапами ГК. Клітини в середовищах із хаотропними аніонами мало реагували на зниження температури, оскільки вони мають властивість руйнувати слабкі зв'язки між молекулами води, збільшуючи їх рухливість. Даний ефект отримав назву «підвищення структурної температури».

Результати досліджень діелектричних характеристик суспензій клітин показали слабку гідратацію еритроцитів у присутності хаотропних аніонів, що корелює з даними літератури про їх накопичення на межі розділу фаз вода–ліпідний шар. Слабка гідратація еритроцитів у присутності найбільш космотропного сульфат-аніона може свідчити про його конкуренцію за зв'язану воду з поверхнею клітин.

Найвищий рівень гідrataції клітин при одночасному зниженні концентрації вільної води в суспензії показав ацетат-аніон, який має найбільші протекторні властивості у гіпертонічних умовах пошкодження. Захисний ефект ацетат-аніона обумовлений функцією води в його присутності як «структурного буфера», який захищає структуру компонентів мембрани від структурної дегідrataції. Дані літератури підтверджують наявність у ацетат-аніона значної гідратної оболонки, яка відрізняється слабкими зв'язками з іоном. Причиною такого специфічного ефекту може бути те, що цей аніон відрізняється від інших у ліотропному ряді нешароподібною формою. Отже, можна припустити, що розчинені частинки зі схожими характеристиками можуть мати аналогічний ефект.

Цікаво було визначити, чи можуть через різну геометрію інші види частинок в середовищі впливати на стійкість еритроцитів до умов, що моделюють фактори кріопошкодження. Найбільш наближеними за розміром до іонів і різноманітними за формфактором є наночастинки. Ми показали, що форма наночастинок впливає на осмотичну поведінку еритроцитів. Найбільший антигемолітичний ефект мали еліпсоїдні наночастинки  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  розміром  $8 \times 30$  нм, захисний ефект яких для клітин підтверджується результатами інших робіт. Застосування такого підходу з метою вивчення кріозахисту клітин в умовах гіпертонічного навантаження заслуговує на окрему увагу дослідників.

Зовсім інший характер мали закономірності впливу ЛА на еритроцити в умовах постгіпертонічного лізису (ПГЛ) – після перенесення клітин з гіпертонічних до ізотонічних умов. Це призводить до їх пошкодження через зменшення тонічності середовища на 1700 мОсмоль за умов зниження температури (останній параметр виявився не обов'язковим для розвитку ПГЛ у присутності сильних хаотропних аніонів ПГЛ).

Вплив аніонів позначався у лінійному зниженні рівня пошкодження клітин від хао- до космотропних аніонів, відповідно до їх розташування у

ліотропному ряді. Умови підвищеної осмоляльності середовища, за яких мембрана набуває проникності для іонів, можуть викликати ще один ефект ліотропних аніонів, який стосується здатності хаотропних аніонів «всолювати», а космотропних «висолювати» цитоплазматичні білки. «Всолювання» призводить до зв'язування з ними внутрішньоклітинних іонів, що спричиняє надходження останніх до клітини ззовні. Таким явищем можна пояснити як збільшення об'єму клітин на початку їх сенсibiliзації у гіпертонічних середовищах із хаотропними аніонами, так й надмірне розтягнення мембрани та лізис клітин при подальшій регідратації у ізотонічних умовах. Космотропні аніони не викликають додаткового надходження зовнішніх іонів, що захищає клітини за умов постгіпертонічного лізису, але не є єдиним механізмом. Космотропні аніони сприяють підвищенню міцності міжбілкових контактів у цитоскелеті та його зв'язків із ЛБ. Отже, за умов даного виду лізису космоетропні аніони мають виражений протекторний ефект і можуть рекомендуватися як захисні агенти.

Таким чином, у результаті проведеного дослідження доведено значний вплив ліотропних аніонів на температурно-осмотичну поведінку еритроцитів та необхідність враховувати ліотропні властивості аніонів при складанні кріозахисних середовищ. Це дозволить цілеспрямовано використовувати хаотропні та космоетропні ефекти для адаптації клітин до факторів кріопошкодження та розробити нові підходи до їх кріозахисту.

У гіпертонічних умовах, які моделюють фактори заморожування, слабкі ліотропні аніони реалізують дві різні стратегії захисту еритроцитів через «ізоляцію» мембрани від пошкодження концентрованим середовищем: хаотропні, можливо, – через накопичення на межі з ЛБ без його руйнування, космоетропні – через створення «водяного буфера» біля клітинних структур та запобігання їх структурному зневодненню без надмірного підвищення міцності зв'язків.



За умов моделювання факторів розморожування (ПГЛ) найбільший захисний ефект мали сильні космотропні аніони, можливо, через «висолювання» та стабілізацію внутрішньоклітинних білків. За умов дегідратації такі аніони ефективно зменшували об'єм клітин, а під час регідратації забезпечували достатній запас пружності мембрани завдяки підвищенню міцності зв'язків білків цитоскелета між собою та з ЛБ.

Єдиними аніонами, які за любых критичних умов приводили до підвищення руйнування еритроцитів були сильні хаотропні. Відомо, що вони накопичуються на гідрофобних поверхнях та проникають всередину ЛБ, дестабілізують та «всолюють» білки клітин, що не сприяє їх адаптації до температурно-осмотичних навантажень. Не зважаючи на такий несприятливий ефект, слабкі хаотропні аніони можуть бути використані у якості кріозахисних агентів, які полегшують адаптацію, наприклад, до ГК. Методом нейтралізації хаотропного ефекту може бути додавання у середовище космотропних аніонів.

**Ключові слова:** склад кріозахисного середовища, хаотропні аніони, космотропні аніони, еритроцити людини, клітинна мембрана, гіпертонічний лізис, гіпертонічний кріогемоліз, постгіпертонічний лізис, наночастинки, діелектрична проникність.

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

### **Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації**

#### *Публікації в наукових фахових виданнях України*

1. Пакулова ОК, Бондаренко ВА, Малкович ЮВ. Морфология эритроцитов человека в растворах анионов ряда Гофмейстера. Вісник проблем біології і медицини 2011;2(2):199–200.

2. **Пакулова ОК**, Бондаренко ВА, Малкович ЮВ. Особенности гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в среде, содержащей анионы лиотропного ряда. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія» 2011;13(947):159–65.

3. **Пакулова ОК**, Клочков ВК, Кавок НС, Костіна ІА, Сопотова ОС, Бондаренко ВА. Влияние наночастиц на основе редкоземельных элементов на осмотическую адаптацию эритроцитов. Біофізичний вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна 2017;37(1):42–50.

4. **Pakulova ОК**, Bondarenko VA, Kostina IO. The lyotropic anions influence on the state of erythrocyte membrane. Вісник проблем біології і медицини 2020;2(156): 391–4. doi:10.29254/2077-4214-2020-2-156-391-394.

*Публікація в зарубіжному спеціалізованому виданні*

5. **Pakulova ОК**, Gorobchenko OA, Nikolov OT, Adelyanov AV, Pastukhova SY, Bondarenko VA. The influence of Hofmeister's effect on the osmotic behaviour of erythrocytes and on the state of water in their suspension. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 2013;44(2–3):167–70. doi:10.1002/mawe.201300111.

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

*Стаття в збірці матеріалів конференції*

6. **Пакулова ОК**, Верджи ЛВ, Бондаренко ВА. Изучение эффекта Гофмейстера на объем эритроцитов человека в средах с повышенной тоничностью. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук 2013;12(59)[Экспериментальная и теоретическая биофизика'13 : матер. междунар. конф. молод. ученых; 21–23 окт. 2013 г.; Пущино, Российская Федерация]:53–5.

Тези конференцій

7. **Пакулова ОК.** Влияние анионов лиотропного ряда в среде дегидратации на осмотический ответ эритроцитов. Проблемы криобиологии 2006;16(4)[Холод в биологии и медицине 2006: тез. ежегодн. конф. молод. ученых; 24–25 мая 2006 г.; Харьков, Украина]:445.

8. Бондаренко ВА, **Пакулова ОК**, Жуйкова АЕ. Поведение клеток в неизотонических условиях: дифференцированный подход к механизмам структурных нарушений и адаптации. Проблемы криобиологии 2008;18(2)[Новые криотехнологии для решения фундаментальных и прикладных задач медицины: тез. докл. конф., посв. 90-летию НАНУ и 10-летию каф. ЮНЕСКО по криобиол; 24–26 нояб. 2008 г.; Харьков, Украина]:209.

9. **Pakulova ОК.** Effects of some anions of Hofmeister series on the human erythrocyte damage in changes osmotic and temperature conditions. Біологія: від молекули до біосфери: тези доп. V міжнар. конф. мол. науковців; 22–25 жовт. 2010 р.; Харків, Україна. Харків; 2010. с. 73.

10. **Пакулова ОК**, Пастухова СЯ. Влияние анионов лиотропного ряда Гофмейстера на мембранные структуры клеток. Біологія: від молекули до біосфери: тези доп. VI міжнар. конф. мол. науковців; 21–24 жовт. 2011 р.; Харків, Україна. Харків; 2011. с. 108.

11. **Pakulova ОК**, Bondarenko VA. Controlling the status of red blood cells by changing the properties of water. Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology: abstr. 4<sup>th</sup> Ukrainian-German Symposium; 2012 Sep 18–20; Ilmenau, Germany. Ilmenau; 2012. p. 173.

12. **Пакулова ОК.** Показатели адаптации эритроцитов к критическим температурно-осмотическим условиям под влиянием эффекта Гофмейстера. Биология – наука XXI века: сб. тез. 17-й междунар. Пушин. школы-конф. мол. ученых; 21–26 апр. 2013 г.; Пушино, Российская Федерация. Пушино; 2013. с. 139.

13. **Pakulova OK**, Klochkov VK, Kavok NS, Kostina IA, Sopotova AS, Bondarenko VA. Effect of rare earth elements nanoparticles on the hypertonic lysis of human erythrocytes. *Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology*: abstr. 5<sup>th</sup> Ukrainian-German Symposium; 2015 Sep 21–25; Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2015. p. 241.

**Стаття, що додатково відображає матеріали дисертації**

14. **Пакулова ОК**, Бондаренко ВА. Влияние анионов ряда Гофмейстера на осмотическую выносливость эритроцитов. *Вісник проблем біології і медицини* 2008;3:23–6.

**ANNOTATION**

*Pakulova O.K.* The osmotic behavior of human erythrocytes during alteration of anionic composition of the medium under hypothermia. – Qualification scientific paper as a manuscript.

Thesis for a PhD Degree in Biology, specialty 03.00.19 – Cryobiology. – V.N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

In this work the influence of specific properties of anions in the medium on the temperature-osmotic behavior of human erythrocytes under conditions simulating the processes of cryo-damage factors were investigated.

Since the middle of the 20<sup>th</sup> century, cryobiologists Lovelock J., Farrant J., Morris G., Bondarenko T.P., Pozdnyakov V.V. and others have paid attention to changes in the level of cryopreservation in the presence of different anions, which corresponds to their location in the lyotropic series. However, due to the lack of sufficient information at that time and the inability to explain such data, researchers have lost interest to this topic.

Today, there is a large amount of scientific research studying the lyotropic effect of ions on various objects. Among them are those that indicate its significant effect on the state of lipid layers and protein gels, which are being targets of cryo-damage of cells. This resulted in a return to the study of the influence of lyotropic anions in cryobiology.

Therefore, the aim of our work was a comprehensive study of the effects of lyotropic anions on the adaptation of human erythrocytes to conditions that simulate the influence of the main factors of cryo-damage during freezing and thawing in hypothermia. Hypertonic lysis (transfer of cells in 4 M NaCl), posthypertonic lysis (transfer from hypertonic into isotonic conditions), and cold shock – cooling in the range of positive temperatures, which occurs by erythrocytes only in a hypertonic media (hypertonic cryohemolysis) were used for this purpose.

For the sake of comprehensiveness, the modifications of the osmolality, duration of pre-incubation, temperature regimes and pH were studied. In order to clarify the ways of influence of the lyotropic effect of anions, the state of water in erythrocyte suspensions and their morphological characteristics were studied.

It is well-known that, the sensitivity to hypertonic lysis changes nonlinearly after partial pre-dehydration of erythrocytes in a series of solutions with increasing tonicity. Around 800 mOsmol/kg (for NaCl) cells are stabilized and at 1400 mOsmol/kg are sensibilized. These phases shift along the axis of osmolality under the effect of ions of different nature. Chaotropic anions (CA) significantly offset the effect of low temperature on cell behavior, whereas kosmotropic anions (KA) enhanced it, which indicates the different nature of the effects that unite these 2 groups of particles. An exception was shown to be a weak kosmotropic acetate-anion that increased the cell stability, especially at 0°C.

The studies of erythrocyte volume compared to the change of hypertonic lysis level in 4 M NaCl and erythrocyte morphology helped to clarify the nature of the differences in the effects of CA and KA. With increasing tonicity of the medium in the presence of CA, cells turn into highly compressed echinocytes with

large spicules. In KA-containing solutions erythrocytes took the shape of severely dehydrated planococytes without spicules.

It was established, that in the solutions containing KA the stabilization of erythrocyte membrane occurs, which leads to cell fragility, and in the solutions with CA, on the contrary, the membrane becomes loosen, which manifests in clumping of cells into a clot as the hypertonicity of the pre-incubation media increases.

To order to clarify whether the cytoskeleton is the target of the lyotropic anions (LA) effect on erythrocytes the course of hypertonic lysis in the pH range 5.5–8.5 was investigated. Significant changes occurred in the presence of anions with chaotropic properties in the solution. In the acidic medium at 37 °C no erythrocyte stabilization phase was observed. This effect could be explained by the combined influence of proton-screening of the charged groups of the cytoskeleton protein spectrin, which leads to the relaxation of its structure, and the destabilizing of the lipid bilayer. KA keep the cells from destruction in both acidic and alkaline medias.

Thus, all the data obtained reflect the influence of anions of the lyotropic series on the adaptation of erythrocytes to the osmotic type of damage. The influence of anions of the lyotropic series on the course of hypertonic cryohemolysis had similar patterns. We hypothesized that this is due to a change in the state of membrane structures.

In contrast to the osmotic type of hemolysis, the development of hypertonic cryohemolysis is characterized by the unfolding of processes over time. Its stages correspond to the known processes that occur on the membrane of erythrocytes after their transfer to hypertonic conditions and until the beginning of cooling: the first stage is an increase of the damage level caused by the rearrangement of components in membrane sheet, and the second is the reducing of hypertonic cryohemolysis level, that is observed only in the ionic medium and is caused by the increased membrane permeability for ions. This makes it possible to study the

features of the influence of lyotropic anions on the functioning of the erythrocyte membrane.

It was revealed that the characteristic curves of the hypertonic cryo-hemolysis development over time are obtained only for certain osmolalities of lyotropic anions solutions, namely for those that correlate with the maximum sensitization of erythrocytes. Noteworthy is the fact that these osmolalities are unique for each anion and correspond to the osmolality of the preincubation solutions, in which cells have undergone the sensitization to hypertonic lysis. Thus, the basic condition for hypertonic cryohemolysis (the presence of a supercritical concentration of hypertonic solution) is specific for each lyotropic anion.

The analysis of the 1<sup>st</sup> stage of hypertonic cryo-hemolysis, showed that anions with chaotropic properties increase the level of hemolysis, but also accelerate this process with a further significant increase in stability during the 2<sup>nd</sup> stage. The latter means easier achievement of ionic equilibrium on the membrane, i.e. faster penetration of ions through it. However, after 40–60 min of hypertonic incubation before cooling, the hemolysis caused by the lyophilization of the lipid bilayer by these hydrophobic anions begins to increase. The anions are able to penetrate phospholipid molecules into the insides of lipid layers, disrupting their packaging.

KA contribute to the stabilization of the lipid bilayer, which is evidenced by the reduced level of cell destruction when changing the structure of the membrane itself and a slight decrease in the level of damage during the 2<sup>nd</sup> stage. The latter means complicatedness of the redistribution of ions through a stable lipid bilayer. However, the level of damage in the presence of kosmotropic anions gradually decreases and up to 120 min of incubation approaches 40 %.

Thus, previously obtained data on the negative effect of sulfate anion on erythrocytes in hypertonic cryo-hemolysis were clarified in our work, and the possibilities of using these anions to protect cells from this type of hemolysis during long preincubation were open.

The loosening of the bonds within the cytoskeletal network by reducing pH promotes the destabilization of cells in the presence of anions with chaotropic properties, but acts in the opposite way in the non-ionic media. That is a consequence of the lipid packing destruction in the presence of CA, which are able to be pushed out from the aquatic media onto the phase boundary.

The blocking of anion exchange by means of ДИДС had no significant effect on the level of HA, confirming the validity of the statement of the leading role of LA as a structural modifiers of the membrane.

The effect of stabilization of membrane lipids prior to pre-incubation at 37 °C by pre-cooling of cells for 10 minutes was most noticeable in the presence of anions with kosmotropic properties that caused the leveling of the difference between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> stages of hypertonic cryohemolysis. In the medium containing chaotropic anions cells have barely responded to the decrease in temperature, since these anions have the ability to break weak bonds between water molecules, increasing their mobility, known as the «increase in structural temperature».

Another pattern characterized the influence of LA during the transfer of cells from hypertonic conditions to isotonic, i.e. posthypertonic lysis. It is known that this can also lead to the cell damage under significant downward shift of the tonicity and the temperature of the solutions. However, in the presence of anions with strong chaotropic properties, posthypertonic lysis was observed even without cooling. The influence of other anions was reflected in a linear decrease of the level of cell damage from anions with chaotropic properties to kosmotropic properties according to their location in the lyotropic series. Hence, in this type of lysis anions with kosmotropic properties have a pronounced protective effect and may be recommended for further studies as protective agents.

As the osmolality of the medium reaches the level, when the membrane becomes permeable to ions, another effect of lyotropic anions may occur, that affects the ability of chaotropic anions ‘salting in’ and kosmotropic anions ‘salting out’ proteins. ‘Salting in’ of cytoplasmic proteins leads to the binding of



intracellular ions and the entry of external ones into the cell. This explains the increased volume of cells at the beginning of their sensibilization in the presence of chaotropic anions, and leads to the hyperextension of the membrane and cells lysis during the rehydration in an isotonic medium. Kosmotropic anions do not cause any additional influx of external ions and protect cells in posthypertonic lysis.

Investigations of the dielectric characteristics of the cell suspensions showed a weak hydration of cells in the presence of anions with chaotropic properties, which correlates with the literature data on their accumulation at the boundary of hydrophobic films. Weak erythrocyte hydration in the presence of the most kosmotropic sulfate-ion could be an indicator of its competition with the cell surface over the bound water.

The highest level of cell hydration while reducing the concentration of free water in the suspension showed the acetate-anion, which has the greatest protective properties under hypertonic damage conditions. This explains its specific effect due to the function of water as a "structural buffer" in its presence.

This is confirmed by the literature data on the presence of a significant hydration shell around this anion, which is characterized by weak ion bonds. This anion also has a non-spherical shape. Thus, it can be assumed that dissolved particles with comparable characteristics could have a similar effect.

It was interesting to determine whether other types of particles in the solution can affect the resistance of erythrocytes to conditions that simulate cryopreservation factors due to their different geometry. The nanoparticles are most closely related to ions and are various in form. It is known that they can affect water molecules and have the ability to model the state of the erythrocyte membrane. We have shown that the shape nanoparticles affects the osmotic behavior of erythrocytes. The largest anti-hemolytic effect was observed by ellipsoid-like nanoparticles. Their protective effect on cells was confirmed by other researchers. Further study of this approach to cryoprotection of cells deserves a special attention of the researchers.

As follows, the main conclusion of our study is to prove the necessity to consider the lyotropic properties of anions (chao- and kosmotropic) during the preparation of cryoprotective media. This will allow the targeted use of lyotropic effects in order to adapt cells to cryo-damaging factors and to develop new approaches in cryoprotection.

Of the theoretical value is the establishment of patterns of the protective effect of weak lyotropic anions, which implement two different strategies of cryoprotection through membrane 'isolation' from damage by concentrated solution: chaotropic – through accumulation at the membrane boundary without destroying it, kosmotropic – through the creation of 'water buffer' near cellular structures and prevent their structural dehydration without excessive increase in bond strength.

When modeling thawing factors (posthypertonic lysis), strong CA had the greatest protective effect due to 'salting out' and stabilization of intracellular proteins. Under dehydration conditions, these anions effectively reduced cell volume, and during rehydration provided a sufficient reserve of membrane elasticity due to the strength of cytoskeletal protein bonds.

The only anions that under any critical conditions led to increased destruction of erythrocytes were strong chaotropics. They accumulate on hydrophobic surfaces and penetrate them, destabilize and 'salting in' cell proteins.

**Key words:** cryoprotective medium composition, chaotropic anions, kosmotropic anions, lyotropic effect, RBC, cell membrane, hypertonic lysis, hypertonic cryo-hemolysis, posthypertonic lysis, nanoparticles, dielectric permittivity.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	28
1.1. Адаптація еритроцитів до впливу основних чинників кріопошкодження	28
1.2. Явище ліотропного ефекту іонів .....	33
1.3. Вплив ліотропних аніонів на біоструктури .....	39
1.3.1. Вплив ліотропних аніонів на поверхні та мембрани.....	39
1.3.2. Залежність структурно-функціонального стану білків від ліотропного ефекту іонів .....	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	51
2.1. Об'єкт досліджень.....	51
2.2. Біоетична експертиза.....	51
2.3. Приготування середовищ із різними аніонами .....	52
2.4. Визначення осмоляльності середовищ .....	52
2.5. Визначення рівню гемолізу еритроцитів .....	52
2.6. Визначення чутливості еритроцитів до гіпертонічного лізису .....	53
2.7. Визначення чутливості еритроцитів до гіпертонічного кріогемолізу.....	53
2.8. Визначення чутливості еритроцитів до постгіпертонічного лізису.....	54
2.9. Дослідження впливу рН на температурно-осмотичну чутливість еритроцитів.....	54
2.10. Морфологічний аналіз еритроцитів .....	55
2.11. Вимірювання об'ємного показника еритроцитів .....	55
2.12. Дослідження діелектричних характеристик суспензії еритроцитів .....	56
2.13. Обробка клітин наночастинками.....	57

2.14. Статистична обробка результатів.....	57
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	59
3.1. Вплив ліотропних аніонів на адаптацію еритроцитів до гіпертонічного лізису у 4 М розчині NaCl .....	59
3.2. Дослідження діелектричних характеристик суспензій еритроцитів. ....	85
3.3. Дослідження гіпертонічного криогемолізу еритроцитів у присутності ліотропних аніонів .....	94
3.4. Адаптація еритроцитів до постгіпертонічного лізису під впливом аніонів ліотропного ряду .....	117
УЗГАЛЬНЕННЯ.....	126
ВИСНОВКИ .....	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	132
Додаток А Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.....	151
Додаток Б Відомості про апробацію результатів дисертації .....	154
Додаток В .....	155

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

Ac<sup>-</sup> – ацетат-аніон

AE1 – аніонообмінний білок

ДДП – декремент діелектричної проникності

ДДС – 4,4'-диізотіоціанатстильбен-2,2'-дисульфонова кислота

ГК – гіпертонічний криогемоліз

ГЛ – гіпертонічний лізис

КА – космотропні аніони

ЛА – ліотропні аніони

ЛБ – ліпідний бішар

ЛР – ліотропний ряд

НАс – ацетатна кислота

НВЧ – надвисокі частоти

НЧ – наночастинки

ПГЛ – постгіпертонічний лізис

ПМ – плазматична мембрана

ХА – хаотропні аніони

ЧДР – частота діелектричної релаксації

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Кріоконсервування – єдиний спосіб «повернути життя» клітинам після тривалого зберігання. Для підвищення ефективності та вдосконалення методів низькотемпературного зберігання необхідне детальне розуміння механізмів кріопошкодження [1-3]. Одним із найбільш актуальних наукових завдань кріобіології є забезпечення тривалого зберігання функціональної та структурної цілісності еритроцитів людини для поповнення резерву найбільш потрібного медицині ресурсу, особливо під час масових уражень населення [4].

Відомо, що основні чинники кріопошкодження клітин пов'язані зі зміною властивостей середовища. Досить детально досліджені осмотичні явища, які залежать від концентрації розчинених частинок і відносяться до сильних «ефектів розчинів» [5-10].

Крім того, відомі також слабкі «ефекти розчинів», обумовлені природою розчинених частинок. Такі ефекти були відкриті ще в 1888 р. Ф. Гофмейстером, який розташував іони у ліотропні ряди (для аніонів:  $\text{ClO}_4^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{As}^- < \text{F}^- < \text{SO}_4^{2-}$ ) від слабогідратованих (хаотропних) до сильногідратованих (космотропних) але їхній вплив досі не має адекватного теоретичного обґрунтування. Тому вплив ліотропних аніонів неможливо прогнозувати, а закономірності для кожного окремого випадку потрібно встановлювати експериментально [11].

Існує багато даних щодо залежності простих біооб'єктів від впливу ліотропних аніонів. Значні зміни відбуваються у стані ліпідних шарів [12, 13], білків та їхніх гелів [14-21], які аналогічні мішеням кріопошкодження клітин [1, 2]. Було показано, що вплив аніонів із найсильнішими ліотропними властивостями призводить до пошкодження еритроцитів під час заморожування, яке збігається зі зміною рівня сенсibiliзації до осмотичного та холодового шоків [22, 23].

Дослідження ефекту ліотропних аніонів не отримало розвитку у кріобіології через відсутність явного кріозахисного впливу та недостатність інформації. Сьогодні у світовій науці інтерес до цього явища зростає, зокрема через те, що воно дозволить розібратися у молекулярних механізмах взаємовідносин біоструктур із водним оточенням. Результати останніх досліджень вказують на можливість керування станом простих біологічних об'єктів через модифікацію гідратної води ліотропними аніонами [18, 24].

У зв'язку з прогресом у дослідженнях ефектів аніонів ліотропного ряду представляло інтерес встановити закономірності їхнього впливу на клітини. Вивчення змін у температурно-осмотичній адаптації еритроцитів дозволить цілеспрямовано використовувати такі ефекти з метою підвищення ефективності кріозберігання клітин і підбору кріозахисних агентів, якими можуть бути й наночастинки [3, 25].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини та тварин біологічного факультету ХНУ ім. В. Н. Каразіна МОН України відповідно до наукового напрямку роботи «Фізіолого-біохімічні та структурно-функціональні закономірності клітинної адаптації до дії екзо- та ендогенних чинників» (номер державної реєстрації 0106U001584) та відділу кріоцитології ІПКіК НАН України за темою «Механізми осмотичної та температурної чутливості клітин при дії модифікаторів цитоскелет-мембранного комплексу, амфіфільних речовин та кріопротекторів» (номер державної реєстрації 0104U006437).

**Мета та завдання дослідження.** Метою даної роботи було комплексне вивчення ефекту аніонів ліотропного ряду на адаптацію еритроцитів людини до умов, які моделюють вплив основних факторів кріопошкодження: гіпертонічного лізису, гіпертонічного кріогемолізу та постгіпертонічного лізису.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні завдання:

1. Дослідити вплив ліотропних аніонів на адаптацію еритроцитів до гіпертонічного лізису в 4 М NaCl за умов зміни осмоляльності середовища попередньої інкубації, температурних режимів і рН.

2. Визначити закономірності гіпертонічного криогемолізу еритроцитів у розчинах, які містять аніони, за умов варіювання температурно-осмотичних показників, тривалості попередньої інкубації та рН середовища.

3. Вивчити особливості температурно-осмотичної адаптації еритроцитів до постгіпертонічного лізису у середовищах, які містять різні аніони, на етапі дегідратації.

4. Визначити характер впливу різних аніонів у середовищі на морфологічні характеристики еритроцитів в умовах підвищеної осмоляльності середовища.

5. Визначити діелектричну проникність суспензій еритроцитів для оцінки впливу аніонів на кількість води, зв'язаної з біоструктурами.

6. Оцінити можливість використання наночастинок із різним формфактором як криозахисних агентів.

*Об'єкт дослідження:* гіпертонічний лізис, постгіпертонічний лізис, гіпертонічний криогемоліз.

*Предмет дослідження:* вплив аніонного складу середовища на гіпертонічний лізис, гіпертонічний криогемоліз і постгіпертонічний лізис еритроцитів людини.

**Методи дослідження.** У роботі використані кріобіологічні (моделювання чинників кріопошкодження), спектрофотометричний, мікрогематокритний, іонометричний, осмометричний, біофізичні методи, метод світлової мікроскопії із використанням термоприставки та статистичний аналіз отриманих експериментальних даних.



**Наукова новизна отриманих результатів.** У роботі *вперше* було комплексно досліджено вплив аніонів ліотропного ряду на адаптивну поведінку еритроцитів людини при моделюванні основних чинників кріопошкодження та встановлено закономірності адаптації клітин у присутності хао- та космотропних аніонів до зсуву осмоляльності та температури середовища. *Вперше* виявлено взаємозв'язок між перебігом гіпертонічного лізису та гіпертонічного кріогемолізу, який полягає у сенсibiliзації еритроцитів до обох видів стресу після попередньої інкубації у середовищах однакової осмоляльності. Ця критична осмоляльність «дзвоникоподібно» змінюється відповідно до розташування аніонів у ліотропному ряду, як і ступінь гідратації клітин у присутності ліотропних аніонів. Саме за критичної осмоляльності найбільш точно проявляються фази розгортання гіпертонічного кріогемолізу в часі.

*Уперше продемонстровано* підвищення адаптивної пластичності клітин за умов гіпертонічного кріогемолізу в присутності слабохаотропного  $\text{Br}^-$ , яке відбувається без пошкодження мембран під час тривалої передінкубації та *пояснено* природу захисного ефекту слабкосмотропного  $\text{As}^-$  через підвищення ступеня гідратації клітин. *Уперше показано* інверсію стабілізаційного впливу середовищ із низьким рН (5,4) у присутності сильних хаотропних аніонів в умовах гіпертонічних навантажень. *Уперше уточнено* дані щодо впливу температури на температурно-осмотичну адаптацію клітин у присутності хао- та космотропних аніонів. *Уперше встановлено* зменшення рівня постгіпертонічного лізису еритроцитів із посиленням космотропних властивостей аніонів, що корелює з особливостями змін морфологічних та об'ємних характеристик еритроцитів за температурно-осмотичного навантаження. *Уперше оцінено* антигемолітичну активність ортованадатних наночастинок із різним формфактором при гіпертонічному лізисі еритроцитів.

**Практичне значення отриманих результатів.** Проведені наукові дослідження обґрунтовують доцільність використання ефекту аніонів

ліотропного ряду в розчині для регуляції температурно-осмотичної поведінки клітин із метою покращення їх адаптації до умов заморожування-розморожування. Отримані у роботі наукові результати дозволять підбирати нові кріопротектори та ефективні кріозахисні середовища. Виявлені закономірності впливу аніонів можуть використовуватися для більш детального вивчення механізмів кріопошкодження та обґрунтування розробки підходів для захисту клітин.

Результати можуть бути рекомендовані до використання в навчальному процесі для підготовки фахівців у галузі кріобіології, фармакології, біофізики (додаток В).

**Особистий внесок здобувача в роботу.** Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Автором проведено пошук та аналіз наукової літератури, розроблено концепції та дизайн дослідження, здійснено експерименти та отримано результати, виконано їх статистичну обробку та аналіз, сформульовано висновки роботи, які ґрунтуються на експериментальних даних, оформлено та підготовлено матеріали до публікації. Визначення мети, завдань дослідження та шляхів їх вирішення, а також обговорення, узагальнення та інтерпретацію отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником, д.б.н., професором В. А. Бондаренком, що відображено в опублікованих у співавторстві роботах за темою дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації представлені на українських і міжнародних конференціях та симпозіумах: конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині 2006» (Харків, 2006 р.); конференції, присвяченій 90-річчю НАН України та 10-річчю кафедри ЮНЕСКО з кріобіології «Нові кріотехнології для вирішення фундаментальних та прикладних задач медицини» (Харків, 2008 р.); V Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2010 р.); VI Міжнародній конференції молодих науковців

«Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2011 р.); 4<sup>th</sup> Ukrainian–German Symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» (Ільменау, 2012 р.); 17-й Міжнародній Пушчинській школі-конференції молодих науковців «Біологія – наука ХХІ сторіччя» (Пушино, 2013 р.); науковій конференції «Експериментальна та теоретична біофізика» (Пушино, 2013 р.); 5<sup>th</sup> Ukrainian–German Symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» (Київ, 2015 р.).

**Публікація матеріалів.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць: 5 статей – у фахових наукових виданнях України (1 – входить до міжнародної наукової бази даних Index Copernicus International), 1 стаття – у спеціальному випуску закордонного наукового видання, яке входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 1 стаття – у збірці матеріалів конференції (загалом 2 наукові статті мають ідентифікатор DOI) та 7 тез доповідей на українських та міжнародних конференціях і симпозіумах.

**Структура й обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 155 сторінках, проілюстрована 24 рисунками. Містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати досліджень та їх обговорення, які представлені у 4-х підрозділах, узагальнення, висновки, список використаної літератури, що містить 180 джерел на 19 сторінках, 3 додатки.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Адаптація еритроцитів до впливу основних чинників кріопошкодження

В середині 50-х років ХХ сторіччя виморожування води у льод визнано основним фактором, який не дає клітинам повернутися до нормального функціонування у процесі кріозберігання. Пошкодження за умов повільного охолодження в першу чергу залежить від зміни осмотичних властивостей середовища і тому отримало назву «ефектів розчину» [26-33].

Для більш детального дослідження осмотичного впливу середовищ на клітини при заморожуванні-розморожуванні використовують спрощені модельні умови, які дозволяють детально розглядати його аспекти, пов'язані, як гіпертонічними умовами (гіпертонічний лізис), так й поверненням з них у нормотонічні (постгіпертонічний лізис) відповідно до етапів кріозберігання [28-33].

Експозиція у гіпертонічних середовищах запускає осмотичний механізм руйнування еритроцитів. Через різницю хімічних потенціалів на клітинній мембрані з'являється рушійна сила для витікання усієї об'ємної та частини зв'язаної води з клітин, об'єм яких за декілька секунд зменшується [34]. Мінімальне зневоднення становить 50–60 % від ізотонічного об'єму еритроцита, але навіть меншою мірою призводить до концентрування й збільшення іонної сили протоплазми приблизно втричі та концентрації білків у цитоплазматичній поверхні мембрани. Внаслідок цих процесів порушується бар'єрна функція мембрани, що за кілька хвилин зрушує  $K^+-Na^+$  іонну рівновагу [35], внаслідок чого розвиваються мембранні дефекти аж до макроскопічних пор та виходу через них гемоглобіну [26, 36-39].

Дані, отримані у рамках такого моделювання, відносно стійкості еритроцитів до критично-осмотичних умов заморожування без додавання кріопротекторів показують, що їх адаптивний потенціал істотно залежить від характеристик середовища, у якому вони знаходяться безпосередньо перед навантаженням. Отже, комбінація початкових параметрів середовища «програмує» адаптивну реакцію клітин [40].

Встановлено, що зміна балансу вільної та зв'язаної води у клітині шляхом попереднього часткового зневоднення еритроцитів проявляється на етапах адаптації після перенесення у 4 М розчин NaCl. Початковий етап адаптації супроводжується швидкою зміною об'єму клітини та поступовим зниженням рівня її пошкодження у гіпертонічних умовах. Наступний етап стабілізації відбувається коли перед перенесенням у гіпертонічні умови клітини перебувають у середовищі з помірною гіпертонічністю. Така передобробка, з одного боку, мінімізує наслідки об'ємного зсуву, а з іншого – такого зневоднення клітин ще недостатньо для формування трансмембранних дефектів. Етап сенсibiliзації, на якому клітини вже в умовах передінкубації через підвищену тонічність середовища отримують дефекти структури мембрани, які при подальшому навантаженні можуть розвинути у стабільні макроскопічні трансмембранні пори [26, 40].

Багато дослідників звертали увагу на те, що осмотична поведінка еритроцитів залежить не тільки від розглянутих вище сильних ефектів розчину (осмоляльності), а й від виду іона в середовищі [5, 7, 41-43]. Слабкі ефекти є універсальними для усіх об'єктів у розчинах через характерний вплив іонів на властивості розчинника. Інтерес до таких ефектів ліотропних аніонів породжує безліч досліджень в усьому світі, що свідчить про їх вкрай важливе значення через можливість розкриття молекулярних механізмів взаємодії біоструктур із водою [11, 14-16, 18-21, 24, 44-53], але дослідження еукаріотичних клітин зустрічаються майже виключно у галузі кріобіології [5, 22, 23, 42].

Відомо, що багато клітин гине через «холодовий шок» під час охолодження в діапазоні позитивних температур, навіть в ізотонічному середовищі, в якому кристали льоду ще не формуються [36]. Однак такий температурний шок не пошкоджує еритроцити без підвищення тонічності середовища. Тому окремим напрямом досліджень було вивчення специфічного виду пошкодження – гіпертонічного кріогемолізу (ГК), яке вперше виявлено майже сторіччя тому Дж. Лавлоком [26]. За цей час, багато дослідників визначили особливості цього процесу [54, 55].

Встановлено, що ГК відбувається під час охолодження еритроцитів у діапазоні з 45–25 до 13–8 °С при експозиції у середовищах, які мають надкритичні характеристики (1200–1400 мОсмоль/кг) та речовини, що не проникають через мембрану. Протягом перших десяти хвилин у площі мембрани відбувається спровоковане порушенням об'ємно-поверхневого балансу перерозподілення компонентів ліпідного бішару, що проявляється лізисом клітин через формування мембранних дефектів при охолодженні, яке посилює ізотропне розтягнення мембрани. Наступним етапом є порушення іонного гомеостазу, що супроводжується зниженням рівня гемолізу через зменшення натягання мембрани. Блокування іонного транспорту підвищує чутливість клітин [54-56].

При ГК також мають значення умови, які безпосередньо передують критичним. Так, попереднє охолодження еритроцитів стабілізує ліпідний бішар, який є найбільш чутливою до зміни температури часткою мембрани, та зменшує рівень пошкодження від ГК [54].

О ролі білків у механізмі ГК свідчить зміна чутливості еритроцитів при різному рН середовища, яке змінює заряд цих макромолекул [57].

Поведінка клітин у процесі відтавання досліджується моделюванням умов, які викликають такий самий рівень пошкодження через експозицію клітин у гіпертонічних середовищах із подальшим перенесенням в ізотонічні – постгіпертонічний лізис (ПГЛ).

Феномен ПГЛ також був вперше описаний Дж. Лавлоком у 1953 р., але й досі відсутнє єдине розуміння механізму пошкодження еритроцитів при регідратації. Оскільки водний баланс регулюється осмотично активними речовинами, саме параметри входу води до клітин віддзеркалюють стан та склад їх внутрішнього вмісту, а також його зміни за гіпертонічних умов [26].

В результаті зневоднення еритроцитів відбувається перетворення характеристик цитоплазматичного білкового гелю через зміну параметрів внутрішньоклітинного середовища. Конформація білків та їх взаємодія один з одним залежать від впливу розчинених речовин, що призводить до утворення аномальних зв'язків, олігомеризації спектрину, дисоціації білків цитоскелета [58].

Відомо, що аніони ліотропного ряду значно впливають на білкові гелі та розчини. При цьому змінюється стан білків через їх «висолювання» або «всолювання» залежно від взаємовідносин розчинених частинок із водою [59-67]. Це може регулювати осмотичну активність протоплазми, ступінь інтегрованості цитоскелета у єдину білкову мережу та силу її зв'язків з інтегральними білками мембрани. Отже, це основні параметри, які обумовлюють механізм ПГЛ [68-70].

Встановлено, що ПГЛ еритроцитів людини відбувається тільки в умовах гіпертонічної експозиції за температури 37 °С достатньої тривалості. При цьому трансформація білкового вмісту еритроцита може проходити з найбільшою ефективністю. Вважається, що відбувається «спікання» цитоскелетної білкової мережі в єдиний комплекс, внаслідок якого підвищується нестабільність мембрани завдяки порушенню зв'язку із підтримуючою мережею субмембранного цитоскелету через втрату мембранних білків смуг 4,5, 6–8 та дезінтеграції її функцій [68].

Охолодження знижує плинність ліпідного бішару мембрани, що пригнічує репарацію гемолітичних пор. Тому найбільш травмуючими умовами при ПГЛ еритроцитів є регідратація за гіпотермічних умов. На

цьому етапі відбувається різке та надмірне збільшення об'єму (до 170 %) через надходження у клітину води за законами осмосу. Однак, цитоскелет не виявляється спроможним швидко зв'язатися з ліпідним бішаром та розширитися з ним. Часткова втрата підтримки цитоскелета у поєднанні з великим натягом призводять до формування дефектів мембрани та виходу гемоглобіну [70]. Зміна вмісту  $Zn^{2+}$  та  $Ca^{2+}$  в середовищі регідратації також впливає на рівень пошкодження при ПГЛ. Вважається, що основні фактори, які керують рівнем ПГЛ, впливають саме на цьому етапі [68-70].

