НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ПАКУЛОВА ОЛЬГА КОСТЯНТИНІВНА

УДК 612.111:577.352.462:57.043

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

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України та Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бондаренко Валерій Антонович,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, м. Харків, в.о. завідувача кафедри фізіології людини і тварин.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Мартинюк Віктор Семенович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», професор кафедри біофізики та медичної інформатики;

кандидат біологічних наук, доцент
Денисова Ольга Миколаївна,
Харківська державна зооветеринарна академія України, доцент кафедри хімії та біохімії ім. професора О. В. Чечоткіна.

Захист відбудеться 4 травня 2021 р. о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розіслано « 1 » квітня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Marco-Jimenez F., 2016). 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 (Chang A., 2017).

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» (Гольцев А. Н., 2012).

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: $ClO_4^- < Br^- < Cl^- < Ac^- < F^- < SO_4^{2-}$) від слабогідратованих (хаотропних) до сильногідратованих (космотропних) (Sun C., 2019), але їхній вплив досі не має адекватного теоретичного обґрунтування. Тому вплив ліотропних аніонів неможливо прогнозувати, а закономірності для кожного окремого випадку потрібно встановлювати експериментально (Collins K. D., 2019).

Існує багато даних щодо залежності простих біооб’єктів від впливу ліотропних аніонів. Значні зміни відбуваються у стані ліпідних шарів (Aroti A., 2009), білків (Dahal Y. R., 2018) та їхніх гелів (Zhang J., 2019), які аналогічні мішеням кріопошкодження клітин (Lagerberg J. W., 2015). Було показано, що вплив аніонів із найсильнішими ліотропними властивостями призводить до пошкодження еритроцитів під час заморожування, яке збігається зі зміною рівня сенсибілізації до осмотичного та холодового шоків (Бондаренко Т. П., 1981; Поздняков В. В., 1989).

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 (Lee E., 2017; Usoltsev, D., 2020).

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 (Stefanic M., 2017).

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 pH.
2. Визначити закономірності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів у розчинах, які містять аніони, за умов варіювання температурно-осмотичних показників, тривалості попередньої інкубації та pH 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 кріозахисних агентів.

Об’єкт дослідження: гіпертонічний лізис, постгіпертонічний лізис, гіпертонічний кріогемоліз.

Предмет дослідження: вплив аніонного складу середовища на гіпертонічний лізис, гіпертонічний кріогемоліз 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 сенсибілізації еритроцитів до обох видів стресу після попередньої інкубації у середовищах однакової осмоляльності. Ця критична осмоляльність «дзвоникоподібно» змінюється відповідно до розташування аніонів у ліотропному

ряді, 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 Br^-, яке відбувається без пошкодження мембран під час тривалої передінкубації та *пояснено* природу захисного ефекту слабокосмотропного Ac^- через підвищення ступеня гідратації клітин. *Уперше показано* інверсію стабілізаційного впливу середовищ із низьким pH (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.

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.);

4th Ukrainian–German Symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology» (Ільменау, 2012 р.); 17-й Міжнародній Пущинській школі-конференції молодих науковців «Біологія — наука XXI сторіччя» (Пущино, 2013 р.); науковій конференції «Експериментальна та теоретична біофізика» (Пущино, 2013 р.); 5th 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність дослідження впливу властивостей ліотропних аніонів на температурно-осмотичну адаптацію еритроцитів. Сформульовано науковий апарат дослідження (мету, завдання та методи). Викладено наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи, відомості про публікації та апробацію основних отриманих результатів. Описано особистий внесок здобувача.

В огляді літератури здійснено аналіз основних джерел сучасної наукової інформації стосовно температурно-осмотичної адаптації еритроцитів та впливу ліотропних іонів на властивості структур різної природи. Наведено основні гіпотези щодо пояснення їх механізмів.

Матеріали та методи дослідження. Еритроцити одержували з чоловічої крові II (A) шляхом 3-разового відмивання розчином NaCl (0,15 моль/л) та осадження на центрифузі «ОПн-3 У 4.2» (ВАТ ТНК «Дастан», Киргизстан). Супернатант видаляли аспірацією, а осад зберігали не довше 2 годин при 0 °С.

Осмоляльність розчинів NaSCN, $NaClO_4$, NaBr, NaCl, NaAc, NaF, Na_2SO_4 вимірювали на осмометрі «ОМКА-1Ц-01» («Медлабор-техніка», Україна).

Кислотно-лужний баланс контролювали за допомогою лабораторного pH-метра І-160 (ОАО «ГЗВП», Білорусь). В умовах температурного зсуву використовували трис-малеатний буфер (pH 5,4−8,4) (Chikayama M., 2000). Усі інші розчини готували на 10 мМ фосфатному буфері (pH 7,4).

Для здійснення гіпертонічного лізису еритроцитів аліквоту (100 мкл 4 % суспензії клітин) переносили у 4 М розчин NaCl (900 мкл) на 5 хв. Перед цим 50 мкл 40 % суспензії еритроцитів витримували протягом 2 хв у 450 мкл розчинів ряду солей Na (300−1800 мОсмоль/кг).

Гіпертонічний кріогемоліз здійснювали у два етапи: за темпертатури 37 ºС у 450 мкл розчинів ряду солей Na з різною осмоляльністю (300−2400 мОсмоль/кг) інкубували 50 мкл суспензії еритроцитів (40 %) протягом 10 хв (або 0,5−120 хв під час досліджень часових залежностей); охолодження здійснювали перенесенням на 10 хв 100 мкл аліквоти кожної проби у 900 мкл (0 ºС) таких самих розчинів. Інші види гемолізу контролювали в аналогічних умовах без охолодження. Для оцінки ступеня проникнення аніонів через мембрану на першому етапі додавали блокатор аніонного транспорту 4,4′-диізотіоціанатстильбен-2,2′-дисульфонову кислоту в кінцевій концентрації $1{,}6\times10^{-5}$ моль/л.

Постгіпертонічний лізис здійснювали 10-хвилинним витримуванням суспензії еритроцитів у ізотонічному NaCl із попередньою інкубацією у розчинах ряду солей Na (10 хв) з осмоляльністю 2000 мОсмоль/кг (максимальною, у якій можливе вимірювання діелектричних показників).

Для визначення рівня гемолізу вимірювали вміст гемоглобіну у супернатанті на спектрофотометрі «СФ-4 А» з проточною кюветою ($\lambda = 543$ нм). За 100 % приймали поглинання дослідної проби з додаванням 0,1 % детергенту Тритон Х-100 (AppliChem, Німеччина).

Відносний об’єм еритроцитів визначали у 7 %-й суспензії після 10-хвилинної експозиції у розчинах ряду солей Na після 3 хв осадження (8000 об/хв) на мікрогематокритній центрифузі «МГЦ-8» (Росія) з використанням стандартних мікрогематокритних капілярів («Radiometer», Данія). Процент гематокриту розраховували відносно загальної висоти стовпа рідини у капілярі за допомогою лічильної лінійки («Janetsky», Німеччина).

Морфологічні характеристики клітин вивчали за допомогою світлового мікроскопа «STUDARE» (Польща). Зображення реєстрували цифровою камерою «CANON PowerShot A510» («Canon», Японія).

Значення реальної (ε') і уявної (ε'') частин комплексної діелектричної проникності ($\varepsilon^*=\varepsilon'-j\varepsilon''$) суспензії еритроцитів вимірювали за кімнатної температури на НВЧ-діелектрометрі резонансного типу (9,2 ГГц) (прилад є авторською розробкою (Hackl C., 2005)).

Частоту діелектричної релаксації (f_d) молекул води у розчині та статичної діелектричної проникності (ε_s) суспензії еритроцитів розраховували з використанням рівнянь Дебая (Debye P., 1929):

$$\varepsilon' = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)/1 + (f/f_d),$$
$$\varepsilon'' = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\, f/f_d / 1 + (f/f_d)^2,$$

де ε_∞ — діелектрична постійна води в інфрачервоному частотному діапазоні; ε_s — статична діелектрична постійна; f_d и f — частота діелектричної релаксації молекул води і мікрохвильового поля відповідно.

Декремент статичної діелектричної проникності ($\Delta\,\varepsilon_s$) суспензії еритроцитів відносно сольового розчину розраховували за формулою:

$$\Delta\,\varepsilon_s = \varepsilon_s^{\text{сольового розчину}} - \varepsilon_s^{\text{суспензії еритроцитів}},$$

де ε_s *сольового розчину*, ε_s *суспензії еритроцитів* — статична діелектрична проникність розчину солей; та суспензії еритроцитів відповідно.

Попередню інкубацію клітин зі сферичними $GdVO_4:Eu^{3+}$ (2 нм); еліпсоїдними $GdVO_4:Eu^{3+}$ (8×30 нм) та стрижнеподібними $LaVO_4:Eu^{3+}$ (6×40 нм) наночастинками здійснювали в ізотонічному сахарозно-сольовому середовищі (7 % сахарози та 0,3 % NaCl) протягом 60 хв за температури 37 °C.

