

DOI: 10.33741/3083-6883.43.01

УДК 612.111:577.352.4:678.744.7

ВИЗНАЧЕННЯ КОЕФІЦІЄНТІВ ПАСИВНОЇ ПРОНИКНОСТІ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ДЛЯ КРІОПРОТЕКТОРІВ У ПРИСУТНОСТІ ПОЛІВІНІЛОВОГО СПИРТУ

Гвоздюк Я. В., Коваленко С. Є., Тимофєєва О. В., Македонська В. О.,
Гуріна Т. М.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

Анотація

Мета. Визначити коефіцієнти пасивної проникності мембран еритроцитів людини для диметилсульфоксиду, гліцерину та 1,2-пропандіолу за наявності полівінілового спирту та оцінити його цитотоксичний ефект залежно від концентрації.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були еритроцити донорської крові людини групи А (II), які зберігалися не більше 48 годин за температури $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Коефіцієнти проникності мембран еритроцитів для молекул різних кріопротекторів визначали методом малокутового розсіювання світла. Концентрацію вільного гемоглобіну в надосадовій рідині та загального гемоглобіну клітинної суспензії оцінювали гемоглобінціанідним методом із використанням набору «Гемоглобін СпЛ 200» (Україна). Показники гематокриту визначали мікрогематокритним методом.

Результати. Дослідження впливу полівінілового спирту (9 кДа) на проникність мембран еритроцитів людини для низки кріопротекторів показали, що коефіцієнти проникності для диметилсульфоксиду та 1,2-пропандіолу достовірно зростають при додаванні 0,1 % полівінілового спирту, після чого спостерігається поступове зниження цих показників із подальшим збільшенням концентрації полівінілового спирту до 1,0 %. Коефіцієнт проникності мембран еритроцитів для гліцерину у присутності полівінілового спирту демонструє достовірне лінійне зростання пропорційно збільшенню концентрації останнього (0,1–1,0) %. Інкубування еритроцитів людини з полівініловим спиртом у вказаному діапазоні концентрацій впродовж 60 хв за температури $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ не призводило до підвищення рівня гемолізу еритроцитів.

Висновки. Полівініловий спирт з молекулярною масою 9 кДа підвищує проникність мембран еритроцитів людини для молекул диметилсульфоксиду, 1,2-пропандіолу та гліцерину, що скорочує час насичення клітин кріопротектором і зменшує загальний час процедури кріоконсервування, при цьому не проявляючи цитотоксичної дії на еритроцити донорської крові.

Ключові слова: кріопротектори, полівініловий спирт, еритроцити людини, коефіцієнти проникності, цитотоксичність.

DETERMINATION OF PASSIVE PERMEABILITY COEFFICIENTS OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES FOR CRYOPROTECTORS IN THE PRESENCE OF POLYVINYL ALCOHOL

Hvozdiuk Ya. V., Kovalenko S. Y., Tymofeeva O. V., Makedonska V. O.,
Gurina T. M.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Abstract

Aim of the study was to determine the passive permeability coefficients of human erythrocyte membranes for dimethyl sulfoxide, glycerol, and 1,2-propanediol in the presence of polyvinyl alcohol, and to evaluate its cytotoxic effect at varying concentrations.

Materials and Methods. The objects of the study were erythrocytes from human donor blood group A (II), which were stored for no more than 48 hours at a temperature of $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. The permeability coefficients of erythrocyte membranes for molecules of various cryoprotectants were determined by the small-angle light scattering method. The concentration of free hemoglobin in the supernatant and total hemoglobin of the cell suspension was estimated by the hemoglobin cyanide method using the Hemoglobin SpL 200 kit (Ukraine). Hematocrit values were determined by the microhematocytic method.

Results. Studies of the influence of polyvinyl alcohol (9 kDa) on the permeability of human erythrocyte membranes for a number of cryoprotectants showed that the permeability coefficients for dimethyl sulfoxide and 1,2-propanediol significantly increase with the addition of 0.1% polyvinyl alcohol, after which a gradual decrease in these indicators is observed with a further increase in the concentration of polyvinyl alcohol to 1.0%. The permeability coefficient of erythrocyte membranes for glycerol in the presence of polyvinyl alcohol demonstrates a significant linear increase in proportion to the increase in the concentration of the latter (0.1 – 1.0%). Incubation of human erythrocytes with polyvinyl alcohol in the specified concentration range for 60 min at a temperature of $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ did not lead to an increase in the level of erythrocyte hemolysis.