К. Muldrew припускає інший механізм пошкодження при ПГЛ. Він вважає, що при зміні концентрації внутрішньоклітинного середовища білки цитоплазми змінюють зв'язки між собою з сольових містків на іонну взаємодію та навпаки («всолуються» – «висолуються») відповідно. Отже, при гіпертонічних/гіпотонічних умовах білки у клітині зв'язують/ звільнюють іони. Зв'язані іони заміщуються зовнішньоклітинними, що на етапі регідратації стає причиною надмірного входу води до клітини та її пошкодження через набрякання. Коректування у цю модель може вносити вплив ліотропного ефекту аніонів через свою здатність регулювати «всолювання-висолювання» білків [71].

Отже, розглянувши вже наявні дані літератури про три основних типи моделей критичних умов, з якими стикаються клітини у циклі заморожування-відтавання, можемо узагальнити, що для усіх варіантів важливі як сильні (такі, як осмотичні) [68], так й менш вивчені слабкі (ліотропні) характеристики середовища [54, 72]. Дотримуючись загальної логіки вивчення більш тонких впливів, є сенс більш детально дослідити ефект ліотропних іонів на адаптацію еритроцитів. Для цього зробимо аналіз літератури за цим напрямом відносно його теоретичного обґрунтування та структур, аналогічних компонентам мембрани (через відсутність даних щодо впливу ліотропного ефекту на функціонування такої складної системи, як еукаріотичні клітини).



## 1.2. Явище ліотропного ефекту іонів

Розуміння впливу іонів на воду завжди цікавило вчених через те, що саме вони забезпечують такі помітні ефекти, як осмотичний тиск концентрованого розчину, який може сягати сотен атмосфер. Тому ще у XIX сторіччі Я. Вант-Гофф, С. Арреніус, В. Оствальд та В. Пфедфер здійснили прорив у їх вивченні [73]. За допомоги теорій Дебая–Хюккеля [74] та Гуї-Чепмена [75] можна прогнозувати «неспецифічні» ефекти іонів, які пов'язані з їх зарядом та концентрацією у простих розчинах електролітів (до 1 М) [76-79].

Менш помітний «специфічний» ліотропний ефект іонів не пояснюється такими причинами та обумовлений слабкими короткодіючими взаємодіями іонів з водою. Слабкі взаємодії у розчинах помітно проявляються завдяки нейтралізації зарядів іонів через утворення іонних пар [11]. Виняткова важливість цього явища для різних дослідних і прикладних галузей привела до інтенсивного його вивчення в результаті якого з'явилися поняття «космотропні та хаотропні» або «гідрофобні та гідрофільні» іони, «висолювання та всолювання», які свідчать про вплив природи розчинених речовин на властивості розчинника (явище ліотропії, яке у відношенні води коректно називати «гідротропією») [77, 80, 81].

Встановлено, що слабкий специфічний вплив іонів є універсальним. Від нього залежать властивості повітряно-, олійно-водних та гідрофобних поверхонь, подвійних шарів і мембран, гелів та білків, активність ферментів та розвиток мікроорганізмів, гідратація наночастинок, транспортні процеси та багато іншого [11, 21, 82, 83]. Деякі з них посилюються поблизу поверхонь. Серед даного переліку є структури, які відповідають мішеням кріпошкодження клітин [84].

Однак природа ліотропного ефекту не пояснюється ні сучасними теоріями фізичної хімії, ні розчинністю солей та дією електролітів, ні

поверхневим натягом, ні виміром рН та  $\xi$ -потенціалів, ні буферними властивостями, ні міцелами та мікроструктурою емульсій, ні поверхневою-активністю речовин та їх транспортом через мембрани, ні гель-золь переходами, ні молекулярними силами та колоїдною стабільністю [77, 82]. Не працюють моделі відповідно до яких вода розглядається як однорідне середовище. Отже, відсутні достатні фундаментальні знання у цій області, проте на практиці специфічні ефекти іонів успішно використовуються завдяки експериментально встановленим закономірностям [77, 85].

Космотропними названі малі іони з високою щільністю заряду тому, що вони є сильно гідратованими (наприклад, сульфат, фосфат і фторид натрій). Їх вплив можна описати за допомогою електростатичних взаємодій, але цього не можна зробити для хаотропних – великих іонів з низькою щільністю заряду та слабо гідратованих (наприклад, роданіду, перхлорату, броміду та позитивно заряджених груп амінокислот) [11, 77].

Важливим кордоном між двома групами іонів є перехід, який позначений силою водневих зв'язків між молекулами води. Для ліотропного ряду (ЛР) аніонів ( $\text{ClO}_4^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{Ac}^- < \text{F}^- < \text{SO}_4^{2-}$ ) він приблизно припадає на  $\text{Cl}^-$ , який є слабохаотропним. Таким чином, зв'язки хаотропних іонів з водними молекулами, які їх оточують, слабкіші, ніж зв'язок вода-вода, а космотропних – сильніше. Отже, аніони і катіони розташовуються у «ряди Гофмейстера» або ЛР відповідно до зменшення енергії гідратації. При зміні розчинника, рН або температури порядок розташування іонів у ЛР може змінюватися до обернення [78, 86].

За силою свого впливу аніони домінують над катіонами, можливо, через більші розмір та кількість в них електронів. Було також відмічено, що ефекти двовалентних іонів, як правило, більш виражені, ніж одновалентних [87]. Крім того, існує залежність від геометрії іона (несферичні іони (ацетат) не підкоряються закономірностям сферичних, таких як галогени та перхлорати) [78].

У деяких випадках ефекти хао- і космотропних іонів реалізуються через різні механізми, а не відповідно до безперервно градуйованої шкали. Також деякі експериментальні дані показують, що зміни тільки в структурі води не пояснюють усі специфічні ефекти іонів. Вплив аніонів ЛР пояснюється також прямими взаємодіями між іонами, макромолекулами та надмолекулярними структурами (наприклад, ліпідними шарами) [88].

Хао- та космотропні аніони здійснюють протилежні ефекти на біостукуру: зменшують або збільшують поверхневий натяг, підвищують або знижують розчинність білків, «всолують» (солюбілізація) їх або «висолують» (агрегація), посилюють або ослаблюють їх денатурацію, знижують або підвищують стабільність білків відповідно.

Існує думка, що основна причина ліотропного ефекту обумовлена комбінацією загального впливу аніонів на структуру розчинника і специфічних взаємодій між іонами та іншою розчиненою речовиною (білками або іншими біополімерами) [89, 90]. За допомогою нейтронної та рентгенівської дифракції показано, що іонні пари спонтанно утворюють тільки протилежно заряджені іони з рівною спорідненістю до води. Це контролює зв'язування іонів з білками та визначає їх розчинність [46, 88].

Таким чином, специфічний вплив іонів обумовлено дією досить різноманітних факторів. W. Kunz запропонував ієрархію сил і вільних енергій, що діють на розглянуті явища, виходячи зі спрощеної моделі безструктурної води [78]:

1) енергія гідратації іона (енергія перенесення іонів з вакууму в об'ємну воду);

2) зміна вільної енергії (для розбавлених розчинів приблизно описується теорією Дебая-Хюкеля);

3) сила поверхневого натягу (управляє міжфазною напругою на межах з розчином);

4) взаємодії між колоїдними частинками або макромолекулами, які описуються теорією ДЛФО (розробленою Дерягіним, Ландау, Фервеем та Овербеком) та передбачають, що стабільність дисперсних частинок у розчині залежить від сумарної енергії ван-дер-ваальсових та електростатичних сил притягнення/відштовхування, які виникають у подвійного дифузного шару. При цьому існує відстань, за якої сили притягнення перевершують електростатичне відштовхування, викликаючи адгезію. Вони лежать в основі науки про колоїди [90, 91].

Для розуміння властивостей розчинів виявилось корисним положення про те, що об'ємну воду можна уявити як суміш двох її видів, які швидко взаємоперетворюються: менш щільної, але більш структурованої форми, та більш щільної, але менш структурованої. Так, розчинена речовина «що структурує розчин» збільшує частку менш щільної архітектури за рахунок більш щільної гідратації розчиненої речовини у воді [88]. Сили, які виникають завдяки структурі розчинника (в тому числі й поверхнево-індуковані), називають «структурним компонентом тиску, що розклинає» – надлишковим тиском, що визначає термодинамічну рівновагу в тонкому прошарку між частинками [90, 91].

Також було показано, що у розчинах без твердих домішок присутні макроскопічні розсіювачі світла, представлені кластерами мікронного розміру, які складаються з полідисперсних нанопузирів повітря радіусом 70–100 нм, концентрація яких підвищується зі збільшенням вмісту іонів. Припускають, що ці кластери нанопузирів можуть впливати на структуру мембран еритроцитів [92].

Специфічний вплив розчинених у воді ліотропних речовин віддзеркалюється на її структурі. У зв'язку з цим з'явилося поняття «структурної температури», як міри рухливості молекул (рис. 1.2.1.1), що віддзеркалює руйнування структури води під впливом ХА, та її структурування у присутності КА [93].

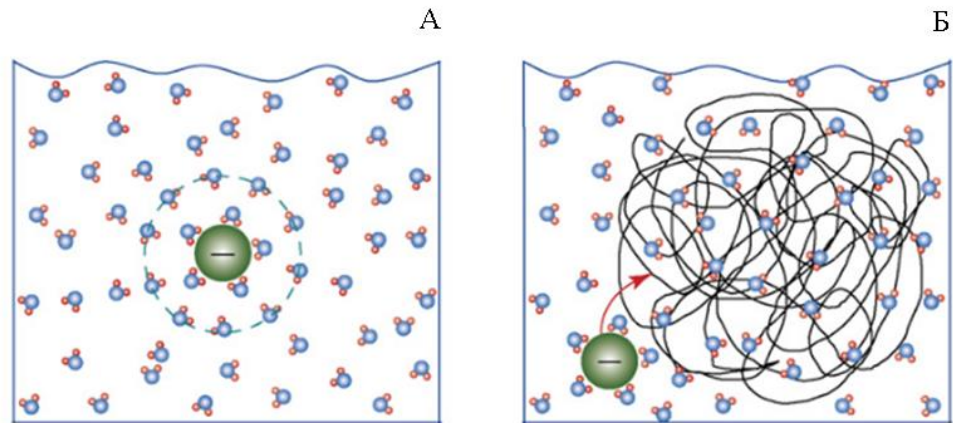


Рис. 1.2.1.1. Вплив ліотропних аніонів на «структурну температуру» через зміну ступеня рухливості молекул у розчині: А – космотропні, Б – хаотропні [94].

Важливим параметром для адаптації клітин до зсуву осмотичних умов є стан їх білків та інших заряджених структур, який значно залежить від рН середовища. Ліотропні іони впливають також й на дану характеристику. Такий ефект важливо враховувати у обмежених середовищах біосистем, у яких концентрації ЛА можуть бути досить високими, що спричинить значний зсув рН. В діапазоні концентрацій до 0,15 М не виникає специфічних ефектів аніонів і зсув рН дуже малий. Загальна проблема виникає за умови більшої концентрації ЛА. Відомо, що у присутності ХА зміни рН сильніше впливають на стан об'єктів у розчині [53]. Через складність вимірювання детальні дані про специфічний ефект іонів на зсув рН відсутні, тому визначати закономірності його впливу потрібно експериментально для кожного випадку [76].

Для прогнозування специфічних ефектів іонів потрібно їх моделювання, але навіть у простих розчинах електролітів на підставі класичних теорій воно неадекватне. Тому було запропоновано враховувати поляризованість іонів та дисперсних сил (тобто взаємодію дипольних моментів). Однак показано, що це не має великого значення [87, 95]. До сьогодні моделювання конкретних ефектів іонів залишається невирішеною проблемою, особливо, стосовно

буферів або клітин. У спрощеному уявленні причинами ліотропного ефекту є різні сили і орієнтація дипольних взаємодій іон–вода [83].

З точки зору молекулярних механізмів внутрішньоклітинна вода розглядається у теорії багатошарової організації поляризованої води у клітині. Відповідно до неї молекули води взаємодіють з зарядженими групами цитоплазматичних білків через що поляризуються та утворюють більш міцні водневі зв'язки, як із білком, так і з наступним шаром молекул води. Це пояснює інші властивості гідратної води та припускає, що уся або майже уся внутрішньоклітинна вода має особу структуру та властивості, які обумовлені динамічною рівновагою між нею, білками та іонами [96]. Але ця теорія не враховує хаотропні ефекти, які лежать за межами електростатичних взаємодій та обумовлюють, наприклад, адсорбцію ХА на неполярних поверхнях [53]. Отже, для розуміння можливих шляхів впливу ЛА важливо враховувати такий критичний орієнтир, як сила взаємодії аніона з водою відносно сили взаємодії молекул води між собою [82].

У відношенні кріопошкодження клітин такий підхід підвищує значущість ролі води у клітині та важливість властивостей цитоплазми в цілому. Отже, змінюючи характеристику іонів, як найбільш мобільного компонента вказаної системи, можна керувати параметрами усієї цитоплазми, «налаштовуючи» її перед температурно-осмотичним навантаженням, оскільки саме початкові умови визначають рівень пошкодження клітин під час температурно-осмотичних навантажень [97]. З цієї точки зору зміну кількості іонів (через осмотичні механізми) можна розглядати як «грубе налаштування», а модифікацію їх ліотропних характеристик – як «тонке налаштування» властивостей цитоплазми та клітин у цілому.

### **1.3. Вплив ліотропних аніонів на біоструктури**

#### **1.3.1. Вплив ліотропних аніонів на поверхні та мембрани**

Одним з найбільш важливих аспектів, коли ефект аніонів ліотропного ряду відіграє значну роль, є взаємодія поверхонь. Як правило, специфічні ефекти іонів проявляються поблизу поверхонь завдяки електростатичним явищам, але можуть бути пов'язані зі специфічними причинами [76].

У 1985 р. K.D. Collins та M.W. Washabaugh вперше запропонували просту модель поведінки води біля усіх поверхонь незалежно від того, неводний компонент є нейтральним або зарядженим, полярним або неполярним. Відповідно до цієї моделі, вода поблизу поверхні розділена на три шари товщиною в одну молекулу води. Розчинена речовина визначає поведінку першого «прикордонного» шару води, об'єм розчину – третього, а обидва конкурують за проміжний водний шар (перехідний) [83].

Сила взаємодії з першим шаром води зменшується від космо- до хаотропних іонів. Структурування води космо-тропними іонами обумовлено не тільки силою зв'язку безпосередньо прилеглих молекул води, але і розподілом свого заряду між ними.

З цієї моделі випливає важливий для кріобіології висновок, що при охолодженні до 0 °С речовини мають тенденцію до нерівномірного розподілу в розчині. Наприклад, іони можуть бути у високій концентрації у першому шарі на межі поділу та у дуже малій в наступних шарах. Перехідний шар води може звільнитися від розчинених речовин та перетворитися на об'ємну воду [83]. Загалом, вважається, що з пониженням температури розчину до 0 °С ліотропний ефект проявляється сильніше. Ця температурна залежність є для них діагностичною [83, 98].

Відомо, що від кількості іонів поблизу зарядженої поверхні залежить локальна зміна діелектричної проникності. Вимірювання діелектричної

проникності показало, що в ряду галоген-аніонів малий іон фториду (який не поляризується) виключається з поверхні, а бромид та йодид, які поляризуємі, присутні на ній та мають більші концентрації у міжфазній зоні, ніж в об'ємі розчину [99]. У системі з двох пластин це призводить до зміни тиску між двома поверхнями [100].

Вплив ліотропного ефекту сильно виражено на ліпідні поверхні, які є важливою складовою біомембран. Є дані, що спорідненість ліотропних аніонів (ЛА) до поверхні міцел зменшується з підсиленням космотропності, причому взаємодії є електростатичними. Сильно гідратовані іони тримаються далі від поверхні, а слабо гідратовані можуть глибоко проникати у гідрофобне ядро шару. В обох випадках вони не зменшують заряд поверхні так, якщо б вони розташовані безпосередньо на ній. Отже, можна очікувати «дзвоникоподібну» залежність зміни властивостей від розташування іонів у ЛР [101].

Присутність різних солей впливає й на фазовий стан ліпідів. Космотропні аніони (КА) призводять до істотного зниження температури переходу фосфатидилетаноламіну з рідкокристалічної в гексагональну фазу і невеликого збільшення температури переходу до рідкокристалічної. Хаотропні аніони (ХА) мають зворотні залежності. Методом рентгенівської дифракції показано, що ці ефекти опосередковані здатністю розчинених речовин змінювати взаємодію ліпід–вода [13]. Цікаво, що температура зміни фазового стану ліпідів може бути точно налаштована шляхом додавання конкретних солей в певній концентрації [91].

Так, впорядкованість моношару ліпідів відповідає ЛР:  $\text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ , а в присутності останніх (сильно хаотропних аніонів) шар ліпідів руйнується. Таку дію приписують їх здатності проникати повз гідрофільної поверхні груп полярних головок у більш гідрофобну частину шару ліпідів [85].



Вплив хаотропного іона призводить до більшої мобільності води в безпосередній близькості від нього, ніж об'ємна вода (тобто послаблюється її структурованість), а іон стає «липким». Такі іони «виштовхуються» на слабо гідратовані поверхні силою водо-водяних взаємодій [102]. Це підтверджується експериментальними даними, що перхлорат і тіоціанат адсорбуються на штучних фосфоліпідних мембранах і надають цим поверхням негативного електростатичного потенціалу [103]. Причому така адсорбція відбувається навіть у відсутності сили тяжіння між іоном й поверхнею.

Несферичний тіоціанат ( $\text{SCN}^-$ ) з великим дипольним моментом і поляризацією є сильно хаотропним та має велике біологічне значення, пов'язане з порушенням ліпідних поверхонь. У більшості випадків невідомо – він взаємодіє з ліпідами безпосередньо або опосереднено. Дослідники показали значні розширення моношарів при контакті з розчином  $\text{SCN}^-$ , порушення конформації ліпідних ланцюгів та структури внутрішньої води [104]. Встановлено, що слабохаотропний  $\text{Cl}^-$  також проникає всередину ліпідних шарів у їх гетерогенних ділянках, але великі аніони через менш структуровану гідратну оболонку проникають глибше [102, 104].

Різні неорганічні та органічні солі можуть змінювати ефективність деяких мембрано-пов'язаних фізіологічних процесів. Спочатку в таких об'єктах, як м'язи і поодинокі м'язові волокна було встановлено, що нітрати та інші аніони можуть призвести до збільшення м'язової напруги. Збільшення впливу аніонів відбувалося в порядку  $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$  [105-107].

У 1960 р. А. Ходжкин зауважив, що цей порядок відповідає адсорбційній здатності аніонів і припустив, що ефект може виникнути в результаті їх адсорбції на поверхні м'язової оболонки, що, у свою чергу, змінює електричне поле на мембрані. Згодом було показано, що порядок впливу аніонів узгоджується з їх порядком у ліотропному ряді [83, 89]. Зокрема у тому, що залежно від виду ЛА змінюється робота натрієвих каналів

скелетних м'язів, а  $\text{ClO}_4^-$  і  $\text{SCN}^-$  знижують провідність через ліпідні мембрани для негативних зарядів і посилюють її для позитивних [103].

Показано, що аніони ліотропного ряду впливають на канали та роботу іонних насосів. У одному з експериментів ЛА пригнічували взаємодію  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази з фосфатною групою відповідно до ряду Гофмейстера. Ступінь зв'язування знижувалася в рази зі збільшенням концентрації солі, а при нульовій температурі звільнення фосфатної групи розтягувалося в часі. Високі концентрації ХА пригнічували активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази за температури  $37^\circ\text{C}$  пропорційно прояву хаотропних властивостей. Контроль над конформацією ферменту автори приписують фазовому стану ліпідної мембрани [108, 109] або зміні відносної стабільності різних конформацій  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, які впливають на кінетику іонного транспорту шляхом зміни дипольного потенціалу через додавання ліотропних аніонів [110].

Велика кількість різноманітних систем, на які впливають аніони ліотропного ряду, сформувала думку, що: всі властивості мембрани, що є чутливими до електричного поля, змінюються під впливом ліотропних аніонів. Виникає лише питання: наскільки сильно виражені такі зміни. Є дані, що поверхні заряджаються через ліпід-іонні взаємодії, причому показано, що ХА ( $\text{ClO}_4^-$  та  $\text{SCN}^-$ ) адсорбуються на ліпідних везикулах і надають їх поверхні негативного електростатичного потенціалу [110], який різко збільшується при температурі фазового переходу ліпідів із гелю в рідкокристалічний стан. Причиною таких перетворень автори вважають зміну максимального числа сайтів зв'язування на одиницю площі [111]. Ефективність аніонів у зниженні  $\xi$ -потенціалу є наступною:  $\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-}$  [110].

Виявлено набухання бішарів та збільшення їх площі в присутності хаотропних  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaI}$  та  $\text{NaSCN}$ , причому ефекти відбуваються відповідно до порядку іонів у ЛР, починаючи з  $\text{SCN}^-$ , який індукує найбільш виражені зміни. Залежність є приблизно лінійною за низьких концентрацій, але стає сильно нелінійною за високих концентрацій [112]. Ці солі

розширюють моношар, руйнують впорядковані фази, змінюють порядок ліпідних ланцюгів та кут їх нахилу в рідкій конденсованій фазі, причому вплив сильних ХА відрізняється від тих, які мають помірні хаотропні властивості [98].

Показано, що аніони й катіони можуть впливати на конформацію ліпідів, переорієнтуючи їх полярну групу, що може бути важливим фактором при зв'язуванні іонів з поверхнею мембрани. На підставі ЯМР-спектроскопічного аналізу показано, що диполь полярної групи фосфатидилхоліну зазнає змін орієнтації при взаємодії з зарядженими молекулами та іонами. Позитивно заряджені частинки рухають N<sup>+</sup>-кінець диполя до водної фази, в той час, як негативно заряджені частинки зміщують його до вуглеводневої фази. Однак переорієнтація полярної групи має тільки незначний компенсаційний ефект, тоді як основним є електростатичний [110].

Отже, практично усі фізико-хімічні властивості біологічних мембран сильно залежать від специфіки іонів у навколишніх водних розчинах. А аніони та катіони ліотропних рядів визнані здатними модифікувати функціонування різних мембранно-пов'язаних фізіологічних процесів, що мають особливе значення для осмотичної адаптації клітин до умов заморожування. Однак незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених ефектам іонів, що стосуються мембран і поверхневих явищ, основні принципи їх впливу на функціонування клітин не дуже зрозумілі.

Показано, що проникність для аніонів знижується високими концентраціями конкурентного аніона. Тіоціанат є найпотужнішим інгібітором серед неорганічних аніонів, який знижує швидкість обміну хлориду до 7 % від його швидкості у хлоридному середовищі [113].

Проникність сульфату за температури 38 °С також знижується у присутності ЛА в послідовності: Cl<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup> < I<sup>-</sup> < NO<sub>3</sub><sup>-</sup> < SCN<sup>-</sup>. Клітини стають практично непроникними для сульфату в холодному середовищі з тіоціанатом (поглинання відсутнє протягом 2–3 днів) [113].

Слід зазначити, що ЛА, які викликають зменшення проникності для аніонів, підвищують проникність для катіонів у такій самій послідовності (з урахуванням сульфату). Проникність для  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  демонструє парадоксальну залежність від температури в присутності тіоціанату (120 мМ). Від 0 до 18 °С потік катіонів сповільнюється, а у разі підвищення температури більш 18 °С – прискорюється. Температурної чутливості хлоридного обміну не спостерігалось [114, 115].

У зв'язку з тим, що гідратованість рідких кристалів фосфоліпідів показує їх виборчу проникність для аніонів, виникає питання про відповідальність ліпідів еритроцита за його селективну проникність. Так, холінова група фосфатидилхоліну має спорідненість до одновалентних аніонів, яка відповідно до послідовності аніонів у ЛР надає все більшого впливу на проникність еритроцитів [76, 103].

Обмін хлоридів і сульфатів відрізняє те, що вони мають рН-залежний максимум, розділений більше ніж однією одиницею рН. При зниженні рН з 7,5 до 6,5 потік хлориду зменшується, а сульфату – збільшується [116].

Катіони й аніони, особливо за високої концентрації розчинених речовин, можуть змінювати чутливість клітини до осмотичного ефекту, пов'язаного зі змінами в об'ємі та структурі клітинної води, конформації макромолекул або безпосередньому впливі іонів [117]. Припускають, що приблизно 40 % ХА (йодиду та саліцилату), які надходять у клітину, адсорбовані на внутрішньоклітинних білках, а інша частина є вільними аніонами, розчиненими у водній фазі. Частка адсорбованих аніонів зі збільшенням температури зменшується незначно [116-118].

### 1.3.2. Залежність структурно-функціонального стану білків від ліотропного ефекту іонів

Дослідження взаємодії білків із розчинами представлена у літературі окремим напрямом. Через складну структуру цих молекул й складних, опосередкованих водою, білок-білкових та білок-електролітних взаємодій розуміння властивостей їх розчинів тільки формується. Специфічні ефекти іонів пов'язані з гідратацією, але їх молекулярне походження ще не визначено [17].

Перші уяви про космотропні аніони, такі як фторид або сульфат, виходили з того, що КА можуть організувати кілька шарів молекул води навколо себе та ефективно «красти» воду з розчинених білків, таким чином «висолюючи» їх. Напроти, ХА, такі як йодид, перхлорат або тіоціанат, не володіють цією здатністю та, відповідно, «всолюють» білки [17]. В останній час з'являється думка, що таку поведінку не можна пояснити взаємодією лише між іоном та водою і розчинений білок повинен бути включений у цей процес. Отже, щоб раціоналізувати ряд Гофмейстера потрібно розуміти не тільки гідратаційні властивості іонів, а також їх взаємодію із білковою поверхнею [17].

Мембранна біологія й наука про колоїди застосовують для опису цієї взаємодії теорію електростатичного подвійного шару, яка спирається на іонний заряд. Однак вона не може пояснити, чому протонування білка залежить від фону сольового розчину, а сумарний заряд біомолекули відрізняється у присутності розчинів хлориду та тіоціанату [82, 88].

За концентрацій солей, коли електростатичні потенціали екрануються, на перший план виходять слабкі взаємодії потенціалу іонної дисперсії, які можуть пояснити гідрофобні взаємодії, завдяки яким хаотропні іони адсорбуються на слабогідратованих речовинах або поверхнях, звільнюючи їх від слабозв'язаної води [11].

Загальновідомо, що аміно- та карбоксильні групи білків можуть іонізуватися у воді. Отже, білки володіють позитивними й/або негативними зарядами, які визначають їх електростатичні взаємодії та призводять до утворення навколо молекули білка гідратної оболонки. Встановлено, що додавання низькомолекулярних електролітів (як й незаряджених полімерів) до розчину білка екранує сили відштовхування між однаково зарядженими білками, що може призвести до їх осадження. Тому два різних електроліти в рівній концентрації можуть надати протилежний вплив на розчинність білка. Пояснюють це тим, що сильно гідратовані аніони не здатні екранувати заряди білка так ефективно, як слабо гідратовані, які підходять ближче до заряджених груп білків. Отже, це є одним із проявів ліотропного ефекту.

У 1960 р. різними термодинамічними та спектроскопічними методами показано, що  $\text{NH}_3^+$ -група білків краще взаємодіє зі слабо гідратованими аніонами (наприклад, бромідом, йодидом, перхлоратом або тіоціанатом), що призводить до «всолювання» (та дестабілізації) білка. Це передбачає «висолювання» (та стабілізацію) іонами, які сильніше розподілені по поверхні білка (рис 1.3.2.1. ) [17].

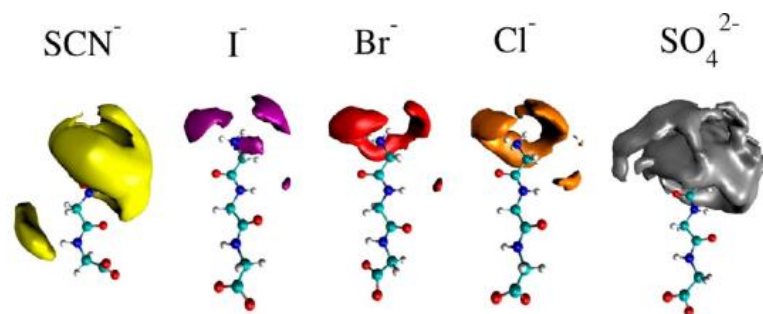


Рис. 1.3.2.1. Модель просторового розподілу аніонів ліотропного ряду біля  $\text{NH}_3^+$ -кінця цвіттеріону тригліцинового олігопептиду [17]

Останнім часом було показано, що здатність конкретної солі впливати на структуру води в об'ємі розчину не завжди відіграє істотну роль у ліотропному ефекті. Так, вплив розчиненої речовини на структуру води не корелює з його впливом на стабільність білків. Згідно з деякими даними іони

в розчинах взаємодіють із зарядженими амінокислотними групами так само, як вони могли взаємодіяти з іонами в розчині, а те, що вони пов'язані, здається, не має великого значення. Було виявлено, що сульфат взаємодіє майже виключно й сильно з катіонними групами пептиду так, що вже в 0,1 М розчині позитивні заряди локально й ефективно нейтралізовані (рис. 1.3.2.2) [119].

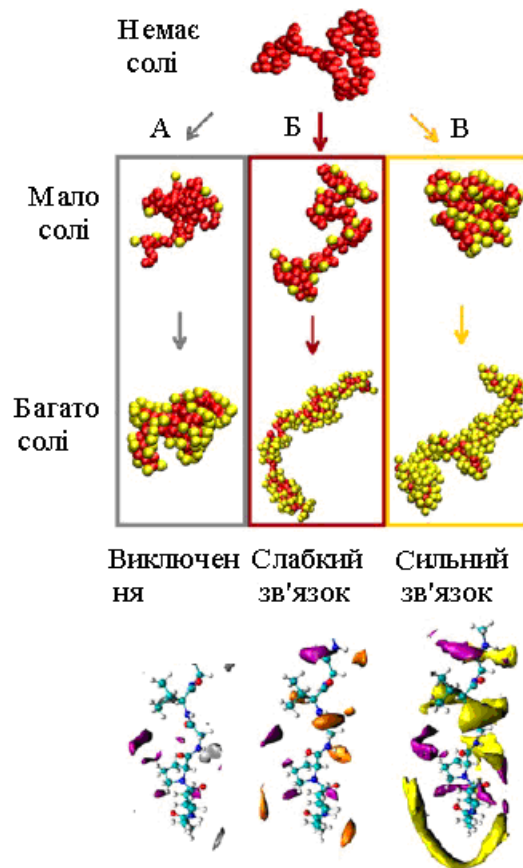


Рис. 1.3.2.2. Модель просторового розподілу солей гуанідину ( $\text{Gnd}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{GndCl}$  та  $\text{GndSCN}$ ): А –  $\text{SO}_4^{2-}$ ; Б –  $\text{Cl}^-$ ; В –  $\text{SCN}^-$  поблизу пентапептиду ELP для трьох різних режимів впливу солі [17].

Відомі дані, що іони, як і протони, можуть поширюватися по поверхні білка або мембрани, швидко проходячи між поверхнею білка та об'ємної води.

Ефекти ЛА на білки дуже різноманітні. Крім зміни розчинності білків, вони впливають на застигання й набухання гелів [21, 120], що сильно

залежить від температури. Охолодження сприяє застиганню й ускладнює набухання білкового гелю. Перше відповідає прямому порядку розташування іонів у ЛР, друге – зворотному ( $SCN > I > NO_3 > Cl > SO_4$ ) [61, 90, 121-126].

Вважають, що до зворотного порядку залежності від ЛР призводить ефект екранування заряду, який домінує при концентраціях солі 200 або 300 мМ. Вище цієї концентрації фізичні властивості відповідають прямим ЛР. Така поведінка є наслідком одночасного прегігу двох процесів: ослаблення електростатичного відштовхування через специфічну асоціацію хаотропних аніонів та здатності іонів змінювати поверхневий натяг білка або водної поверхні [124, 127, 128].

Аніони ліотропного ряду також змінюють показник рН. Присутність  $SCN^-$  знижує рН на поверхні білка, тому для отримання того ж ефекту, що й у присутності  $Cl^-$ , рН розчину з  $SCN^-$  має бути вищим [122]. При зсуві рН середовища в кислий бік від ізоелектричної точки білка вплив іонів ЛР зберігається, але послідовність ряду обертається. Так, при позитивному сумарному заряді лізоциму в низьких рН виявили вплив зворотного ЛР аніонів, прямого – для катіонів ( $Cs^+ < K^+ < Na^+$ ) [121].

Під впливом ліотропного ефекту змінюється спочатку структура, а потім функціональна активність білків, яка, як правило, демонструє характерну «дзвоникоподібну» залежність від порядку іонів у ЛР. Показано, що хаотропні й космотропні аніони у високій концентрації є інгібіторами ферменту NADH-оксидази бактерії *Thermus Thermophilus* за допомогою різних механізмів. Хаотропні аніони знижували активаційний бар'єр ферментативної реакції, а космотропні – навпаки. Аніони з середини ЛР не чинили істотного впливу на активність ферменту навіть при високій концентрації. У присутності аніонів не було виявлено ніяких істотних змін в формі ароматичної зони ферменту, але змінювалася гнучкість поліпептидного ланцюга його активного сайту. Аніонний ряд Гофмейстера виявився агентом,



який ефективно змінював активність ферменту за рахунок гнучкості поліпептидного ланцюга [11, 125].

Вважають, що для адекватної характеристики реальної продуктивності ферменту необхідно враховувати специфічні ефекти іонів, оскільки конформація ферменту, стабільність й активність є результатом складної взаємодії факторів, які не охоплюються класичними (електростатичними) теоріями фізичної хімії [86].

Електроліти мають високий ступінь специфічності впливу на активність ферментів, однак механізми цієї дії зрозумілі тільки частково. Слід зазначити, що існує не один ряд Гофмейстера і що навіть в межах одного ряду можуть бути перестановки декількох іонів залежно від властивостей. Цей ряд може бути «дзвоникоподібним», як у випадку з активністю деяких ферментів, які знаходяться під сильним впливом космотропних і хаотропних іонів та набагато менше залежать від таких «Гофмейстер-нейтральних» іонів, як натрій та хлорид [125].

Аніони ліотропного ряду впливають й на конформацію білків. Денатурація-ренатурація білка істотно залежить від електростатичної взаємодії заряджених груп, які є значними у молекулярних процесах за участю білків, у тому числі у білок-білкових взаємодіях, що відбуваються через зв'язування лігандів. Ефективність їх екранування вище для хаотропних аніонів, які денатурують (в порівнянні з фізіологічними або такими, що стабілізують). Аніони, які денатурують, як правило, взаємодіють переважно з поверхнею білка, в той час як ті, що стабілізують, переважно виключаються. Це свідчить про те, що ефективність різних аніонів в екрануванні взаємодій зарядів у білках також може відбиватися на порядку розташування іонів у ЛР [126]. Деякі автори вважають, що збільшення поверхневого натягу розчину, який забезпечують аніони, стабілізує білок у згорнутій конформації [129].

**Висновок з обзора літератури.** Численні дослідження, які присвячені явищу ліотропного впливу аніонів, дозволили дійти розуміння, що цей ефект

є значущим для структур, що входять до клітинної мембрани як складові. Тому він має впливати й на структурно-функціональний стан клітин. Проте передбачити вплив ліотропного ефекту аніонів у конкретних умовах, навіть у випадку простих об'єктів, без експериментальних даних неможливо через відсутність достатніх теоретичних обґрунтувань, а тому він потребує експериментального вивчення для кожного окремого випадка [11].

У рамках кріобіології було показано, що зміни, спричинені аніонами з найсильнішими ліотропними властивостями, сенсibiliзують клітини при заморожуванні та це відповідає пошкодженню при осмотичних та холодовому шоках [22, 23].

З вищенаведеного видно, що подальші дослідження ефекту ЛА у галузі кріобіології можуть дозволити цілеспрямовано використовувати ліотропні ефекти для керування станом клітин з метою підвищення ефективності кріозберігання та підбору кріозахисних агентів, зокрема наночастинок [130].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Об'єкт досліджень

Експерименти проводили на еритроцитах крові людини, отриманої Харківським обласним центром служби крові від дорослих донорів чоловічої статі, які мають другу (А) групу крові. Еритроцити консервували розчином Глюгіцир.

Еритроцити відмивали десятикратним об'ємом 0,15 М розчину NaCl (на 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,4) на лабораторній центрифугі «ОПн-3 У 4.2» (ВАТ ТНК «Дастан», Киргизстан) при 3000 об/хв протягом 3, 3 і 10 хв. Супернатант і лейкоцитарну плівку видаляли методом аспірації. Отриманий щільний осад еритроцитів розбавляли у 2 рази фізіологічним розчином NaCl, кінцева концентрація клітин становила 40 %. Суспензію клітин зберігали за температури 0 °С та використовували протягом 2-х годин.

#### 2.2. Біоетична експертиза

Роботу з біоматеріалом (кров людини) проводили згідно з міжнародно визнаними нормами GLP (1992 р.), ICH C8P (2002 р.), принципами ICH GCP (2008 р.), GLP (2002 р.), а також відповідно до типових положень з питань етики МОЗ України від 01.11.2000 р. № 281, Закону України «Про лікарські засоби» від 04.04.1996 № 123/96-ВР, ст. 7, 8, 12, Статуту Української асоціації з біоетики та «Типового положення про комісію з питань етики», затвердженого наказом МОЗ України від 12.07.2012 р. № 523. Доцільність використання біоматеріалу та його кількість було узгоджено з комісією з біоетики Науково-дослідного

інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Експертиза з питань біоетики проведена на засіданні комітету з біоетики Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 1 від 16.01.2020 р.).

### **2.3. Приготування середовищ із різними аніонами**

Готували ряд розчинів нейтральних солей натрію: NaSCN, NaClO<sub>4</sub>, NaBr, NaCl, NaAc, NaF, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на 10 % фосфатному буфері й доводили до рН 7,4 за допомогою лабораторного рН-метра I-160 (ОАО «ГЗВП», Білорусь).

### **2.4. Визначення осмоляльності середовищ**

Осмоляльність контролювали кріоскопічним методом вимірювання осмотичного тиску в усіх досліджуваних середовищах шляхом реєстрації характеристик їх замерзання на осмометрі «ОМКА-1Ц-01» («Медлабор-техніка», Україна).

В охолоджувачі кріоскопічного осмометра встановлювали температуру нижчу, ніж та, за якої починається кристалізація у середовищі. Потім вносили до нього 200 мл середовища в кріоскопічній кюветі з датчиком температури та фіксували осмоляльність за показаннями прибору.

### **2.5. Визначення рівню гемолізу еритроцитів**

Рівень гемолізу визначали в супернатанті методом спектрофотометрії на довжині хвилі  $\lambda = 543$  нм після центрифугування проб на лабораторній центрифугі «ОПн-3 У 4.2» (ВАТ ТНК «Дастан», Киргизстан) при 3000 об/хв протягом 3 хв.

За 100 % приймали поглинання дослідної проби з додаванням 0,1 % детергенту Тритон X-100 (AppliChem, Німеччина).

## **2.6. Визначення чутливості еритроцитів до гіпертонічного лізису**

Осмотичне пошкодження еритроцитів внаслідок різкого підвищення концентрації позаклітинного середовища моделювали за допомогою їх експозиції у гіпертонічному середовищі. Для цього 100 мкл суспензії на 5 хв переносили в 900 мкл розчину 4 М NaCl.

Вплив ліотропних аніонів здійснювався на етапі попередньої інкубації. Для цього 50 мкл 40 % суспензії еритроцитів на 2 хв переносили в 450 мкл середовищ із різними аніонами з осмоляльністю 300, 600, 900, 1200, 1500 та 1800 мОсмоль/кг.

Експеримент проводили в температурних режимах: 37–37 та 0–0 °С.

## **2.7. Визначення чутливості еритроцитів до гіпертонічного кріогемолізу**

Гіпертонічний гемоліз здійснювали при осмоляльностях середовища від 300 до 2400 мОсмоль/кг у два етапи. На першому етапі 50 мкл суспензії еритроцитів (40 %) переносили у 450 мкл досліджуваного середовища за температури 37 °С на 10 хв (під час дослідження часової залежності інкубація тривала від 0,5 до 120 хв). На другому етапі аліквоту 100 мкл суспензії переносили на 10 хв у 900 мкл аналогічних середовищ, але за температури 0 °С. Контроль інших видів гемолізу здійснювали за температури 37 °С без зміни температурного режиму й протягом усього часу інкубації.

Обробку блокатором аніонного транспорту – 4,4'-диізотіоціанат-стильбен-2,2'-дисульфонову кислоту (ДІДС) в кінцевій концентрації

$1,6 \times 10^{-5}$  моль/л проводили в середовищах передінкубації (за температури  $37^\circ\text{C}$ ) із різними аніонами протягом 10 та 60 хв при 2000 мОсмоль/кг.