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) ± стандартне відхилення середнього арифметичного (m). (На блокових діаграмах планками вказано математичне очікування (μ)). Кожен показник вимірювали не менш 6 разів у двох паралельних пробах. Відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Результати власних досліджень та їх обговорення

Вплив аніонів на адаптацію еритроцитів до гіпертонічного лізису в 4 M NaCl. Після передінкубації в ізотонічних розчинах із різними аніонами рівень гіпертонічного лізису еритроцитів при 37 і 0 °C знижувався від хаотропних (ХА) до космотропних (КА) аніонів відповідно до їх положення у ліотропному ряді (рис. 1).

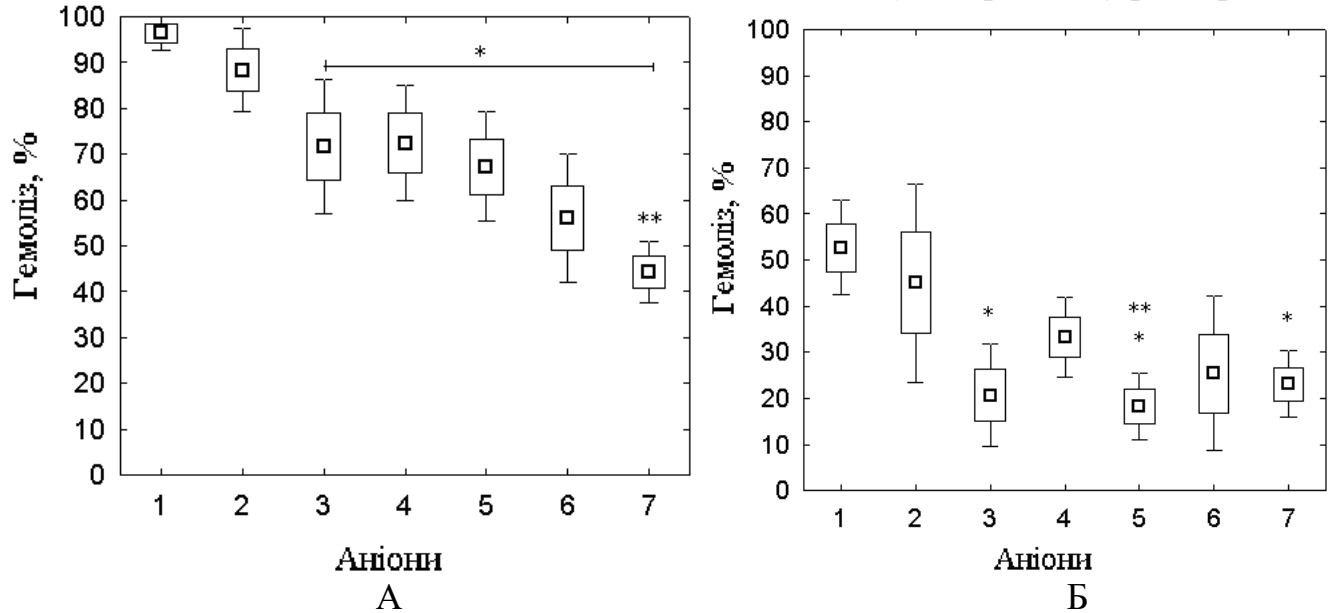
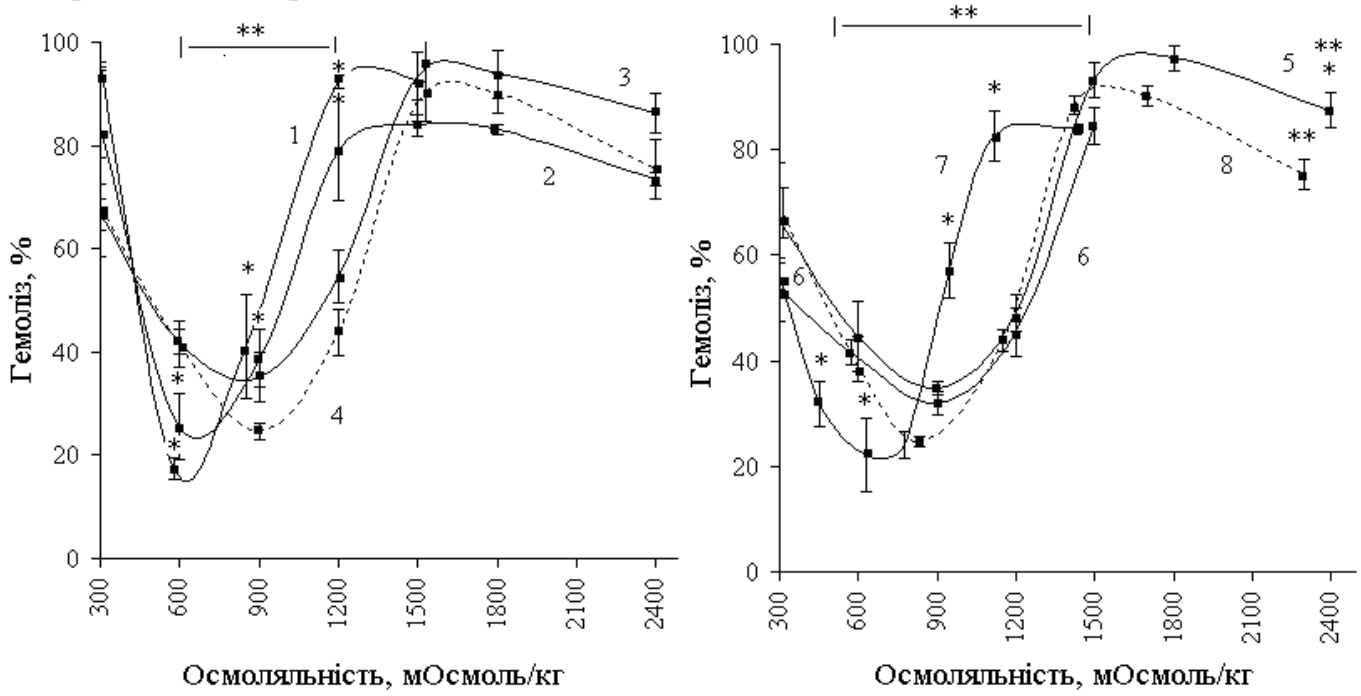


Рис. 1 Рівень гіпертонічного лізису еритроцитів у 4 M NaCl за температури 37 (А) та 0 °C (Б) після попередньої інкубації в ізотонічних розчинах тієї ж самої температури з аніонами: 1 – SCN^-; 2 – ClO_4^-; 3 – Br^-; 4 – Cl^-; 5 – Ac^-; 6 – F^-; 7 – SO_4^{2-}

Примітки: блоки M ± m, планки M ± μ, n = 6, 100 % — гемоліз дослідних проб Тритоном X-100; відмінності значущі порівняно з SCN^- та ClO_4^- (*) та з Cl^- (**), $p \leq 0,05$.

Причиною такого явища може бути посилення руйнування структури ліпідного бішару зі збільшенням хаотропних властивостей аніонів. При 0 °С виражений антигемолітичний ефект мали аніони Br^- та Ac^-.

Попередня часткова дегідратація еритроцитів у середовищах із сильними ХА і КА зсувала інтервали осмоляльності, у яких клітини стабілізуються та сенсибілізуються до гіпертонічного лізису, ліворуч відносно майже ліотропно-нейтрального Cl^- (рис. 2, 3).



А Б

Рис. 2 Залежність рівня гіпертонічного лізису еритроцитів при 37 °С у 4 М NaCl від осмоляльності середовища передінкубації для аніонів: А – хаотропних (1 – SCN^-; 2 – ClO_4^-; 3 – Br^-; 4 – Cl^-); Б – космотропних (5 – Ac^-; 6 – F^-; 7 – SO_4^{2-}) та Cl^- (8)

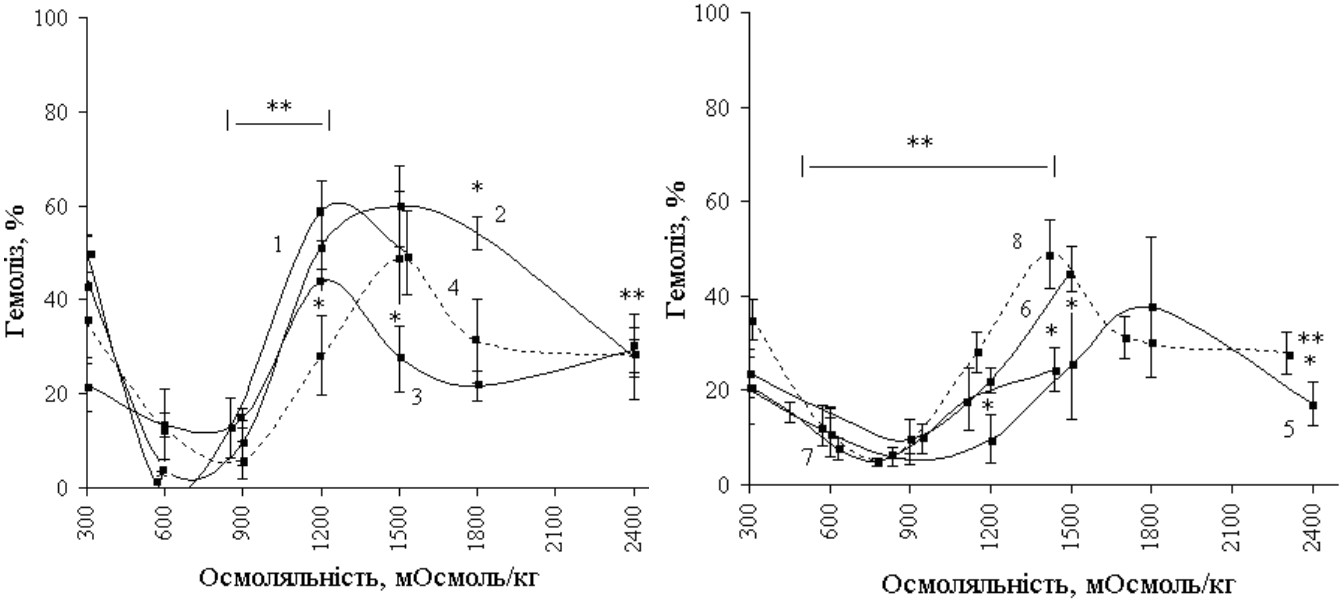
Примітки: M ± m, n = 6, 100 % — гемоліз дослідних проб Тритоном Х-100, відмінності значущі порівняно з Cl^- (*) та з рівнем гемолізу для інших осмоляльностей середовища з даним аніоном (**), $p \leq 0,05$.