Conclusions: Polyvinyl alcohol with a molecular weight of 9 kDa increases the permeability of human erythrocyte membranes for dimethyl sulfoxide, 1,2-propanediol and glycerol molecules, which reduces the time of saturation of cells with cryoprotectant and reduces the total time of the cryopreservation procedure, while not exhibiting a cytotoxic effect on donor blood erythrocytes.

Keywords: cryoprotectants, polyvinyl alcohol, erythrocytes, permeability, cytotoxicity.

Вступ

На сьогоднішній день у зв'язку з проведенням бойових дій на території України існує постійна потреба в необмежених запасах донорської крові людини всіх груп. Дуже важливою як для військових, так і для цивільного населення, є наявність швидкого доступу до еритроцитів донорської крові та своєчасного відновлення об'єму циркулюючої крові. У зв'язку з цим, актуальною проблемою сучасної трансфузіології є розробка нових

комбінованих кріозахисних розчинів для забезпечення достатніх запасів кріоконсервованої донорської крові.

Сучасні розчини, що пропонуються, мають сприяти підвищенню збереженості компонентів крові після кріоконсервування за рахунок зниження пошкодження клітин на етапах заморожування-відтавання. Відомо, що саме зміни у структурі біологічних об'єктів, які відбуваються під час фазових перетворень льоду є основною причиною загибелі клітин, що кріоконсервуються. Традиційні кріопротектори у складі кріозахисних розчинів для кріоконсервування крові (диметилсульфоксид і гліцерин) в концентраціях, які зазвичай використовують, в повній мірі не нивілюють наслідки кристалізації та рекристалізації льоду під час заморожування-відтавання [1].

Тому увагу вчених все більше привертають синтетичні водорозчинні гідроксилвмісні полімери, такі як полівініловий спирт, який є потужним інгібітором рекристалізації льоду [2]. Полівініловий спирт забезпечує стабілізацію мембрани, є біосумісним, легко видаляється після розморожування. Він є перспективним щодо створення нових комбінованих кріопротекторів для заморожування та довготривалого зберігання донорської крові людини, зокрема еритроцитів [3, 4]. Це відкриває можливість подальших досліджень, в результаті яких будуть надані рекомендації щодо зниження концентрацій основних кріопротекторів без втрати показників кінцевої збереженості біологічного матеріалу.

Коефіцієнти проникності клітинних мембран для води і кріопротекторів є важливими параметрами, які впливають на часові характеристики масообміну між клітинами і середовищем на етапах низькотемпературного консервування.

Мета роботи – визначити коефіцієнти пасивної проникності мембран еритроцитів людини для диметилсульфоксиду, гліцерину та 1,2-пропандіолу за наявності полівінілового спирту та оцінити його цитотоксичний ефект залежно від концентрації.

Матеріали і методи. Дослідження здійснювали на еритроцитах донорської крові людини групи А (II), заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир» у Харківському обласному центрі переливання крові, яка зберігалась не більше 48 годин за температури $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Еритроцити отримували центрифугуванням донорської крові за 1250 g протягом 25 хв.

У роботі використовували полівініловий спирт (ПВС) з м. м. 9 кДа («Sigma-Aldrich», США) та кріопротектори – диметилсульфоксид (ДМСО) (CAS, США), гліцерин (BASF, Німеччина) та 1,2-пропандіол (1,2-ПД) (Укрторгресурс, Україна).

Для дослідження цитотоксичної дії на еритроцити розчини ПВС з концентраціями 0,1; 0,2; 0,5 та 1,0 мас. % готували на основі 0,1 М фосфатно-сольового буфера (рН 7,4). Після 24-годинної витримки за температури $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ розчини ПВС по краплях протягом 5 хв додавали до еритроконцентрату у співвідношенні 1:1 за об'ємом. Пошкоджуючу дію ПВС на еритроцити вивчали після 60 хв. експозиції.

Концентрацію вільного гемоглобіну в надосадовій рідині і загального гемоглобіну клітинної суспензії визначали гемоглобінціанідним методом за допомогою набору «Гемоглобін Спл 200» (Україна), процент гемолізу еритроцитів у надосаді розраховували, як описано в роботі [5]. Показник гематокриту визначали центрифугуванням на центрифугі СМ-70 суспензії еритроцитів, вміщеної у спеціальні капіляри.