## **2.8. Визначення чутливості еритроцитів до постгіпертонічного лізису**

Для моделювання осмотичних умов, які виникають під час розморожування, аліквоту суспензії еритроцитів після 10-хвилинної інкубації в гіпертонічних середовищах з ліотропними аніонами переносили на 10 хв у ізотонічний розчин NaCl (при рН 7,4).

Максимальна осмоляльність гіпертонічних середовищ, за якої можливе вимірювання діалектичних показників суспензій дорівнювала 2000 мОсмоль/кг. Через обмежену розчинність максимальна осмоляльність середовища з фторидом натрію становила 1500 мОсмоль/кг (0,75 М).

## **2.9. Дослідження впливу рН на температурно-осмотичну чутливість еритроцитів**

Під час дослідження впливу рН на гіпертонічний лізис (ГЛ) клітин вони перебували у середовищах попередньої інкубації з різним показником кислотності (5,4, 7,4 або 8,4) протягом 2 хв, після чого клітини переносили на 5 хв у гіпертонічний розчин 4 М NaCl тієї самої температури при рН 7,4.

Вплив рН на ГК еритроцитів досліджували у двох варіантах. У першому випадку обидва середовища (за температури 37 та  $0^\circ\text{C}$ ) мали однакові значення рН (5,4–5,4; 6,4–6,4; 7,4–7,4 та 8,4–8,4), а в другому – різні (5,4–7,4; 7,4–5,4).

## 2.10. Морфологічний аналіз еритроцитів

Для морфологічної оцінки особливостей форми еритроцитів використовували світловий мікроскоп «STUDARE» (Польща) при  $\times 200$ , із термоприставкою.

Препарати для мікроскопування готували на предметному склі, змішуючи в краплі 130 мкл середовища, яке містило різні аніони та 10 мкл 80 % суспензії клітин. Осмоляльність середовищ відповідала ізотонічним умовам, стабілізації та сенсibiliзації клітин при ГЛ для кожного з досліджуваних аніонів у обох температурних варіантах (37 та 0 °C). Приготування препарату відбувалося за відповідної температури.

Зображення реєстрували за допомогою цифрової фотокамери «CANON PowerShot A510» («Canon», Японія).

Оцінювання морфологічних параметрів здійснювали за загальноприйнятою класифікацією [139].

## 2.11. Вимірювання об'ємного показника еритроцитів

Відносний об'єм еритроцитів вимірювали мікрогематокритним методом після їх 10-хвилинної інкубації за температури 37 °C у розчинах ряду солей Na. Стандартний гематокритний капіляр («Radiometer», Данія) заповнювали на 7 %-ою суспензією 7/8 його довжини та центрифугували протягом 3 хв у мікрогематокритній центрифугі «МГЦ-8» (Російська федерація) при 8000 об/хв.

Процент гематокриту розраховували відносно загальної висоти стовпчика рідини у капілярі за допомогою рахункової лінійки (Німеччина).

## 2.12. Дослідження діелектричних характеристик суспензії еритроцитів

Реальну ( $\epsilon'$ ) та уявну ( $\epsilon''$ ) частини комплексної діелектричної проникності  $\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$  суспензії еритроцитів вимірювали за допомогою надвисокочастотного (НВЧ) діелектрометра резонансного типу (прилад є авторською розробкою [131] на частоті 9,2 ГГц за кімнатної температури. Коригування на присутність у середовищі неорганічних іонів робили на основі вимірювання їх вкладу в провідність. Вимірювання цього параметра здійснювали на частоті 1 кГц [132].

На основі отриманих значень  $\epsilon'$  та  $\epsilon''$  розраховували частоту діелектричної релаксації молекул води ( $f_d$ ) та статичну діелектричну проникність ( $\epsilon_s$ ) суспензії еритроцитів із використанням рівнянь Дебая [133]:

$$\begin{aligned} \epsilon' &= \epsilon_\infty + (\epsilon_s - \epsilon_\infty) / (1 + (f/f_d)), \\ \epsilon'' &= (\epsilon_s - \epsilon_\infty) f / f_d / (1 + (f/f_d)^2), \end{aligned}$$

де:  $f_d$  і  $f$  – частота діелектричної релаксації молекул води та частота мікрохвильового поля, відповідно;  $\epsilon_s$  – статична діелектрична проникність;  $\epsilon_\infty$  – діелектрична постійна води в інфрачервоному частотному діапазоні.

Кількість зв'язаної води в суспензії еритроцитів оцінювали за формулою:

$$\Delta \epsilon_s = \epsilon_s^{\text{сольового розчину}} - \epsilon_s^{\text{суспензія еритроцитів}},$$

де:  $\Delta \epsilon_s$  – декремент статичної діелектричної проникності клітинної суспензії щодо сольового середовища;  $\epsilon_s^{\text{сольового розчину}}$  – статична діелектрична проникність середовища з аніонами;  $\epsilon_s^{\text{сусп. еритроцитів}}$  – статична діелектрична проникність суспензії еритроцитів.



Метод заснований на тому, що зв'язана вода має низьку діелектричну проникність на частотах близько 1 ГГц й релаксація вільних молекул води робить основний внесок у діелектричну проникність клітинної суспензії [134].

У зв'язку зі змінами в кількості зв'язаної води в системі (тобто води, яка не бере участі у процесі релаксації), декремент статичної діелектричної проникності суспензії змінюється за умов постійної концентрації клітин.

Використані для усіх досліджень реактиви мали кваліфікації «х.ч.» й «ч.д.а.».

### **2.13. Обробка клітин наночастинками**

Для дослідження використовували наночастинки (НЧ) на основі рідкоземельних металів: сферичні  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  розміром 2 нм; еліпсоїдні  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  розміром  $8 \times 30$  нм; стрижнеподібні  $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  розміром  $6 \times 40$  нм.

Попередню інкубацію клітин із НЧ здійснювали в ізотонічному сахарозно-сольовому середовищі (7 % сахарози та 0,3 % NaCl) при концентрації НЧ 0,01, 0,05 та 0,1 г/л. Тривалість експозиції клітин із НЧ становила 60 хв за температури 37 °С. Потім аліквоти суспензії еритроцитів переносили на 10 хв у 4 М розчин NaCl за температури 37 °С.

### **2.14. Статистична обробка результатів**

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програм «Statistica 8.0.550» («StatSoft Inc», США) та «MS Excel» («Microsoft», США). Нормальність розподілу кількісних показників оцінювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для нормального розподілу статистичну значущість обчислювали за критерієм Стьюдента, інакше – за критерієм Манна-Уїтні або

Краскела-Уоліса (для декількох груп). Дані представлені як середнє арифметичне значення кількісних показників ( $M$ )  $\pm$  стандартне відхилення середнього арифметичного ( $m$ ). На блокових діаграмах планками вказано математичне очікування ( $\mu$ ). Кожен показник вимірювали не менше 6 разів у двох паралельних пробах. Відмінності вважали статистично значущими при  $p \leq 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Вплив ліотропних аніонів на адаптацію еритроцитів до гіпертонічного лізису у 4 М розчині NaCl

У даному розділі представлено результати експериментальних досліджень закономірностей впливу аніонів ліотропного ряду (ЛР) на адаптацію еритроцитів до гіпертонічних умов (у 4 М розчині NaCl), що моделює чинники кріопошкодження клітин під час заморожування внаслідок виморожування води у фазу льоду.

Раніше було встановлено, що саме початкові умови відіграють значну роль у здатності клітин витримувати подальше осмотичне навантаження. Так, попередня часткова дегідратація у середовищах з помірно підвищеною осмоляльністю по-різному впливає на здатність еритроцитів витримувати гіпертонічне навантаження середовища (4 М розчин NaCl). Отже, у таких умовах вирішальним є ступінь попереднього зневоднення клітин [72, 97].

Відомо, що стійкий стан еритроцитів після перенесення у гіпертонічні умови з середовищ із NaCl осмоляльністю близько 800 мОсмоль/кг пов'язаний з певним об'ємом і формою клітин, а за умов передінкубації у середовищі з більшою осмоляльністю (1400 мОсмоль/кг) відбувається їх дестабілізація. Підвищення осмоляльності середовища передінкубації пов'язане з переходом від «об'ємного» до «структурного» зневоднення.

З метою встановлення впливу ЛА на поведінку еритроцитів після початкової часткової дегідратації в експерименті поступово збільшували осмоляльність середовищ передінкубації, які містили аніони. На рис. 3.1.1 представлено дані про вплив аніонного фону ряду середовищ із

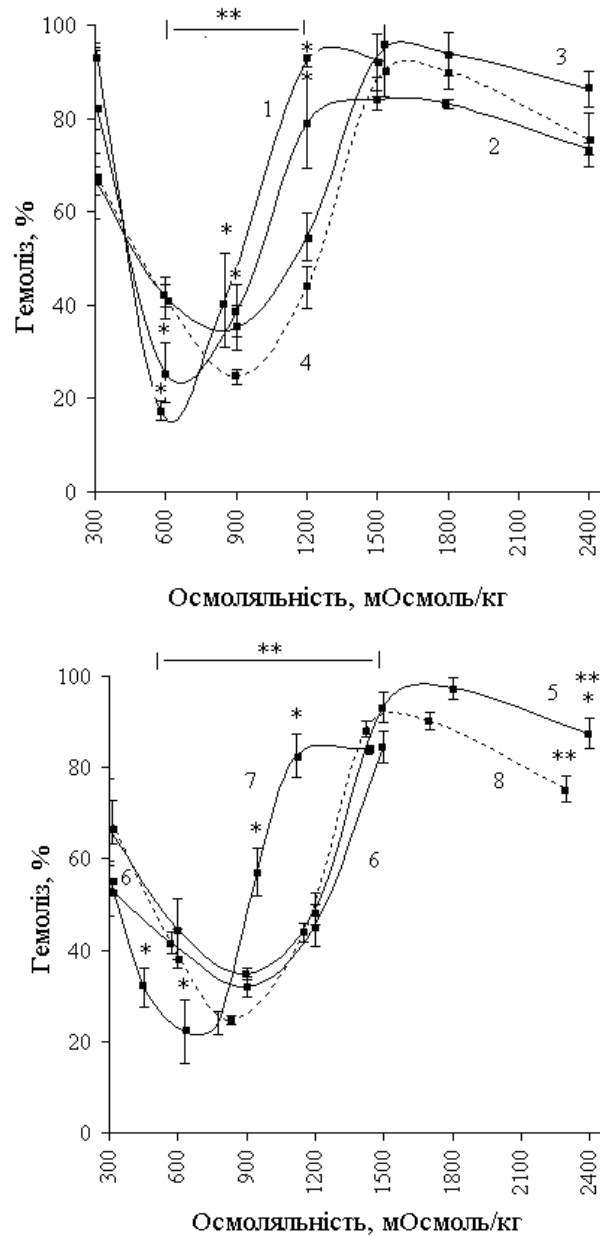


Рис. 3.1.1. Залежність рівня гіпертонічного лізису еритроцитів за температури 37 °С у 4 М розчині NaCl від осмоляльності середовища передінкубації для аніонів: А – хаотропних (1 – SCN<sup>-</sup>; 2 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 3 – Br<sup>-</sup>; 4 – Cl<sup>-</sup>); Б – космоетропних (5 – As<sup>-</sup>; 6 – F<sup>-</sup>; 7 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) та Cl<sup>-</sup> (8).

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з Cl<sup>-</sup> (\*) та рівнем гемолізу для інших осмоляльностей середовища з таким самим аніоном (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

осмоляльністю, яка збільшується, на пошкодження клітин до гіпертонічного лізису (ГЛ) за фізіологічної температури.

Збереження усіх етапів адаптації у середовищах з будь-якими ЛА підтверджує перевагу осмотичних ефектів розчинів над ефектами, які виникають під впливом специфічних властивостей іонів. Останні проявляються у вигляді зсуву інтервалів осмоляльності, у яких стабілізуються та сенсibilізуються клітини, за віссю осмоляльності. Характер зсуву свідчить про підвищення лабільності клітин під впливом аніонів, які займають крайні положення у ЛР, а отже відрізняються значним впливом на воду: з одного боку – найбільш сильні хаотропні  $\text{SCN}^-$  та  $\text{ClO}_4^-$ , з іншого – сильно космоотропний аніон  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Максимальна стабілізація клітин після обробки у середовищах із вказаними іонами припадала на осмоляльність 600 мОсмоль/кг, а сенсibilізація – 1200 мОсмоль/кг. Отже, зміни чутливості клітин не відповідають лінійному порядку розташування іонів у ЛР, а значить механізм впливу ЛА на осмотичну стійкість еритроцитів не може бути пов'язаний тільки зі збільшенням гідратного радіуса аніонів у ліотропному ряді.

Відомо, що такі «дзвоникоподібні» залежності поведінки біоструктур під впливом іонів ліотропного ряду, серед іншого, характерні для ліпідних шарів. Сильно гідратовані (космоотропні) аніони тримаються далі від поверхні, а слабо гідратовані (хаотропні) можуть глибоко проникати у гідрофобне ядро ліпідного бішару (ЛБ). В обох випадках вони не зменшують заряд поверхні що проявляється у «дзвоникоподібних» залежностях. Отже, одержані результати можуть бути наслідком особливостей взаємодії ліотропних аніонів із ЛБ [135].

Фізичний стан ЛБ найбільш сильно залежить від температури та стабілізується під час охолодження. У зв'язку з цим вплив ЛА на стійкість

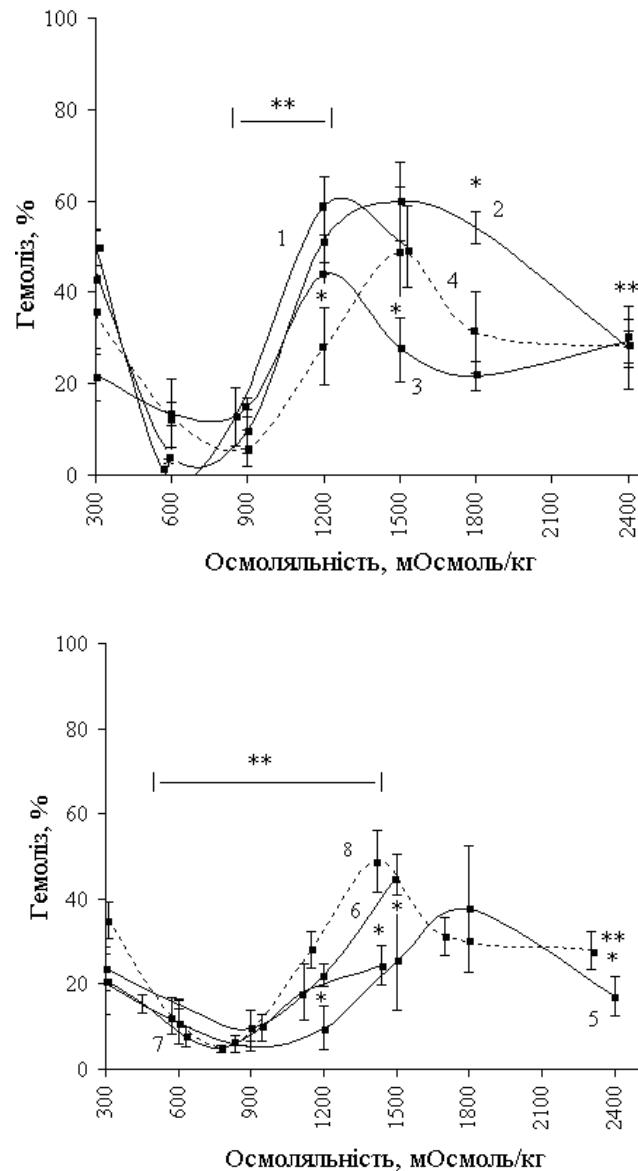


Рис. 3.1.2. Залежність рівня гіпертонічного лізису еритроцитів за температури 0 °С у 4 М розчині NaCl від осмоляльності середовища передінкубації для аніонів: А – хаотропних (1 – SCN<sup>-</sup>; 2 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 3 – Br<sup>-</sup>; 4 – Cl<sup>-</sup>); Б – космоетропних (5 – Ac<sup>-</sup>; 6 – F<sup>-</sup>; 7 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) та Cl<sup>-</sup> (8).

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з Cl<sup>-</sup> (\*) та з рівнем гемолізу для інших осмоляльностей середовища з даним аніоном (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

еритроцитів перевіряли в умовах гіпотермії. На рис. 3.1.2 представлено дані про вплив аніонного фону середовищ передінкубації з різною осмоляльністю на чутливість клітин до ГЛ за температури 0 °С.

З рис. 3.1.1 та 3.1.2 видно, що розташування інтервалів осмоляльності, у якій стабілізуються та сенсibiliзуються клітини, на її осі не залежить від температури, а зміни стосуються рівня гемолізу, що має лінійну залежність від властивостей аніонів у ЛР. За умов охолодження пошкодження клітин значно знижується в напрямі від ХА до КА. Вид кривих, що характеризують гемоліз еритроцитів у присутності ХА, практично не змінився відносно виду кривих, одержаних для температури 37 °С. Отже, вплив ХА на стан клітин менш залежить від температури, а КА при охолодженні захищають їх від осмотичного пошкодження в інтервалі осмоляльностей середовища передінкубації 1200 – 1500 мОсмоль/кг, який відповідає структурній дегідратації еритроцитів та супроводжується їхньою сенсibiliзацією за умов подальшого перенесення до 4 М розчину NaCl.

Збільшення осмотичної стійкості еритроцитів при охолодженні пов'язують із підвищенням в'язкості мембранних структур, оскільки ліпідна частина плазматичної мембрани (ПМ) зазнає найбільш значних змін під впливом температури, що уповільнює зневоднення клітин. При наявності трансмембранних дефектів і масовому проникненні КА всередину клітини може реалізуватися механізм посилення зв'язків цитоскелетних білків внаслідок впливу цього виду аніонів, що має властивість «висолювати» їх з розчину (зменшувати розчинність).

Зауважимо, що для кривої, яка характеризує вплив  $As^-$ , точка максимального пошкодження значно зміщується в бік більшої осмоляльності (до 1800 мОсмоль/кг). Відхилення від контрольних значень різних показників біосистем у присутності цього аніона спостерігалось кріобіологами й раніше [22], однак досі немає розуміння, чим зумовлений такий ефект.

Відомо, що посилення взаємодії КА з молекулами, які їх оточують, обмежує рухливість останніх і, таким чином, знижує їх «структурну температуру». Істотне зниження рівня пошкодження у присутності КА, мабуть, є результатом накладення ефектів зниження як фізичної, так і «структурної» температур. Навпаки, ХА надають системі підвищеної «структурної температури» і, таким чином, нейтралізують зниження фізичної. У результаті такої протилежної спрямованості впливу «структурної» та фізичної температур амплітуда змін рівня пошкодження клітин за умов 0 °С та 37 °С у присутності цих іонів практично не змінюється.

На рис. 3.1.3 показано максимальну амплітуду зміни рівня пошкодження клітин між станами стабілізації та сенсibilізації для обох температурних режимів (37 °С та 0 °С). Видно, що за температури 0 °С рівень пошкодження клітин при сенсibilізації значно (у 3 рази) знижується у напрямі від ХА до КА, а за температури 37 °С такий ефект майже відсутній.

Показано, що ХА зменшують температурну залежність пошкодження клітин, а КА, в міру посилення своїх властивостей, істотно покращують адаптацію при охолодженні. Як і раніше, відмінні риси мають іони Вг<sup>-</sup> та Ас<sup>-</sup>, які демонструють менший відсоток рівня гемолізу за температури 0 °С. Природа такого їх впливу вимагає прояснення.

У літературних джерелах є багато даних про специфічний вплив ЛА на ліпідні шари й межі розділу поверхонь ліпід–вода. Слабо гідратовані ХА дестабілізують структуру ліпідних шарів, шляхом проникнення всередину між молекулами ліпідів, що може стати причиною порушень у структурі ЛБ і нестабільного стану клітин. За рахунок великої гідратної оболонки, КА створюють більш упорядкований шар води навколо полярних голівок ліпідів, що впорядковує їх структуру [11, 82, 102, 136].



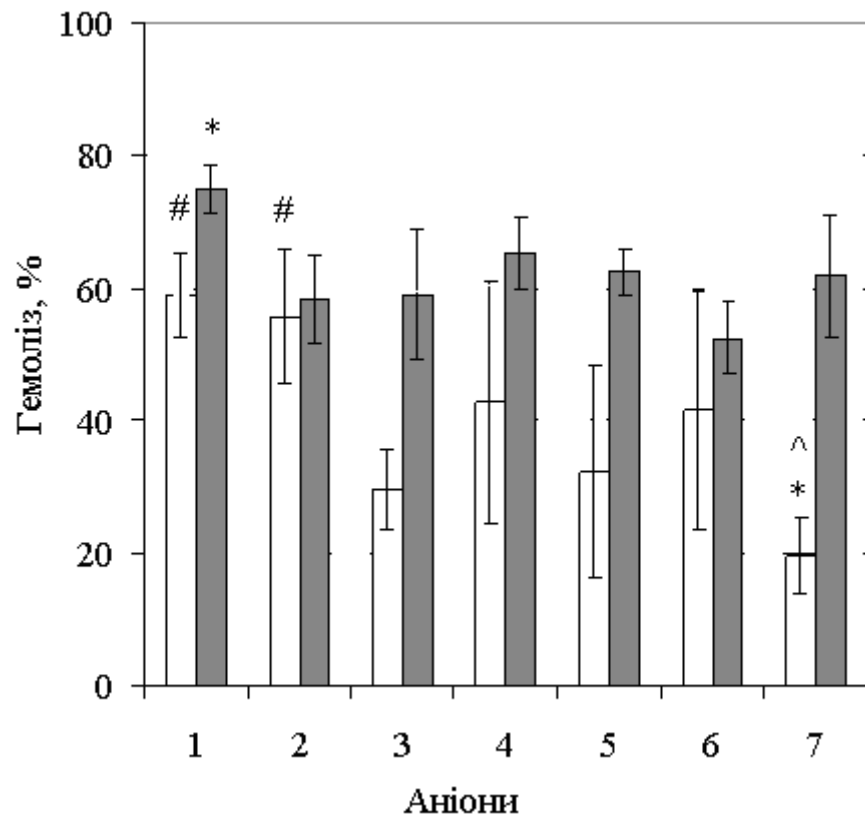


Рис. 3.1.3. Різниця між мінімальним (при стабілізації) та максимальним (при сенсibiliзації) рівнем пошкодження еритроцитів у 4 М розчині NaCl після 2-хвилинної передінкубації у середовищах, які містять ліотропні аніони: 1 – SCN<sup>-</sup>; 2 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 3 – Br<sup>-</sup>; 4 – Cl<sup>-</sup>; 5 – Ac<sup>-</sup>; 6 – F<sup>-</sup>; 7 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> за температури 37 °C та 0 °C.

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон X-100; відмінності значущі порівняно з Cl<sup>-</sup> (\*), з SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> і Br<sup>-</sup> за температури 0 °C (#), а також з SCN<sup>-</sup> та ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> за температури 0 °C (^);  $p \leq 0,05$ .

Відомо, що взаємодія з водою – основний фактор, який організує та забезпечує впорядкований стан ЛБ через гідрофобні взаємодії. Тоді стан клітин у присутності ЛА має змінюватися й за відсутності осмотичного навантаження на етапі передінкубації. Для перевірки цього припущення

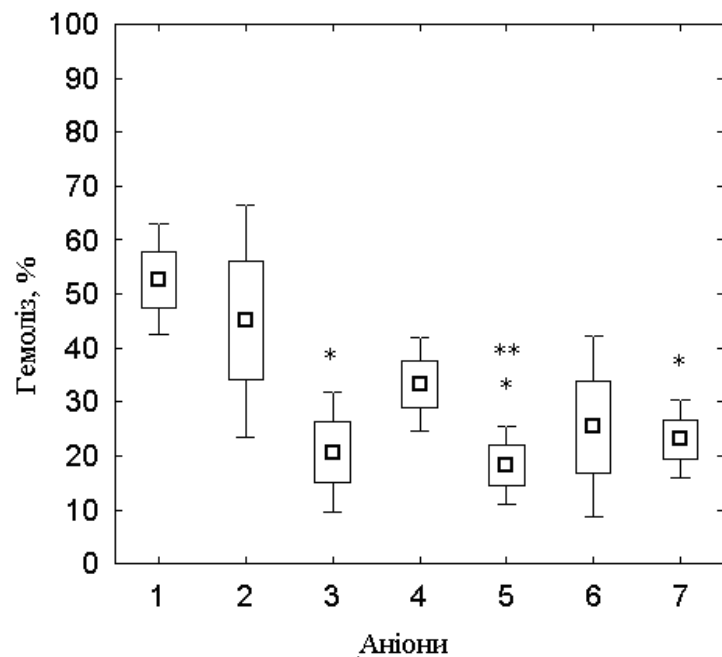
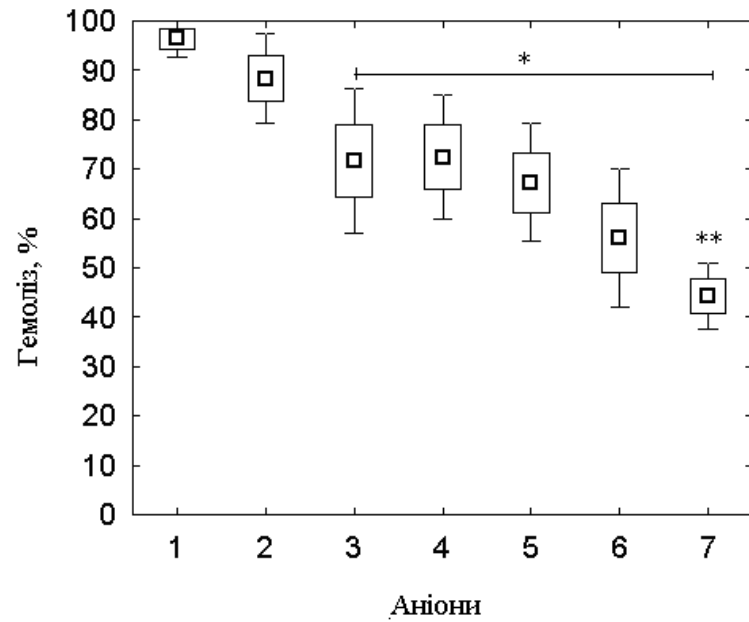


Рис. 3.1.4. Рівень гіпертонічного лізису еритроцитів у 4 М розчині NaCl за температури 37 °C (А) та 0 °C (Б) після попередньої інкубації в ізотонічних розчинах тієї ж температури з аніонами: 1 – SCN<sup>-</sup>; 2 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 3 – Br<sup>-</sup>; 4 – Cl<sup>-</sup>; 5 – Ac<sup>-</sup>; 6 – F<sup>-</sup>; 7 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

*Примітки:* блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з SCN<sup>-</sup> та ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> (\*) та з Cl<sup>-</sup> (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

еритроцити перед перенесенням у 4 М розчин NaCl експонували в ізотонічних середовищах із ЛА. Результати представлено на рис. 3.1.4.

У такому дизайні експерименту динамічні процеси, які пов'язані зі зміною об'єму клітин та осмотичним рухом іонів або води через мембрану, не мають значення, а тому спостерігаються лише відмінності у стійкості еритроцитів, що обумовлені особливостями впливу ЛА на мембрану клітини, а не рухливістю аніонів через мембрану.

З експериментальних даних видно, що за обох температурних режимів у міру посилення космотропності рівень пошкодження послідовно знижується майже у два рази. Особливості поведінки зберегли клітини під впливом  $\text{Br}^-$  та  $\text{As}^-$ . Після обробки цими аніонами у три рази відрізнявся рівень пошкодження клітин між температурними режимами 0 та 37 °С.

Сильний хаотропний  $\text{ClO}_4^-$  нейтралізує вплив охолодження на клітини через підвищення рухливості молекул у присутності цього аніона (так званої «структурної температури»). Така тенденція спостерігається й у присутності слабохаотропного  $\text{Br}^-$ , однак він не має руйнівного впливу на ЛБ та може проявляти захисний ефект при осмотичному навантаженні еритроцитів, можливо, через помірне зниження впорядкованості ЛБ репаруються мікропошкодження мембрани.

Слабкий космотропний  $\text{As}^-$  також має ряд особливостей, які проявляються у його взаємодії з клітиною. У недисоційованій формі він проходить крізь ЛБ переважно завдяки неіонній дифузії. Слід зауважити, що такий шлях проникнення у клітину нечутливий до інгібіторів аніонного транспорту. Відомо, що швидкість трансмембранного обміну лінійно зростає під час підвищення концентрації оцтової кислоти й різко збільшується при зниженні рН [137]. Ще один шлях проникнення у клітину – обмінний транспорт аніонів  $\text{As}^-$  на  $\text{Cl}^-$  – проявляє такі ж властивості, як і транспорт неорганічних аніонів. Припускається, що перенесення  $\text{As}^-$  здійснюється

аніонтранспортною системою еритроцитів – білком смуги 3. Відомі також унікальні властивості насиченого розчину ацетату натрію, який має здатність переохолоджуватися без утворення твердої фази, тому що його іони можуть стабілізувати водні структури [138].

Отже, зміни стійкості еритроцитів при перенесенні їх з ізотонічних середовищ в основному обумовлені модифікацією ліпідного шару еритроцитарних мембран ліотропними аніонами.

Становило інтерес вивчити, як змінюється білкова частина мембрани під впливом ЛА. Для цього досліджували зміни температурно-осмотичної поведінки еритроцитів за різної кислотності середовища.

Відомо, що еритроцити стабільні в діапазоні показника рН 7–8. Для наших цілей було обрано діапазон показника рН 5,4 – 8,4, при якому клітини не змінюють об'єм. Результати, представлені на рис. 3.1.5 та 3.1.6, характеризують вплив зміни рН середовищ передінкубації, які містили ЛА, на пошкодження еритроцитів у 4 М розчині NaCl при 37 та 0 °С.

Деякі дослідники вважають, що за високої концентрації протонів екрануються негативні заряди спектрина, фосфоліпідів і сіалових кислот глікокалікса, що призводить до ослаблення зв'язків у цитоскелеті, між ним і мембраною, порушень у ЛБ, зниження потенціалу на ПМ і накопичення аніонів на її поверхні. За високого вмісту  $\text{OH}^-$  негативні заряди мембранних компонентів «оголюються» та іонізуються, через що формуються аномальні зв'язки між білками цитоскелета та підвищується його ригідність [139, 140]. Останнє пояснює зниження стійкості еритроцитів до осмотичного навантаження при значному підвищенні показника рН тільки під час охолодження в присутності КА, які через впорядкування води біля ЛБ можуть занадто стабілізувати його структуру (рис. 3.1.6).

Найбільш істотне зниження стійкості клітин у середовищі з показником рН 5,4 за температури 37 °С у присутності сильно ХА пояснюється ефектом нейтралізації протонами негативних зарядів на

поверхні клітини, що, в свою чергу, призводить до зменшення щільності пакування ліпідів і сприяє накопиченню на клітинній мембрані аніонів через зменшення сил електростатичного відштовхування.

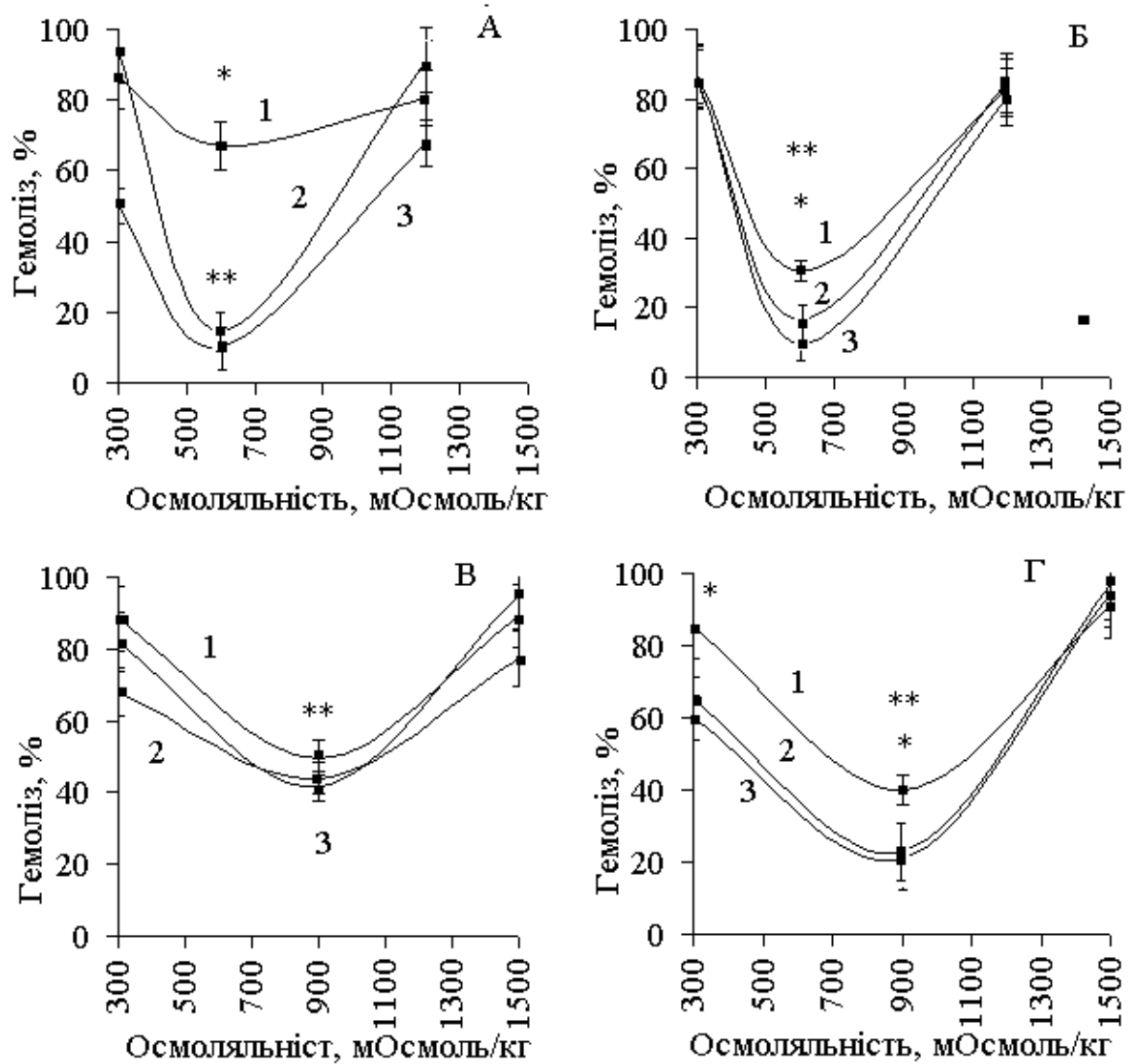


Рис. 3.1.5. Залежність рівня пошкодження еритроцитів у 4 М розчині NaCl (10 хв) від осмоляльності й аніонного складу (А – SCN<sup>-</sup>, Б – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, В – Cl<sup>-</sup>, Г – As<sup>-</sup>) середовища попередньої 10-хвилинної інкубації з різними значеннями показника рН (1 – 5,4 (для As<sup>-</sup> – 6); 2 – 7,4; 3 – 8,4) за температури 37 °С.

*Примітки:* М ± m, n = 6, за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з рН 7,4 (\*) та суміжними осмоляльностями середовища для такого самого аніона (\*\*); p ≤ 0,05.

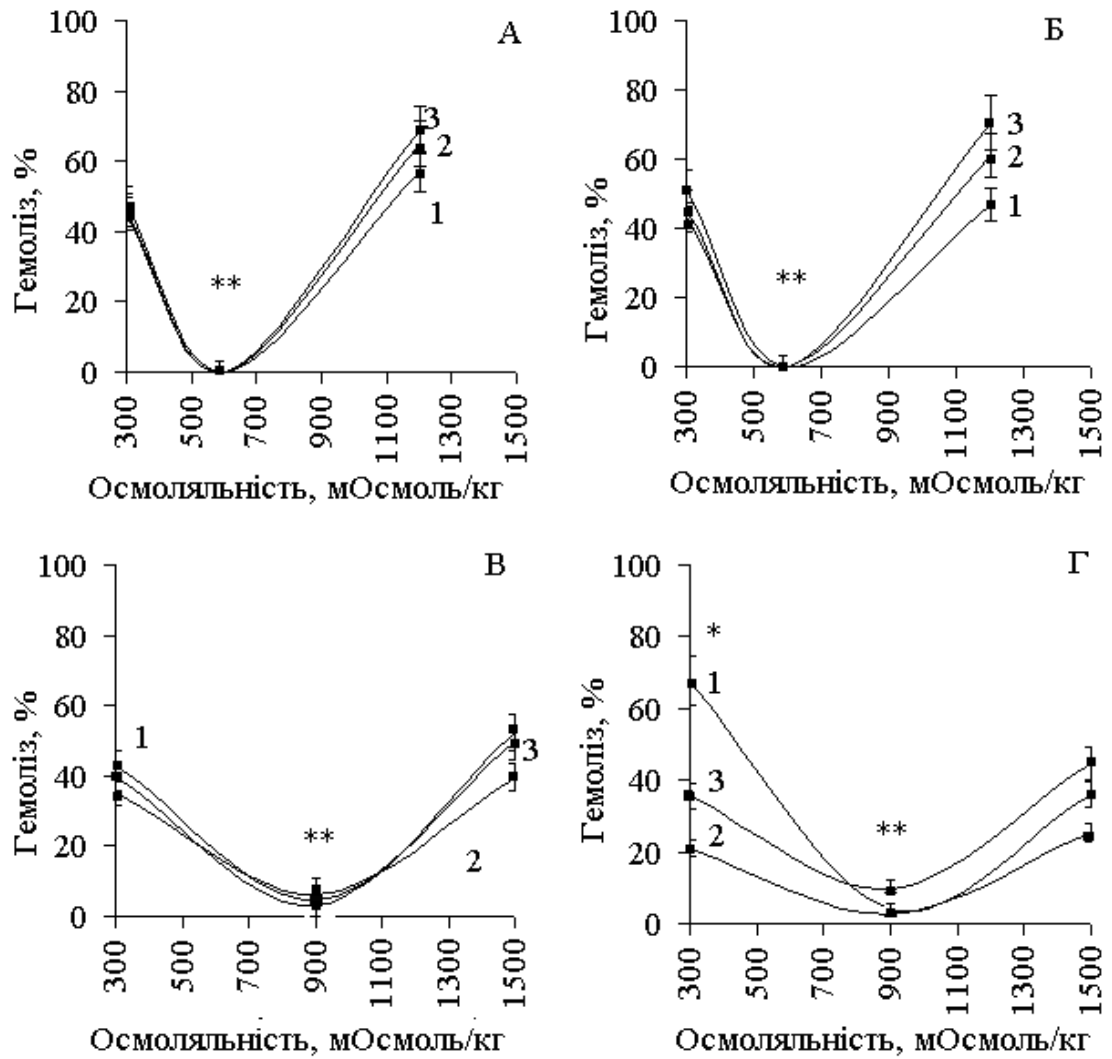


Рис. 3.1.6. Залежність рівня пошкодження еритроцитів у 4 М розчині NaCl (10 хв) від осмоляльності та аніонного складу (А – SCN<sup>-</sup>, Б – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, В – Cl<sup>-</sup>, Г – As<sup>-</sup>) середовища попередньої 10-хвилинної інкубації з різними значеннями показника рН (1 – 5,4 (для As<sup>-</sup> – 6); 2 – 7,4; 3 – 8,4) за температури 0 °С.

*Примітки:*  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з рН 7,4 (\*) та з суміжними осмоляльностями середовища для такого самого аніона (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

Отже, поєднання електростатичних і гідрофобних сил, які виштовхують цей вид іонів на межу розділу поверхонь, може ефективно збільшувати концентрацію ХА біля поверхні ЛБ [82]. Це позбавляє бішар впорядкувальної

дії водяним оточенням та посилює руйнівний вплив ХА на ЛБ [11]. На тлі таких ефектів «розслаблення» зв'язків між білками цитоскелета також не сприяє стійкості клітин за температури 37 °С.

За умов охолодження до 0 °С такого ефекту ХА немає, як і взагалі залежності ГЛ еритроцитів від рН середовищ. Тенденція до неї з'являється тільки при сенсibiliзації, коли порушується вибіркова проникність клітинної мембрани (рис. 3.1.6). Отже, у випадку з ХА стан цитоскелету суттєво не впливає на реалізацію механізму осмотичного лізису еритроцитів.

Присутність слабоекотропного  $As^-$  за умов обох температур підвищувала чутливість клітин до кислотності середовища, що пояснюється перевагою електростатичних взаємодій у його впливі на мембрану [82].

Найбільш стійкими до гіпертонічного шоку можна вважати клітини, які пройшли попередню інкубацію в охолоджених середовищах  $As^-$  при рН 7,4 особливо під час стабілізації клітин, яка за таких умов припадала на інтервал осмоляльності 900 мОсмоль/кг.