Особливості впливу аніонів за температури 0 °С були проявлені сильніше (рис. 3). Так, у присутності слабохаотропного Br^- під час передінкубації у 1200 мОсмоль/кг спостерігався максимальний рівень гемолізу — (43,9 ± 3,0) %, а у 1800 мОсмоль/кг він значно зменшувався — до (21,7 ± 4,1) % (рис. 3, А, крива 3). Передінкубація зі слабокосмотропним Ac^- зсувала інтервал, у якому сенсибілізувалися еритроцити, до 1500–1800 мОсмоль/кг (рис. 3, Б, крива 5).

Слід зауважити, що КА підсилювали вплив низької температури та значно зменшували рівень пошкодження клітин (рис. 3, Б). Такий ефект можна пояснити зміною «структурної температури» (рухливості молекул): КА її знижують, а ХА підвищують (Zhang Y., 2006).

Отже, після попередньої часткової дегідратації чутливість клітин до гіпертонічного лізису з сильними ХА та КА підвищувалася, а зі слабкими —

знижувалася. Аналогічна залежність (з мінімальним кріопошкодженням у присутності слабокосмотропного Ac^-) раніше була отримана для мембран мітохондрій гепатоцитів щурів (Бондаренко Т. П., 1981).



А Б

Рис. 3 Залежність рівня гіпертонічного лізису еритроцитів при 0 °С у 4 М NaCl від осмоляльності середовища передінкубації для аніонів: А – хаотропних (1 – SCN^-; 2 – ClO_4^-; 3 – Br^-; 4 – Cl^-); Б – космотропних (5 – Ac^-; 6 – F^-; 7 – SO_4^{2-}) та Cl^- (8)

Примітки: M ± m, n = 6, 100 % — гемоліз дослідних проб Тритоном Х-100; відмінності значущі порівняно з Cl^- (*) та з рівнем гемолізу для інших осмоляльностей середовища з даним аніоном (**), $p \leq 0,05$.

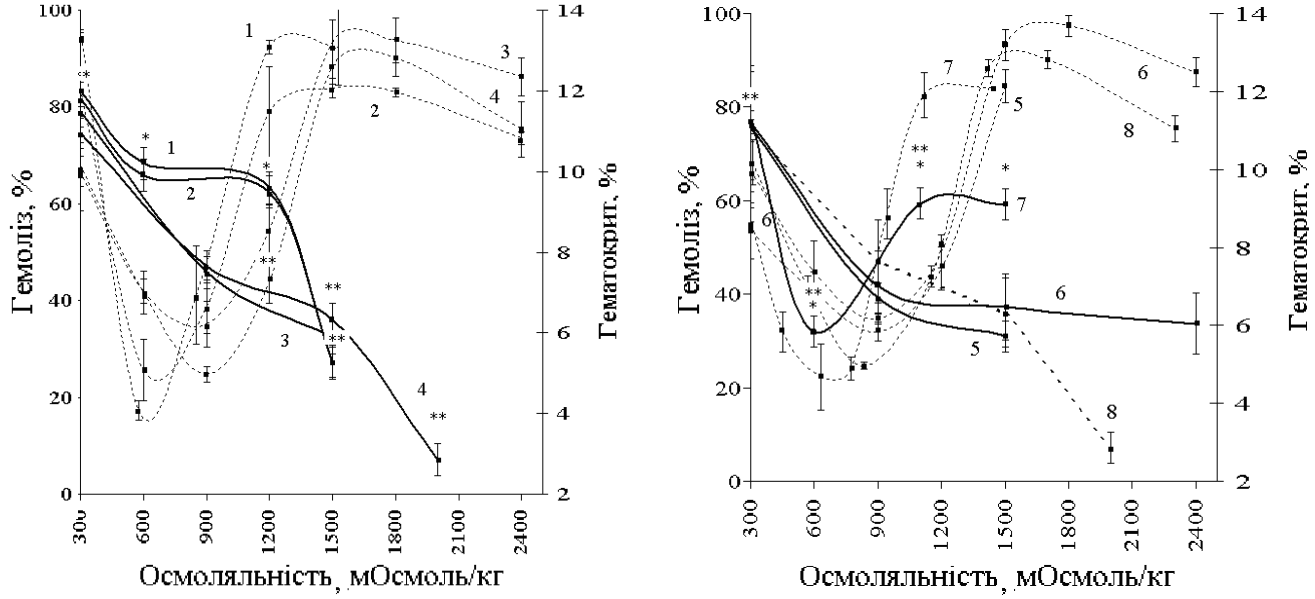
У наших дослідженнях при 0 °С Ac^- належав найбільш широкий інтервал осмоляльності середовищ передінкубації (600–1200 мОсмоль/кг), після експозиції в яких клітини зберігали стабільність. Цей аніон має ряд особливостей, які можуть бути причиною такого впливу, наприклад, іншу геометрію частинок. Тому було доцільним перевірити залежність гіпертонічного пошкодження еритроцитів від найбільш подібних до аніонів агентів із різним формфактором, якими є наночастинки (НЧ).

Значний захисний ефект – (17,8 ± 4,6) % відносно контролю — (38,0 ± 4,0) % виявила передінкубація еритроцитів саме з еліпсоїдними (30×8 нм) НЧ ($GdVO_4$:Eu^{3+}, 0,05 г/л, 60 хв). Особливий вплив таких НЧ підтверджується й іншими дослідниками (Гольцев А. Н., 2017). Отже, використання НЧ подібної форми може стати одним із ефективних шляхів запобігання кріопошкодженню та вивчення його механізмів (Гольцев А. М., 2020).

Виявити можливу різницю шляхів реалізації пошкодження при частковій дегідратації у присутності КА та ХА, можна за змінами об’єму (рис. 4) та морфологічними характеристиками еритроцитів (рис. 5).

З рис. 4 видно, що осмоляльність розчинів передінкубації, у якій клітини набувають стійкості до гіпертонічного лізису, відповідає тій, у якій змінюється характер ходу кривих, що віддзеркалюють об’єм еритроцитів. Відомо, що

стабілізація клітин свідчить про закінчення їх об'ємного зневоднення. Отже, для сильних ХА та КА даний ефект спостерігається при менших осмоляльностях, але при цьому для клітин характерна значна різниця в об'ємі.



А Б

Рис. 4 Гематокрит еритроцитів (——) у середовищах різної осмоляльності, які містять аніони: А – хаотропні (1 – SCN^-; 2 – ClO_4^-; 3 – Br^-; 4 – Cl^-), Б – космотропні (5 – Ac^-; 6 – F^-; 7 – SO_4^{2-}) та Cl^- (8, – – –) та рівень гемолізу при подальшому перенесенні у 4 М NaCl при 37 °С (-----): А – хаотропні (1 – SCN^-; 2 – ClO_4^-; 3 – Br^-; 4 – Cl^-), Б – космотропні (5 – Ac^-; 6 – F^-; 7 – SO_4^{2-}) та Cl^- (8)

Примітки: M ± m, n = 6, 100 % – гемоліз дослідних проб із Тритоном Х-100 або загальний об'єм суспензії, * – відмінності значущі порівняно з Cl^-, $p \leq 0,05$.

Порушення бар'єрної функції мембрани під час сенсибілізації клітин надає можливості ліотропним аніонам впливати на іонний баланс еритроцитів через здатність ХА «всолювати», а КА «висолювати» білки. «Всолювання» цитоплазматичних білків призводить до зв'язування з ними внутрішньоклітинних і надходження до клітини зовнішніх іонів. Це пояснює збільшений об'єм еритроцитів на початку їх сенсибілізації у присутності найбільш хаотропних аніонів SCN^- та ClO_4^- (рис. 4, криві 1 та 2 (——) при 600 мОсмоль/кг) та поступове його зменшення до найкосмотропнішого SO_4^{2-} (рис. 4, крива 7 (——) при 600 мОсмоль/кг).

При осмоляльностях середовища передінкубації, які сенсибілізують клітини, зміни гематокриту суспензій більше віддзеркалюють відмінності їх пакування через набування еритроцитами різної форми (рис. 5, В). Цим фактом обумовлено значний підйом правого крила кривої для SO_4^{2-} (рис. 4, Б, крива 7 (——) при 1200 мОсмоль/кг), коли клітини найбільш креновані (рис. 5, вариант SO_4^{2-}, В).