Оскільки осмотична стабільність еритроцитів тісно пов'язана зі зниженням об'єму клітин [97], а ефект аніонів ліотропного ряду може реалізуватися через різну гідратацію іонів або клітинних структур [141], наступним етапом було дослідження зміни об'ємних параметрів еритроцитів під впливом ЛА (рис. 3.1.7).

На рис. 3.1.7 наведено об'ємні характеристики клітин порівняно з їхньою осмотичною стійкістю до подальшого перенесення у 4 М розчин NaCl. Видно, що інтенсивне зниження об'єму еритроцитів у середовищах із сильним КА відбувається у інтервалі осмоляльності у якому клітини набувають стабільності (300–600 мОсмоль/кг). У середовищах із сильними ХА ( $SCN^-$  та  $ClO_4^-$ ) різке зниження об'єму починається тільки за осмоляльності 1200 мОсмоль/кг, де клітини вже досягли максимального рівня пошкодження.

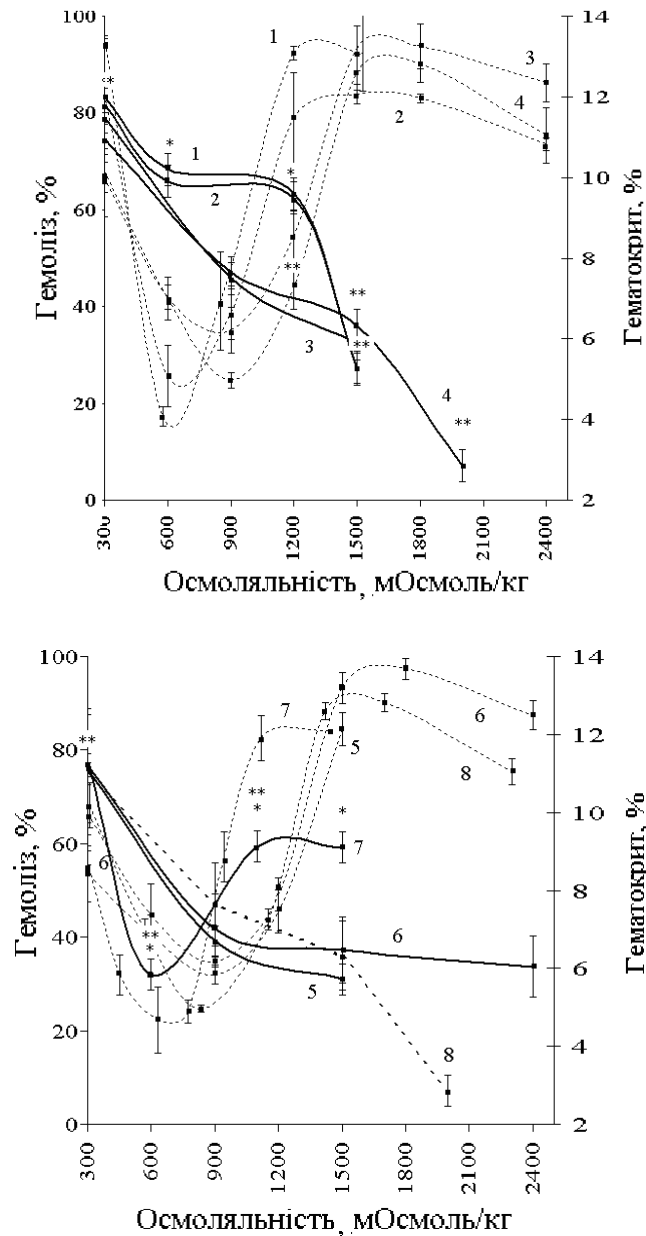


Рис. 3.1.7. Гематокрит еритроцитів (□□) у середовищах різної осмоляльності, які містять аніони: А – хаотропні (1 – SCN<sup>-</sup>; 2 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 3 – Br<sup>-</sup>; 4 – Cl<sup>-</sup>), Б – космоетропні (5 – Ac<sup>-</sup>; 6 – F<sup>-</sup>; 7 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) та Cl<sup>-</sup> (8, ---) та рівень гемолізу при подальшому перенесенні у 4 М розчин NaCl при 37 °С (---): А – хаотропні (1 – SCN<sup>-</sup>; 2 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 3 – Br<sup>-</sup>; 4 – Cl<sup>-</sup>), Б – космоетропні (5 – Ac<sup>-</sup>; 6 – F<sup>-</sup>; 7 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) та Cl<sup>-</sup> (8).

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100 або загальний об'єм суспензії; \* – відмінності значущі порівняно з Cl<sup>-</sup>;  $p \leq 0,05$ .



У середовищах із сильними хао- та космотропними аніонами, коли клітини сягали майже однакового максимального рівня адаптації (16 % для  $\text{SCN}^-$  та 21 % для  $\text{SO}_4^{2-}$ ), показник гематокриту відрізнявся максимально (71 % для  $\text{SCN}^-$  та 32 % для  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Отже, ефективність осмотичної адаптації не завжди залежить від об'єму еритроцитів. Після набуття ПМ проникності для іонів під впливом ЛА може змінюватися колоїдний стан цитоплазми. Сильні ХА «всолують» білки переводячи їх у золь, що підтримує об'єм клітин у діапазоні 600–1200 мОсмоль/кг. Подальше інтенсивне зменшення об'єму можна пояснити швидкою фазою явної коагуляції золью через виключення води з поверхні білків [77].

В присутності найсильнішого з КА праве крило кривої залежності гематокриту від осмоляльності середовища значно підіймалося. Як відомо, це може віддзеркалювати зміни форми клітин [97]. Отже, щоб з'ясувати причини такого ходу кривих потрібно дослідити ще й морфологічні характеристики еритроцитів, які можуть значно впливати на щільність пакування клітин, а, отже, й на гематокрит суспензії.

З метою встановлення особливостей трансформації еритроцитів за умов впливу ЛА було проведено дослідження, яке дозволило вивчити їх морфологічну відповідь на часткову дегідратацію у середовищах помірної гіпертонії.

На рис. 3.1.8 представлено морфологічні характеристики еритроцитів, які отримано після інкубації у середовищах різного аніонного складу та осмоляльності, яка відповідає етапам адаптації еритроцитів до ГЛ за температури 37 °С. (Осмоляльність середовищ у якій клітини сягають мінімального та максимального пошкодження у 4 М розчині NaCl не є однаковою для усіх ЛА).

Видно, що ЛА мають помітний вплив на морфологічні характеристики клітин на усіх стадіях адаптивного процесу. Еритроцити в ізотонічних середовищах здебільшого перетворювалися на ехіноцити (рис. 3.1.8, А) та тільки за умов впливу  $\text{ClO}_4^-$  та  $\text{F}^-$  зберігали дискоїдну форму. При стабілізації

(рис. 3.1.8, Б) форма всіх клітин наближалася до кулястої з мінімальною кількістю спікул, що свідчить про стабільний стан ПМ [139].

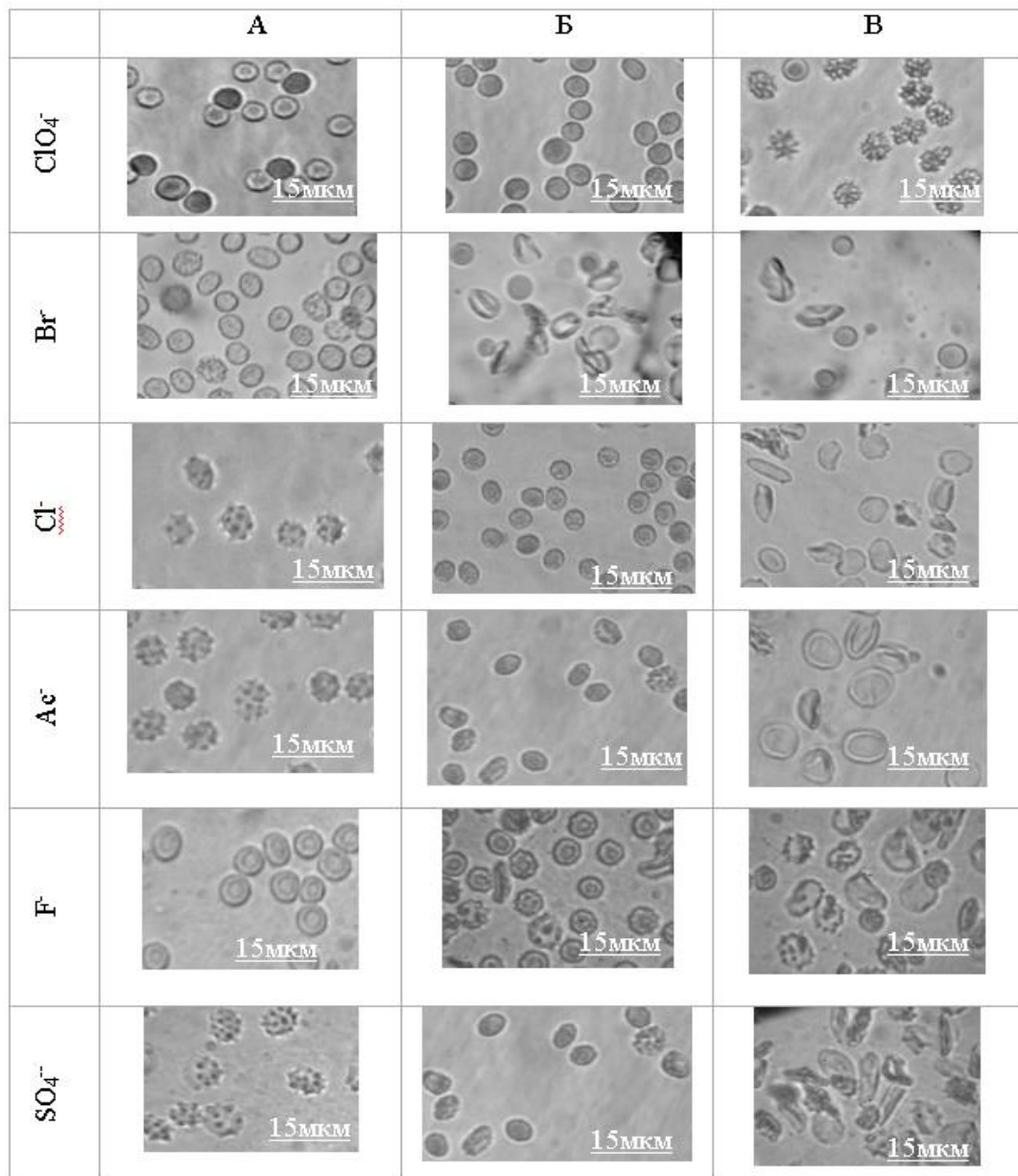


Рис. 3.1.8. Морфологія еритроцитів, інкубованих протягом 10 хв за температури  $37^\circ\text{C}$  у середовищах із різними аніонами та осмоляльністю, яка відповідає фізіологічним умовам (А), мінімальному рівню гемолізу при подальшому перенесенні у 4 М розчин  $\text{NaCl}$  для  $\text{ClO}_4^-$  і  $\text{SO}_4^{2-}$  – 600 мОсмоль/кг, для  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ac}^-$  та  $\text{F}^-$  – 900 мОсмоль/кг (Б), максимальному рівню гемолізу при подальшому перенесенні у 4 М розчин  $\text{NaCl}$  для  $\text{ClO}_4^-$  і  $\text{Br}^-$  – 1200 мОсмоль/кг, для  $\text{Cl}^-$  і  $\text{F}^-$  – 1500 мОсмоль/кг та для  $\text{Ac}^-$  – 1800 мОсмоль/кг (В).

За умов сенсibilізації клітин (рис. 3.1.8, В), яка для  $\text{ClO}_4^-$  та  $\text{SO}_4^{2-}$  сягала максимуму за осмоляльності 1200 мОсмоль/кг, а для  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{As}^-$  та  $\text{F}^-$  – за 1500 мОсмоль/кг, морфологічні відмінності були найбільшими.

За осмотичних умов, у яких закінчується період стабілізації та починається сенсibilізація до ГЛ, мембрана клітин пошкоджується та набуває проникності до іонів. Для сильних хао- та космотропних аніонів таке значення осмоляльності є найменшим у ЛР (600 мОсмоль/кг). Таке явище відповідає даним, отриманим для мембран мітохондрій гепатоцитів щурів, згідно з якими вихід холестерину з мембран починався за менших концентрацій середовищ саме із  $\text{ClO}_4^-$  та  $\text{SO}_4^{2-}$  [22].

Отже, враховуючи проникнення ЛА у середину клітини, зміни морфологічних та об'ємних показників еритроцитів у діапазоні осмоляльностей середовища, які сенсibilізують еритроцити, можна пояснити впливом характерних особливостей ЛА на стан внутрішньоклітинного білкового колоїду. ХА сприяють утворенню золю, а з підвищенням концентрації коагулюють його через ефективне зменшення тиску води, який розклинає, та нейтралізацію зарядів білків [77].

У середовищі з сильним ХА ( $\text{ClO}_4^-$ ) дезадаптовані клітини мали форму ехіноцитів зі значною кількістю великих спікул. Це свідчить як про підвищення пластичності ЛБ через порушення впорядковувального впливу на нього молекул води внаслідок накопичення ХА на мембранній поверхні, так і про ослаблення структурних зв'язків між білками цитоплазми та цитоскелету з мембраною, що є наслідком ефекту цих іонів, що «висолює» білки [11, 76, 82, 102, 141].

За умов сенсibilізації у присутності  $\text{Cl}^-$  еритроцити трансформувалися у планоцити, які мали спікули на тороїдальному ободі (дискоехіноцитоз). Такі характеристики вказують на нестабільний стан мембрани на тлі значного зневоднення.

Сильно космотропні аніони  $\text{SO}_4^{2-}$  та  $\text{F}^-$  трансформували клітини у надто сплющені неправильні форми без спікул внаслідок впорядковування ліпідів через оточення сильно гідратованими іонами. Можна припустити, що така форма є наслідком створення внутрішньоклітинними білками міцних зв'язків як між собою, так і з ЛБ через вплив КА, що «висолюють» (стабілізують) білки, тому структура еритроцитарних компонентів являє собою гель. В умовах підвищеної осмоляльності середовища у результаті розподілу найбільшого навантаження по краях диска еритроцита клітина складається «як коробка» та втрачає гемоглобін.

У присутності слабкосмотропного  $\text{As}^-$  у зоні сенсibiliзації спостерігалися мінімальна кількість деформованих клітин та послаблення дискоехіноцитозу на тлі показників сильного зневоднення (витончення тороїдального ободу та збільшення діаметра центральної ямки еритроцита) [139]. Ці характеристики свідчать, що зневоднення клітин відбувається зі збереженням стабільності мембрани у якій відсутні занадто ригідні конструкції, що створювали б дефекти під час деформації клітин.

Отже, для ХА першочергову роль відіграє дезінтеграція мембранних компонентів через втрату їх структури, що не дозволяє клітині витримати велике осмотичне навантаження внаслідок низької опірності, а для КА пошкодження відбувається шляхом руйнування надмірно ригідних елементів. Особливості впливу слабкосмотропного аніона  $\text{As}^-$  потребують більш детального вивчення.

Такі результати досліджень дають змогу зробити висновок, що високий ступінь пошкодження еритроцитів при ГЛ у присутності сильних хао- та космотропних аніонів має різні шляхи реалізації. Радикальна зміна морфологічних характеристик під впливом ЛА з протилежних кінців ряду пояснює відмінності у ході кривих, які характеризують залежність гематокриту суспензій еритроцитів від осмоляльності середовищ (див. рис. 3.1.7). На етапі сенсibiliзації в присутності сильних КА

сульфату гематокрит збільшується завдяки менш щільному пакуванню еритроцитів через специфічну форму клітин (рис. 3.1.8, В,  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

Значна різниця в об'ємах клітин у присутності сильних ХА ( $\text{SCN}^-$  та  $\text{ClO}_4^-$ ) за осмоляльності середовища 600–1200 мОсмоль/кг (див. рис. 3.1.7, А, криві (□□) 1 та 2) та сильного КА ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) за 600 мОсмоль/кг (див. рис. 3.1.7, Б, крива (□□) 7) навряд чи може бути наслідком змін у осмотичному стані еритроцитів через вплив ЛА на розчинність внутрішньоклітинних білків [58] через втрату полупроникності ПМ.

Вважається, що для одного виду аніона перехід від стабільного стану до сенсibilізації клітин обумовлено зміною об'ємної дегідратації на структурну [72]. З точки зору ЛР аніонів видно, що завдяки впливу на стан води та заряд білків ЛА можуть змінювати колоїдний стан цитоплазми еритроцитів, про що свідчить особливий хід кривої зменшення об'єму клітин у присутності сильних ХА. Він гарно пояснюється переходом білкового гелю у золь з подальшою його коагуляцією згідно (з теорією ДЛФО) через те, що сильні ХА ближче підходять до поверхні білків та ефективніше нейтралізують їх заряди [77].

Ефект КА, навпаки, сприяє посиленню зв'язків між білками та їх «висолюванню», але перешкоджає коагуляції через ослаблене екранування зарядів, що викликає протилежні тенденції у зміні не тільки об'ємних, а й морфологічних показників еритроцитів.

Розчинення («всолювання») білків під впливом ХА призводить до послаблення, а повне екранування зарядів до знищення зв'язків між білками цитоскелета та його із ЛБ і цитоплазматичними білками, що гарно простежується у отриманих морфологічних характеристиках (рис. 3.1.8) [16, 59].

Морфологічну відповідь клітин вивчали також в умовах гіпотермії. На рис. 3.1.9 представлено дані, які характеризують зовнішній вигляд клітин після інкубації за температури 0 °С.

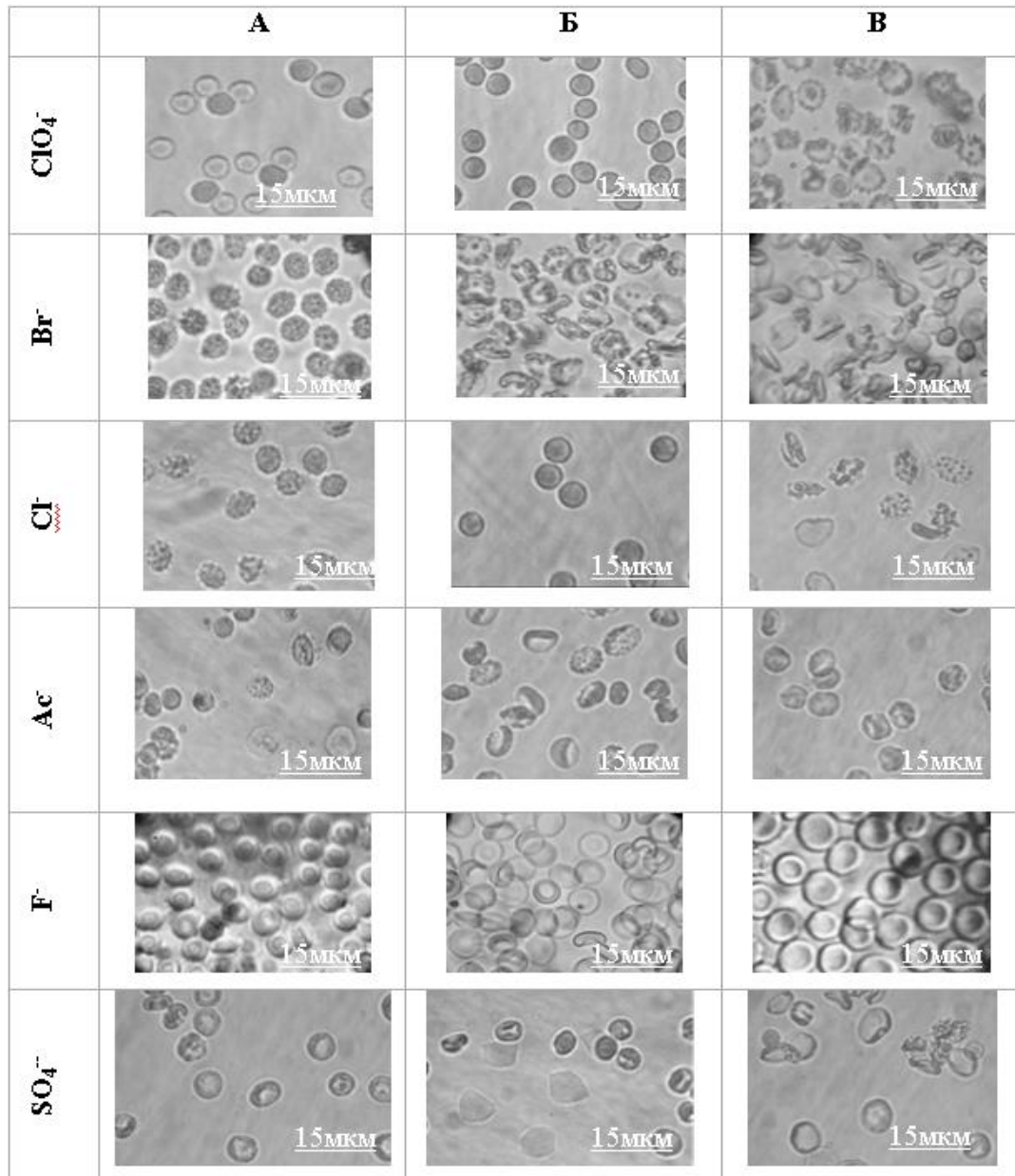


Рис. 3.1.9. Морфологія еритроцитів, інкубованих протягом 10 хв при 0 °С у середовищах з різними аніонами та осмоляльністю, яка відповідає: А – фізіологічній; Б – мінімальному рівню пошкодження (для ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> – 600 мОсмоль/кг, для Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ac<sup>-</sup> та F<sup>-</sup> – 900 мОсмоль/кг, для SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – 800 мОсмоль/кг), В – максимальному рівню пошкодження (для ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> та SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – 1500 мОсмоль/кг, для Br<sup>-</sup> – 1200 мОсмоль/кг та для Ac<sup>-</sup> – 1800 мОсмоль/кг) при гіпертонічному лізисі у 4 М розчині NaCl.

Встановлено, що за умов впливу ХА (рис. 3.1.9, А) відмінності у морфологічних параметрах еритроцитів за температур 0 та 37 °С були

мінімальними. Це узгоджується з висловленим раніше твердженням щодо стійкості клітин до зниження температури у присутності ХА завдяки нейтралізації ефекту охолодження шляхом підвищення «структурної» температури.

За температури 0 °С КА роблять мембрану такою, яка практично не має спікул і зберігає округлі форми навіть при осмоляльності, яка істотно перевищує аналогічні показники під час сенсibiliзації клітин за температури 37 °С. Це свідчить про зростання впорядкованості ЛБ при охолодженні, особливо в поєднанні зі зниженням «структурної температури» у присутності КА.

За умов стабілізації клітин (рис. 3.1.9, Б) спостерігався сферостоматоцитоз, особливо виражений у присутності  $\text{SO}_4^{2-}$ . Ця форма характерна для найбільш стійкого стану клітин [139]. У середовищах із  $\text{As}^-$  еритроцити сягали таких морфологічних параметрів у діапазоні високих осмоляльностей (близько 1800 мОсмоль/кг), який відповідає максимальній стабілізації клітин під час ГЛ (див. рис. 3.1.2., крива 5).

Пояснення цьому можна шукати в особливостях взаємодії  $\text{As}^-$  з водою та клітинами. Відомо, що цей аніон у складі нейтральної молекули  $\text{HAs}$  легко проникає крізь ПМ, чим може запобігати осмотичному перенавантаженню на мембрані, а розчин  $\text{NaAs}$  має здатність формувати «теплий лід» та переохолоджуватися без утворення твердої фази [138].

Відомо також, що форма еритроцитів залежить від осмотичного тиску цитоплазми та поверхневих натягів обох шарів ліпідів. Ефект аніонів ЛР поширюється на зазначені фактори, змінюючи поверхневий натяг на межі розділу ліпід-вода, пакування ЛБ і стан білків. Зміни морфологічних характеристик еритроцитів можуть вказувати на ослаблення напруженості на мембрані у середовищах зі слабкосмотропним аніоном  $\text{As}^-$  та пояснювати максимальне зменшення рівня пошкодження плазматичної мембрани у його присутності.

Отже, аніони ЛР впливають на здатність еритроцитів переносити критичні умови, однак невідомо яким чином. Однією з причин, яка лежить в основі ліотропних ефектів аніонів, вважають їх різні геометричні показники [77]. Дійсно, значно відрізняється саме вплив  $As^-$ , який єдиний з ЛА має довгасту форму. Тому представляло інтерес дослідити вплив на осмотичну адаптацію еритроцитів інших об'єктів, які відрізняються за формфактором.

Встановлено, що біоактивність наноб'єктів залежить від геометричних параметрів, яка визначає їх здатність впливати на структуру ліпідного бішару [53, 142]. Найбільш наближеними до іонів об'єктами, які мають великий вибір варіантів форми й активно використовуються у сучасній біології для модифікації стану клітин (у тому числі й їх кріопошкодження) є наночастинки (НЧ) [3, 130]. Крім того, встановлено, що НЧ можуть орієнтувати молекули води, впливати на плинність й деформабільність мембран еритроцитів [25]. Тому НЧ із різним форм-фактором було обрано для дослідження осмотичної поведінки еритроцитів, а саме – їх адаптації до гіпертонічного лізису в 4 М розчині NaCl за різних умов передінкубації (рис. 3.1.10).

На рис. 3.1.10 показано залежність осмотичного гемолізу еритроцитів від присутності у середовищі НЧ із різним формфактором. Видно, що протигемолітичний ефект демонструють лише еліпсоїдні НЧ, особливо за концентрації 0,05 г/л. Подібні результати також були одержані під час досліджень інших клітин [143]. До того ж, особливості наночастинок із рідкоземельними елементами надають можливість реєстрації їх розташування відносно клітин завдяки сцинтиляційним властивостям, які надають рідкоземельні елементи [144].



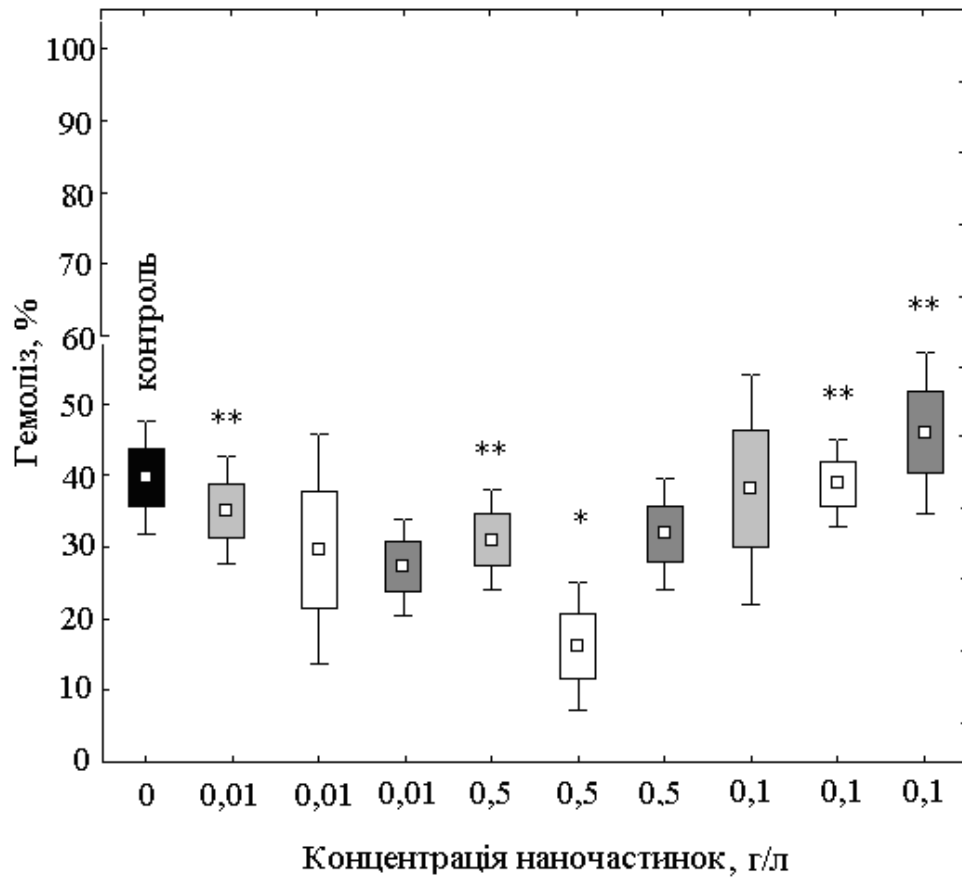


Рис. 3.1.10. Рівень гіпертонічного лізису еритроцитів після 60-хвилинної попередньої інкубації в ізотонічному сахарозно-сольовому середовищі, яке містило наночастинки з різним формфактором (сферичні  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  2 нм (■), еліпсоїдні  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  30×8 нм (□) та стрижнеподібні  $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  40×6 нм (■)).

*Примітки:* Блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з контролем (\*), відмінності значущі порівняно з еліпсоїдними наночастинками у концентрації 0,05 г/л (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

Таким чином, на осмотичну поведінку еритроцитів впливає формфактор НЧ. Механізмом такого ефекту цих непроникних у клітину НЧ може бути зміна властивостей примембранної води [47] або гідрофобних взаємодій [145], які впливають на структуру ліпідного бішару. Отже, НЧ

впливають як ліотропні агенти на воду, макромолекули та надмолекулярні комплекси [44].

Останні дослідження надають можливість нового погляду на ліотропний вплив великих частинок, які виходять за рамки класичного ряду Гофмейстера та названі «суперхаотропними» (наприклад, боратні кластери та та поліоксометалати). Для таких частинок хаотропний ефект стає найбільш ефективним. При подальшому збільшенні розмірів слабогідратованих частинок хаотропний ефект переходить у більш сильний гідрофобний, який є основною силою організації ЛБ [53]. Отже, при використанні НЧ потрібно враховувати їх ступінь гідратації щоб запобігти руйнуючому впливові описаних ефектів.

Ліотропний вплив аніонів на воду обумовлює параметри надмолекулярної само збірки, що може бути основою створення високоефективних кріопротекторів на основі наноматеріалів, які реагують на подразники [146]. Тому, подальші дослідження цього явища відкривають нові шляхи не тільки для визначення шляхів регуляції функціонування клітин та їх температурно-осмотичної адаптації, а й для створення кріозахисних агентів.

**Висновки.** У результаті проведених досліджень ми дійшли висновку, що однією з причин різної здатності еритроцитів адаптуватися до гіпертонічного лізису у 4 М розчині NaCl після передінкубації у середовищах із ЛА є зміна стану мембрани клітин, усі компоненти якої можуть бути модифіковані специфічними ефектами аніонів. Результати експерименту із охолодженням показали, що значного ліотропного впливу зазнає ліпідний бішар, а зміна електростатичних взаємодій за допомогою зсуву рН не має такого ефекту та свідчить про незначну роль взаємодії ЛА із зарядженими групами, насамперед, білків цитоскелета.

Еритроцити набували стійкості до перенесення у 4 М розчин NaCl за 600 мОсмоль/кг середовища передінкубації в присутності сильних ХА

(SCN<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) і КА (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) та за 900 мОсмоль/кг у присутності менш ліотропних (Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ac<sup>-</sup> та F<sup>-</sup>). За високих осмоляльностей середовища передінкубації за температури 0 °С максимальний захисний ефект мають аніони слабкосмотропного Ac<sup>-</sup> – (17,3 ± 9,6) % гемолізу за осомляльності 2400 мОсмоль/кг і слабохаотропного Br<sup>-</sup> – (21,7 ± 4,1) % за 1800 мОсмоль/кг.

Об'ємні показники клітин залежать від специфічних ефектів іонів, але це не корелює з ефективністю адаптації. Отриманні результати гарно пояснюються тим, що значну роль у таких процесах відіграють зміни колоїдного стану цитоплазми еритроцитів під впливом ЛА (через зміну тиску шару води, що розклинає колоїдні частинки та різної здатності екранувати заряди на білках). ХА розривають контакти між білками переводячи їх у стан золю (що може підтримувати об'єм клітин) за умов збільшення концентрації аніонів до межі 1200 мОсмоль/кг. Подальше підвищення осмоляльності середовища призводить до коагуляції золю та різкого лінійного зменшення об'єму еритроцитів, яке не залежить від концентрації [77].

Таким чином, відсутність кореляції свідчить, що в процесі адаптації еритроцитів критичною є архітектура клітин, яка проявляється через їхні морфологічні параметри від надмірної пластичності клітин (під впливом сильних ХА), що зменшувала їх опірність руйнуванню у 4 М розчині NaCl, до надмірної ригідності (у присутності сильних КА), що призводило до руйнування під гіпертонічним навантаженням через крихкість.

Отже, вплив ЛА ґрунтується не тільки на їх здатності до різного ступеню гідратації клітинних компонентів, але й реалізується через взаємодію безпосередньо із білками та ЛБ клітин, а також зміну колоїдного стану внутрішньоклітинних білків. Таким чином, ліотропні властивості реалізуються через зміни у системі «ЛА – вода – біомолекули».

Сильні ХА нейтралізують вплив охолодження через підвищення «структурної температури» середовища. Зі збільшенням космотропності аніонів температурна залежність посилювалася. Найкраща адаптація

спостерігалася у клітин, які були попередньо оброблені в присутності ацетат-аніона при рН 7,4 в умовах гіпотермії. Охолодження та низький рН (5,4) не захищають клітини в середовищах із найхаотропнішими аніонами.

Аніон  $As^-$  єдиний з ЛР має довгасту форму. Еліпсоїдні НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$   $30 \times 8$  нм також показали найкращий захисний ефект при 60-хвилинній передінкубації у концентрації 0,05 г/л:  $(17,8 \pm 4,6) \%$  відносно контролю  $(38,0 \pm 4,0) \%$ , що підтверджується іншими дослідниками. Отже, дослідження впливу формфактора НЧ можуть стати новим напрямом пошуку кріозахисних агентів та ефективних шляхів підвищення кріоадаптації клітин, а також вивчення її механізмів завдяки сцинтиляційним властивостям рідкоземельних елементів у складі наночастинок.

Результати проведених досліджень свідчать про необхідність враховувати ліотропні характеристики речовин у розчинах при складанні кріозахисних середовищ. Використання аніонів ЛР рекомендовано для направленої модифікації структурно-функціонального стану еритроцитів безпосередньо перед зберіганням.

За результатами підрозділу 3.1 опубліковані роботи: [147-155]

### **3.2. Дослідження діелектричних характеристик суспензій еритроцитів.**

Відомо, що свої ефекти ЛА здійснюють через зміну взаємодій біоструктур із водою, а навіть незначні зміни стану води можуть бути зареєстровані методом НВЧ-діелектрометрії у діапазоні частот, який відповідає дисперсії молекул води. За її допомогою можна визначити зміну співвідношення вільної–зв’язаної води [156].

З метою виявлення особливостей об’ємної структури води у суспензії клітин у присутності підвищеної концентрації різних ЛА досліджували зміни декременту статичної діелектричної проникності (ДДП) і частоти діелектричної релаксації (ЧДР). На рис. 3.2.1 та 3.2.2 видно, що ці параметри характерно змінюються залежно від виду ЛА, присутнього в суспензії.

Зниження діелектричної проникності (див. рис. 3.2.1) показує кількість води, яка не бере участі у релаксації. У такому випадку це відображає кількість води, яка пов’язана з поверхнею біоструктур, тому що вимірювання здійснювалися відносно сольового середовища відповідного ЛА.

З рис. 3.2.1 видно, що вода пов’язувалася з біоструктурами клітин в усіх варіантах, але ступінь взаємодій визначався характерними властивостями ЛА. Менша ступінь гідратації спостерігалася як для всіх ХА, так і для найкосмотропнішого сульфату.

Незалежно від сили проявів своїх властивостей, ХА заміщають молекули води на поверхні ліпідних структур через гідрофобні взаємодії, що мають дисперсну природу. Відомо, що КА утримують воду біля себе завдяки високій щільності заряду, яка притягує молекули води. Біоструктури не володіють таким впливом, а тому мають мінімальну гідратацію в присутності КА. Отже, в обох випадках кількість іммобілізованої води біля структур клітини є незначною.

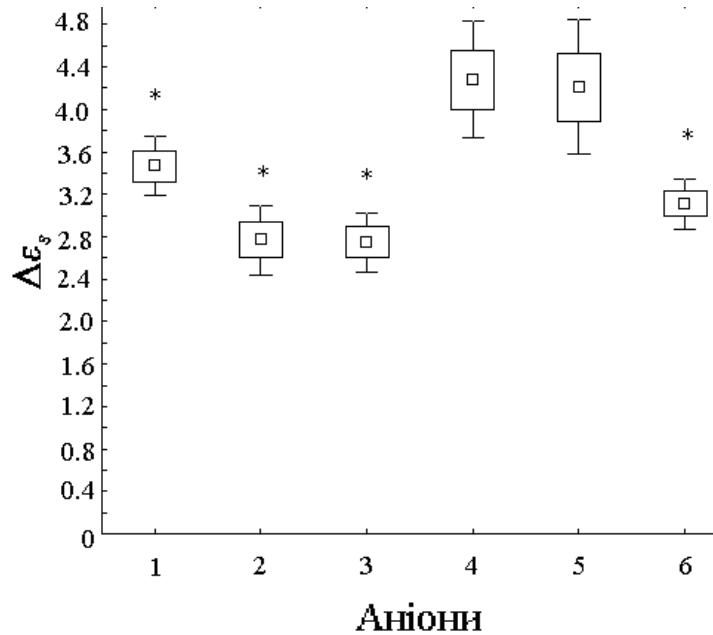


Рис. 3.2.1. Значення декременту статичної діелектричної проникності 10 % (за масою) суспензії еритроцитів у розчинах (2000 мОсмоль/кг), які містять ліотропні аніони: 1 –  $\text{ClO}_4^-$ ; 2 –  $\text{Br}^-$ ; 3 –  $\text{Cl}^-$ ; 4 –  $\text{As}^-$ ; 5 –  $\text{F}^-$ ; 6 –  $\text{SO}_4^{2-}$ , за температури 20 °С.

*Примітки:* блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ , відмінності значущі порівняно з  $\text{As}^-$  та  $\text{F}^-$  (\*),  $p \leq 0,05$ .

Загалом, найбільші коливання ДДП характерні для КА, які реалізують свій вплив шляхом електростатичних взаємодій [157]. Помітно, що зменшення ДДП для КА відповідає зменшенню ПГЛ еритроцитів: ступінь виключення води з поверхні біоструктур має бути пов'язаний із їх стабілізацією, що підтверджується багатьма літературними даними [18, 157, 158].

Цікаво було оцінити орієнтаційну динаміку води через дослідження частоти діелектричної релаксації її молекул. У нашому випадку зниження ЧДР свідчить про зменшення кількості вільної води, здатної швидко перебудувувати мережу водневих зв'язків, у присутності біоструктур еритроцитів, модифікованих впливом ЛА.

На рис. 3.2.2 представлено дані зміни ЧДР у суспензіях еритроцитів відносно середовищ із ЛА. Видно, що зміна концентрації вільної води у суспензії пов'язана із положенням аніона в ЛР. Позитивні значення вказують на зниження концентрації вільної води в суспензії.

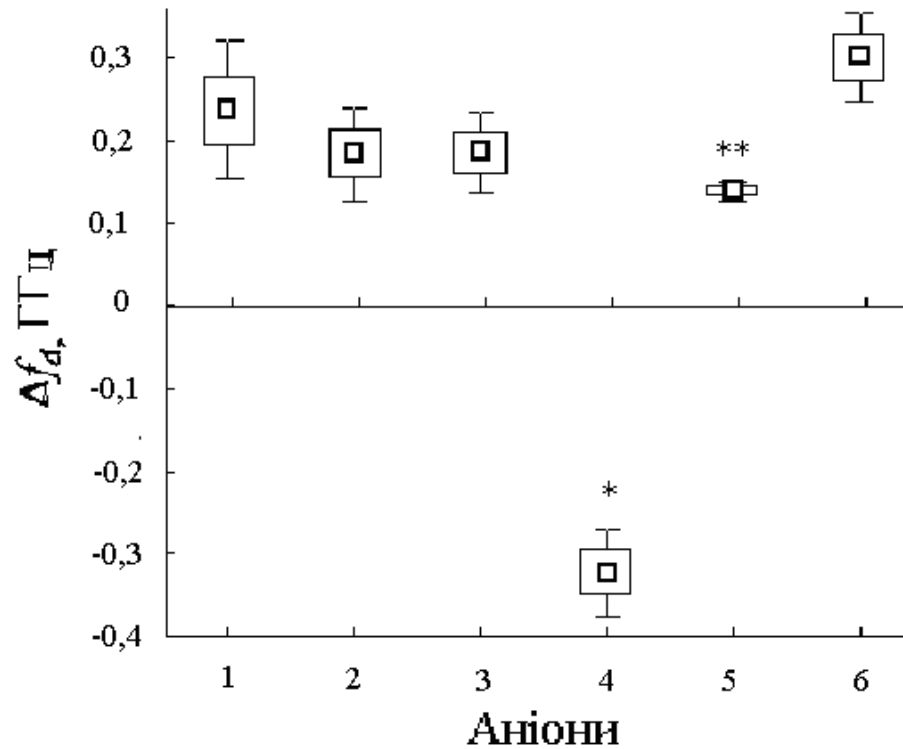


Рис. 3.2.2. Різниця між значеннями частоти діелектричної релаксації молекул води у 2000 мОсмоль/кг розчинах ліотропних аніонів і частоти діелектричної релаксації ( $\Delta f_d$ ) молекул води у суспензії еритроцитів 10 % (за масою) при такому самому аніонному складі розчину: 1 –  $\text{ClO}_4^-$ ; 2 –  $\text{Br}^-$ ; 3 –  $\text{Cl}^-$ ; 4 –  $\text{Ac}^-$ ; 5 –  $\text{F}^-$ ; 6 –  $\text{SO}_4^{2-}$ .

*Примітки:* блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ ; відмінності значущі порівняно з  $\text{Ac}^-$  (\*) та з  $\text{SO}_4^{2-}$  (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

Ці дані свідчать про різний характер поведінки молекул води біля біоструктур у присутності ХА та КА. Для перших вона майже не змінювалася, що підтверджує неелектростатичну природу їх взаємодій із молекулами й мембранними структурами та погоджується з даними

літератури [159]. Для КА, які впливають через взаємодію із зарядженими групами молекул, ЧДР значно зростала з посиленням космотропності, але не перевищувала показників, отриманих для ХА.

Це узгоджується з даними літератури, які свідчать про незначні ефекти іонів на орієнтацію та щільність водневих зв'язків за межами першої сольватаційної оболонки. Отже, зі збільшенням щільності заряду іона збільшується не об'єм мережі водневих зв'язків, а жорсткість прикріплення молекул води (час їх перебування поблизу іона) [157].

Спостерігалось значне підвищення орієнтаційної динаміки води (послаблення структурованості) біля біоструктур у суспензіях еритроцитів зі слабкосмотропним аніоном  $As^-$  відносно середовища з цим аніоном. Отже, на тлі максимальної гідратації біоструктур у присутності цього аніона вода не має з ними потужних взаємодій.

Показано, що у водному розчині  $NaAs$  за концентрації 1 М у кожного аніона дуже мало (менше двох) нерухомо зв'язаних молекул води, однак, аніони сильно гідратовані значною кількістю «повільної» води, динаміка якої була знижена. В такому розчині спостерігали відносно сильну гідрофільну взаємодію води з  $COO^-$  - фрагментами та гідрофобну гідратацію  $CH_3$ -груп, яка помітно зменшувалася з концентруванням розчину та нагріванням.

Останні дані показують, що біполярні молекулярні аніони відрізняються сильним, але коротшим електричним полем диполей, і їх гідратаційний об'єм незначно зменшується з підвищенням концентрації розчиненої речовини. Більша концентрація розчиненої речовини не впливає на розмір оболонки, але послаблює електричне поле в гідратаційній оболонці [160]. Отже, присутність  $As^-$  дає змогу біоструктурам залишатися гідратованими навіть за великої осмоляльності середовищ (що підтверджується морфологічними даними з рис. 3.1.8 та рис. 3.1.9) та не є перешкодою для перерозподілу компонентів і перебудов мембранних структур, які потрібні для адаптації клітин.



Таким чином, наші дані можна трактувати так, що за умов внесення клітин у структуроване слабкими зв'язками середовище ацетату відбувається посилена гідратація біоструктур без огляду на підвищену концентрацію середовища. При цьому ламається структура «повільної» води й збільшується кількість вільної. Такий вплив, мабуть, реорганізує воду біля макромолекул та ЛБ [161] так, щоб вона працювала наче структурний буфер і дозволяла їм плавню реорганізуватися та адаптуватися до пошкодження при ГЛ і ГК. Однак, як показано вище, для ПГЛ наслідки такого характеру впливу аніонів не були ключовими.

Той факт, що у середовищах із сильно КА (сульфатом) спостерігалось збільшення зв'язаної води, говорить про сильний зв'язок КА з їх гідратними оболонками та мінімальну гідратацію біоструктур. Це підтверджується морфологічними характеристиками, що свідчать про сильне зневоднення клітин у гіпертонічних середовищах із сульфатом (див. рис. 3.1.8 та рис. 3.1.9). У цьому випадку можна говорити про конкуренцію за воду між біоструктурами та аніонами, які мають сильнішу взаємодію з нею [162].

Встановлено, що в середовищах усіх ЛА, окрім F<sup>-</sup>, є не пов'язана з аніонами гіперрухлива вода, кількість якої більша для ХА [163, 164]. Таким чином, отримані нами закономірності адаптивної поведінки еритроцитів у всіх видах модельних критичних умов свідчать про те, що прискорення адаптивних процесів під впливом сильних ХА може бути пов'язане з підвищеною кількістю легкодоступної гіпермобільної води, а їх уповільнення в присутності Ас<sup>-</sup> – зниженням швидкості перебудов через «повільну» воду.

Такий висновок підтверджується переконливим доказом E. A. Vogler, який проаналізував понад 100 експериментальних і теоретичних досліджень про властивості міжфазної «прикордонної» води між поверхнями та об'ємом середовища (води, пов'язаної з розчиненими речовинами). Товщина шару цієї води може складати до десятків нанометрів від поверхні й залежить від співвідношень між віцинальною та об'ємною фазами води. Фізико-хімічні

властивості цієї води глибоко впливають на біологічні реакції та властивості поверхонь дуже простим способом: ключові прояви біологічної активності чутливі до змін стану міжфазної води і залежать від її адгезії й напруженості контактуючих поверхонь [165].

Практичним наслідком цього може бути можливість направленої зміни адаптивної поведінки клітин шляхом комбінування у середовищі іонів або молекул із різним характером впливу на міжфазну воду. Так, показано, що температура фазового переходу шару фосфоліпідів може залежати від зміни співвідношення присутніх у навколишньому середовищі аніонів [166].

Оскільки середовища з фторидом відрізняються зниженою кількістю, а після деякого порогу, й відсутністю гіперрухливої води (яка служить джерелом міжфазної), то, можливо, саме це є причиною крихкості біоструктур та пригнічення біологічних процесів у його присутності. Це підтверджується тим, що саме фторид має мінімальний проміжок між концентраціями, характерними для норми фізіологічної потреби та токсичності.

Таким чином, за гіпертонічних умов міжфазна вода служить своєрідним буфером і дозволяє біоструктурам не так жорстко взаємодіяти з іонним оточенням. Для  $As^-$  цей буфер має максимальні характеристики й приводить до м'якого сповільненого протікання процесів, а для фтору й сульфату – мінімальні, що робить їх впливи жорсткими та швидкими.

Отже, критичні зміни в стані цитоскелета та гемоглобінового гелю при експозиції клітин у гіпертонічних середовищах за температури  $37\text{ }^\circ\text{C}$  відрізняються для ХА та КА аніонів. У присутності гідрофобних і «липких» ХА посилюється зміна конформації білків цитоскелета, чому сприяє відкріплення його від дестабілізованого цими аніонами ЛБ. У присутності КА значно стабілізуються зв'язки між білками цитоскелета та ЛБ, бо біомолекули залишаються оточеними водою. Це посилює зворотність змін у мембрані еритроцита та збереженість при збільшенні об'єму в процесі ПГЛ.

Отже, встановлено, що аніони ліотропного ряду мають вплив на ПГЛ еритроцитів (у температурному режимі 37–0 °С) та його характер відрізняється від пошкодження у гіпертонічних умовах. Рівень ПГЛ лінійно знижується зі збільшенням космотропних властивостей аніонів і набуває мінімальних значень у середовищах із аніонами фтору та сульфату, які стабілізують ЛБ та білки. В присутності сильно ХА перхлорату ПГЛ проявляється навіть без охолодження на етапі регідратації (у режимі 37–37 °С).

Критичні зміни трапляються саме у стані білків цитоскелета та гемоглобіну на гіпертонічному етапі за температури 37 °С. У присутності ХА відбувається їх «висолювання» та перехід у розчинений стан, що дестабілізує оболонку еритроцита, та через що можуть додатково накопичуватися осмотично активні частинки у клітині. Космотропні аніони стабілізують структуру та взаємодію білків між собою і ЛБ, що захищає їх від пошкодження при регідратації. Це можна використовувати для керування температурно–осмотичною поведінкою клітини через іонний склад середовища.

Дані НВЧ-діелектрометрії показали, що для ХА майже немає відмінностей у гідратації клітин. Зміни рівня ПГЛ не відповідали вимірюваним характеристикам води в суспензії. Різниця в стані міжфазної води обумовлена присутніми в ній ЛА та визначає стан клітин. Хаотропні аніони безпосередньо взаємодіють із біомолекулами, дегідратують їх та збільшують ПГЛ через порушення структурних зв'язків. Космотропні аніони змінюють поведінку клітин через модуляцію стану води біля структур. Особливу роль відіграє міжфазна вода, яка під впливом ХА стає «гіперрухливою» та дозволяє прискорене перебудування, а під впливом  $As^-$  – «повільною» й виступає «структурним буфером» між клітинами та впливом середовища із підвищеним вмістом іонів, що дозволяє клітинам адаптуватися до зміни осмоляльності.

**Висновки.** У результаті проведених досліджень встановлено, що аніони ліотропного ряду ефективно пливають на стан води в суспензіях еритроцитів, що корелює з їх сенсibiliзацією до пошкодження у гіпертонічних умовах. Відомо, що це пошкодження залежить від ступеня дегідратації клітин, але досі не було показано, що його можна регулювати за допомогою варіювання ліотропних властивостей аніонів у середовищі.

Наші дані вказують на можливість ефективної оцінки ступеня гідратації клітин методом НВЧ-діелектрометрії (9,2 ГГц), яким можна оцінити зміни стану води в суспензії еритроцитів. Отже, даний метод може бути використаний для прогнозування адаптаційної здатності клітин.

У гіпертонічних умовах (2000 мОсмоль/кг) у середовищах із  $\text{As}^-$  клітини мали максимальний рівень гідратації. На це вказував декремент діелектричної проникності (10 % суспензії), який дорівнював  $4,28 \pm 0,28$ , що означало підвищення кількості зв'язаної води.

Стан вільної води оцінювали шляхом розрахунку різниці частот діелектричної релаксації ( $\Delta f_d$ ). Вона мала характерні риси у присутності  $\text{As}^-$ : спостерігалось й збільшення частоти діелектричної релаксації ( $\Delta f_d$ ) молекул вільної води у суспензії еритроцитів відносно розчину з цим аніоном і різниця приймала значення нижчі нуля ( $-0,32 \pm 0,03$ ) ГГц. Таке явище свідчить про розупорядкування вільної води після внесення клітин до розчину.

З літератури відомо, що в  $\text{As}^-$  є велика гідратна оболонка, яка має слабкі зв'язки з аніоном. Через це вода в присутності цього аніона стає «повільною» та легко пов'язується з іншими інкрементами у середовищі, якими у даному випадку є еритроцити. Отже, отримані дані пояснюють захисний ефект  $\text{As}^-$  у гіпертонічних умовах середовища підвищенням здатності клітин зв'язувати воду, внаслідок чого знижено ступінь їх дегідратації у гіпертонічних умовах.

Таким чином, аніони ліотропного ряду впливають на рівень гідратації клітин, ступінь якої корелює з чутливістю еритроцитів до пошкодження у гіпертонічних умовах. Оскільки рівень ГЛ еритроцитів обумовлений ступенем їхньої дегідратації, то цілком логічно, що у присутності аніонів ацетату, які максимально гідратують клітини, рівень гіпертонічного пошкодження найменший. Отже, саме цю характеристику можна рекомендувати для добору інших кріозахисних агентів і компонентів кріозахисних середовищ. Дана тема є перспективною, тому вона потребує подальших досліджень.

За результатами підрозділу 3.2 опубліковано роботу [167].

### 3.3. Дослідження гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів у присутності ліотропних аніонів

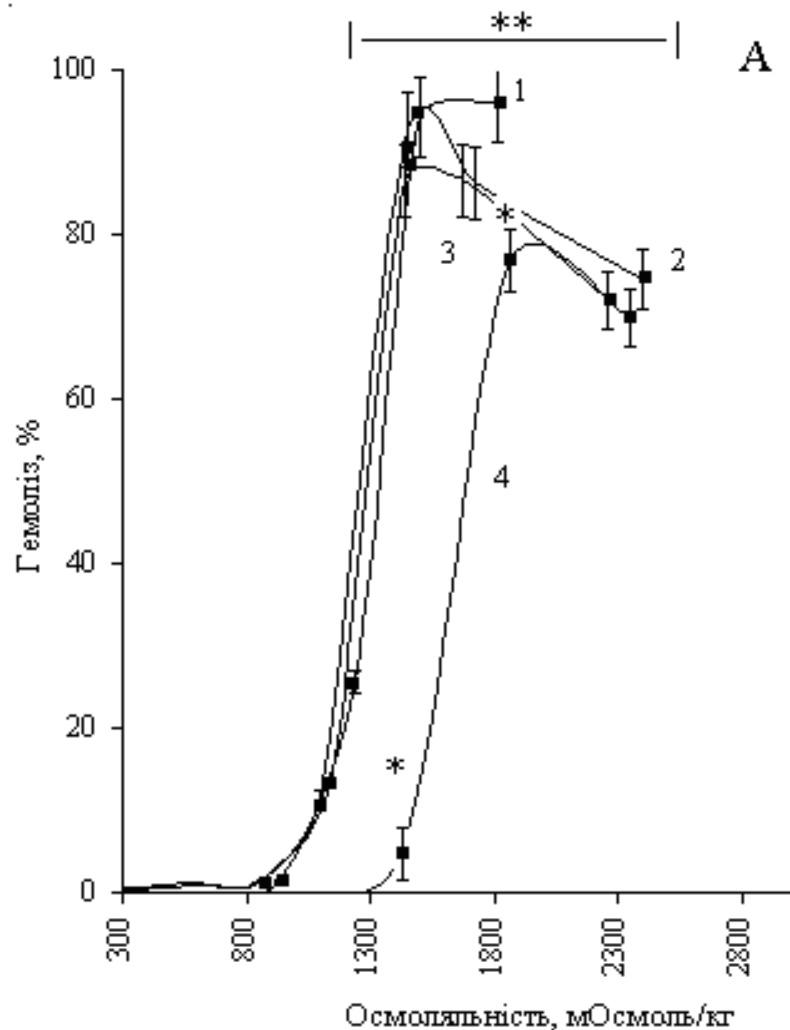
На попередньому етапі досліджень розглядалися основні характеристики осмотичної поведінки еритроцитів. Пошкодження еритроцитів охолодженням до 0 °С відбувається тільки в гіпертонічному середовищі. Цей процес представляє особливий інтерес, оскільки більш точно моделює їх руйнування під час заморожування, в момент поєднаної зміни осмоляльності та температури середовища. Описане явище відоме як гіпертонічний кріогемоліз (ГК) еритроцитів, всебічний розгляд різних аспектів якого подано в роботах різних авторів [54, 55, 72, 168], однак вплив специфічних властивостей іонів на процеси кріогемолізу висвітлено недостатньо.

Пошкодженні при ГК в основному залежить від змін у стані ПМ та її проникності для іонів. Отже, дослідження вже відомих закономірностей ГК у присутності ЛА може допомогти визначити основні мішені впливу останніх на вказані мішені кріопошкодження. Перш за все, ми дослідили залежність ГК від осмоляльності середовищ різного аніонного складу. Результати власних експериментальних досліджень представлено на рис. 3.3.1.

З рис. 3.3.1 видно, що максимуми на кривих ГК, які отримані для різних ЛА, відрізняються як за рівнями пошкодження еритроцитів, так і за ефективним значенням осмоляльності середовища. Найбільш високі рівні пошкодження клітинних мембран при менших значеннях осмоляльності (як й у випадку з осмотичною витривалістю при ГЛ) спостерігалися за умов впливу ЛА, які мають сильно виражені космотропні або хаотропні властивості. Встановлена закономірність полягає у наступному: чим більший специфічний вплив ЛА, тим менша адаптивна здатність клітин за умов підвищення осмоляльності середовища незалежно від температури.

У середовищі з NaF і осмоляльністю 1250 мОсмоль/кг пошкодження клітин становило лише 1 %, а при значенні 1414 мОсмоль/кг він підвищився до 50 % (за максимальної концентрації розчинності для цієї солі). Різниця в осмоляльності середовищ склала всього 164 мОсмоль/кг. Результати власних попередніх досліджень свідчать, що виражені космоотропні властивості F<sup>-</sup> роблять мембранні структури більш ригідними, що дозволяє їм до певного часу успішно протистояти пошкодженню, проте за критичної концентрації зовнішнього середовища ця система швидко «ламається», і рівень гемолізу еритроцитів різко зростає.

Особливу увагу привертає поведінка клітин, які зазнають ГК у середовищі, що містить As<sup>-</sup>. Вихід кривої на максимальний рівень пошкодження дуже пологий та утримується на високому рівні у широкому



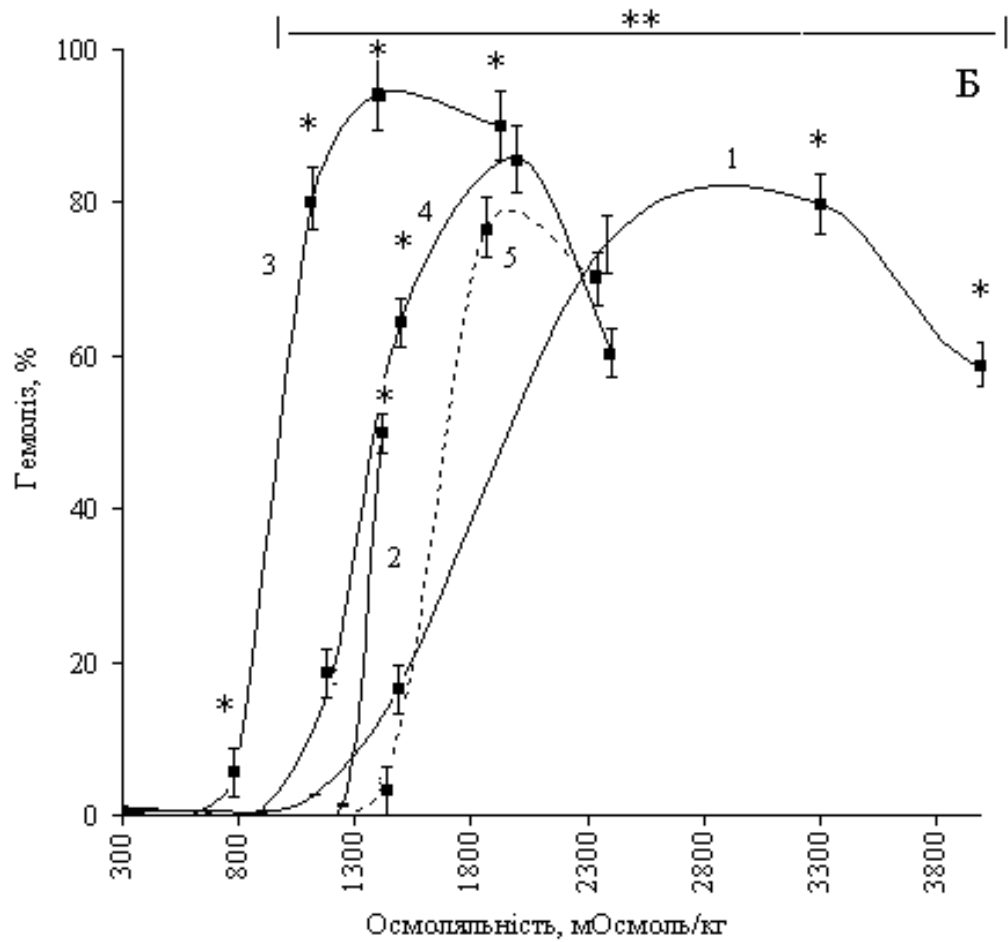


Рис. 3.3.1. Залежність рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів від осмоляльності середовища з різними аніонами: А – хаотропні (1–  $\text{SCN}^-$ ; 2 –  $\text{ClO}_4^-$ ; 3 –  $\text{Br}^-$ ; 4 –  $\text{Cl}^-$ ); Б – космотропні (1 –  $\text{Ac}^-$ ; 2 –  $\text{F}^-$ ; 3 –  $\text{SO}_4^{2-}$ ; 4 – суміш 1:1  $\text{SCN}^-$  та  $\text{Ac}^-$ ) та 5 –  $\text{Cl}^-$ .

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з  $\text{Cl}^-$  (\*) та з рівнем гемолізу для інших осмоляльностей середовища з таким самим аніоном (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

діапазоні значень осмоляльності (75 % пошкодження еритроцитів при 2389 мОсмоль/кг та 80 % – при 3303 мОсмоль/кг). Відомо, що ацетат достатньо легко проникає в клітину двома шляхами: перенесенням у вигляді аніонів через аніонтранспортний білок та за рахунок процесів дифузії через ЛБ у вигляді недисоційованих молекул [137]. Завдяки цьому можна пояснити



пологий підйом кривої, яка характеризує пошкодження клітинних мембран в середовищі з  $As^-$ . Проте залишається нез'ясованою причина збереження високого рівня пошкодження в достатньо великому діапазоні підвищених осмоляльностей середовища.

З метою виявлення конкурентної природи впливу ЛА еритроцити помістили в середовище, з сумішшю аніонів  $ClO_4^-$  та  $As^-$  (які спричинили найбільший і найменший рівні пошкодження при ГК) у рівних пропорціях. Встановлено, що у такій суміші еритроцити демонструють середнє значення рівню гемолізу (рис. 3.3.1 Б, крива 4) при менших осмоляльностях більш наближене до рівня пошкодження у присутності ХА, а при більших значеннях осмоляльності середовища – до рівня пошкодження у присутності КА.

Отже, вплив обох аніонів на мембрану не має конкурентної природи. Дані літератури вказують на те, що підбором комбінацій ЛА за їх властивостями можна ослаблювати або нейтралізувати руйнуючий вплив ХА [45, 169], а також «налаштовувати» біоструктури змінюючи їх відносини із водою [122]. Крива для суміші аніонів (рис. 3.3.1 Б, крива 4) в усьому інтервалі досліджуваних концентрацій розташована в діапазоні менших осмоляльностей відносно фізіологічного та майже «ліотропно-нейтрального»  $Cl^-$ , що свідчить про переважний вплив ХА, які концентруються на межі розділу поверхонь [11, 82, 102]. Через таке явище вони мають більший вплив на клітини за однакової концентрації хао- та космотропних аніонів у середовищі.

Раніше було встановлено, що головною причиною підвищеної чутливості еритроцитів до ГК є зміни у мембранних структурах, які спричинені ХА через їх гідрофобні властивості та спорідненість до ЛБ. Проте Dalmark M. і Wieth J. показали, що аніони з підсиленими хаотропними властивостями стають на перешкоді потокам  $Cl^-$  через мембрану еритроцита людини [116]. Цей факт також може пояснити зсув піку пошкодження при

ГК у бік меншої осмоляльності через ускладнення зняття осмотичного навантаження на мембрані.

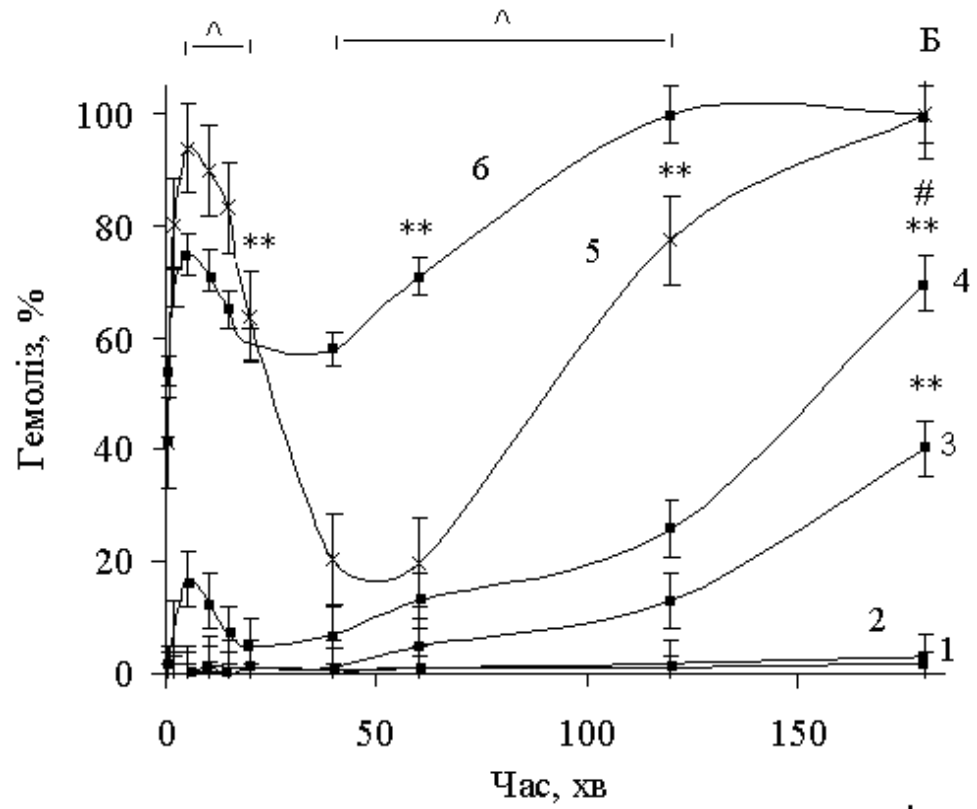
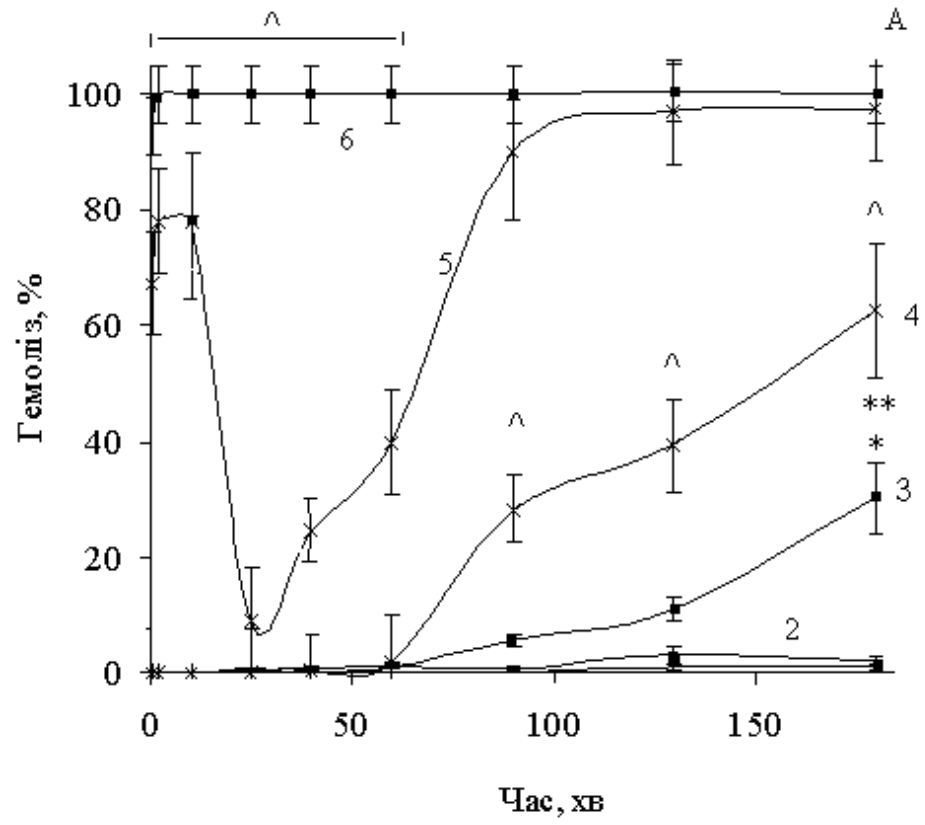
Отже, на клітинному рівні реалізація ефектів ЛА з різними властивостями може відрізнятися як за способом впливу на плазматичну мембрану та полягати у здійсненні її структурних модифікацій, так і спроможністю ЛА проникати через мембрану внаслідок різного діаметра іонів.

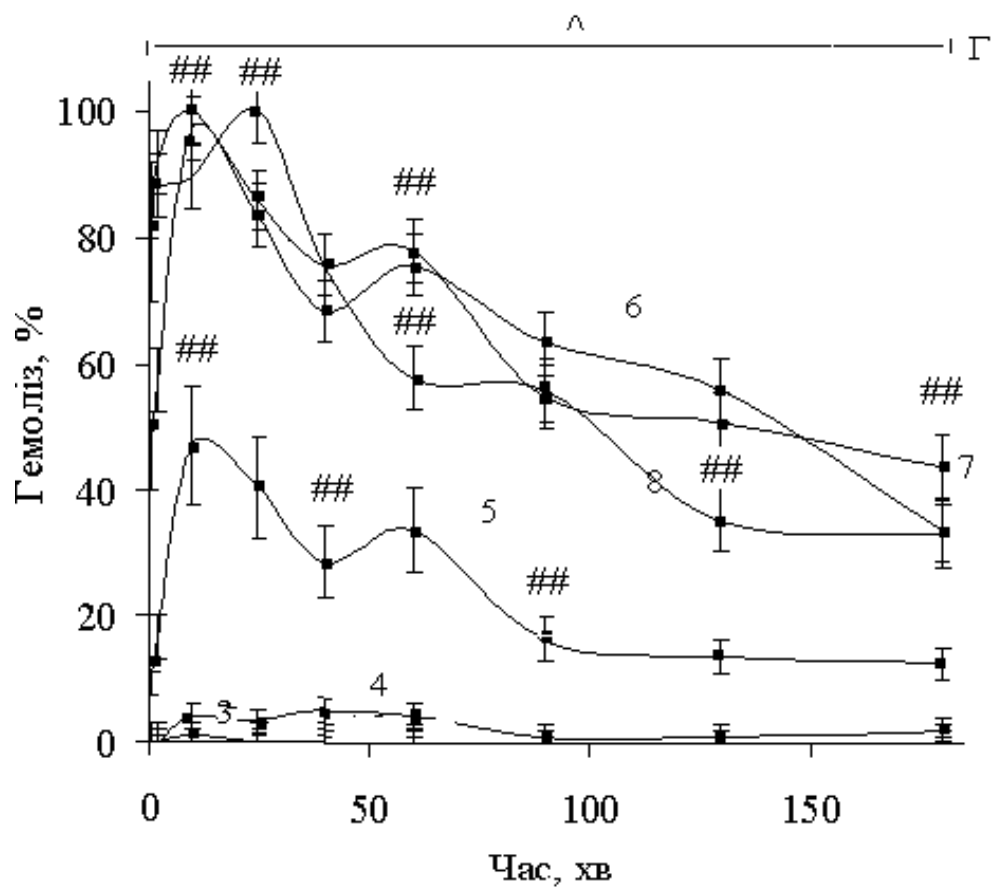
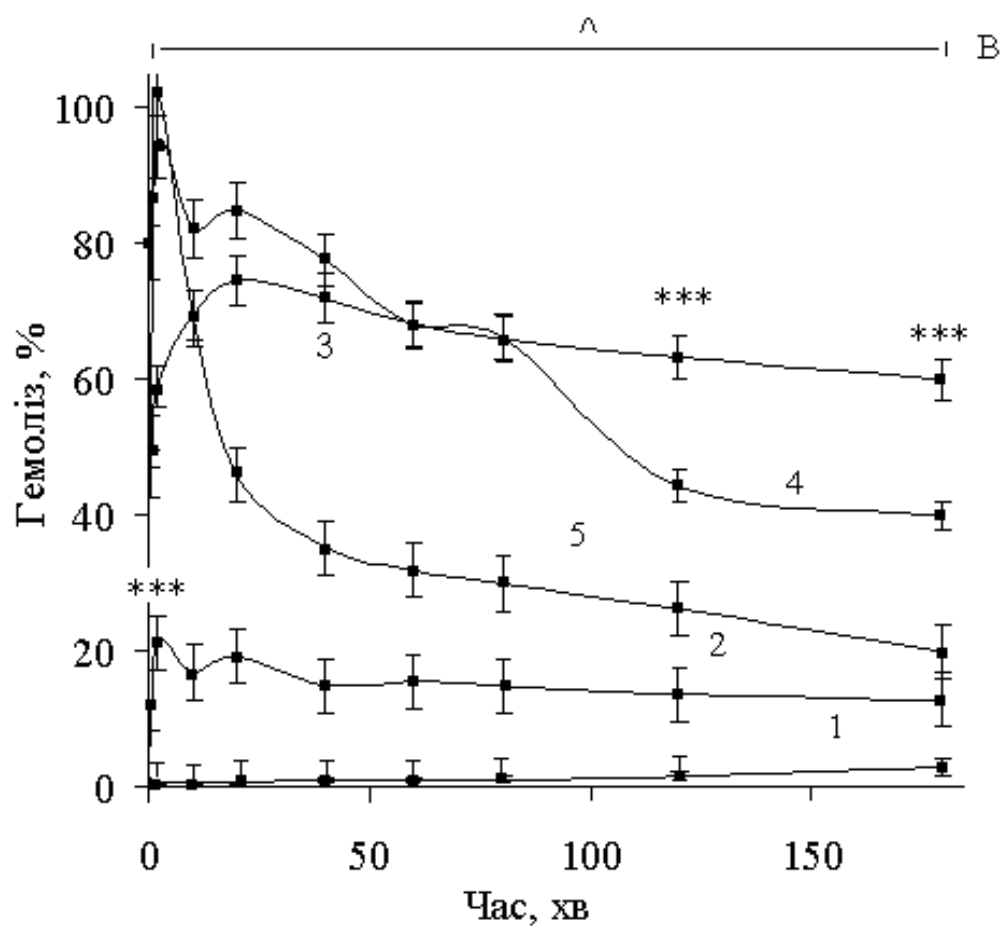
З метою встановлення ролі трансмембранних транспортних процесів у гемолізі еритроцитів на наступному етапі ми досліджували рівень їх пошкодження під час гіпертонічного кріогемолізу в залежності від часу попередньої інкубації в середовищах із різним вмістом аніонів (рис. 3.3.2) [55, 56].

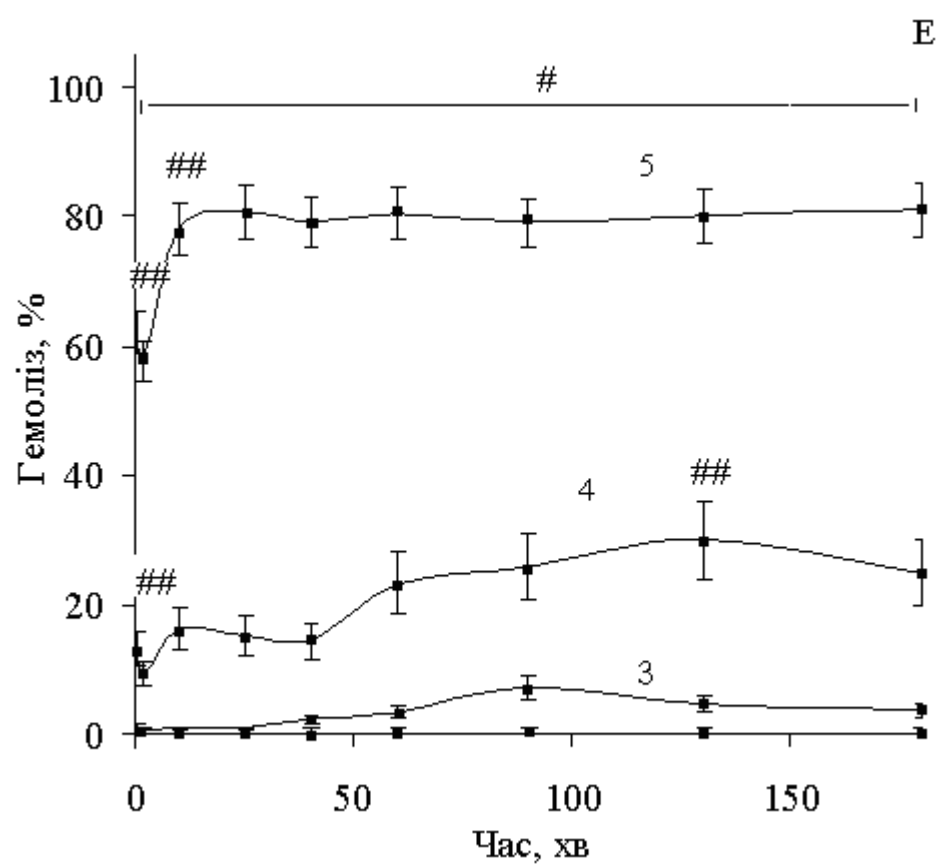
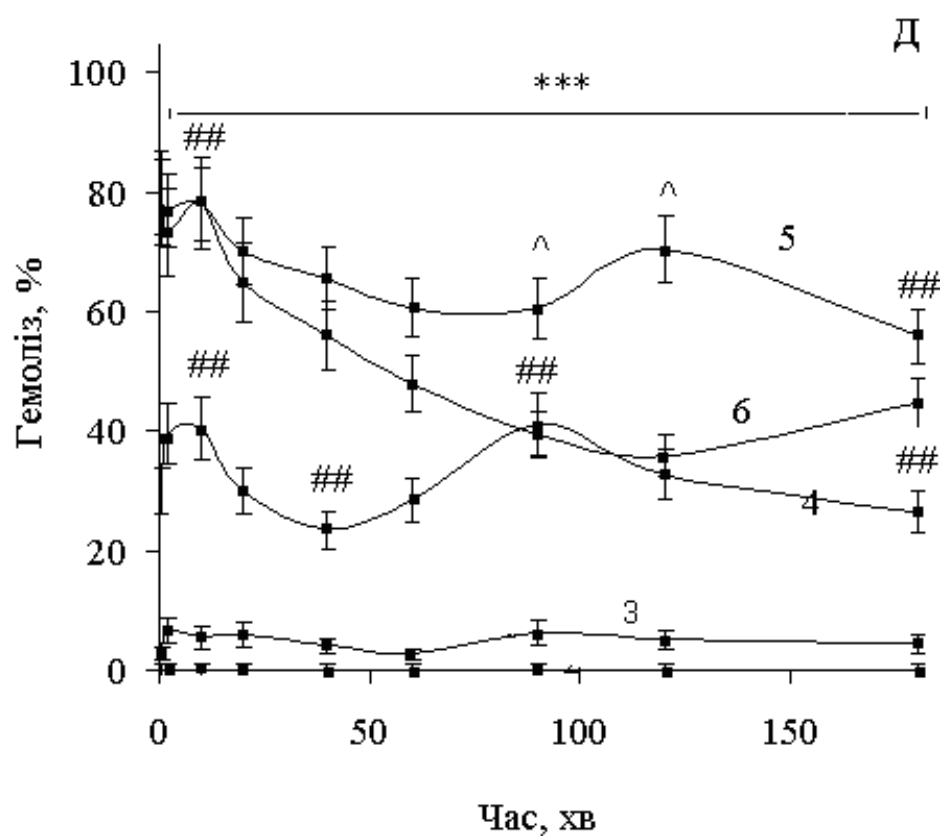
З рис. 3.3.2 видно, що поведінка клітин обумовлена видом ЛА в середовищі, причому найбільш виражені зміни спостерігалися в середовищах з тією осмоляльністю (індивідуальною для кожного іона), за якої наступав етап сенсibilізації еритроцитів при ГЛ (див. рис. 3.1.1) співпадає з такою ж при ГК (див. рис. 3.3.1). Даний ефект можна пояснити наявністю на мембрані єдиної мішені впливу ЛА. За інших значень осмоляльностей зміни рівня ГК менш виражені, тому можна припустити, що вони є не критичними.

Відомо, що концентрація середовища визначає параметри перебудови ЛБ при ГК, за яких при подальшому охолодженні відбувається руйнування клітин [54, 55, 72]. Це дає підстави зробити висновок, що для кожного ЛА існує своя зона критичної осмоляльності, у якій вплив ЛА на еритроцит проявляється найбільш специфічно.

Хао- та космоетропні аніони найбільш виражено змінювали рівень ГК за умов меншої осмоляльності середовищ, ніж у присутності ліотропно-нейтрального  $\text{Cl}^-$ . Найбільша ж осмоляльність середовища у якій дезадаптуються клітини у присутності  $\text{As}^-$  (рис. 3.3.2, Д).