Добре видно, що морфологічні характеристики клітин у середовищах з осмоляльністю, яка сенсибілізує їх до гіпертонічного лізису (рис. 5, В) відрізняється у присутності різних аніонів, що характеризує їх вплив на особливості структурного зневоднення еритроцитів. Помітна різниця для сильних ХА та КА, яка віддзеркалює різні шляхи пошкодження. Під впливом ХА ClO_4^- еритроцити набували форми ехіноцитів із великими спікулами, що свідчить про плинність мембрани. Під дією сильних КА SO_4^{2-}

та F^- — трансформувалися на дуже зневоднені планоцити через її ригідність. Отже, пошкодження відбувається у присутності КА завдяки надмірній крихкості мембрани (рис. 5, SO_4^{2-}, В), а у присутності ХА – через її надмірну гнучкість (рис. 5, ClO_4^-, В).

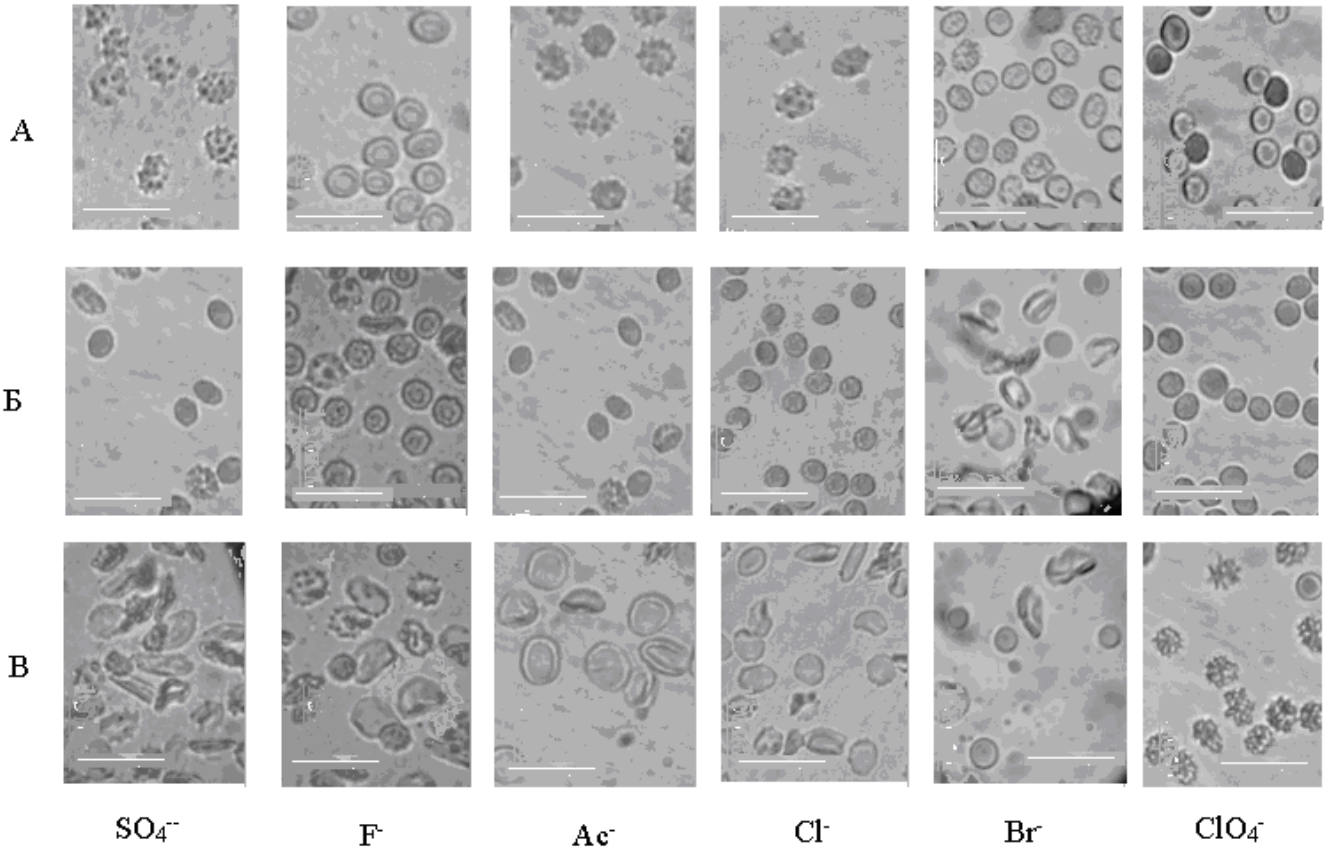


Рис. 5 Морфологічні характеристики еритроцитів, після 10-хвилинної інкубації (37 ºС) у середовищах із різними аніонами та осмоляльністю, яка відповідає фізіологічним умовам (А), мінімальному рівню гемолізу при подальшому перенесенні у 4 М NaCl для ClO_4^- і SO_4^{2-} – 600 мОсмоль/кг, для Cl^-, Ac^- та F^- – 900 мОсмоль/кг (Б), максимальному рівню гемолізу при подальшому перенесенні у 4 М NaCl для ClO_4^- і Br^- – 1200 мОсмоль/кг; для Cl^- і F^- – 1500 мОсмоль/кг та для Ac^- – 1800 мОсмоль/кг (В), масштабна лінійка – 15 мкм

Для визначення впливу аніонів на вклад білків цитоскелета у адаптацію еритроцитів до гіпертонічного лізису змінювали показник pH. У присутності ClO_4^- за температури 37 ºС та pH 5,4 була майже відсутня стабілізація клітин (за 600 мОсмоль/кг). Такий руйнівний вплив можна пояснити зниженням pH поверхні білків ХА, а також поєднанням розслаблення зв'язків у цитоскелеті через екранування протонами заряджених груп спектрину з підвищенням плинності ліпідного бішару ХА. За умов стабілізації ліпідної частини мембрани за 0 ºС такий ефект не виявлявся. Разом із тим космотропні аніони зберігають клітину від руйнування як за pH 5,4, так і за pH 8,4. Отже, для підбору pH середовищ із ліотропними аніонами потрібно враховувати їх вплив на мембранні білки.

Дослідження діелектричних характеристик суспензій еритроцитів. Для обґрунтування виявлених відмінностей впливу щодо аніонів ліотропного ряду досліджували зміни кількості зв'язаної води в суспензії еритроцитів відносно

розчинів із аніонами шляхом оцінювання декременту статичної діелектричної проникності ($\Delta\varepsilon_s$) їхніх суспензій при осмоляльності, яка сенсибілізує (рис. 6).

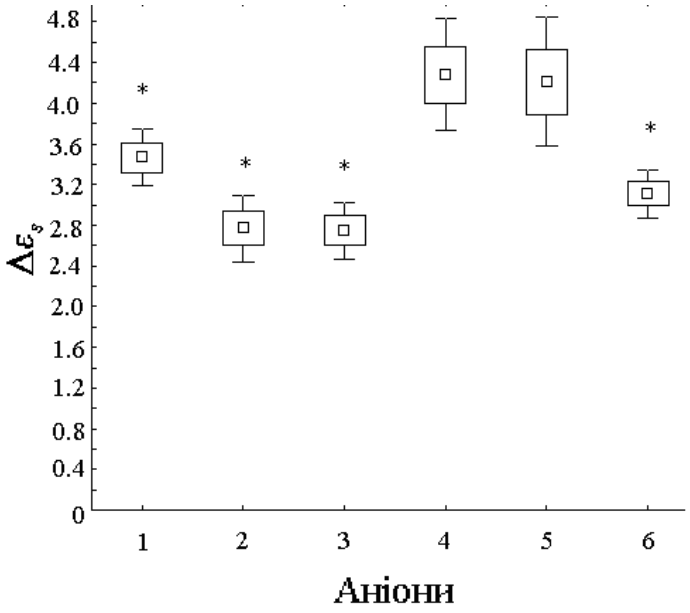


Рис. 6 Значення декременту статичної діелектричної проникності 10 % (за масою) суспензії еритроцитів у розчинах (2000 мОсмоль/кг), які містять ліотропні аніони: 1 – ClO_4^-; 2 – Br^-; 3 – Cl^-; 4 – Ac^-; 5 – F^-; 6 – SO_4^{2-}, при 20 °С

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

Максимальне збільшення значення $\Delta\varepsilon_s$ для Ac^- та F^- (рис. 6, аніони 4 та 5) свідчить про підвищену кількість зв'язаної води у суспензіях із цими аніонами. Однак для Ac^- спостерігалося й збільшення частоти діелектричної релаксації (Δf_d) молекул вільної води у суспензії еритроцитів відносно розчину (рис. 7, аніон 4).