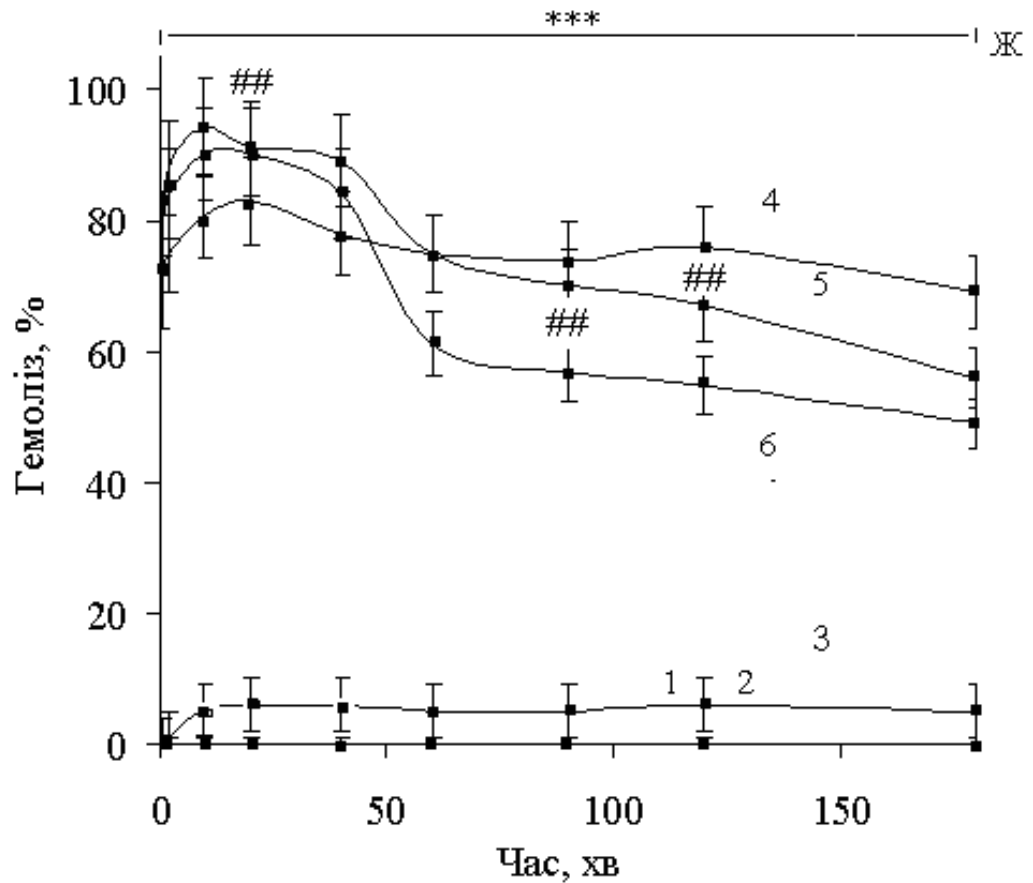


Рис. 3.3.2. Залежність рівня пошкодження еритроцитів за умов гіпертонічного криогемолізу від часу передінкубації при температурі 37 °С у середовищах різної осмоляльності, які містили аніони: А –  $\text{SCN}^-$  (1 – 300, 2 – 579, 3 – 804, 4 – 1137, 5 – 1360, 6 – 1963 мОсмоль/кг); Б –  $\text{ClO}_4^-$  (1 – 337, 2 – 607, 3 – 867, 4 – 1135, 5 – 1436, 6 – 2251 мОсмоль/кг); В –  $\text{Br}^-$  (1 – 300, 2 – 900, 3 – 1200, 4 – 1500, 5 – 2400 мОсмоль/кг); Г –  $\text{Cl}^-$  (1 – 300, 2 – 600, 3 – 900, 4 – 1036, 5 – 1306, 6 – 1512, 7 – 2059, 8 – 2729 мОсмоль/кг); Д –  $\text{Ac}^-$  (1 – 300, 2 – 776, 3 – 1386, 4 – 1571, 5 – 2137, 6 – 2786 мОсмоль/кг); Е –  $\text{F}^-$  (1 – 300, 2 – 600, 3 – 900, 4 – 1200, 5 – 1500 мОсмоль/кг); Ж –  $\text{SO}_4^{2-}$  (1 – 252, 2 – 576, 3 – 774, 4 – 1118, 5 – 1402, 6 – 1925 мОсмоль/кг).

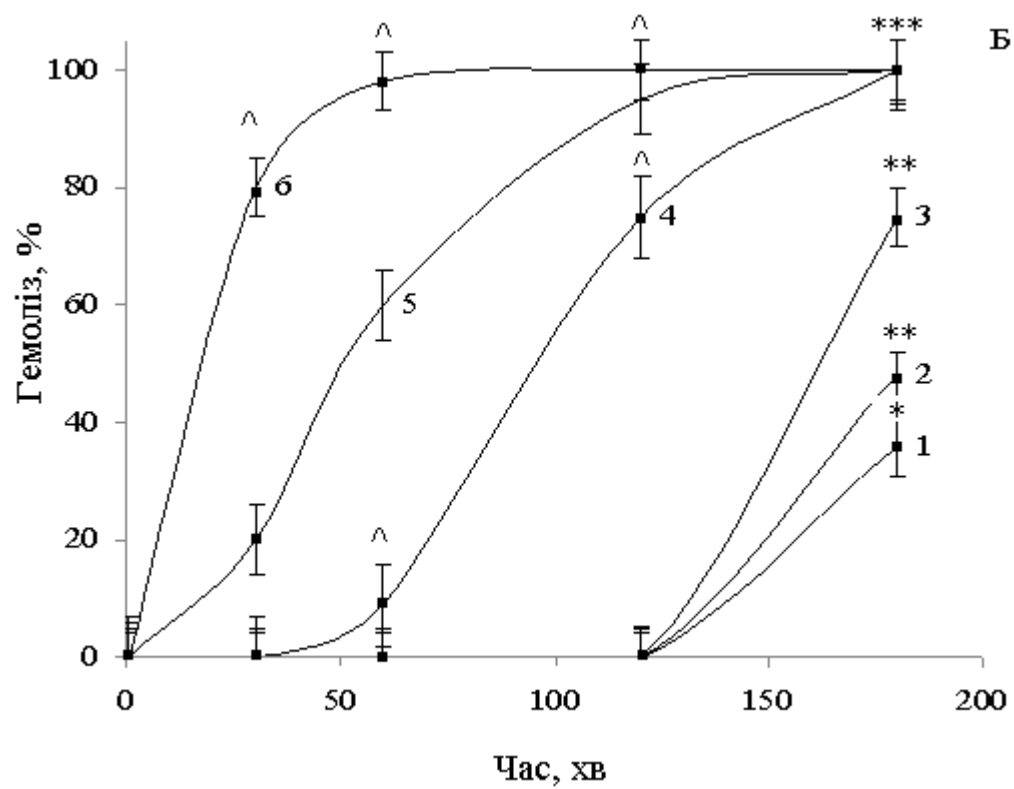
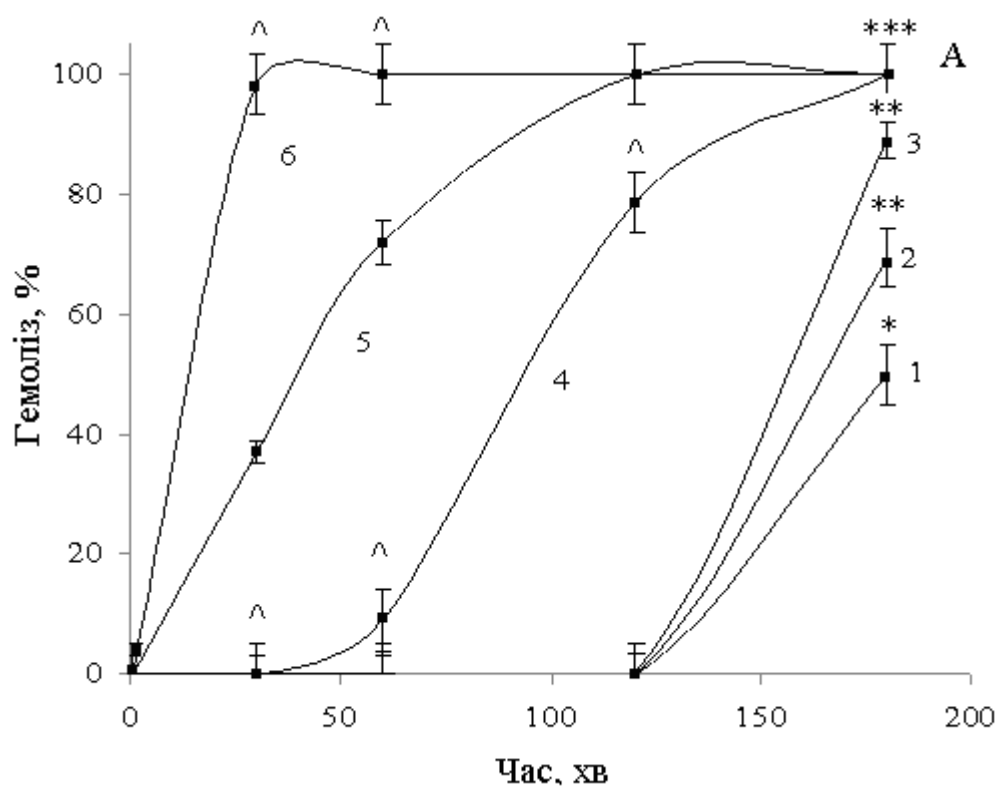
*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з 0 % гемолізу (\*), з рівнем гемолізу для іншого часу за тієї ж осмоляльності (\*\*), з осмоляльністю 3 для того ж часу (\*\*\*), з осмоляльністю 5 для того ж часу (^), з 4 осмоляльністю для того ж часу (#) та з різним часом для такої ж осмоляльності (##);  $p \leq 0,05$ .

Для кожного з ЛА контролювали рівень гемолізу еритроцитів, який не пов'язаний із ГК, в умовах тривалої інкубації у середовищах різної осмоляльності за температури 37 °С (рис. 3.3.3) та 0 °С (рис. 3.3.4). У присутності сильних ХА (роданід- та перхлорат-аніонів) спостерігається нестабільність, яка проявляється інтенсивніше та швидше в часі зі зростанням концентрації аніонів в середовищі. В силу слабкої гідратованості аніонів їх локальна концентрація поблизу поверхні ЛБ збільшена й вони легко проникають між гідрофобними молекулами всередину шару фосфоліпідів, руйнуючи його структуру [11, 76, 82].

У випадку сильних ХА в середовищі з осмоляльністю близько до 2000 мОсмоль/кг спостерігалось повне руйнування клітин за 25 хв, а при 1130 мОсмоль/кг – монотонне зростання рівня спонтанного гемолізу розпочиналося на 40-й хвилині інкубації як за температури 37, так і 0 °С (див. рис. 3.3.3 та 3.3.4). Таким чином, результатами власних експериментальних досліджень показано, що температурний вплив є мало значущим для цієї групи аніонів.

Хлорид-аніон, який має слабкі хаотропні властивості, при значенні осмоляльності близько 2000 мОсмоль/кг до кінця другої години інкубації дестабілізував не більше 40 % клітин за температури 37 °С (див. рис. 3.3.3, В) та 20 % за температури 0 °С (див. рис. 3.3.4, В). Слабокосмотропний Ас<sup>-</sup> зовсім не викликав пошкодження мембрани, а у присутності аніонів із більш вираженими космотропними властивостями через 190 хв процес лізису не перевищував 20 % за температури 37 °С та 10 % за температури 0 °С.

Представлений дизайн експериментів показав, що фоновий рівень спонтанного лізису еритроцитів істотно не впливає на рівень пошкодження клітин, оскільки термін часу дослідження ГК був коротший за початок спонтанного гемолізу за певної концентрації середовищ.





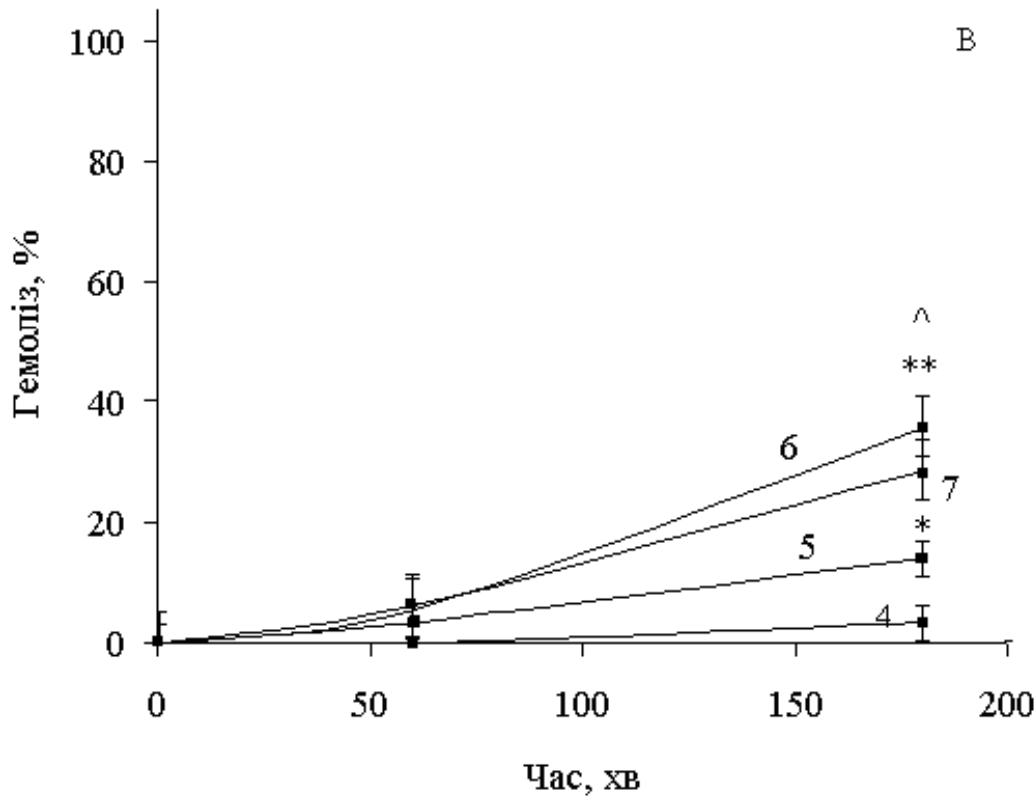
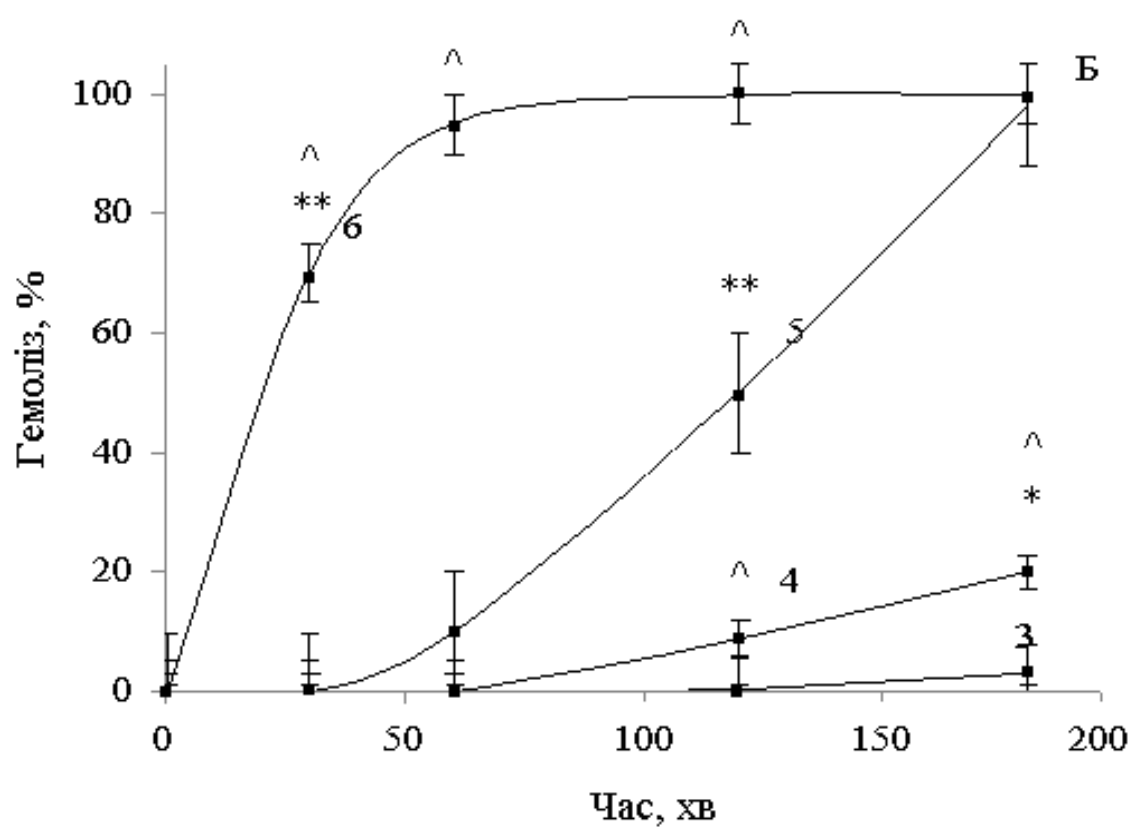
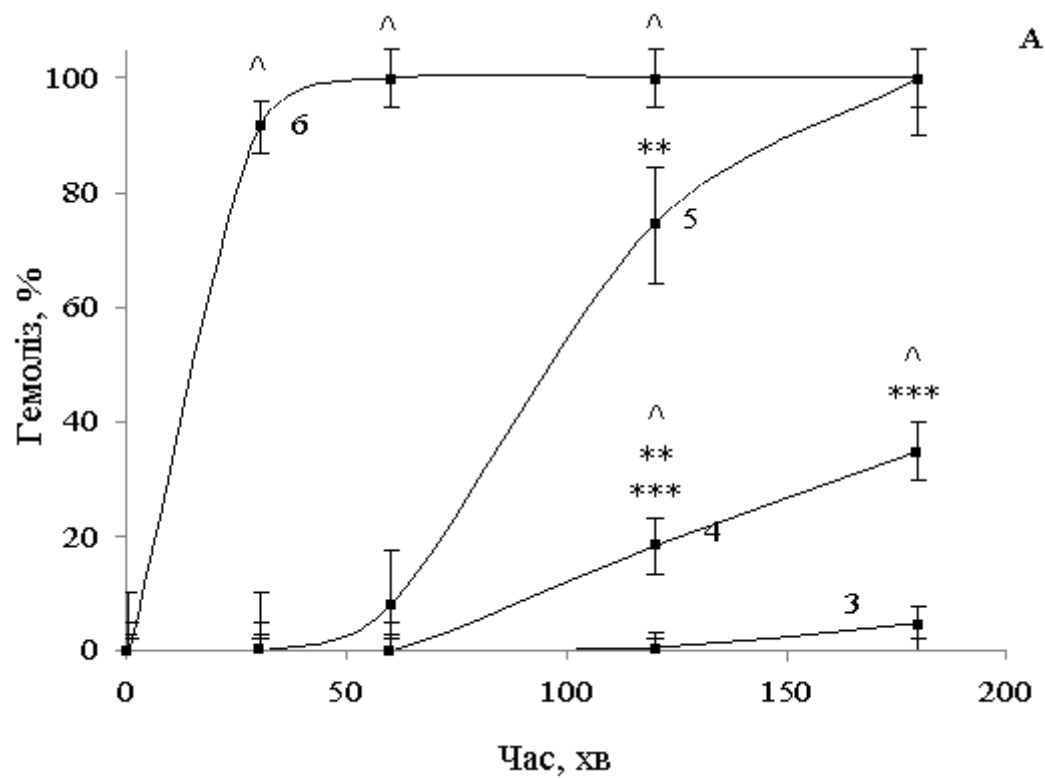


Рис. 3.3.3. Залежність рівня пошкодження еритроцитів від часу інкубації за температури 37 °С у середовищах із різною осмоляльністю, які містять аніони: А –  $\text{SCN}^-$  (1 – 300, 2 – 579, 3 – 804, 4 – 1137, 5 – 1360, 6 – 1963 мОсмоль/кг); Б –  $\text{ClO}_4^-$  (1 – 337, 2 – 607, 3 – 867, 4 – 1135, 5 – 1436, 6 – 2251 мОсмоль/кг); В –  $\text{Cl}^-$  (1 – 300, 2 – 600, 3 – 1036, 4 – 1306, 5 – 1512, 6 – 2059, 7 – 2729 мОсмоль/кг). Для інших досліджуваних аніонів істотного гемолізу не спостерігалось, дані не представлені.

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з 0 % гемолізу (\*), з рівнем гемолізу для суміжного часу за тієї ж осмоляльності (\*\*), з осмоляльністю 3 для того ж часу (\*\*\*) та з осмоляльністю 5 для того ж часу (^);  $p \leq 0,05$ .



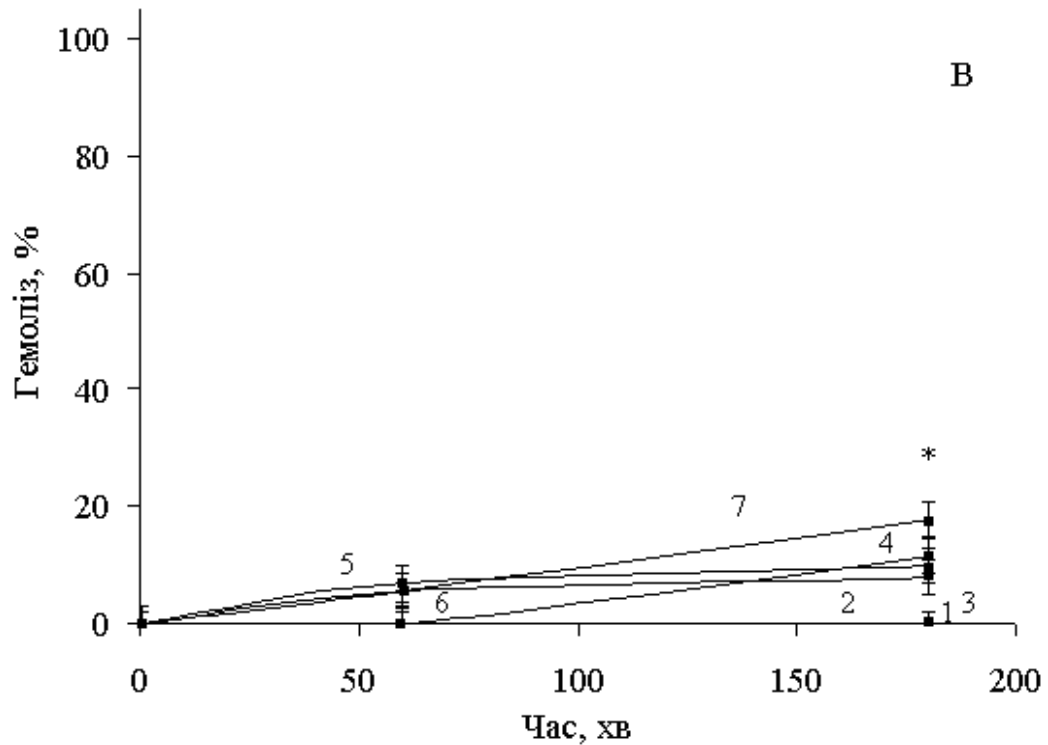


Рис. 3.3.4. Залежність рівня пошкодження еритроцитів від часу інкубації за температури 0 °С в середовищах різної осмоляльності, які містять аніони:

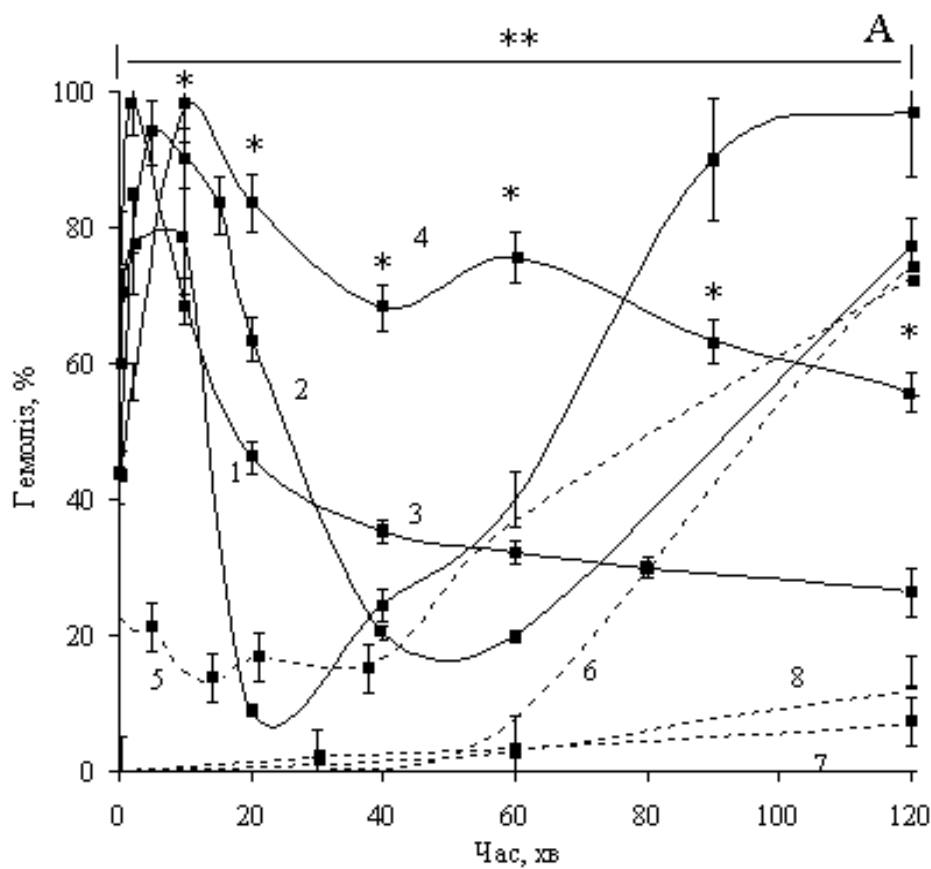
А – SCN<sup>-</sup> (1 – 300, 2 – 579, 3 – 804, 4 – 1137, 5 – 1360, 6 – 1963 мОсмоль/кг),  
 Б – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> (1 – 337, 2 – 607, 3 – 867, 4 – 1135, 5 – 1436, 6 – 2251 мОсмоль/кг),  
 В – Cl<sup>-</sup> (1 – 300, 2 – 600, 3 – 1036, 4 – 1306, 5 – 1512, 6 – 2059, 7 – 2729 мОсмоль/кг). Для інших досліджуваних аніонів істотного гемолізу не спостерігалось, дані не представлені. (M ± m, n = 6, за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; \* – відмінності значущі (p ≤ 0,05) порівняно з 0 % гемолізу; \*\* – відмінності значущі (p ≤ 0,05) порівняно з суміжним часом для такої ж осмоляльності; \*\*\* – відмінності значущі (p ≤ 0,05) порівняно з 3 осмоляльністю для того ж часу; ^ – відмінності значущі (p ≤ 0,05) порівняно з 5 осмоляльністю для того ж часу.)

На рис. 3.3.5 наведено результати експериментальних досліджень, які найбільш точно характеризують зміни стану клітин на різних стадіях ГК для кожного з ЛА. З'ясувалося, що критична осмоляльність середовища, яка

формує такі умови для клітин, залежить від положення аніона у ліотропному ряді: для  $\text{SCN}^-$  – 1200 мОсмоль/кг;  $\text{ClO}_4^-$  – 1500 мОсмоль/кг;  $\text{Cl}^-$  – 1800 мОсмоль/кг,  $\text{As}^-$  – 2400 мОсмоль/кг,  $\text{F}^-$  – 1300 мОсмоль/кг та  $\text{SO}_4^{2-}$  – 1900 мОсмоль/кг. Важливо, що ці значення осмоляльностей співпадають з тими, які характерні для максимальної сенсibiliзації еритроцитів до ГК у присутності кожного з ЛА (див. рис. 3.3.1).

Оскільки форма таких кривих віддзеркалює динаміку процесів, які відбуваються внаслідок переформування компонентів мембрани, то за характером кривих можна визначити специфіку впливу ЛА на процеси мембранних перебудов [55].

З рис. 3.3.5 видно, що ЛА спричиняли специфічні зміни мембран еритроцитів, аналогічні тим, що спостерігалися при ГЛ клітин, зі збереженням характерних для ГК стадій. З підвищенням космотропності



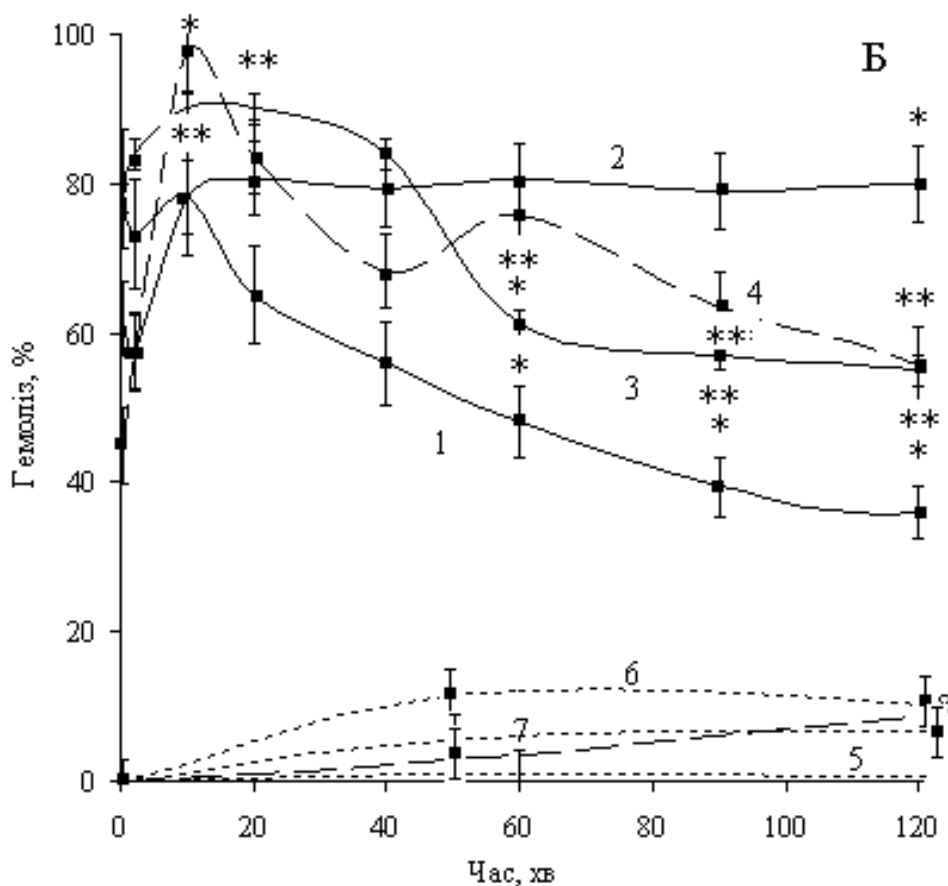


Рис. 3.3.5. Залежність рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів від часу передінкубації при 37 °С у середовищах з критичною осмоляльністю (яка відповідає максимальній сенсibiliзації клітин до цього виду пошкодження) в присутності аніонів: А – хаотропних (1 –  $\text{SCN}^-$  при 1200 мОсмоль/кг; 2 –  $\text{ClO}_4^-$  при 1500 мОсмоль/кг; 3 –  $\text{Br}^-$  при 2400 мОсмоль/кг; 4 –  $\text{Cl}^-$  при 1800 мОсмоль/кг) та рівень пошкодження за аналогічної осмоляльності розчинів без охолодження (5 –  $\text{SCN}^-$ ; 6 –  $\text{ClO}_4^-$ ; 7 –  $\text{Cl}^-$ ; 8 –  $\text{Br}^-$ ); Б – космотропних (1 –  $\text{Ac}^-$  при 2400 мОсмоль/кг; 2 –  $\text{F}^-$  при 1300 мОсмоль/кг; 3 –  $\text{SO}_4^{2-}$  при 1900 мОсмоль/кг) та рівень пошкодження за аналогічної осмоляльності розчинів без охолодження (4 –  $\text{Ac}^-$ ; 5 –  $\text{F}^-$ ; 6 –  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з  $\text{Cl}^-$  (\*) та з показниками для інших осмоляльностей середовища з даним аніоном (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

аніонів коливання рівня лізису були більш тривалішими та мали меншу амплітуду. У присутності ХА спостерігається більш виражений перебіг усіх етапів ГК, а з 40-ї хвилини передінкубації починався гемоліз клітин (рис. 3.3.5, криві 1 та 2), який є наслідком солюбілізації ЛБ цими ХА [102, 135].

Вважається, що високий рівень пошкодження клітин у процесі ГК в перші 10 хвилин передінкубації у гіпертонічному середовищі надкритичної концентрації за температури 37 °С відображає латеральний перерозподіл компонентів мембрани (першій етап ГК). Подальше падіння рівня пошкодження еритроцитів пов'язують із перерозподілом катіонів  $K^+$  та  $Na^+$  через мембрану (другий етап ГК) [55]. Отримані нами експериментальні дані демонструють, що на обох етапах ЛА модифікували описані явища, отже, можна внести уточнення у відомі закономірності ГК.

Так, у присутності ХА процеси перебудови мембранних компонентів та перерозподіл катіонів відбувалися активніше, за таких умов пік пошкодження на першому етапі приходився на більш ранній час (5 хв). Це підтверджує дестабілізацію ХА структури ЛБ, яка більш інтенсивно перебудовується в їх присутності. З іншої точки зору, спостерігалось значне полегшення адаптації клітин, які за 40–60 хв попередньої інкубації набували значно більшої стійкості. Для  $SCN^-$  пошкодження становило лише 15 %, а для  $ClO_4^-$  – 20 % ( $p < 0,05$ ).

Відомо, що зниження рівня ГК на другому етапі відбувається тільки в іонних середовищах і пояснюється збільшенням проникності мембрани для іонів, які знімають з неї критичне навантаження [54, 55]. За таких умов швидке досягнення стійкого стану під впливом ХА є наслідком полегшеного проникнення катіонів через мембрану внаслідок підвищеної рухливості мембранних компонентів.

Відомо, що сильні ХА утруднюють обмін  $Cl^-/OH^-$ . Послаблення виходу  $Cl^-$  та входу  $OH^-$  сприяє протонуванню внутрішньоклітинних білків (завдяки концентруванню внутрішньоклітинного вмісту). Ефект протонування приводить до розслаблення цитоскелета й зберігання пластичності

мембранних структур та може підвищувати стійкість клітин аж до початку сольобілізації ЛБ. Для перевірки впливу ЛА на стан білків цитоскелета вимірювали рівень ГК за різних значень рН середовищ із ліотропними аніонами.

На рис. 3.3.6 наведено дані досліджень, які характеризують вплив рН середовищ критичних осмоляльностей на ГК еритроцитів. Можна бачити, що незалежно від складу середовища тенденція зниження ГК із підкисленням середовища зберігається. Тільки для  $\text{ClO}_4^-$  рівень пошкодження не знижувався при рН 5,4, залишаючись на рівні рН 6,4.

Таким чином, клітини в присутності сильного ХА втрачали стійкість за низького значення показника рН, що може бути наслідком пригнічення цими аніонами  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$ -обміну або хаотропного ефекту зниження рН поверхонь. Екранування заряджених груп спектрину (основного цитоскелетного білка еритроцитів) протонуванням розслаблює цитоскелет, що у поєднанні із дестабілізацією ЛБ збільшує рівень ГК.

Непроникальна крізь ПМ сахароза, яка не спричиняє впливу на цитоскелетні білки та аніонтранспортний білок АЕ1, не викликала ефекту дестабілізації клітинних мембран та в її присутності клітини максимально зберігалися при значенні рН 5,4.

З метою перевірки впливу ЛА на потоки аніонів через мембрану еритроцитів були проведені досліді із класичним блокатором аніонного транспорту – 4,4'-диізоціаностильбен-2,2'-дисульфонову кислоту (ДІДС), який є алостеричним конкурентним інгібітором аніонообмінного транспортера (АЕ1) (рис. 3.3.7).

З рис. 3.3.7 видно, що в умовах 10-хвилинної інкубації та у присутності ХА вплив блокатора має тенденцію знижувати пошкодження при ГК на 7 %, а за умов 60-хвилинної інкубації рівень гемолізу в середовищі з  $\text{ClO}_4^-$  сягає 100 %. У той самий час як, в середовищі з  $\text{Cl}^-$  рівень ГК при блокуванні

транспорту аніонів підвищується на 12 % незалежно від часу, а в присутності  $Ac^-$  – на 6 % та 15 % після 10- та 60-хвилинної передінкубації відповідно.

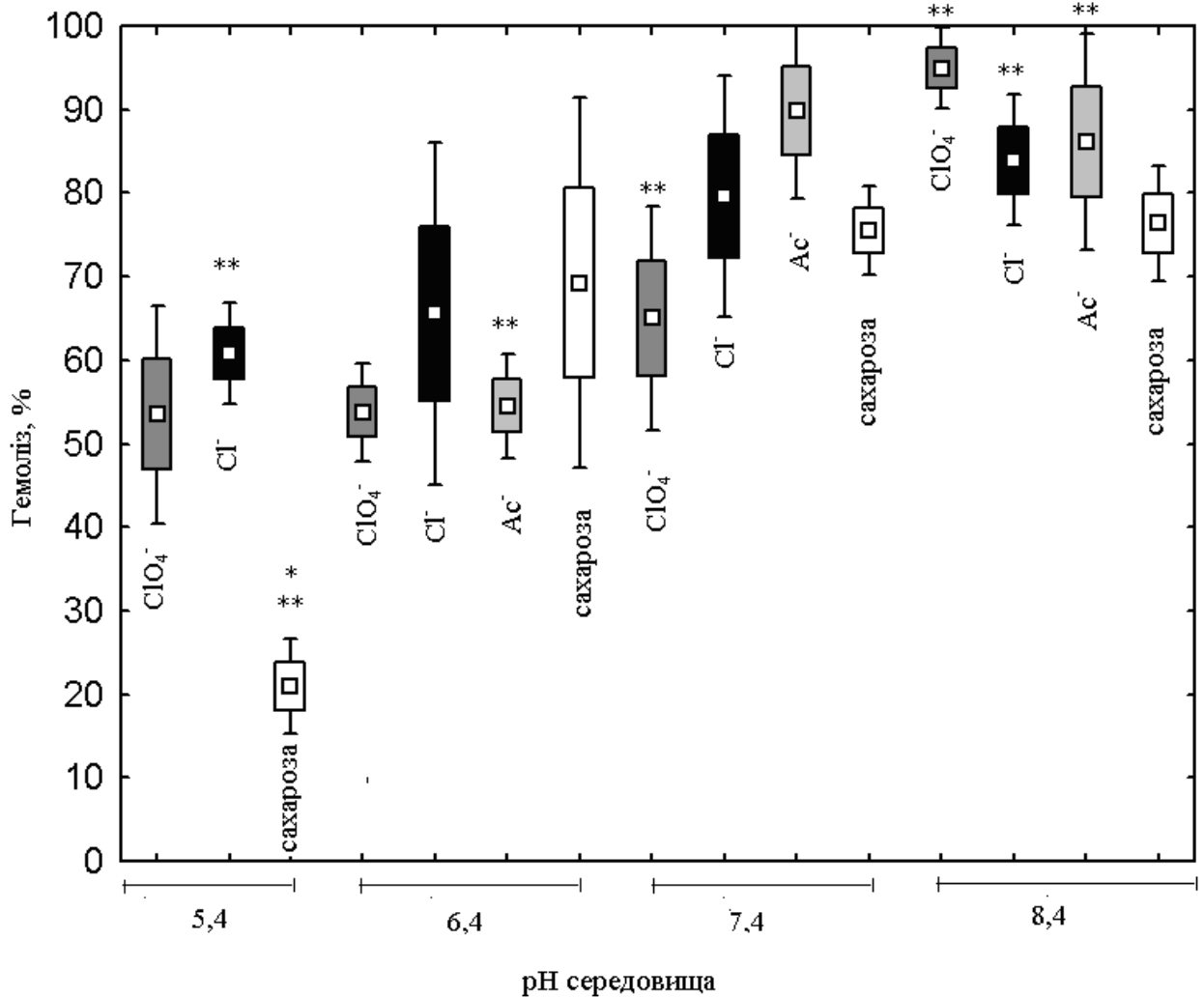


Рис. 3.3.6. Залежність рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів від показнику рН у середовищах з різними аніонами:  $ClO_4^-$  за осмоляльності 2000 мОсмоль/кг,  $Cl^-$  – 1800 мОсмоль/кг;  $Ac^-$  – 2400 мОсмоль/кг та сахарозою – 1000 мОсмоль/кг.

*Примітки:* блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ ; за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з  $Cl^-$  та сахарозою при рН 5,4 (\*) та між помітками «\*\*» для середовищ однакового складу (\*\*);  $p \leq 0,05$ .