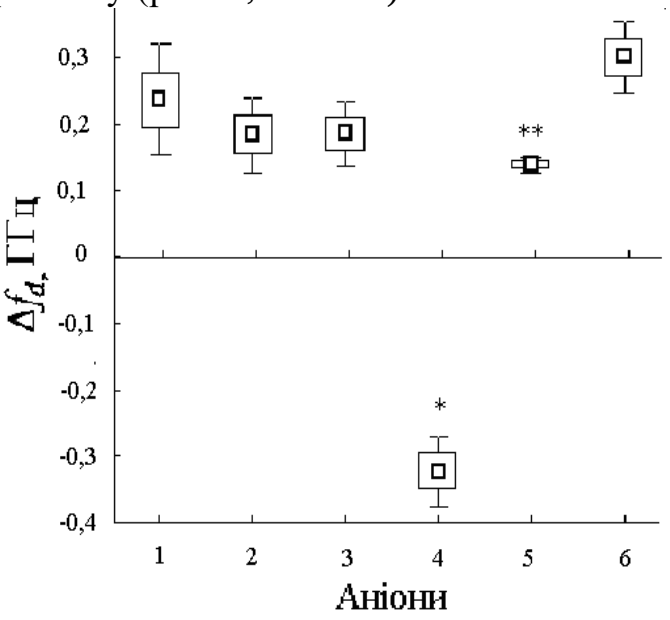


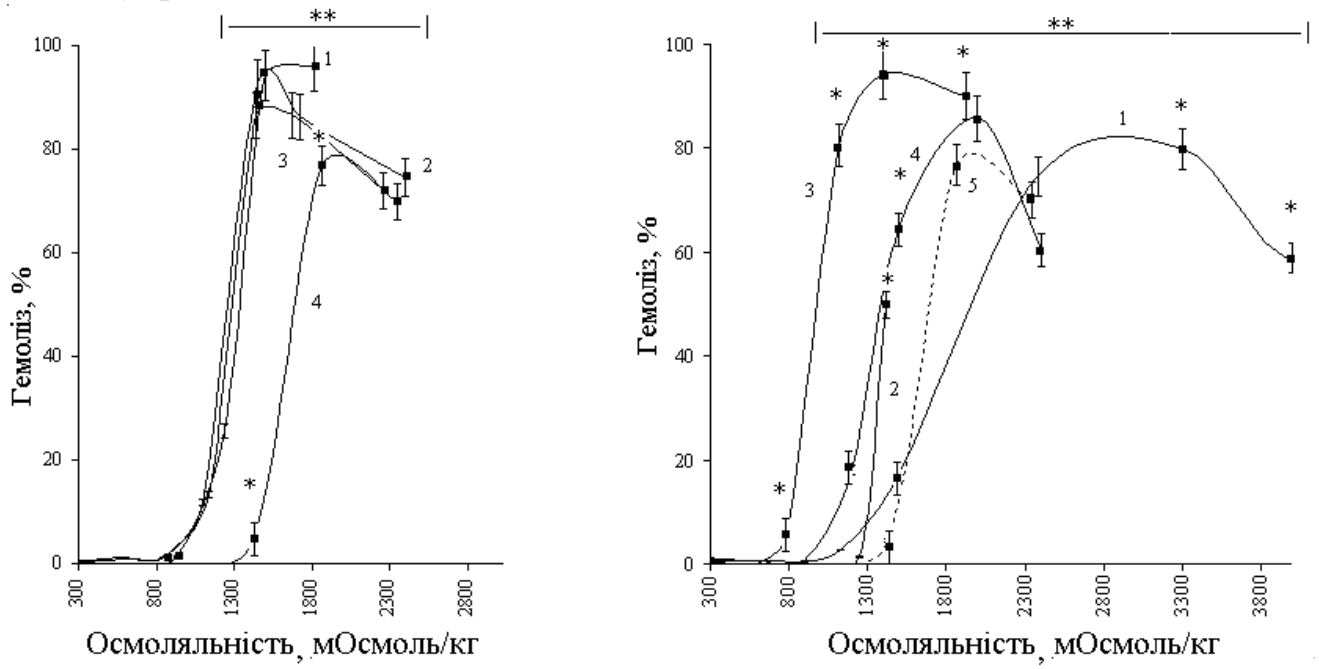
Рис. 7 Різниця між значеннями частоти діелектричної релаксації молекул води у 2000 мОсмоль/кг розчинах ліотропних аніонів і частоти діелектричної релаксації (Δf_d) молекул води у суспензії еритроцитів 10 % (за масою) при такому самому аніонному складі розчину: 1 – ClO_4^-; 2 – Br^-; 3 – Cl^-; 4 – Ac^-; 5 – F^-; 6 – SO_4^{2-}

Примітки: блоки M ± m, планки M ± μ, n = 6, відмінності значущі порівняно з Ac^- (*) та з SO_4^{2-} (**), $p \leq 0{,}05$.

Описане явище свідчить про розупорядкування вільної води після внесення клітин до розчину. Такі дані пояснюються наявністю в Ac^- великої гідратної оболонки, яка має слабкі зв'язки з аніоном. Через це вода в присутності цього аніону стає «повільною» (Rahman H. M., 2012). Таким чином, захисний ефект Ac^- обумовлений підвищенням здатності клітин зв'язувати воду, внаслідок чого знижується ступінь їх дегідратації у гіпертонічних умовах.

Дослідження впливу аніонів на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів. Залежність такого виду пошкодження клітин від осмоляльності середовища (рис. 8) мала високий рівень кореляції з даними, які характеризують ступінь гідратації клітин (див. рис. 6). Отже, залежність рівня пошкодження від положення аніона в ліотропному ряді була нелінійною, як і при гіпертонічному лізисі у розчині 4 М NaCl (див. рис. 2, 3).

У присутності слабокосмотропного Ac^- також спостерігався зсув піку пошкодження клітин до підвищених осмоляльностей (3000 мОсмоль/кг) (рис. 8, Б, крива 1), що значно перевищує дану характеристику для інших аніонів. Рівень пошкодження при ХА був майже однаковим (рис. 8, А), а у присутності КА мав значні розбіжності в осмоляльностях середовищ, у яких клітини мали найбільший рівень гемолізу (рис. 8, Б).



А Б

Рис. 8 Залежність рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів від осмоляльності середовища з різними аніонами: А – хаотропні (1– SCN^-; 2 – ClO_4^-; 3 – Br^-; 4 – Cl^-); Б – космотропні (1 – Ac^-; 2 – F^-; 3 – SO_4^{2-}; 4 – суміш 1:1 SCN^- та Ac^-) та 5 – Cl^-

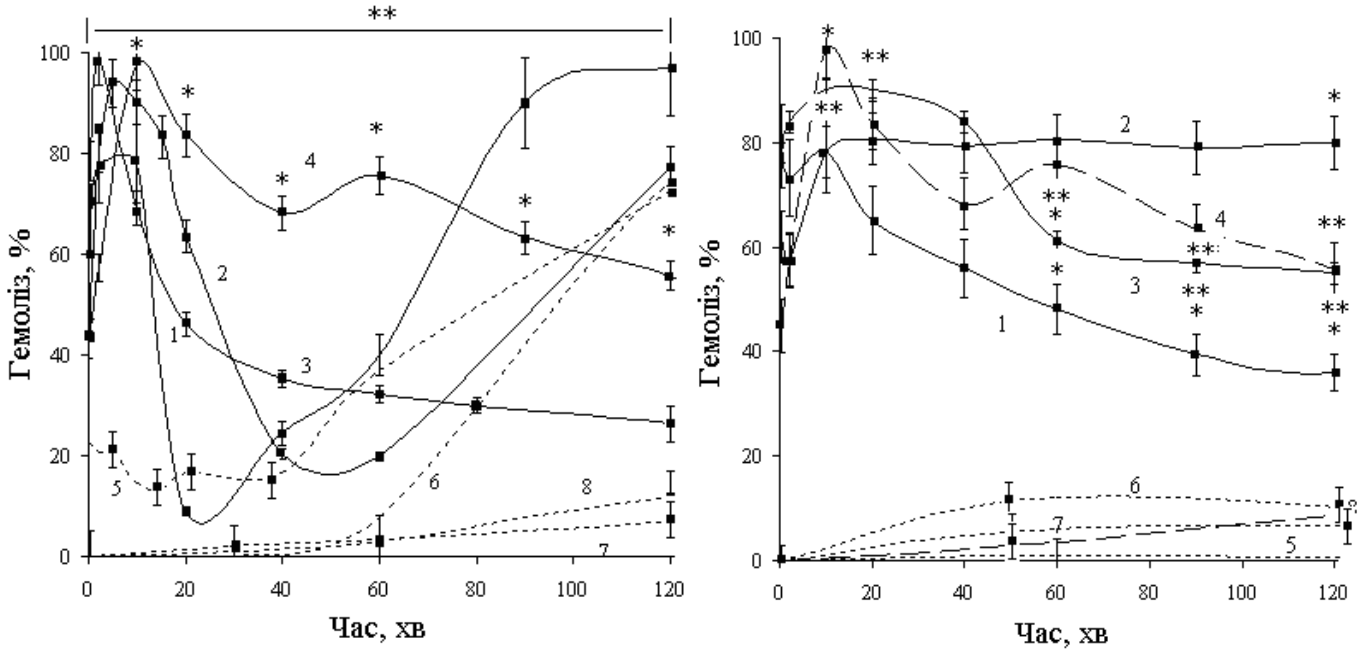
Примітки: M ± m, n = 6, 100 % — гемоліз дослідних проб Тритоном Х-100; відмінності значущі порівняно з Cl^- (*) та з рівнем гемолізу для інших осмоляльностей середовища з таким самим аніоном (**), $p \leq 0{,}05$.