ДІДС пригнічує зниження трансмембранного градієнта та відповідає за стабілізацію об'єму еритроцитів, оскільки значне зниження набухання дозволяє еритроцитам із пошкодженою мембраною активувати відносно повільний (метаболічний) механізм клітинної стабілізації об'єму та/чи репарації пошкоджених мембран [54].

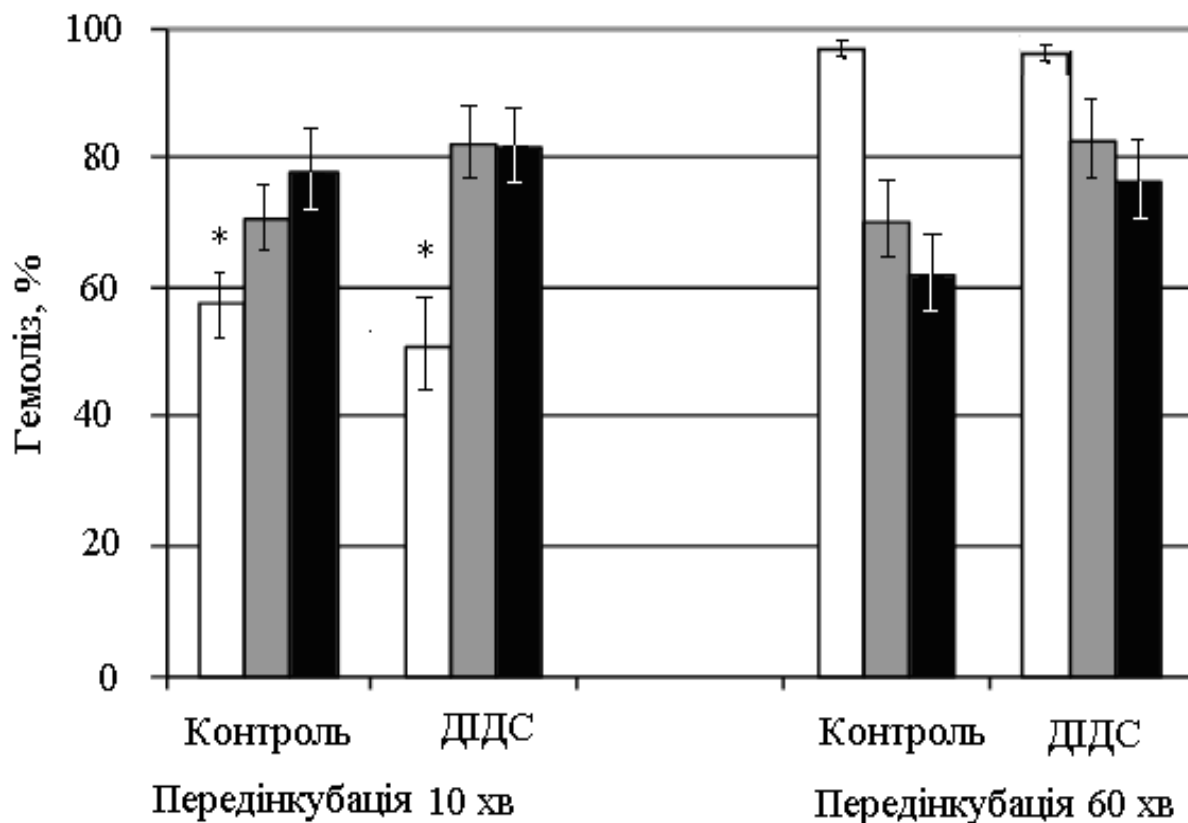


Рис. 3.3.7. Вплив різної тривалості передінкубації з ДІДС ( $1,6 \times 10^{-5}$  моль/л) за температури  $37^\circ\text{C}$  з аніонами  $\text{ClO}_4^-$  (□),  $\text{Cl}^-$  (■) та  $\text{Ac}^-$  (■) на рівень гіпертонічного криогемолізу еритроцитів.

*Примітки:* планки  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ; за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з 60-хвилинною передінкубацією (\*);  $p \leq 0,05$ .

Причиною сенсифікаційного впливу блокування аніонного транспорту в присутності  $\text{Ac}^-$  може бути порушення балансу перерозподілу іонів, оскільки ацетат легко проникає крізь мембрану всередину еритроцита (в недисоційованій формі), а заблокований ДІДС канал аніон-транспортного

білка не дозволяє внутрішньоклітинним іонам вийти з клітини, для збереження балансу. Посилення стабільності клітин у присутності ДІДС відбувалося лише у середовищах із ХА. Знижений рівень гемолізу в середовищі з  $\text{ClO}_4^-$ , можливо, свідчить про здатність ДІДС стабілізувати мембрану [170]. Отже, можна зробити висновок, що транспортні процеси крізь плазматичну мембрану також чутливі до впливу ліотропних аніонів, але меншою мірою, ніж трансформація структурних параметрів мембранних компонентів.

Осмоляльність середовища, насамперед, впливає на водний баланс клітини, на структуру та функції її компонентів, у тому числі на молекулярному рівні, а ЛА доповнюють ці зміни власними специфічними впливами, які проявляються у критичних умовах як за ГЛ, так і за ГК. Найбільший рівень ГК спостерігається після інкубації еритроцитів у гіпертонічних середовищах при тих самих значеннях осмоляльності, в межах яких клітини сенсibiliзуються до ГЛ.

Вплив аніонів на ГК реалізується через зміну властивостей мембранних компонентів еритроцита, а шляхи впливу хао- та космотропних аніонів є різними. Хаотропні аніони взаємодіють безпосередньо з ЛБ, прискорюючи реалізацію перебудови, та з часом приводять до його сольобілізації.

Ліотропні аніони, які займають крайнє положення в ряду, знижують адаптивні здатності клітин при ГК, але мають різну природу – (як і при ГЛ). Дефекти виникали за менших осмоляльностей середовищ у міру віддалення від майже «ліотропно-нейтрального» СГ. Найбільший захисний вплив спричиняв слабкосмотропний  $\text{As}^-$ , особливо в поєднанні з попереднім охолодженням.

Поєднання у середовищі ЛА з різними характеристиками є засобом налаштування стану клітини на конкретні екстремальні умови, що відкриває перспективи у розробці захисних агентів. Тому, механізми впливу ЛА потребують подальших досліджень.

**Висновки.** Результати дослідження вказують на залежність гіпертонічного криогемолізу еритроцитів від виду ліотропного аніона у середовищі. Зміни рівня пошкодження корелюють з даними, щодо ступеня гідратації клітин, який підтверджує висновок про вплив рівня гідратації клітин на чутливість до пошкодження у гіпертонічних умовах, які моделюють чинники криопошкодження при заморожуванні.

Залежність рівня пошкодження від положення аніона в ліотропному ряді була нелінійною, як й при гіпертонічному лізисі у розчині 4 М NaCl. У присутності слабкосмотропного  $As^-$  також спостерігався зсув піку пошкодження клітин до підвищених осмоляльностей (3000 мОсмоль/кг), що значно перевищує дану характеристику для інших аніонів. Осмоляльність середовища, за якої еритроцити мали максимальний рівень гіпертонічного криогемолізу, для сильних ХА ( $SCN^-$ ,  $ClO_4^-$ ) та КА ( $F^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ) була менша – 1200–1500 мОсмоль/кг, а для слабких ліотропних ( $Br^-$ ,  $As^-$ ) більша – 2400 мОсмоль/кг.

Виражені фази адаптації на кривих розвитку гіпертонічного криогемолізу в часі вдалося отримати тільки при такій осмоляльності середовища, яка відповідала максимальній сенсibiliзації клітин до цього виду пошкодження для кожного з аніонів. Даний факт підтверджує залежність перебігу процесів від ступеня гідратації клітин. Антигемолітична ефективність для  $Br^-$  і  $As^-$  з 20-ї хвилини передінкубації ( $(46,0 \pm 3,5) \%$  і  $(55,9 \pm 11,2) \%$  відповідно, відносно  $(83,6 \pm 8,1) \%$  для  $Cl^-$ ) до 120-ї хвилини ( $(26,5 \pm 3,2) \%$  і  $(36,0 \pm 8,0) \%$  відповідно, відносно  $(55,7 \pm 7,8) \%$  для  $Cl^-$ )

Виявлено взаємозв'язок між перебігом гіпертонічного лізису та гіпертонічного криогемолізу, який полягає у сенсibiliзації еритроцитів до обох видів стресу після попередньої інкубації у середовищах однакової осмоляльності. Ця критична осмоляльність «дзвоникоподібно» змінювалася відповідно до розташування аніонів у ліотропному ряді. Саме у цій критичній

осмоляльності середовища найбільш точно проявлялися усі фази розгортання гіпертонічного криогемолізу в часі, які обумовлені ступенем гідратації клітин.

За допомогою ліотропних аніонів можливо керувати рівнем гідратації мембранних компонентів клітин та підвищити ефективність криоконсервування за рахунок покращення адаптації еритроцитів до охолодження у гіпертонічних умовах. Подальші дослідження за таким напрямом є перспективними.

За результатами підрозділу 3.3 опубліковано роботи: [149, 150, 171-174]

### **3.4. Адаптація еритроцитів до постгіпертонічного лізису під впливом аніонів ліотропного ряду**

Відомо, що еритроцити значно пошкоджуються під час процедури розморожування. У зв'язку з цим важливо з'ясувати, як відображаються ліотропні характеристики аніонів на цьому етапі з метою визначення їх ключових мішеней у клітині і спрямованості впливу на них для забезпечення оптимальних параметрів підвищення збереженості клітин.

Причиною пошкодження клітин під час розморожування є різкий зсув осмоляльності середовища в бік зниження через звільнення осмотично активної води з кристалів льоду. Вхід води в клітини відбувається відповідно до законів осмосу: через напівпроникну мембрану в бік більшої концентрації речовин, яка при розморожуванні знаходиться всередині еритроцита. Таке явище призводить до надмірного збільшення об'єму клітин аж до розриву плазматичної мембрани [58, 170].

Встановлено, що рівень пошкодження в умовах різкого зниження тонічності середовища – постгіпертонічного лізису (ПГЛ) - відповідає руйнуванню еритроцитів при розморожуванні. Тому моделювання кріоушкодження за допомогою ПГЛ дає можливість детально вивчити механізми руйнування еритроцитів на цьому етапі [5, 170].

Постгіпертонічний лізис еритроцитів здійснюється у два етапи: дегідратація у гіпертонічному середовищі та подальша регідратація в ізотонічних умовах (у нашому випадку 300 мОсмоль/кг NaCl) [69]. Оскільки важливо розуміти ступінь дегідратації клітин під час їх перебування у гіпертонічних умовах, то для цього етапу було обрано осмоляльність середовища, за якої вимірювали кількість зв'язаної води методом НВЧ-діелектрометрії (2000 мОсмоль/кг).

Відомо, що в основі даного виду пошкодження лежать механізми, що принципово відрізняються від пошкодження клітин під час гіпертонічних

видів лізису (ГК і ГЛ), які розглядалися вище. Основними факторами, що впливають на рівень ПГЛ еритроцитів є, з одного боку, зміна їх об'єму, з іншого, – пружно-еластичні властивості їхніх мембран.

Як видно з вищенаведених даних на обидва вказаних параметри ефективно впливають аніони ЛР. Об'єм клітин змінюється відповідно до «всолуючого/висолуючого» ефекту хао- або космотропних аніонів на білки та їх колоїдний стан у цитоплазмі клітин (див. рис. 3.1.7). Структура мембрани, крім властивостей білків цитоскелета, які проявляються у морфологічних особливостях клітин (див. рис. 3.1.8), також сильно залежить від впливу ЛА на плинність шару ліпідів і, відповідно, їх здатність «заліковувати» дефекти, які утворилися, поки вони не перетворилися на гемолітичні пори [175].

З урахуванням вищевикладеного було висунуто припущення, що ЛА можуть чинити істотний вплив на цей вид лізису. Космотропні аніони, з одного боку, знижують плинність ЛБ, що може привести до фіксації дефектів і підвищення рівня ПГЛ. З іншого боку, наслідком впливу цього виду аніонів на колоїдний стан внутрішньоклітинних білків є ефективне зменшення об'єму клітин (див. рис. 3.1.7, Б, крива 7 ( $\square\square$ )) і посилення зв'язків між білками цитоскелету, що віддзеркалюється у морфології еритроцитів (див. рис. 3.1.8, В,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Обидва останні фактори можуть призвести до зниження рівня пошкодження під час ПГЛ.

Хаотропні аніони, в силу своєї гідрофобності і здатності накопичуватися на кордоні з ЛБ різним ступенем порушують впорядкованість ліпідних шарів, затримують злиття пор та подовжують ендцитоз [112, 122, 175]. У такому випадку, не можна очікувати прискорення «заліковування» гемолітичних пор ХА, а, отже, зниження рівня пошкодження клітин від ПГЛ. «Всолуючий» ефект ХА щодо білків, найбільш ймовірно, є причиною їх специфічного впливу на об'єм клітин [58, 96]. Для сильних ХА в інтервалі осмоляльності 600–1200 мОсмоль/кг цей показник

залишався практично постійним і найвищим – на рівні 9,9–9,5 % гематокриту в середовищі з  $\text{ClO}_4^-$  (відповідно), що значно більше відносно такого показника в присутності слабохаотропного  $\text{Br}^-$  – 7,5 % гематокриту за умов осмоляльності середовища 900 мОсмоль/кг.

В області 1500 мОсмоль/кг об'єм клітин інкубованих із  $\text{ClO}_4^-$  уже значуще не відрізнявся від показників для  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ac}^-$  та  $\text{F}^-$  (див. рис. 3.1.7, криві 3, 4, 5 та 6). Зрозуміло, що збільшення об'єму не сприяє збереженню еритроцитів під час ПГЛ, проте не ясно який з етапів його зміни надасть вирішальний вплив на етапі регідратації.

Стан цитоскелета також буде залежати від присутності ХА, які послаблюють зв'язки між білками і погіршують його пружно-еластичні характеристики. Цей параметр не може сприяти стійкості клітин до збільшення об'єму.

Питання про те, яка з зазначених мішеней ліотропного ефекту аніонів надасть вирішальний вплив на рівень пошкодження еритроцитів під час ПГЛ, вимагає експериментального вивчення. Результати проведених досліджень показали, що аніони ЛР істотно впливають на цей вид пошкодження (рис. 3.4.1 і 3.4.2).

На рис. 3.4.1 наведено дані щодо рівня ПГЛ еритроцитів під час регідратації в умовах фізіологічних температур (37 °С). Зазвичай, руйнування клітин у такому температурному режимі не спостерігається через підвищену плинність ЛБ, що дозволяє своєчасно репарувати дефекти та виключити можливість їх трансформації у гемолітичні пори [68-70].

Добре видно, що виключенням виявилися еритроцити, що проходили етап дегідратації у присутності сильних ХА перхлорату (рис. 3.4.1, варіант 1). Під впливом цих аніонів клітини демонстрували пошкодження високого рівня –  $(70,1 \pm 8,0)$  % гемолізу.

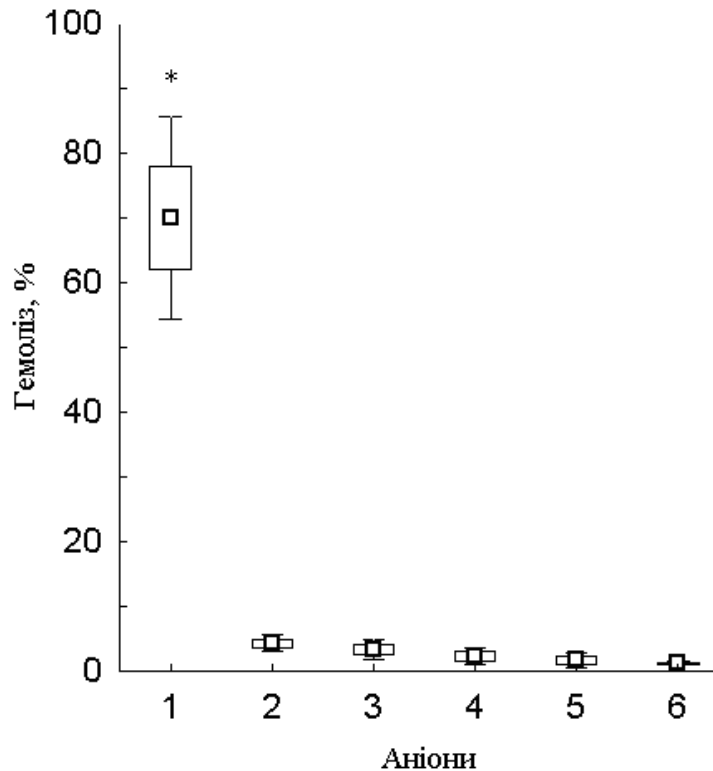


Рис. 3.4.1. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини в ізотонічному розчині NaCl (10 хв) від виду аніона в середовищі передінкубації (1 – ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 2 – Br<sup>-</sup>; 3 – Cl<sup>-</sup>; 4 – Ac<sup>-</sup>; 5 – F<sup>-</sup>; 6 – SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) з осмоляльністю 2000 мОсмоль/кг (10 хв) при температурному режимі 37–37 °С.

*Примітки:* блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> (\*);  $p \leq 0,05$ .

Оскільки клітини знаходилися у концентрованому середовищі з цим сильним ХА лише 10 хв, то рівень пошкодження дорівнював 20 % (див. рис. 3.3.3, Б, крива б). Отже, більшою мірою пошкодження клітин залежить від перебігу процесів на етапі регідратації.

Пошкодження клітин при ПГЛі під впливом ХА є наслідком їх впливу на колоїдний стан та конформацію білків, їх зв'язки між собою, з ЛБ та його руйнуванням, що підтверджується дослідженнями на інших об'єктах [176].



Також важливу роль грає можливе збільшення тривалості заліковування пор у мембрані через набрякання ЛБ [175].

За гіпотезою К. Muldrew [58] руйнування еритроцитів під час ПГЛ може бути наслідком критичного збільшення об'єму клітин на етапі регідратації через додатковий вхід зовнішньоклітинних іонів під час дегідратації (завдяки заміщенню тих іонів, що пов'язалися із «всоленими» білками). Іншим наслідком «всолуючої» дії є послаблення зв'язків між білками цитоскелета, яке не сприяє еластичності мембрани та стійкості еритроцитів до збільшення об'єму.

На рис. 3.4.2 видно лінійну залежність рівня ПГЛ еритроцитів від ліотропних властивостей аніонів згідно з їхнім розташуванням у ЛР. Пошкодження поступово зменшувалося від ХА перхлорату та броміду до КА фториду та сульфату. «Ліотропно-нейтральний»  $\text{Cl}^-$  та слабкосмотропний  $\text{Ac}^-$  спричиняли середній рівень пошкодження. Середовище із сильним космотропним аніоном  $\text{F}^-$  мало осмоляльність 1500 мОсмоль/кг через те, що його натрієва сіль має обмежену розчинність. Інакше можна б було очікувати більшого рівню пошкодження, що краще вписується у лінійну закономірність.

Максимальне збільшення рівня ПГЛ еритроцитів (між температурними режимами 37–37 та 37–0 °С) було зафіксовано для середовищ із слабохаотропним  $\text{Br}^-$ . Отже, за умов регідратації за температури 0 °С, яка обмежує здатність ЛБ репарувати дефекти мембрани та фіксує стан зв'язків між білками [68-70], проявляється результат впливу  $\text{Br}^-$  на білки цитоскелету, який «всолує», що ослаблює його пружно-еластичні властивості через зменшення сили міжбілкових взаємодій у цитоскелеті. Таке явище демонструє наскільки чутливі ключові білкові мішені до впливу навіть слабких ХА в умовах обмеження репарувальних можливостей ЛБ.

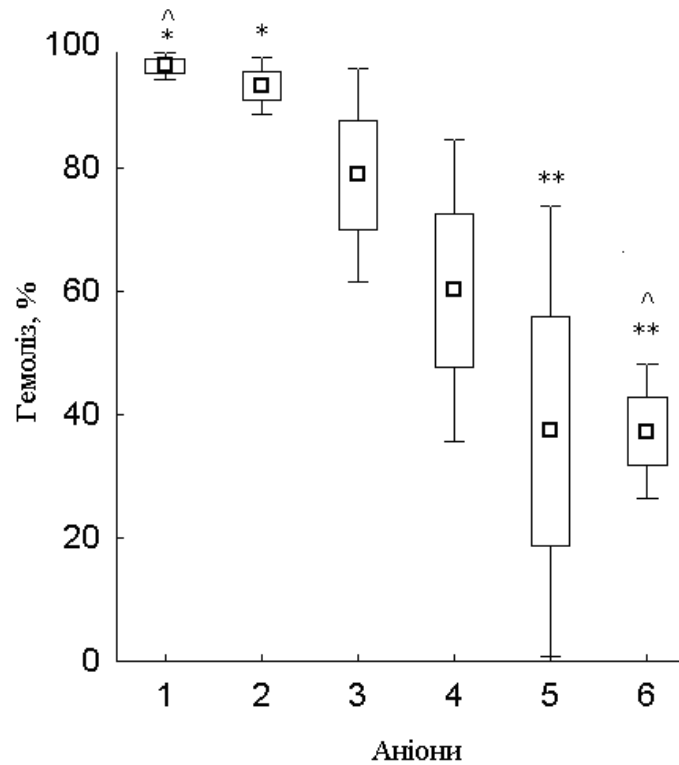


Рис. 3.4.2. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини в ізотонічному розчині NaCl (10 хв) від виду аніона в середовищі передінкубації (1 –  $\text{ClO}_4^-$ ; 2 –  $\text{Br}^-$ ; 3 –  $\text{Cl}^-$ ; 4 –  $\text{Ac}^-$ ; 5 –  $\text{F}^-$  (1500 мОсмоль/кг); 6 –  $\text{SO}_4^{2-}$ ) з осмоляльністю 2000 мОсмоль/кг (10 хв) при температурному режимі 37–0 °С.

*Примітки:* блоки  $M \pm m$ , планки  $M \pm \mu$ ,  $n = 6$ , за 100 % прийнято гемоліз дослідних проб детергентом Тритон Х-100; відмінності значущі порівняно з  $\text{Cl}^-$  (^), космотропними аніонами  $\text{F}^-$  і  $\text{SO}_4^{2-}$  (\*) та з хаотропним  $\text{ClO}_4^-$  (\*\*);  $p \leq 0,05$ .

Отже, на відміну від ГК та ГЛ, для яких залежність рівня пошкодження від розташування аніонів у ЛР була «дзвоникоподібною» та корелювала із ступенем гідратованості клітин, під час ПГЛ (за умов присутності ЛА у середовищі дегідратації) кількість зв'язаної води та стан вільної води в еритроцитах не має вирішального впливу. Такий висновок ґрунтується на відсутності кореляції рівня пошкодження клітин під час ПГЛ із рівнем декременту діелектричної проникності суспензій еритроцитів (див. рис. 3.2.1)

та різниці частот діелектричної релаксації молекул води між середовищами, у які не містили або містили еритроцити (див. рис. 3.2.2) відповідно.

Однак, за даними інших дослідників, у випадку присутності ЛА у середовищі регідратації рівень ПГЛ мав «дзвоникоподібну» залежність від зміни властивостей аніонів у ЛР. Під впливом слабокосмотропного ацетату знижувався максимально – на рівні 50 % [170]. Отже, за умов наявності ЛА, який «уповільнює» воду, можна припустити обмеження швидкості надходження води до клітин. Таке явище сприяє можливості еритроцитів адаптуватися до змін тоничності середовища (наприклад, максимально звільнитися від надмірної кількості іонів у клітині, що обмежить вхід води, збільшення об'єму та навантаження на мембрану).

Пояснити лінійну залежність рівня ПГЛ від розташування аніонів у ЛР за умов наявності ЛА у середовищі дегідратації можна їхнім впливом на стан внутрішньоклітинних білків, оскільки мембрана за таких умов (при концентрації середовища вищій за 0,8 М NaCl) набуває проникності для іонів. Зв'язки між білками в цитоплазмі клітини та цитоскелетними білками посилюються відповідно до зростання космотропних властивостей ЛА в середовищі. Це приводить до зменшення об'єму клітин та посилення пружності їх мембрани. Особливо сильно проявляються такі ефекти у присутності найсильнішого КА – сульфату. Ефективне зниження об'єму еритроцитів під час регідратації можна бачити на лівому крилі кривої для аніонів сульфату на рис. 3.1.7, а підйом її правого крила обумовлений характерними змінами у морфології (див. рис. 3.1.8), які є наслідком посилення жорсткості цитоскелету в силу «всолювання» його білків та скоріше за все пов'язано із переходом цитоплазматичних білків у стан гелю [77].

Майже повне руйнування еритроцитів після дегідратації у присутності  $\text{ClO}_4^-$  свідчить, що підвищення ними так званої «структурної температури» не захищало від руйнування за умов охолодження до 0 °C на етапі регідратації.

Таке явище свідчить про сенсibiliзуючий вплив більш значних факторів, які є наслідками втрати клітиною інтегративної цілісності між такими компонентами як цитоплазма, цитоскелет та ЛБ під впливом сильних ХА.

Таким чином, під час ПГЛ з дегідратацією в присутності ЛА, адаптація еритроцитів обумовлена не ступенем гідратації клітин, а підвищенням КА міцності зв'язків між білками та їх з ЛБ, що надає посилення пружно-еластичних властивостей цитоскелету, зменшує об'єм клітин (через перехід цитоплазми у стан гелю, який може відновляти свій об'єм) та не викликає додаткового надходження до них зовнішньоклітинних іонів за механізмом, описаним у роботі [58].

**Висновки.** У результаті проведених досліджень та аналізу даних літератури можна зробити висновок, що ліотропні властивості значно впливають на пошкодження клітин під час моделювання факторів кріопошкодження при розморожуванні. Отже, такі властивості компонентів кріозахисних середовищ та кріопротекторів важливо враховувати.

Закономірності впливу аніонів ЛР на рівень пошкодження під час ПГЛ суттєво відрізняються від тих, що були отримані для лізису у гіпертонічних умовах. Вони мають лінійну залежність від розташування аніонів у ряді й визначаються в основному впливом ліотропних властивостей аніонів на зв'язки білків, від яких залежать як пружно-еластичні властивості мембрани, так і об'єм клітин. Зміна даних характеристик добре простежується в результатах, отриманих під час дослідження об'ємних і морфологічних характеристик еритроцитів в умовах експозиції у помірно гіпертонічних розчинах з ЛА. За характеристиками зниження об'єму і надбанням характерних форм еритроцитами можна визначати ступінь космотропності кріозахисних агентів для практичного використання.

Таким чином, знаючи закономірності впливу ЛА можна цілеспрямовано регулювати параметри відповідальних за пошкодження

клітин елементів: осмотичну активність цитоплазми і пружно-еластичні властивості цитоскелету на підставі зміни взаємодії з водою їх білків. А саме, за допомогою максимальних космотропних властивостей ЛА посилювати їх «висолювання». Такий шлях збільшувати міцність міжбілкових зв'язків та цитоскелету, знижує об'єм еритроцитів за рахунок переходу цитоплазми у стан стабільного гелю та відсутності додаткового входу в клітину зовнішніх іонів.

Все вказане є наслідком специфічних змін ліотропними аніонами властивостей води всередині клітини. Отже через аніони або інші речовини із ліотропними характеристиками можна модифікувати властивості води у цитоплазмі, що досі не мало ефективних важелів управління.

За результатами підрозділу 3.4 опубліковано роботу: [167]

## УЗГАЛЬНЕННЯ

В результаті проведеної експериментальної роботи було встановлено, що на температурно-осмотичну поведінку клітин хаотропні та космотропні аніони впливають по різному.

За умов моделювання факторів заморожування, а саме – при підвищеній осмоляльності середовища (гіпертонічному лізисі та гіпертонічному криогемолізі) можна виділити сильні хаотропні ( $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ) та космотропні ( $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), ліотропно-нейтральний ( $\text{Cl}^-$ ), а також слабкі хаотропний ( $\text{Br}^-$ ) та космотропний ( $\text{Ac}^-$ ) аніони. Присутність сильних ліотропних аніонів призводить до підвищення чутливості клітин, а слабкі її знижують. Особливо виражений захисний ефект мають слабкосмотропні аніони  $\text{Ac}^-$  в умовах гіпотермії при рН 7,4.

Було встановлено, що значення осмоляльності середовища, яка максимально сенсibiliзує еритроцити до гіпертонічного лізису в 4 М розчині  $\text{NaCl}$  та гіпертонічного криогемолізу подібні для кожного з аніонів: для  $\text{SCN}^-$  це 1200, для  $\text{ClO}_4^-$  – 1500, для  $\text{Br}^-$  – 2400, для  $\text{Cl}^-$  – 1800, для  $\text{Ac}^-$  – 2400, для  $\text{F}^-$  – 1300 та для  $\text{SO}_4^{2-}$  – 1200 мОсмоль/кг. Оскільки ЛА розташовані у ЛР відповідно до свого впливу на воду та експериментально показаний їх вплив на гідратацію клітин у гіпертонічних умовах, то саме зміни у гідратації компонентів еритроцитів можуть бути причиною такої залежності рівня їх пошкодження від осмотичних умов.

Показано, що вплив гіпотермічних умов в усіх варіантах досліджень значно менш відчувався клітинами у присутності сильних хаотропних аніонів. Це пояснюється підвищенням рухливості молекул середовища («структурної температури») в їх присутності. З посиленням космотропних властивостей аніонів значно збільшується вплив охолодження завдяки чому

зменшується рівень пошкодження при сенсibiliзації клітин до гіпертонічних лізису та кріогемолізу, особливо за умов попереднього охолодження до 0 °С.

В результаті аналізу отриманих експериментальних даних та літератури можна стверджувати, що ліотропний вплив аніонів реалізується переважно через зміну стану ліпідних та білкових компонентів мембрани клітин безпосередньо, або через модифікацію їх взаємодій з водним оточенням. Він не пов'язаний з різною швидкістю транспорту аніонів через мембрану.

Відповідно своїй гідрофобній природі хаотропні аніони накопичуються на поверхні шару ліпідів та зменшують його впорядкованість, що може підвищувати плинність ліпідного бішару еритроцитів. Також вони мають властивість «всолювати» білки, що може призводити до розслаблення зв'язків цитоскелету та підвищення об'єму клітин. Такі ефекти, як правило, не сприяють інтегративній цілісності, збереженню функцій та адаптації еритроцитів під час кріопошкодження [45].

Однак, їх вплив можна використовувати за деяких умов [169]. Так, слабохаотропний  $\text{Br}^-$  виявляє антигемолітичний ефект як при гіпертонічному лізисі у середовищах з підвищеною осмоляльністю, так і при кріогемолізі за рахунок прискорення адаптації, можливо, за рахунок прискорення перебудови мембранних компонентів. Іншим шляхом послаблення хаотропного впливу є нейтралізація його введенням у середовище космотропних компонентів або зниженням температури [176].

Космотропні аніони впорядковують ліпідний бішар та «висолюють» білки перешкоджаючи їх переходу у стан золю з подальшою коагуляцією [21, 77]. В клітині це може призводити до зміцнення зв'язків внутрішньоклітинних білків між собою та з ліпідами бішару. Наслідком посилення колоїдної стабільності цитоплазми, а також такої структурної основи мембрани, як цитоскелет, є підвищення стабільності клітин. Під впливом сильних космотропних аніонів ( $\text{F}^-$  та  $\text{SO}_4^{2-}$ ) це видно за умов

постгіпертонічного лізису або гіпертонічного гемолізу в 4 М розчині NaCl після передінкубації в ізотонічних умовах за температури 0 °С.

Пошкодження еритроцитів при постгіпертонічному навантаженні зменшується від групи хаотропних ( $\text{ClO}_4^-$  та  $\text{Br}^-$ ) до найкосмотропніших аніонів ( $\text{F}^-$  та  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Такі результати відповідають практиці промислового використання ліотропних речовин у відношенні до прокаріотичних клітин [45].

Гіпертонічні умови призводять до пошкодження клітин під впливом космотропних аніонів через надмірну ламкість мембрани. Отже, поведінка еритроцитів під впливом цих аніонів принципово відрізняється при підвищенні та зниженні тонічності середовища.

Методом діелектрометрії встановлено, що слабкосмотропний  $\text{As}^-$  єдиний демонструє захисний ефект, як в умовах гіпертонічного, так й постгіпертонічного навантаження завдяки наявності у нього великої гідратної оболонки слабозв'язаної «повільної води». Вона слабо підпорядкована аніону та виконує роль «водяного буферу» для клітин, що запобігає структурному зневодненню мембранних компонентів в гіпертонічних умовах. Такі ефекти  $\text{As}^-$  можуть ґрунтуватися на особливостях його довгастої форми. Еліпсоїдні НЧ також виявили антигемолітичний ефект. Отже, такий підхід відкриває новий шлях до підбору кріозахисних агентів.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що ліотропні аніони є модифікаторами мембрани, перед усе, через трансформацію її водного оточення, що підтверджують останні дослідження інших науковців [177]. Підвищення чутливості йде через надмірне зневоднення клітин в присутності сильних хао- і космотропних аніонів, але різними шляхами: через накопичення аніонів на межі мембрана-вода або через конкуренцію з клітиною за воду, відповідно. Захисний ефект слаболіотропних аніонів реалізується через «відбудову» мембрани від впливу середовища, що ушкоджує, і також розділяється на два типи: слабохаотропний (при якому аніони «ізолюють» мембрану, накопичуючись на її поверхні) й



слабокосмотропний (коли біля неї створюється «водний буфер», який походить зі слабозв'язаної з аніонами води).

За допомогою встановлених закономірностей для слабких ЛА та сильних КА можна «налаштувати» стан клітин відповідно до того, які саме вимоги пред'являє середовище до їх компонентів. Вплив сильних ХА в усіх варіантах кріопшкодження еритроцитів не сприяв їх адаптації, що підтверджується даними літератури для інших об'єктів [45] та. Ці аніони мають властивість порушувати не ковалентні взаємодії біоструктур, що приводить до порушення цілісності клітин через дестабілізацію таких важливих для температурно-осмотичної адаптації компонентів, як білки та ЛБ [45, 46, 178], але розуміючи їх ефекти також можна вирішувати деякі задачі [169]. Показано, що дезадаптивний вплив ХА деякою мірою можна нейтралізувати додаванням у середовище КА.

Встановлено, що аніони з протилежних кінців ліотропного ряду впливають на адаптацію еритроцитів тією ж мірою, що й зміна рН у діапазоні 5,4–8,4. Отже, при складанні середовищ для зберігання клітин необхідно враховувати хаотропні та космотропні властивості компонентів кріозахисних середовищ та кріопротекторів та за потреби нейтралізувати або пом'якшувати їх ліотропний вплив в залежності від підвищення або зниження тонічності середовища [176]. Для оцінки хаотропності та космотропності речовин вже існує метод [179]. Також можна визначити вплив ЛА на стан води за допомогою використаних у даній роботі діелетрометричних параметрів.

Отже, використання ліотропних ефектів аніонів, речовин (в тому числі нативних або штучних білків [44], НЧ або високоефективних наноматеріалів, які реагують на подразники [146, 180], має перспективи, як інструмент корекції у клітині стану води, мембрани та цитоплазми, що важливо для досягнення внутрішньоклітинного склування, як основної мети кріозберігання [1, 139]. Тому дослідження у цьому напрямі важливо продовжувати.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне й експериментальне узагальнення та нове рішення наукового завдання, спрямованого на вивчення дії чинників кріопошкодження еритроцитів у процесі заморожування-розморожування, а також на розробку підходів, які дозволяють підвищити стійкість клітин до температурно-осмотичного зсуву в середовищі. Досліджено гіпертонічні лізис та кріогемоліз, а також постгіпертонічний лізис еритроцитів людини у середовищах із хаотропними ( $\text{SCN}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  та  $\text{Br}^-$ ) та космоотропними ( $\text{Ac}^-$ ,  $\text{F}^-$  та  $\text{SO}_4^{2-}$ ) аніонами.

1. Еритроцити набували стійкості у 4 М розчині NaCl за осмоляльності середовища передінкубації 600 мОсмоль/кг у присутності сильних ХА ( $\text{SCN}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) і КА ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) та за осмоляльності 900 мОсмоль/кг у присутності менш ліотропних аніонів ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ac}^-$  та  $\text{F}^-$ ). Встановлено, що у високих осмоляльностях середовища передінкубації за температури 0 °С максимальний захисний ефект мають аніони слабкоосмотропного  $\text{Ac}^-$  – (17,3 ± 9,6) % гемолізу (за 2400 мОсмоль/кг) та слабохаотропного  $\text{Br}^-$  – (21,7 ± 4,1) % за 1800 мОсмоль/кг). Охолодження та низький показник рН (5,4) не захищають клітини в середовищах із найбільш хаотропними аніонами.

2. Залежність осмоляльності середовища, у якому еритроцити мали максимальний рівень гіпертонічного кріогемолізу та виражені адаптивні фази, від положення аніона в ліотропному ряді є «дзвоникоподібною»: менша осмоляльність (1200–1500 мОсмоль/кг) характерна для сильних хао- ( $\text{SCN}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) і космоотропних ( $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) аніонів, більша (2400 мОсмоль/кг) – для слаболіотропних ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{Ac}^-$ ). Найефективніше зниження рівня пошкодження встановлено для  $\text{Br}^-$  і  $\text{Ac}^-$  з 20-ї хвилини передінкубації ((46,0 ± 3,5) % і (55,9 ± 11,2) % відповідно, відносно (83,6 ± 8,1) % для  $\text{Cl}^-$ ) до 120-ї хвилини ((26,5 ± 3,2) % і (36,0 ± 8,0) % відповідно, відносно (55,7 ± 7,8) % для  $\text{Cl}^-$ )).

3. Рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів залежить від розташування аніонів у ліотропному ряді та лінійно зменшується від хаотропних ( $(96,7 \pm 1,1) \%$  для  $\text{ClO}_4^-$ ) до космотропних аніонів ( $(37,3 \pm 5,6) \%$  для  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

4. Морфологічні характеристики еритроцитів залежить від виду аніона в середовищі та вказує на різні шляхи сенсibiliзації клітин до гіпертонічних умов. Сильні ХА трансформують клітини через збільшені стоматоцити на компактні ехіноцити з великою кількістю розвинених спікул, а сильні КА – через малі стоматоцити на дуже зневоднені планоцити без спікул.

5. У гіпертонічних умовах ( $2000 \text{ мОсмоль/кг}$ ) у середовищах із  $\text{As}^-$  клітини мають максимальний рівень гідратації (декремент діелектричної проникності  $10 \%$  суспензії дорівнює  $4,28 \pm 0,28$ ), а вільна вода у суспензії менш структурована, ніж у розчині (різниця частот діелектричної релаксації –  $(-0,32 \pm 0,03) \text{ ГГц}$ ). Такі характеристики можуть бути критерієм підбору ефективних кріопротекторів, що потребує подальших досліджень.