Даний факт свідчить, що ступінь гідратованості обумовлює здатність еритроцитів адаптуватися до гіпертонічних пошкоджень, а також про можливість керувати ним, змінюючи ліотропні характеристики аніонів у середовищі.

Відомо, що пошкодження клітин при гіпертонічному кріогемолізі спостерігається за критичної тонічності середовища та залежить від часу передінкубації. Характерні фази такої залежності відповідають процесам, які відбуваються на мембрані еритроцитів: початкове підвищення рівня пошкодження обумовлено перебудовою

компонентів ліпідного бішару, а подальше його зниження – зменшенням градієнта концентрації іонів на мембрані (Бондаренко В. А., 1988; Гордієнко Є. О., 1997).

Виражені фази на кривих розвитку гіпертонічного кріогемолізу в часі вдалося отримати тільки при осмоляльності середовища, яка відповідала максимальній сенсибілізації клітин до цього виду пошкодження для кожного з аніонів (рис. 8, 9), що свідчить про залежність процесів адаптації від ступеня гідратації клітин.



А Б

Рис. 9 Залежність рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів від часу передінкубації при 37 ºС у середовищах із критичною осмоляльністю (яка відповідає максимальній сенсибілізації клітин до цього виду пошкодження) в присутності аніонів: А – хаотропних (1 – SCN^- при 1200 мОсмоль/кг; 2 – ClO_4^- при 1500 мОсмоль/кг; 3 – Br^- при 2400 мОсмоль/кг; 4 – Cl^- при 1800 мОсмоль/кг) та рівень пошкодження за аналогічної осмоляльності розчинів без охолодження (5 – SCN^-; 6 – ClO_4^-; 7 – Cl^-; 8 – Br^-); Б – космотропних (1 – Ac^- при 2400 мОсмоль/кг; 2 – F^- при 1300 мОсмоль/кг; 3 – SO_4^{2-} при 1900 мОсмоль/кг) та рівень пошкодження за аналогічної осмоляльності розчинів без охолодження (4 – Ac^-; 5 – F^-; 6 – SO_4^{2-})

Примітки: M ± m, n = 6, 100 % — гемоліз дослідних проб Тритоном X-100; відмінності значущі порівняно з Cl^- (*) та з показниками для інших осмоляльностей середовища з даним аніоном (**), $p \leq 0{,}05$.

Так, сильні ХА прискорювали усі вказані етапи та на 20–40-й хвилині приводили до мінімального рівня пошкодження (рис. 9, А, криві 1, 2), але потім починався інший вид гемолізу, обумовлений здатністю цих гідрофобних аніонів руйнувати ліпідний бішар (рис. 9, А, криві 5, 6). Слабохаотропний Br^- теж прискорював адаптацію еритроцитів, але не мав гемолітичного ефекту (рис. 9, криві 3 та 8). Отже, він є самим ефективним антигемолітичним агентом.

Найбільш космотропний SO_4^{2-}, напроти, уповільнював перебудову ліпідного бішару, яка закінчувалася на 40-й хвилині (рис. 9, Б, крива 3). В присутності Ac^- спостерігався менший рівень пошкодження, ніж Cl^-, але такого низького рівня

пошкодження, як у присутності Br^- на 40-й хвилині ((35,2 ± 3,2) %) (рис. 9, А, крива 3), клітини сягали лише на 120 хв ((36,0 ± 7,8) %) (рис. 9, Б, крива 1).

Отже, космотропні аніони уповільнюють процеси перерозподілу ліпідів і транспорту іонів. Слабокосмотропний Ac^- запобігає руйнуванню мембрани, але затримує її перебудову. Така здатність Ac^- дозволяє застосовувати його для захисту клітин від гіпертонічного пошкодження за тривалої передінкубації.

Блокування аніонного транспорту через мембрану 4,4′-диізотіоціанатстильбен-2,2′-дисульфоновою кислотою довело, що перенесення аніонів через мембрану не впливає на реалізацію їх ефектів (дані не наведено).

Отже, ліотропні аніони впливають на клітини, насамперед модифікуючи їхнє водне оточення. Захисний ефект слаболіотропних аніонів реалізується через «відлаштування» мембрани від негативного впливу гіпертонічного розчину двома шляхами: швидким, коли ХА «ізолюють» мембрану, накопичуючись на її поверхні, та повільним, коли КА створюють «водний буфер» навколо неї.

Адаптація еритроцитів до постгіпертонічного лізису під впливом аніонів ліотропного ряду. Регідратація клітин після перенесення з гіпертонічних (2000 мОсмоль/кг, 37 ºС) до ізотонічних (0 ºС) умов супроводжується поступовим зниженням рівня їх пошкодження відповідно до розташування аніонів у ліотропному ряді від хао- ((96,7 ± 1,1) % гемолізу для ClO_4^-) до космотропних ((37,3 ± 5,6) % гемолізу для SO_4^{2-}) (рис. 10).

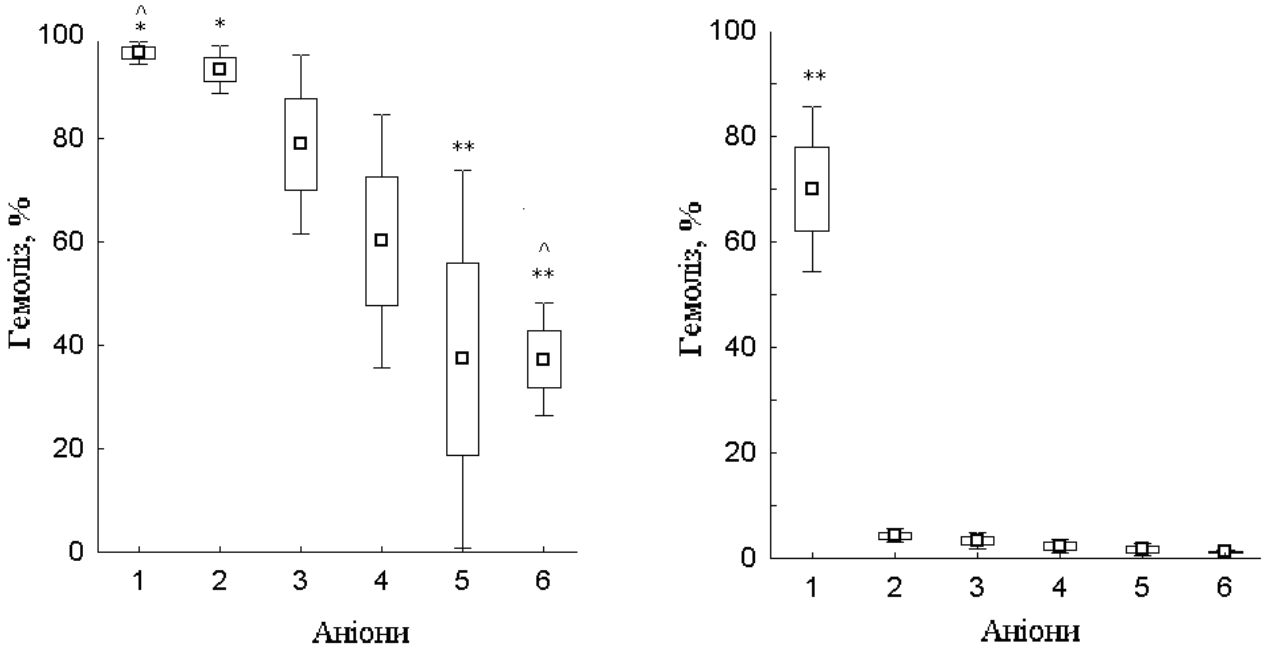


Рис. 10 Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини в ізотонічному розчині NaCl (10 хв) від виду аніона в середовищі передінкубації (1 – ClO_4^-; 2 – Br^-; 3 – Cl^-; 4 – Ac^-; 5 – F^-; 6 – SO_4^{2-}) з осмоляльністю 2000 мОсмоль/кг (10 хв) при температурних режимах 37–0 °С (А) та 37–37 °С (Б)

Примітки: блоки M ± m, планки M ± μ, n = 6, 100 % — гемоліз дослідних проб Тритоном Х-100; відмінності значущі порівняно з Cl^- (^), з космотропними аніонами F^- і SO_4^{2-} (*) та з хаотропним ClO_4^- (**), $p \leq 0,05$.

Оскільки за такого рівня осмоляльності середовища мембрана стає проникною для аніонів, то така залежність більшою мірою може бути пов’язана з описаним вище впливом ліотропних аніонів на розчинність цитоплазматичних білків. Їх «висолювання» в присутності КА не викликає додаткового надходження в клітину зовнішніх іонів у гіпертонічних умовах і води за умов регідратації (відповідно законам осмосу). Описаний ефект зберігає клітини від пошкодження через перерозтягнення мембрани (Muldrew K., 2008). Отже, КА ефективно захищають еритроцити від постгіпертонічного лізису, який моделює чинники пошкодження у процесі розморожування.

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 (SCN^-, ClO_4^- та Br^-) та космотропними (Ac^-, F^- та SO_4^{2-}) аніонами.