6. Форма наночастинок у середовищі впливає на адаптацію еритроцитів до лізису в  $4 \text{ М}$  розчині  $\text{NaCl}$ . Максимальний антигемолітичний ефект під час  $60$ -хвилинної передінкубації мали еліпсоїдні НЧ ( $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ,  $30 \times 8 \text{ нм}$ ,  $0,05 \text{ г/л}$ ) –  $(17,8 \pm 4,6) \%$  відносно контролю ( $(38,0 \pm 4,0) \%$ ). Вплив формфактора наночастинок потребує подальшого дослідження з метою пошуку ефективних шляхів підвищення кріоадаптації клітин і вивчення її механізмів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Marco-Jimenez F, Akdemir H, editors. Cryopreservation in eukaryotes. Rijeka, Croatia: InTech; 2016. 228 p. DOI: 10.5772/62605
2. Chang AL, Hoehn RS, Jernigan P, Cox D, Schreiber M, Pritts TA. Previous cryopreservation alters the natural history of the red blood cell storage lesion. *Shock* 2016;46(3 Suppl 1):89-95. DOI: 10.1097/shk.0000000000000668
3. Zhu W, Guo J, Agola JO, Croissant JG, Wang Z, Shang J, et al. Metal-organic framework nanoparticle-assisted cryopreservation of red blood cells. *J Am Chem Soc* 2019;141(19):7789-96. DOI: 10.1021/jacs.9b00992
4. Chang A, Kim Y, Hoehn R, Jernigan P, Pritts T. Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. *Blood Transfus* 2017;15(4):341-7. DOI: 10.2450/2016.0083-16
5. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953;10(3):414-26. DOI: 10.1016/0006-3002(53)90273-X
6. Daw A, Farrant J, Morris GJ. Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing. *Cryobiology* 1973;10(2):126-33. DOI: 10.1016/0011-2240(73)90018-7
7. Farrant J, Woolgar AE. Possible relationships between the physical properties of solutions and cell damage during freezing. In book: Ciba Foundation Symposium - The Frozen Cell. Churchill, London: 1970;97-129. DOI: 10.1002/9780470719732.ch7
8. Farrant J, Woolgar AE. Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage. I. Sodium chloride. *Cryobiology* 1972;9(1):9-15. DOI: 10.1016/0011-2240(72)90003-x
9. Bortner CD, Cidlowski JA. Ions, the movement of water and the apoptotic volume decrease. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:611211. DOI: 10.3389/fcell.2020.611211

10. Anderson DM, Benson JD, Kearsley AJ. Numerical solution of inward solidification of a dilute ternary solution towards a semi-permeable spherical cell. *Math. Biosci.* 2019;316:108240. DOI: 10.1016/j.mbs.2019.108240
11. Collins KD. The behavior of ions in water is controlled by their water affinity. *Q Rev Biophys* 2019;52:e11. DOI: 10.1017/S0033583519000106
12. Aroti A, Leontidis E, Dubois M, Zemb T, Brezesinski G. Monolayers, bilayers and micelles of zwitterionic lipids as model systems for the study of specific anion effects. *Colloids Surf A* 2007;303(1–2):144-58. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.03.011
13. Sanderson PW, Lis LJ, Quinn PJ, Williams WP. The Hofmeister effect in relation to membrane lipid phase stability. *Biochim Biophys Acta* 1991;1067(1):43-50. DOI: 10.1016/0005-2736(91)90024-3
14. Zhou HX, Pang X. Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. *Chem rev* 2018;118(4):1691-741. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00305
15. Zhang J, Zhang B, Chen Q, Zhang B, Song J. Hofmeister anion-induced tunable rheology of self-healing supramolecular hydrogels. *Nanoscale Res Lett* 2019;14(1):5. DOI: 10.1186/s11671-018-2823-8
16. Dahal YR, Schmit JD. Ion specificity and nonmonotonic protein solubility from salt entropy. *Biophys J* 2018;114(1):76-87. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.10.040
17. Okur HI, Hladílková J, Rembert KB, Cho Y, Heyda J, Dzubiella J., et al. Beyond the Hofmeister series: ion-specific effects on proteins and their biological functions. *J Phys Chem B* 2017;121(9):1997-2014. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10797
18. Lee E, Choi JH, Cho M. The effect of Hofmeister anions on water structure at protein surfaces. *Phys Chem Chem Phys* 2017;19(30):20008-15. DOI: 10.1039/C7CP02826A
19. Zhao H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. *J Chem Technol Biotechnol* 2016;91(1):25-50. DOI: 10.1002/jctb.4837

20. Aoki K, Shiraki K, Hattori T. Salt effects on the picosecond dynamics of lysozyme hydration water investigated by terahertz time-domain spectroscopy and an insight into the Hofmeister series for protein stability and solubility. *Phys Chem Chem Phys* 2016;18(22):15060-9. DOI: 10.1039/C5CP06324H

21. Lin J, Huang Y, Wang S. The Hofmeister effect on protein hydrogels with stranded and particulate microstructures. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020;196:111332. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111332

22. Бондаренко ТП. Роль липидов в повреждении мембраны митохондрий и эритроцитов при охлаждении [диссертация]. Харьков: ИПКиК АН Укр.; 1981. 151 с.

23. Поздняков ВВ. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку [диссертация]. Харьков: ИПКиК АН Укр.; 1989. 126 с.

24. Usoltsev D, Sitnikova V, Kajava A, Uspenskaya M. FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin and Trypsin under Neutral Salts. *Biomolecules* 2020;10(4).

25. Stefanic M, Ward K, Tawfik H, Seemann R, Baulin V, Guo Y, et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials* 2017;140:138-49. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.018

26. Lovelock JE. Physical instability and thermal shock in red cells. *Nature* 1954;173(4406):659-61. DOI: 10.1038/173659a0

27. Pegg DE, Diaper MP. The effect of initial tonicity on freeze/thaw injury to human red cells suspended in solutions of sodium chloride. *Cryobiology* 1991;28(1):18-35. DOI: 10.1016/0011-2240(91)90004-8

28. Pegg DE. Principles of Cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN, editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 368. Humana Press; 2007. p. 39-57. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_3

29. Pegg DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation

of tissues and organs. *Cryobiology* 2010;60(3,Suppl):S36-44. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2010.02.003

30. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1977;14(3):287-302. DOI: 10.1016/0011-2240(77)90177-8

31. Woolgar AE. Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements. *Cryobiology* 1974;11(1):44-51. DOI: 10.1016/0011-2240(74)90037-6

32. Woolgar AE, Morris GJ. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human red blood cells. *Cryobiology* 1973;10(1):82-6. DOI: 10.1016/0011-2240(73)90011-4

33. Farrant J, Woolgar AE. Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage. 2. Sucrose. *Cryobiology* 1972;9(1):16-21. DOI: 10.1016/0011-2240(72)90004-1

34. Rodriguez RA, Liang H, Chen LY, Plascencia-Villa G, Perry G. Single-channel permeability and glycerol affinity of human aquaglyceroporin AQP3. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2019;1861(4):768-75. DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.01.008

35. Lahmann JM, Benson JD, Higgins AZ. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for post-thaw washing of human erythrocytes. *Cryobiology* 1372018;80:1-11. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.12.003

36. Белоус АМ, Грищенко ВИ. Криобиология. Киев: Наукова думка; 1994:364-95.

37. Белоус АМ, Бондаренко ВА, Бондаренко ТП. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран. Итоги науки и техники/ВИНИТИ. Сер. Биофизика. 1978;9:80-113

38. Pegg DE, Diaper MP. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes. *Biophys J* 1988;54(3):471-88. DOI: 10.1016/S0006-3495(88)82980-1

39. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells:

past, present, and future. *Transfus Med Rev* 2005;19(2):127-42. DOI: 10.1016/j.tmr.v.2004.11.004

40. Поздняков ВВ, Бондаренко ВА. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4 М NaCl. *Криобиология* 1989;1:47-9.

41. Morris GJ. Lipid loss and haemolysis by thermal shock: lack of correlation. *Cryobiology* 1975;12(3):192-201. DOI: 10.1016/0011-2240(75)90017-6

42. Lovelock JE. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147(929):427-33. DOI: 10.1098/rspb.1957.0062

43. Бондаренко ТП. Комбинированное действие температуры и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу. *Проблемы криобиологии* 1993;2:11-6.

44. Hiller S. Molecular chaperones and their denaturing effect on client proteins. *J Biomol NMR* 2021;75(1):1-8. DOI: 10.1007/s10858-020-00353-7

45. Timson DJ. The roles and applications of chaotropes and kosmotropes in industrial fermentation processes. *World J Microbiol Biotechnol* 2020;36(6):89. DOI: 10.1007/s11274-020-02865-8

46. Shiraki K, Mimura M, Nishinami S, Ura T. Effect of additives on liquid droplets and aggregates of proteins. *Biophys Rev* 2020;12(2):587-92. DOI: 10.1007/s12551-020-00682-9

47. Kang B, Tang H, Zhao Z, Song S. Hofmeister Series: Insights of Ion Specificity from Amphiphilic Assembly and Interface Property. *ACS omega* 2020;5(12):6229-39. Доступно на: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00237>

48. O'Neill SC, Kanthe AD, Weber JA, Tu RS. 'Reverse' Hofmeister effects on the sol-gel transition rates for an  $\alpha$ -helical peptide-PEG bioconjugate. *Phys Chem Chem Phys* 2018;20(30):20287-95. DOI: 10.1039/C8CP03316A

49. Luo Y, Li H, Gao X, Tian R. Description of colloidal particles aggregation in the presence of Hofmeister effects: on the relationship between ion



adsorption energy and particle aggregation activation energy. *Phys Chem Chem Phys* 2018;20(35):22831-40. DOI: 10.1039/C8CP04002H

50. Tatini D, Sarri F, Maltoni P, Ambrosi M, Carretti E, Ninham BW, et al. Specific ion effects in polysaccharide dispersions. *Carbohydr Polym* 2017;173:344-52. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.05.078

51. Sivan U. The inevitable accumulation of large ions and neutral molecules near hydrophobic surfaces and small ions near hydrophilic ones. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2016;22:1-7. DOI: 10.1016/j.cocis.2016.02.004

52. Henry M. Hofmeister series: The quantum mechanical viewpoint. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2016;23:119-25. DOI: 10.1016/j.cocis.2016.08.001

53. Assaf KI, Nau WM. The chaotropic effect as an assembly motif in chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 2018;57(43):13968-81. DOI: 10.1002/anie.201804597

54. Бондаренко ВА. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов [диссертация]. Харьков: ИПКиК АН Укр.; 1988. с. 49.

55. Гордиенко ЕА, Коваленко СЕ. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза. *Проблемы криобиологии* 1997;3:3-7.

56. Гордиенко ЕА, Коваленко СЕ. Биофизическая модель явления гипертонического криогемолиза. *Проблемы криобиологии* 1996;4:24-32.

57. Белоус АМ, Гордиенко ЕА, Розанов ЛФ. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция. Москва: Высшая школа; 1987. 80 с.

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

59. Majumdar R, Manikwar P, Hickey JM, Samra HS, Sathish NA, Bishop SM, et al. Effects of salts from the Hofmeister series on the conformational stability, aggregation propensity, and local flexibility of an IgG1 monoclonal antibody. *Biochemistry* 2013;52(19):3376-89. DOI: 10.1021/bi400232p

60. Pegram LM, Wendorff T, Erdmann R, Shkel I, Bellissimo D, Felitsky DJ, et al. Why Hofmeister effects of many salts favor protein folding but

not DNA helix formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(17):7716-21. DOI: 10.1073/pnas.0913376107

61. Mason PE, Dempsey CE, Vrbka L, Heyda J, Brady JW, Jungwirth P. Specificity of ion-protein interactions: complementary and competitive effects of tetrapropylammonium, guanidinium, sulfate, and chloride ions. *J Phys Chem B* 2009;113(10):3227-34. DOI: 10.1021/jp8112232

62. Pegram LM, Record MT, Jr. Thermodynamic origin of hofmeister ion effects. *J Phys Chem B* 2008;112(31):9428-36. DOI: 10.1021/jp800816a

63. Lund M, Vrbka L, Jungwirth P. Specific ion binding to nonpolar surface patches of proteins. *J Am Chem Soc* 2008;130(35):11582-3. DOI: 10.1021/ja803274p

64. Geisler M, Pirzer T, Ackerschott C, Lud S, Garrido J, Scheibel T, et al. Hydrophobic and Hofmeister effects on the adhesion of spider silk proteins onto solid substrates: An AFM-based single-molecule study. *Langmuir* 2008;24(4):1350-5. DOI:10.1021/la702341j

65. Vrbka L, Jungwirth P, Bauduin P, Touraud D, Kunz W. Specific ion effects at protein surfaces: a molecular dynamics study of bovine pancreatic trypsin inhibitor and horseradish peroxidase in selected salt solutions. *J Phys Chem B* 2006;110(13):7036-43. DOI: 10.1021/jp0567624

66. Lopez-Arenas L, Solis-Mendiola S, Padilla-Zuniga J, Hernandez-Arana A. Hofmeister effects in protein unfolding kinetics: estimation of changes in surface area upon formation of the transition state. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764(7):1260-7. DOI: 10.1016/j.bbapap.2006.05.006

67. Zhou HX. Interactions of macromolecules with salt ions: an electrostatic theory for the Hofmeister effect. *Proteins* 2005;61(1):69-78. DOI: 10.1002/prot.20500

68. Белоус АМ, Бондаренко ВА, Бабийчук ЛА, Бондаренко ТП, Бойко НМ. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе. *Криобиология* 1985;2:25-32.

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

70. Руденко СА, Бондаренко ВА. Роль изменения объема эритроцитов при постгипертоническом лизисе. В кн.: Моделирование криобиологических процессов. Харьков: Б.и.; 1988:55-67.

71. Parsons DF, Duignan TT, Salis A. Cation effects on haemoglobin aggregation: balance of chemisorption against physisorption of ions. Interface Focus 2017;7(4):20160137. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0137

72. Поздняков ВВ, Бондаренко ВА. "Объемный сдвиг" как фактор, контролирующей осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов. В кн.: Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. Харьков; 1990:115-123.

73. Соловьев ЮИ. Очерки по истории физической химии. Москва: Наука; 1964. 341 с.

74. Hückel E, Debye P. The theory of electrolytes: I. lowering of freezing point and related phenomena. Phys Z. 1923;24:185-206.

75. Chapman D. A contribution to the theory of electrocapillarity. Philos Mag Ser 6 1913;25:475-81. DOI: 10.1080/14786440408634187

76. Kunz W. Specific ion effects in liquids, in biological systems and at interfaces. Pure Appl Chem 2006;78(8):1611-7. DOI: 10.1351/pac200678081611

77. Kunz W, Nostro PL, Ninham BW. Hofmeister Phenomena. Curr Opin Colloid Interface Sci 2004;9:1-197

78. Kunz W, Lo Nostro P, Ninham BW. The present state of affairs with Hofmeister effects. Curr Opin Colloid Interf Sci 2004; 9:1-18. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.05.004

79. Lo Nostro P, Ninham BW. Perspectives. Current Opin Colloid Interf Sci 2016;23:126. DOI: 10.1016/j.cocis.2016.06.008

80. Hofmeister F. Zur lehre von der wirkung der salze. Arch Exp Pathol Pharmakol. 1888;25(1):1-30. DOI: 10.1007/BF01838161

81. Kunz W, Henle J, Ninham BW. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr Opin Colloid Interf Sci* 2004;9(1-2):19-37. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.05.005

82. Collins KD. Why continuum electrostatics theories cannot explain biological structure, polyelectrolytes or ionic strength effects in ion-protein interactions. *Biophys Chem* 2012;167:43-59. DOI: 10.1016/j.bpc.2012.04.002

83. Collins KD, Washabaugh MW. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q Rev Biophys* 1985;18(4):323-422. DOI: 10.1017/s0033583500005369

84. Lagerberg JW. Cryopreservation of red blood cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 2015;1257:353-67.

85. Gurau MC, Lim SM, Castellana ET, Albertorio F, Kataoka S, Cremer PS. On the mechanism of the hofmeister effect. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126(34):10522-3.

86. Робинсон Р, Стокс Р. Растворы электролитов. Москва: Изд-во иностр. лит.; 1963. 647 с.

87. Kunz W, Belloni L, Bernard O, Ninham BW. Osmotic Coefficients and Surface Tensions of Aqueous Electrolyte Solutions: Role of Dispersion Forces. *J Phys Chem B* 2004;108:2398-404. DOI: 10.1021/jp036113x

88. Collins KD. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* 2004;34(3):300-11. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.021

89. Cacace MG, Landau EM, Ramsden JJ. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys* 1997;30(3):241-77. DOI: 10.1017/s0033583597003363

90. Bostrom M, Williams DRM, Ninham BW. Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series. *Curr Opin Colloid Interf Sci* 2004;9:48-52. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.05.001

91. Ninham B. Physical chemistry: The loss of certainty. In: Nylander T,

Lindman B, editors. Lipid and Polymer-Lipid Systems. Progr Colloid Polym Sci 2002;120:1-12. Berlin, Heidelberg: Springer; 2002. DOI: 10.1007/3-540-45291-5\_1

92. Bunkin NF, Ninham BW, Ignatiev PS, Kozlov VA, Shkirin AV, Starosvetskij AV. Long-living nanobubbles of dissolved gas in aqueous solutions of salts and erythrocyte suspensions. J Biophotonics 2011;4(3):150-64. DOI: 10.1002/jbio.201000093

93. Ueberreiter K. Change of water structure by solvents and polymers. Colloid and Polymer Science. 260 1982(1):37–45. DOI: 10.1007/BF01447674

94. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. Curr Opin Chem Biol 2006;10(6):658-63. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020

95. Ahn-Ercan G, Krienke H, Kunz W. Role of polarizability in molecular interactions in ion solvation. Curr Opin Colloid Interf Sci 2004;9(1–2):92-6. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.05.010

96. Линг Г. Физическая теория живой клетки: Незамеченная революция 2008, СПб: Наука. 377 с.

97. Александрова ДИ. Влияние начальных осмотических и температурных условий на устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку [диссертация]. Харьков: ИПКиК НАН Укр.; 2011. 172 с.

98. Christoforou M, Leontidis E, Brezesinski G. Effects of sodium salts of lyotropic anions on low-temperature, ordered lipid monolayers. J Phys Chem B 2012;116(50):14602-12. DOI: 10.1021/jp307004e

99. Jungwirth P, Tobias DJ. Molecular structure of salt solutions: A new view of the interface with implications for heterogeneous atmospheric chemistry. J Phys Chem B 2001;105(43):10468-72. DOI: 10.1021/jp012750g

100. Ben-Yaakov D, Andelman D, Podgornik R. Dielectric decrement as a source of ion-specific effects. J Chem Phys 2011;134(7):074705. DOI: 10.1063/1.3549915

101. Murgia S, Monduzzi M, Palazzo G. Quantification of specific anion

binding to non-ionic triton X-100 micelles. *Langmuir* 2012;28(2):1283-9. DOI: 10.1021/la203918d

102. Collins KD. Sticky ions in biological systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(12):5553-7. DOI: 10.1073/pnas.92.12.5553

103. McLaughlin S, Bruder A, Chen S, Moser C. Chaotropic anions and the surface potential of bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1975;394(2):304-13. DOI: 10.1016/0005-2736(75)90267-9

104. Viswanath P, Aroti A, Motschmann H, Leontidis E. Vibrational sum frequency generation spectroscopic investigation of the interaction of thiocyanate ions with zwitterionic phospholipid monolayers at the air–water interface. *J Phys Chem B* 2009;113(44):14816-23. DOI: 10.1021/jp906455k

105. Lillie RS. On the nature of chemical stimulation and on the influence of neutral sodium salts on various forms of chemical stimulation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1910;7 170–4. DOI: 10.3181/00379727-7-110

106. Kahn AJ, Sandow A. The potentiation of muscular contraction by the nitrate-ion. *Science* 1950;112(2918):647-9. DOI: 10.1126/science.112.2918.647

107. Kahn AJ, Sandow A. Effects of bromide, nitrate, and iodide on responses of skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* 1955;62(7):139-75. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1955.tb35370.x

108. Suzuki K, Post RL. Equilibrium of phosphointermediates of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase: action of sodium ion and Hofmeister effect. *J Gen Physiol* 1997;109(5):537-54. DOI: 10.1085/jgp.109.5.537

109. Klodos I, Post RL, Forbush B, 3rd. Kinetic heterogeneity of phosphoenzyme of Na,K-ATPase modeled by unmixed lipid phases. Competence of the phosphointermediate. *J Biol Chem* 1994;269(3):1734-43.

110. Clarke RJ, Lüpfer C. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect. *Biophys J* 1999;76(5):2614-24. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77414-X

111. Tatulian SA. Effect of lipid phase transition on the binding of anions to

dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1983;736(2):189-95. DOI: 10.1016/0005-2736(83)90283-3

112. Leontidis E, Aroti A, Belloni L, Dubois M, Zemb T. Effects of monovalent anions of the Hofmeister series on DPPC lipid bilayers Part II: modeling the perpendicular and lateral equation-of-state. *Biophys J* 2007;93(5):1591-607. DOI: 10.1529/biophysj.107.109264

113. Simchowicz L. Interactions of bromide, iodide, and fluoride with the pathways of chloride transport and diffusion in human neutrophils. *J Gen Physiol* 1988;91(6):835-60. DOI: 10.1085/jgp.91.6.835

114. Van Hoogevest P, Van Duijn G, Batenburg AM, De Kruijff B, De Gier J. The anion permeability of vesicles reconstituted with intrinsic proteins from the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1983;734(1):1-17. DOI: 10.1016/0005-2736(83)90068-8

115. Wieth JO. Effect of some monovalent anions on chloride and sulphate permeability of human red cells. *J Physiol* 1970;207(3):581-609. DOI: 10.1113/jphysiol.1970.sp009082

116. Dalmark M, Wieth JO. Temperature dependence of chloride, bromide, iodide, thiocyanate and salicylate transport in human red cells. *J Physiol* 1972;224(3):583-610. DOI: 10.1113/jphysiol.1972.sp009914

117. Raaphorst GP, Kruuv J. Effect of salt solutions on radiosensitivity of mammalian cells. I. Specific ion effects. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1977;32(1):71-88. DOI: 10.1080/09553007714550761

118. Lo Nostro P, Ninham BW, Lo Nostro A, Pesavento G, Fratoni L, Baglioni P. Specific ion effects on the growth rates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Phys Biol* 2005;2(1):1-7. DOI: 10.1088/1478-3967/2/1/001

119. Rembert KB, Paterová J, Heyda J, Hilty C, Jungwirth P, Cremer PS. Molecular mechanisms of ion-specific effects on proteins. *J Am Chem Soc.* 2012;134(24):10039-46. DOI: 10.1021/ja301297g Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical journal* 1996;71(4):2056-63.

120. Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* 1996;71(4):2056-63. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79404-3
121. Boström M, Parsons DF, Salis A, Ninham BW, Monduzzi M. Possible origin of the inverse and direct Hofmeister series for lysozyme at low and high salt concentrations. *Langmuir* 2011;27(15):9504-11. DOI: 10.1021/la202023r
122. Boström M, Williams DR, Stewart PR, Ninham BW. Hofmeister effects in membrane biology: the role of ionic dispersion potentials. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2003;68(4 Pt 1):041902. DOI: 10.1103/PhysRevE.68.041902
123. Parmar AS, Muschol M. Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: Effects of chaotropic versus kosmotropic ions. *Biophys J* 2009;97(2):590-8. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.04.045
124. Friedman R, Nachliel E, Gutman M. Molecular dynamics of a protein surface: ion-residues interactions. *Biophys J* 2005;89(2):768-81. DOI: 10.1529/biophysj.105.058917
125. Zoldak G, Sprinzl M, Sedlak E. Modulation of activity of NADH oxidase from *Thermus thermophilus* through change in flexibility in the enzyme active site induced by Hofmeister series anions. *Eur J Biochem* 2004;271(1):48-57. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03900.x
126. Perez-Jimenez R, Godoy-Ruiz R, Ibarra-Molero B, Sanchez-Ruiz JM. The efficiency of different salts to screen charge interactions in proteins: a Hofmeister effect? *Biophys J* 2004;86(4):2414-29. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74298-8
127. Dang LX, Sun X, Ginovska-Pangovska B, Annapureddy HVR, Truong TB. Understanding ion-ion interactions in bulk and aqueous interfaces using molecular simulations. *Faraday Discuss* 2013;160(0):151-60. DOI: 10.1039/c2fd20093g
128. Dang LX, Chang TM. Molecular mechanism of ion binding to the liquid/vapor interface of water. *J Phys Chem B* 2002;106:235-8. DOI: 10.1021/jp011853w



129. Tadeo X, López-Méndez B, Castaño D, Trigueros T, Millet O. Protein stabilization and the Hofmeister effect: the role of hydrophobic solvation. *Biophys J* 2009;97( 9):2595-603. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.08.029
130. Гольцев А. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2020;30(4):313-30.
131. Hackl EV, Gatash SV, Nikolov OT. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2005; 63(2):137-8. DOI: 10.1016/j.jbbm.2005.04.002.
132. Pungor E. Oscillometry conductometry. In *International Series of Monographs on Analytical Chemistry*. Vol. 21. Oxford: Pergamon Press; 1965. 239 p. DOI: 10.1016/C2013-0-01799-9.
133. Debye P. Polar molecules. New York: The Chemical Catalog Company, Inc.; 1929. 172 p.
134. Grant EH, Sheppard RJ, South SP. Dielectric behavior of biological molecules in solution, In the series: *Monographs on Physical Biochemistry*. New York: Oxford University Press; 1978. 237 p.
135. Sachs JN, Woolf TB. Understanding the Hofmeister effect in interactions between chaotropic anions and lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* 2003;125(29):8742-3. DOI: 10.1021/ja0355729
136. Collins KD. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical journal* 1997;72(1):65-76.
137. Руденко СВ, Ши Л, Бондаренко ВА. Реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. Влияние органических анионов. *Біофізичний вісник* 2009;2(23):59-61.
138. Rahman HM, Nefter G, Buchner R. Hydration of formate and acetate ions by dielectric relaxation spectroscopy. *J Phys Chem B* 2012;116(1):314-23. DOI: 10.1021/jp207504d
139. Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: ИПКиК НАН Украины; 2012. 767 с.

140. Bieri VG, Wallach DF. Variations of lipid-protein interactions in erythrocyte ghosts as a function of temperature and pH in physiological and non-physiological ranges. A study using a paramagnetic quenching of protein fluorescence by nitroxide lipid analogues. *Biochimica et biophysica acta* 1975;406(3):415-23.

141. Collins KD. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. *Biophys chem* 2006;119(3):271-81. DOI: 10.1016/j.bpc.2005.08.010

142. Curtis EM, Bahrami AH, Weikl TR, Hall CK. Modeling nanoparticle wrapping or translocation in bilayer membranes. *Nanoscale* 2015;7(34):14505-14. DOI: 10.1039/C5NR02255J

143. Гольцев АН, Бабенко НН, Гаевская ЮА, Бондарович НА, Останков МВ, Челомбитько ОВ и др. Способность наночастиц на основе ортованадатов к идентификации *in vitro* и инактивации *in vivo* стволовых раковых клеток. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології* 2013;11(4): 729-39. Доступно на: [https://www.imp.kiev.ua/nanosys/media/pdf/2013/4/nano\\_vol11\\_iss4\\_p0729p0739\\_2013.pdf](https://www.imp.kiev.ua/nanosys/media/pdf/2013/4/nano_vol11_iss4_p0729p0739_2013.pdf)

144. Клочков ВК. Водные коллоидные растворы наноломинофоров  $n\text{ReVO}_4$ :  $\text{Eu}^{3+}$  ( $\text{Re} = \text{I}, \text{Cd}, \text{La}$ ). *Наноструктурное материаловедение* 2009;2:3-8.

145. Xia Z, Lau BLT. Mitigating effects of osmolytes on the interactions between nanoparticles and supported lipid bilayer. *Journal of colloid and interface science* 2020;568:1-7.

146. Li Y, Zhao T, Wang C, Lin Z, Huang G, Sumer BD, et al. Molecular basis of cooperativity in pH-triggered supramolecular self-assembly. *Nat Commun* 2016;7:13214. DOI: 10.1038/ncomms13214

147. Пакулова ОК. Влияние анионов лиотропного ряда в среде дегидратации на осмотический ответ эритроцитов. Тезисы конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине 2006». 24-25 мая 2006 г. Харьков. *Проблемы криобиологии* 2006;16(4):445.

148. Бондаренко ВА, Пакулова ОК, Жуйкова АЕ. Поведение клеток в

неизотонических условиях: дифференцированный подход к механизмам структурных нарушений и адаптации. Тезисы докладов конференции «Новые криотехнологии для решения фундаментальных и прикладных задач медицины», посвященной 90-летию НАН Украины и 10-летию кафедры ЮНЕСКО по криобиологии. 24–26 ноября 2008 г. Харьков. Проблемы криобиологии 2008;18(2):209.

149. Пакулова ОК, Бондаренко ВА. Влияние анионов ряда Гофмейстера на осмотическую выносливость эритроцитов. Вісник проблем біології і медицини 2008;3:23-6.

150. Pakulova OK, Bondarenko VA. Controlling the status of red blood cells by changing the properties of water. Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology: abstr. 4<sup>th</sup> Ukrainian-German Symposium; 2012 Sep 18–20; Ilmenau, Germany. Ilmenau; 2012. p. 173.

151. Пакулова ОК, Бондаренко ВА, Малкович ЮВ. Морфология эритроцитов человека в растворах анионов ряда Гофмейстера. Вісник проблем біології і медицини 2011;2(2):199–200.

152. Пакулова ОК, Бондаренко ВА. Влияние анионов ряда Гофмейстера на осмотическую выносливость эритроцитов. Вісник проблем біології і медицини 2008;3:23–6.

153. Пакулова ОК, Клочков ВК, Кавок НС, Костіна ІА, Сопотова ОС, Бондаренко ВА. Влияние наночастиц на основе редкоземельных элементов на осмотическую адаптацию эритроцитов. Біофізичний вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна 2017;37(1):42–50.

154. Pakulova OK, Bondarenko VA, Kostina IO. The lyotropic anions influence on the state of erythrocyte membrane. Вісник проблем біології і медицини 2020;2(156): 391–4. doi:10.29254/2077-4214-2020-2-156-391-394

155. Pakulova OK, Klochkov VK, Kavok NS, Kostina IA, Sopotova AS, Bondarenko VA. Effect of rare earth elements nanoparticles on the hypertonic lysis of human erythrocytes. Physics and Chemistry of Nanostructures and

Nanobiotechnology: abstr. 5<sup>th</sup> Ukrainian-German Symposium; 2015 Sep 21–25; Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2015. p. 241.

156. Robinson RA, Stokes RH. Electrolyte solutions. 2nd revised ed. Dover Publications: NY, Mineola; 1959. 559 p.

157. Bakker HJ. Structural dynamics of aqueous salt solutions. *Chem Rev* 2008;108(4):1456-73. DOI: 10.1021/cr0206622

158. Zhang Y, Furyk S, Bergbreiter DE, Cremer PS. Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series. *J Am Chem Soc* 2005;127(41):14505-10. DOI: 10.1021/ja0546424

159. Collins KD, Neilson GW, Enderby JE. Ions in water: characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophys Chem* 2007;128(2-3):95-104. DOI: 10.1016/j.bpc.2007.03.009

160. Sun CQ, Huang Y, Zhang X. Hydration of Hofmeister ions. *Adv Colloid Interface Sci* 2019;268:1-24. DOI: 10.1016/j.cis.2019.03.003

161. Chen X, Yang T, Kataoka S, Cremer PS. Specific ion effects on interfacial water structure near macromolecules. *J Am Chem Soc* 2007;129(40):12272-9. DOI: 10.1021/ja073869r

162. Kaatze U. On the existence of bound water in biological systems as probed by dielectric spectroscopy. *Phys Med Biol* 1990;35(12):1663-81. DOI: 10.1088/0031-9155/35/12/006

163. Mogami G, Miyazaki T, Wazawa T, Matubayasi N, Suzuki M. Anion-dependence of fast relaxation component in Na-, K-halide solutions at low concentrations measured by high-resolution microwave dielectric spectroscopy. *J Phys Chem A* 2013;117(23):4851-62. DOI: 10.1021/jp4012119

164. Okazaki Y, Taniuchi T, Mogami G, Matubayasi N, Suzuki M. Comparative study on the properties of hydration water of Na- and K-halide ions by Raman OH/OD-stretching spectroscopy and dielectric relaxation data. *J Phys Chem A* 2014;118(16):2922-30. DOI: 10.1021/jp412804d

165. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces.

Adv Colloid Interface Sci 1998;74:69-117. DOI: 10.1016/s0001-8686(97)00040-7

166. Ninham BW, Parsegian VA. Electrostatic potential between surfaces bearing ionizable groups in ionic equilibrium with physiologic saline solution. *J Theor Biol* 1971;31(3):405-28. DOI: 10.1016/0022-5193(71)90019-1

167. Pakulova OK, Gorobchenko OA, Nikolov OT, Adelyanov AV, Pastukhova SY, Bondarenko VA. The influence of Hofmeister's effect on the osmotic behaviour of erythrocytes and on the state of water in their suspension. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2013;44(2-3):167-70. doi:10.1002/mawe.201300111.

168. Белоус АМ. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток. *Криобиология* 1990;9(3):3-12.

169. Ball P, Hallsworth JE. Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications. *Phys Chem Chem Phys* 2015;17(13):8297-305. DOI: 10.1039/C4CP04564E

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

171. Пакулова ОК, Бондаренко ВА, Малкович ЮВ. Особенности гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в среде, содержащей анионы лиотропного ряда. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія»* 2011;13(947):159-65.

172. Пакулова ОК, Верджи ЛВ, Бондаренко ВА. Изучение эффекта Гофмейстера на объем эритроцитов человека в средах с повышенной тоничностью. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук* 2013;12(59)[Экспериментальная и теоретическая биофизика'13 : матер. междунар. конф. молод. ученых; 21-23 окт. 2013 г.; Пушино, Российская Федерация]:53-5.

173. Pakulova OK. Effects of some anions of Hofmeister series on the human erythrocyte damage in changes osmotic and temperature conditions. *Біологія: від молекули до біосфери: тези доп. V міжнар. конф. мол. науковців;*

22–25 жовт. 2010 р.; Харків, Україна. Харків; 2010. с. 73.

174. Пакулова ОК. Показатели адаптации эритроцитов к критическим температурно-осмотическим условиям под влиянием эффекта Гофмейстера. Биология – наука XXI века: сб. тез. 17-й междунар. Пуштин. школы-конф. мол. ученых; 21–26 апр. 2013 г.; Пушино, Российская Федерация. Пушино; 2013. с. 139.

175. He X, Ewing AG. Counteranions in the stimulation solution alter the dynamics of exocytosis consistent with the Hofmeister series. *J Am Chem Soc* 2020;142(29):12591-5. DOI: 10.1021/jacs.0c05319

176. Cray JA, Stevenson A, Ball P, Bankar SB, Eleutherio ECA, Ezeji TC, et al. Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;33:228-59. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.02.010

177. Zhang Y, Cremer PS. Chemistry of Hofmeister anions and osmolytes. *Annu Rev Phys Chem* 2010;61:63-83. DOI: 10.1146/annurev.physchem.59.032607.093635

178. Gibb CL, Gibb BC. Anion binding to hydrophobic concavity is central to the salting-in effects of Hofmeister chaotropes. *J Am Chem Soc* 2011;133(19):7344-7. DOI: 10.1021/ja202308n

179. Cray JA, Russell JT, Timson DJ, Singhal RS, Hallsworth JE. A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ Microbiol* 2013;15(1):287-96. DOI: 10.1111/1462-2920.12018

180. Zongo L, Lange H, Crestini C. A study of the effect of kosmotropic and chaotropic ions on the release characteristics of lignin microcapsules under stimuli-responsive conditions. *ACS Omega* 2019;4(4):6979-93. DOI: 10.1021/acsomega.8b03510

## Додаток А

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

#### Публікації в наукових фахових виданнях України

1. **Пакулова ОК**, Бондаренко ВА, Малкович ЮВ. Морфология эритроцитов человека в растворах анионов ряда Гофмейстера. Вісник проблем біології і медицини 2011;2(2):199–200.

2. **Пакулова ОК**, Бондаренко ВА, Малкович ЮВ. Особенности гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в среде, содержащей анионы лиотропного ряда. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія» 2011;13(947):159–65.

3. **Пакулова ОК**, Клочков ВК, Кавок НС, Костіна ІА, Сопотова ОС, Бондаренко ВА. Влияние наночастиц на основе редкоземельных элементов на осмотическую адаптацию эритроцитов. Біофізичний вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна 2017;37(1):42–50.

4. **Pakulova ОК**, Bondarenko VA, Kostina IO. The lyotropic anions influence on the state of erythrocyte membrane. Вісник проблем біології і медицини 2020;2(156): 391–4. doi:10.29254/2077-4214-2020-2-156-391-394.

#### Публікація в зарубіжному спеціалізованому виданні

5. **Pakulova ОК**, Gorobchenko OA, Nikolov OT, Adelyanov AV, Pastukhova SY, Bondarenko VA. The influence of Hofmeister's effect on the osmotic behaviour of erythrocytes and on the state of water in their suspension. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 2013;44(2–3):167–70. doi:10.1002/mawe.201300111.

## Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

### Стаття в збірці матеріалів конференції

6. **Пакулова ОК**, Верджи ЛВ, Бондаренко ВА. Изучение эффекта Гофмейстера на объем эритроцитов человека в средах с повышенной тоничностью. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук 2013;12(59)[Экспериментальная и теоретическая биофизика'13 : матер. междунар. конф. молод. ученых; 21–23 окт. 2013 г.; Пущино, Российская Федерация]:53–5.

### Тези конференцій

7. **Пакулова ОК**. Влияние анионов лиотропного ряда в среде дегидратации на осмотический ответ эритроцитов. Проблемы криобиологии 2006;16(4)[Холод в биологии и медицине 2006: тез. ежегодн. конф. молод. ученых; 24–25 мая 2006 г.; Харьков, Украина]:445.

8. Бондаренко ВА, **Пакулова ОК**, Жуйкова АЕ. Поведение клеток в неизотонических условиях: дифференцированный подход к механизмам структурных нарушений и адаптации. Проблемы криобиологии 2008;18(2)[Новые криотехнологии для решения фундаментальных и прикладных задач медицины: тез. докл. конф., посв. 90-летию НАНУ и 10-летию каф. ЮНЕСКО по криобиол; 24–26 нояб. 2008 г.; Харьков, Украина]:209.

9. **Pakulova ОК**. Effects of some anions of Hofmeister series on the human erythrocyte damage in changes osmotic and temperature conditions. Біологія: від молекули до біосфери: тези доп. V міжнар. конф. мол. науковців; 22–25 жовт. 2010 р.; Харків, Україна. Харків; 2010. с. 73.

10. **Пакулова ОК**, Пастухова СЯ. Влияние анионов лиотропного ряда Гофмейстера на мембранные структуры клеток. Біологія: від молекули до



біосфери: тези доп. VI міжнар. конф. мол. науковців; 21–24 жовт. 2011 р.; Харків, Україна. Харків; 2011. с. 108.

11. **Pakulova OK, Bondarenko VA.** Controlling the status of red blood cells by changing the properties of water. *Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology*: abstr. 4<sup>th</sup> Ukrainian-German Symposium; 2012 Sep 18–20; Ilmenau, Germany. Ilmenau; 2012. p. 173.

12. **Пакулова ОК.** Показатели адаптации эритроцитов к критическим температурно-осмотическим условиям под влиянием эффекта Гофмейстера. *Биология – наука XXI века: сб. тез. 17-й междунар. Пушчин. школы-конф. мол. ученых*; 21–26 апр. 2013 г.; Пушино, Российская Федерация. Пушино; 2013. с. 139.

13. **Pakulova OK, Klochkov VK, Kavok NS, Kostina IA, Sopotova AS, Bondarenko VA.** Effect of rare earth elements nanoparticles on the hypertonic lysis of human erythrocytes. *Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology*: abstr. 5<sup>th</sup> Ukrainian-German Symposium; 2015 Sep 21–25; Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2015. p. 241.

#### **Стаття, що додатково відображає матеріали дисертації**

14. **Пакулова ОК, Бондаренко ВА.** Влияние анионов ряда Гофмейстера на осмотическую выносливость эритроцитов. *Вісник проблем біології і медицини* 2008;3:23–6.

## Додаток Б


### Відомості про апробацію результатів дисертації

Матеріали дисертаційної роботи були представлені й обговорювалися на наукових форумах:

- 30-й щорічній конференції молодих науковців «Холод у біології та медицині» (Харків, 24–25.05.2006 р.), особиста участь, усна доповідь;
- конференції, присвяченій 90-річчю НАН України і 10-річчю кафедри ЮНЕСКО з кріобіології «Нові кріотехнології для вирішення фундаментальних і прикладних завдань медицини» (Харків, 24–26.11.2008 р.), особиста участь, усна доповідь;
- V та VI Міжнародних конференціях молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 22–25.10.2010 р., 21–24.10.2011 р.), особиста участь, усні доповіді;
- 4-му і 5-му україно-німецькому симпозиумі «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» (Ільменау, Німеччина, 18–20.09.2012 р.; Київ, 21–25.09.2015 р.), особиста участь, постерна та усна доповіді;
- 17-й Міжнародної Пуцинської школі-конференції молодих науковців «Біологія – наука XXI сторіччя» (Пушино, Росія, 21-26.04.2013 р.), заочна участь;
- науковій конференції «Экспериментальная и теоретическая биофизика'13» (Пушино, Росія, 21–23.10.2013 р.), особиста участь, постерна доповідь.

## Додаток В

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної  
роботи Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна  
М. О. Азаренков

## АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи Пакулової Ольги Костянтинівни «Осмотична поведінка еритроцитів людини при зміні аніонного складу середовища в умовах гіпотермії» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі завідувача кафедри фізіології людини та тварин, професора, доктора біологічних наук Бондаренка В. А., заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Волкової Н. Є. та голови науково-методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертаційної роботи Пакулової Ольги Костянтинівни, а саме: особливості температурно-осмотичної адаптації еритроцитів у присутності різних аніонів впроваджені у навчальний процес на біологічному факультеті у рамках спеціальних курсів «Фізіологія адаптацій і екстремальних станів» для студентів 1-го року навчання та «Сучасні проблеми кріобіології» для студентів 2-го року навчання за освітньо-кваліфікаційним рівнем «Магістр» кафедри фізіології людини та тварин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Завідувач кафедри  
фізіології людини та тварин,  
д.б.н., професор

В. А. Бондаренко

Заступник декана з навчальної  
роботи, к.б.н., доцент

Н. Є. Волкова

Голова науково-методичної комісії  
біологічного факультету  
роботи, к.б.н., доцент

В. В. Мартиненко