1. Еритроцити набували стійкості у 4 М розчині NaCl за осмоляльності середовища передінкубації 600 мОсмоль/кг у присутності сильних ХА (SCN^-, ClO_4^-) і КА (SO_4^{2-}) та за осмоляльності 900 мОсмоль/кг у присутності менш ліотропних аніонів (Br^-, Cl^-, Ac^- та F^-). Встановлено, що у високих осмоляльностях середовища передінкубації за температури 0 °С максимальний захисний ефект мають аніони слабокосмотропного Ac^- — (17,3 ± 9,6) % гемолізу (за 2400 мОсмоль/кг) та слабохаотропного Br^- — (21,7 ± 4,1) % (за 1800 мОсмоль/кг). Охолодження та низький показник pH (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- (SCN^-, ClO_4^-) і космотропних (F^-, SO_4^{2-}) аніонів, більша (2400 мОсмоль/кг) — для слаболіотропних (Br^-, Ac^-). Найефективніше зниження рівня пошкодження встановлено для Br^- і Ac^- з 20-ї хвилини передінкубації ((46,0 ± 3,5) % і (55,9 ± 11,2) % відвопідно, відносно (83,6 ± 8,1) % для Cl^-) до 120-ї хвилини ((26,5 ± 3,2) % і (36,0 ± 8,0) % відповідно, відносно (55,7 ± 7,8) % для Cl^-)).

3. Рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів залежить від розташування аніонів у ліотропному ряді та лінійно зменшується від хаотропних ((96,7 ± 1,1) % для ClO_4^-) до космотропних аніонів ((37,3 ± 5,6) % для SO_4^{2-}).

4. Морфологічні характеристики еритроцитів залежить від виду аніона в середовищі та вказує на різні шляхи сенсибілізації 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 мОсмоль/кг) у середовищах із Ac^- клітини мають максимальний рівень гідратації (декремент діелектричної проникності 10 % суспензії дорівнює 4,28 ± 0,28), а вільна вода у суспензії менш структурована, ніж у розчині (різниця частот діелектричної релаксації — (– 0,32 ± 0,03) 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 М розчині NaCl. Максимальний антигемолітичний ефект під час 60-хвилинної передінкубації мали еліпсоїдні НЧ ($GdVO_4:Eu^{3+}$, 30×8 нм, 0,05 г/л) — (17,8 ± 4,6) % відносно контролю ((38,0 ± 4,0) %). Вплив формфактора наночастинок потребує подальшого дослідження з метою пошуку ефективних шляхів підвищення кріоадаптації клітин і вивчення її механізмів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації в наукових фахових виданнях України

1. **Пакулова О.,** Бондаренко В. Морфология эритроцитов человека в растворах анионов ряда Гофмейстера. *Вісник проблем біології і медицини*. 2011. Т. 2, № 2. С. 199−200. (Внесок здобувача: *розробка концепції та дизайну експерименту, отримання результатів впливу аніонів на морфологію еритроцитів у різних концентраціях розчинів із ліотропними аніонами, їх статистичний аналіз, інтерпретація та опис даних).*

2. **Пакулова О. К.,** Бондаренко В. А., Малкович Ю. В. Особенности гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в среде содержащей анионы лиотропного ряда. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія».* 2011. Вип. 13, № 947. С. 159−165. (Внесок здобувача: *розробка концепції та дизайну експерименту, отримання результатів впливу аніонів на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів у різних концентраціях, часі та pH, статистичний аналіз, інтерпретація та опис даних).*

3. **Пакулова О. К**., Клочков В. К., Кавок Н. С., Костіна І. А., Сопотова О. С., Бондаренко В. А., Влияние наночастиц на основе редкоземельных элементов на осмотическую адаптацию эритроцитов. *Біофізичний вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*. 2017. Вип. 37, №1. С. 42−50. (Внесок здобувача: *розробка концепції та дизайну експерименту, отримання експериментальних результатів впливу наночастинок на гіпертонічний гемоліз еритроцитів, статистична обробка та інтерпретація даних).*

4. **Pakulova O. K.,** Bondarenko V. A., Kostina I. O., The lyotropic anions influence on the state of erythrocyte membrane. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. Вип. 2, № 156. С. 391−394. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-2-156-391-394. *(eLIBRARY.ru, Index Copernicus International)* (Внесок здобувача: *розробка концепції та дизайну експерименту, отримання результатів впливу аніонів на гіпертонічний лізис та об'єм еритроцитів, статистичний аналіз, інтерпретація та опис даних).*

Публікація в зарубіжному спеціалізованому виданні

5. **Pakulova O. K.,** Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Adelyanov A. V., Pastukhova S. Y., Bondarenko V. A., 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. Vol. 44, Is. 2−3 : Special issue «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology». P. 167−170. DOI: 10.1002/mawe.201300111. (Scopus) (Внесок здобувача: *розробка концепції та дизайну експерименту, отримання результатів вимірювань діелектричної проникності та провідності зразків розчинів та суспензій еритроцитів у них, статистична обробка результатів, їх інтерпретація та описання).*

Стаття в збірці матеріалів конференції

6. **Пакулова О. К.,** Верджи Л. В., Бондаренко В. А. Изучение эффекта Гофмейстера на объем эритроцитов человека в средах с повышенной тоничностью. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2013. Вып. 12, № 59 : Экспериментальная и теоретическая биофизика'13 : матер. междунар. конф. молод. ученых (г. Пущино, 21−23 окт. 2013). С. 53−55. (Внесок здобувача: розробка дизайну експерименту, одержання результатів мікрогематокритного вимірювання об'єму еритроцитів, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).

Тези конференцій

7. **Пакулова О. К.** Влияние анионов лиотропного ряда в среде дегидратации на осмотический ответ эритроцитов. *Проблемы криобиологии.* 2006. Т. 16, № 4 : *Холод в биологии и медицине 2006* : тез. конф. молод. ученых (г. Харьков 24−25 мая 2006). С. 445.

8. Бондаренко В. А., **Пакулова О. К.,** Жуйкова А. Е. Поведение клеток в неизотонических условиях: дифференцированный подход к механизмам структурных нарушений и адаптации. *Проблемы криобиологии*. 2008. Т. 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. (г. Харьков, 24−26 ноября 2008). С. 209.

9. **Pakulova O. K.** 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. молодих науковців (м. Харків, 22–25 жовт. 2010 р.). Харків, 2010. С. 73.

10. **Пакулова О. К.,** Пастухова С. Я. Влияние анионов лиотропного ряда Гофмейстера на мембранные структуры клеток. *Біологія: від молекули до біосфери* : тези доп. VI міжнар. конф. молодих науковців (м. Харків, 21−24 жовт. 2011 р.). Харків, 2011. С. 108.

11. **Pakulova O. K.,** Bondarenko V. A. Controlling the status of red blood cells by changing the properties of water. *4-th Ukrainian−German Symposium Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology 2012* : program with abstr. (Ilmenau, 18−20 Sept. 2012). Ilmenau : Ilmenau university of technology, 2012. P. 173.

12. **Пакулова О. К.** Показатели адаптации эритроцитов к критическим температурно-осмотическим условиям под влиянием эффекта Гофмейстера. *Биология – наука XXI века* : сборн. тез 17 междунар. Пущинской

школы-конфер. молодых ученых, (г. Пущино, 21−26 апр. 2013). Пущино, 2013. С. 139.

13. **Pakulova O. K.,** Klochkov V. K., Kavok N. S., Kostina I. A., Sopotova A. S., Bondarenko V. A. Effect of rare earth elements nanoparticles on the hypertonic lysis of human erythrocytes. *5-th Ukrainian−German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology* : book of abstr. (Kyiv, 21−25 Sept. 2015). Kyiv, 2015. P. 241.

Стаття, що додатково відображає матеріали дисертації

14. **Пакулова О.,** Бондаренко В. Влияние анионов ряда Гофмейстера на осмотическую выносливость эритроцитов. *Вісник проблем біології і медицини*. 2008. Т. 3, С. 23–26. (Внесок здобувача: *розробка концепції та схеми експерименту, отримання результатів впливу аніонів на гіпертонічний гемоліз еритроцитів у різних концентраціях розчинів із ліотропними аніонами, їх статистичний аналіз, інтерпретація та опис).*

АНОТАЦІЯ

Пакулова О. К. Осмотична поведінка еритроцитів людини при зміні аніонного складу середовища в умовах гіпотермії. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 − кріобіологія. — Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Вивчено вплив ліотропних аніонів (ClO_4^- < Br^- < Cl^- < Ac^- < F^- < SO_4^{2-}) на адаптацію еритроцитів людини до умов, які моделюють чинники кріопошкодження при заморожуванні-розморожуванні (гіпертонічному та постгіпертонічному шоках, гіпертонічному кріогемолізі).

Встановлено, що положення аніона в ряду впливає на рівень чутливості та морфологічні характеристики клітин через зміну гідратації їхніх структур, але не через різну проникність мембрани для них. За ступенем пошкодження клітин в гіпертонічних умовах аніони поділяються на п'ять груп: сильні хаотропні (ClO_4^- і SCN^-) та космотропні (F^- і SO_4^{2-}), які сенсибілізують клітини за гіпертонічних умов, а також слабкі хаотропний (Br^-) та космотропний (Ac^-), які адаптують клітини відносно майже ліотропно-нейтрального (Cl^-).

В умовах гіпертонічного шоку максимально захищає еритроцити слабокосмотропний Ac^- при 900 мОсмоль/кг, 0 °С і pH 7,4. За гіпертонічного кріогемолізу пошкодження еритроцитів знижують слабохаотропні Br^- і Ac^- в експозиції 60–120 хв. При регідратації після гіпертонічних умов мінімальний рівень гемолізу спостерігався у присутності F^- і SO_4^{2-}.

Показано, що хаотропні аніони нівелюють стабілізаційний вплив гіпотермії через підвищення «структурної температури» і сенсибілізують клітини при зниженні pH середовища. Космотропні аніони мають протилежні ефекти.

Шляхи реалізації ліотропних ефектів не пов’язані із проникністю аніонів через мембрану, а лежать у площині модифікації властивостей мембрани та цитоплазми клітин, пов’язані зі ступенем їх гідратації. Оцінити зміни у гідратації клітин під

впливом ліотропних властивостей розчинених частинок можна через діелектричні характеристики середовища.

Отже, важливо враховувати ліотропні властивості кріопротекторів та компонентів кріозахисних середовищ та за їх допомогою можна регулювати адаптацію клітин.

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

АННОТАЦИЯ

Пакулова О. К. Осмотическое поведение эритроцитов человека при изменении анионного состава среды в условиях гипотермии. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 − криобиология. — Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2021.

Диссертационная работа посвящена комплексному исследованию закономерностей влияния анионов лиотропного ряда (ClO_4^- < Br^- < Cl^- < Ac^- < F^- < SO_4^{2-}) на температурно-осмотическую адаптацию эритроцитов человека при моделировании основных факторов их криоповреждения (гипертонический лизис, постгипертонический лизис, гипертонический криогемолиз).

Установлено, что анионы разделяются на 5 групп: сильные хаотропные (ClO_4^-, SCN^-) и космотропные (F^-, SO_4^{2-}), которые сенсибилизируют эритроциты к гипертоническим условиям, а также слабые хаотропный (Br^-) и космотропный (Ac^-), адаптирующие клетки.

В ходе исследований выявлено, что повреждение при постгипертоническом лизисе эритроцитов снижается линейно от хаотропных ((96,7 ± 1,1) % для ClO_4^- и (93,3 ± 2,3) % для Br^-) к космотропным ((37,3 ± 5,6) % для SO_4^{2-}) анионам согласно их расположению в лиотропном ряду. Показано, что сильнохаотропный ClO_4^- повреждал клетки при регидратации даже без охлаждения.

Предложено объяснение, что из-за проникновения в клетку при осмоляльности среды прединкубации 2000 мОсмоль/кг способность хаотропных анионов «всаливать» внутриклеточные белки приводит к связыванию с ними внутриклеточных и поступлению в клетки внешних ионов, что является причиной чрезмерного растяжения мембраны и лизиса. Космотропные анионы, «высаливающие» белки, не вызывают дополнительного поступления внешних ионов.

Показано, что при переносе эритроцитов в 4 М раствор NaCl из изотонических условий уровень лизиса эритроцитов при 37 и 0 °С также линейно снижался от хаотропного к космотропному краю ряда. Причинами данного эффекта могут быть повышение текучести липидного бислоя хаотропными и снижение ее космотропными анионами.

Установлено, что при частичной дегидратации клеток в средах с анионами перед гипертоническим лизисом в 4 М растворе NaCl анионы с обоих краев

лиотропного ряда повышали чувствительность эритроцитов. Это коррелирует с уровнем гидратации клеток, который уменьшается в присутствии сильных хаотропных и космотропных анионов. Максимальная гидратация клеток происходит в присутствии Ac^-, который обладает большой гидратной оболочкой слабосвязанной воды, препятствующей обезвоживанию клетки путем создания «водного буфера».

В связи с особой продолговатой формой ацетат-аниона были исследованы наночастицы, имеющие разный формфактор. Прединкубация в течение 60 мин с наночастицами эллипсовидной формы (30×8 нм) из $GdVO_4:Eu^{3+}$ также максимально защищала эритроциты от повреждения при гипертоническом лизисе. Подбор наночастиц такой формы может быть одним из способов криозащиты.

Продемонстрировано, что изменения морфологических характеристик эритроцитов указывают на различные пути их сенсибилизации к гипертоническим условиям. В присутствии сильнохаотропных анионов клетки трансформируются в компактные эхиноциты с большим количеством развитых спикул. Присутствие сильнокосмотропных анионов превращает эритроциты в обезвоженные планоциты без спикул. Таким образом, обезвоживание клеток в присутствии хаотропных и космотропных анионов происходит разными путями: через накопление анионов на границе мембрана-вода или конкуренцию с клеткой за воду соответственно.

Осмоляльность среды прединкубации, при которой эритроциты приобретали стабильность: для SCN^-, ClO_4^- и SO_4^{2-} составляла 600 мОсмоль/кг, для Br^-, Cl^-, Ac^- и F^- – 900 мОсмоль/кг. Максимальный защитный эффект при высоких осмоляльностях среды прединкубации в 0 °C имели: слабокосмотропный Ac^- ((17,3 ± 9,6) % гемолиза) при 2400 мОсмоль/кг и слабохаотропный Br^- ((21,7 ± 4,1) % гемолиза) при 1800 мОсмоль/кг.

Обнаружено, что при гипертоническом криогемолизе для каждого из анионов существует своя критическая осмоляльность среды, при которой проявляются адаптивные процессы в мембране: для SCN^- – 1200; ClO_4^- – 1500; Br^- – 2400; Cl^- – 1800; Ac^- – 2400; F^- – 1300 и SO_4^{2-} – 1200 мОсмоль/кг. Установлено, что на 20 мин прединкубации относительно Cl^- ((83,6 ± 8,1) % гемолиза) защитный эффект имеют слабохаотропный Br^- ((46,0 ± 3,5) % гемолиза) и слабокосмотропный Ac^- ((55,9 ± 11,2) % гемолиза). В дальнейшем этот антигемолитический эффект усиливается и к 120 мин составляет, соответственно, (26,5 ± 3,2) % и (36,0 ± 8,0) % относительно (55,7 ± 7,8) % гемолиза для Cl^-.

Блокирование анионного транспорта доказало, что обнаруженные эффекты анионов не реализуются через разную проницаемость мембраны для них.

Полученные результаты позволяют утверждать, что лиотропные анионы — модификаторы мембраны через трансформацию ее водного окружения. Защитный эффект реализуется через «отстройку» мембраны от повреждающего влияния раствора и имеет два типа: быстрый — слабохаотропный (при котором анионы «изолируют» мембрану, накапливаясь на ее поверхности) и медленный — слабокосмотропный (при котором около мембраны создается «буфер» слабосвязанной с анионами воды).

Дальнейшие исследования лиотропного эффекта помогут более глубоко изучить механизмы криоповреждения и разработать новые подходы к составлению криозащитных сред и подбору криопротекторов.

Ключевые слова: состав криозащитной среды, хаотропные анионы, космотропные анионы, эритроциты человека, клеточная мембрана, гипертонический лизис, гипертонический криогемолиз, постгипертонический лизис, наночастицы, диэлектрическая проницаемость.

ANNOTATION

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

Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences in speciality 3.00.19 – cryobiology. — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The aim of this work was to study the effect of lyotropic anions (ClO_4^- < Br^- < Cl^- < Ac^- < F^- < SO_4^{2-}) on the adaptation of human erythrocytes to conditions simulating the factors of cryodamage during freezeng-thawing processes (hypertonic and posthypertonic shocks, hypertonic cryo-hemolysis).

It was found that the position of the anion in the lyotropic series affected the level of sensitivity and morphology of cells by changing the hydration of their structures, but not because of the different permeability of these anions through the membrane. According to the effect on cell damage under hypertonic conditions, the anions can be categorized in five types: strong (ClO_4^-, SCN^-) and weak (Br^-) chaotropic, lyotropic neutral (Cl^-), as well as weak (Ac^-) and strong (F^-, SO_4^{2-}) kosmotropic. Strong lyotropic effects of ions sensitize cells in hypertonic conditions. Weak kosmotropic Ac^- protects erythrocytes during the hypertonic shock, especially at 900 mOsmol/kg, 0 °C and pH 7.4. During hypertonic cryo-hemolysis, weak chaotropic Br^- and Ac^- reduced the damage at prolonged exposure (60–120 min). In the course of rehydration after hypertension, the minimum level of hemolysis was observed in the presence of F^- and SO_4^{2-} anions.

It was shown that chaotropic anions neutralized the stabilizing effect of hypothermia due to an increase of "structural temperature" and sensitized the cells with a decrease in the pH of the medium. Kosmotropic anions showed opposite effects.

In hypertonic sensitization in the presence of strong kosmotropic anions, erythrocytes are transformed into dehydrated discocytes, and in presence of chaotropic ones, they did into compact echinocytes with large spicules.

Lyotropic anions can be used to regulate cell adaptation under hypothermic storage.

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Ac^- — ацетат-аніон; ГК — гіпертонічний кріогемоліз; КА — космотропні аніони; НЧ — наночастинки; ХА — хаотропні аніони.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 23.03.2021

Формат 60 х 84 1/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.

Друк ксерографічний. Ум. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам. №