Для визначення коефіцієнтів пасивної проникності мембран еритроцитів людини для кріопротекторів були отримані кінетичні криві гемолізу еритроцитів в 1М водних розчинах досліджуваних речовин методом малокутового розсіювання світла [6]. Принцип реєстрації світла, розсіяного на різні кути, давно використовується для визначення розмірів клітин. Розсіювання світла біологічними суспензіями визначається неоднорідностями, якими є вміщені в рідину клітини і макромолекули. Взаємні відстані, які втричі перевищують радіус частинок, є достатніми для того, щоб вважати їх

незалежними розсіювачами. Концентрація еритроцитів у крові становить $\sim 5 \times 10^9$ кл/мл. Таким чином, достатньо розвести кров приблизно в тисячу разів, щоб виконувалася умова незалежності розсіювачів. Якщо розмір частинок приблизно співпадає з довжиною падаючої хвилі, то головний внесок в екстинкцію вносить розсіювання, а не поглинання. Для еритроцитів оптимальна довжина хвиль, що падають на суспензію, становить ~ 1 мкм. При цьому, зазвичай, вважається, що внеском мембрани в розсіювання можна знехтувати, і розчинені всередині клітини речовини рівномірно розподілені по об'єму клітини [7].

Спосіб вимірювання коефіцієнтів проникності еритроцитів для кріопротекторів ґрунтується на фізико-математичній моделі гіпотонічного гемолізу еритроцитів людини [8]. Теорія процесу гіпотонічного гемолізу в комбінації з теорією розсіювання дозволяє розрахувати залежність інтенсивності розсіяного під певним кутом світла із заданою довжиною хвилі від часу при різних значеннях коефіцієнта проникності мембран еритроцитів для розчиненої в позаклітинному середовищі проникної речовини. Після відповідного підбору значення коефіцієнта проникності експериментальна та теоретична криві збігаються. Саме шляхом суміщення експериментальної залежності та теоретичної кривої, розрахованої за відповідних значень коефіцієнта проникності, і визначається останній параметр.

Інтенсивність розсіяного суспензією еритроцитів людини світла під кутом 9° у напрямку до пучка, що падає, вимірювали за допомогою пристрою, розробленого у відділі НТК ІПКіК НАНУ та виготовленого науково-виробничою фірмою “Кріокон” (м. Харків). Пристрій складається з кюветної камери із системою первинної обробки сигналу, термостату для підтримки температури кюветної камери на заданому рівні та системи реєстрації результатів вимірювань. У ході проведення експерименту на екран монітора виводяться значення інтенсивності світла, розсіяного зразком з розчином

(нульова лінія), поточне значення та часова залежність інтенсивності розсіяного суспензією клітин світла. Усі дані зберігаються у файлі експерименту.

За даними експериментальної кривої гіпотонічного гемолізу еритроцитів людини визначали час 50 % гемолізу ($t_{1/2}$), при якому інтенсивність розсіяного суспензією еритроцитів світла падає до значення, що відповідає виходу з клітини половини гемоглобіну, який спочатку містився в ній. Коефіцієнт проникності (K_1) визначали за виміряним часом $t_{1/2}$ з графіка теоретичної залежності, розрахованої на основі фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу еритроцитів людини у водному розчині проникної речовини при відповідних значеннях коефіцієнта проникності [6, 8].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми «Statgraphicsplusfor Windows 2.1» («ManugisticsInc», США) за непараметричним критерієм Манна–Уїтні. Експериментальні дані приведені як середнє арифметичне $\pm$ середнє квадратичне відхилення. Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Було проведено серію експериментів по визначенню коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів донорської крові для молекул ДМСО, 1,2-ПД і гліцерину у присутності ПВС різної концентрації (від 0,1 % до 1,0 %).

Як видно з табл. 1, коефіцієнти проникності мембран еритроцитів для молекул ДМСО та 1,2-ПД достовірно зростають при додаванні 0,1 % ПВС, після чого спостерігається поступове зниження цих показників із подальшим збільшенням концентрації ПВС у розчинах. Натомість коефіцієнт проникності мембран еритроцитів для молекул гліцерину у присутності ПВС демонструє достовірне лінійне зростання пропорційно збільшенню концентрації ПВС.

Таблиця 1. Коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для молекул ДМСО, 1,2-ПД та гліцерину в присутності ПВС різної концентрації (n=6)

Концентрація ПВС (м.м. 9 кДа)	Коефіцієнт проникності мембран еритроцитів, $K_1 \times 10^7, \text{м/с}$		
	ДМСО	1,2-ПД	Гліцерин

Контроль (без ПВС)	$3,46 \pm 0,29$	$10,07 \pm 1,37$	$0,58 \pm 0,15$
0,1%	$4,69 \pm 0,41^*$	$13,05 \pm 1,41^*$	$0,95 \pm 0,22^*$
0,2%	$3,69 \pm 0,44$	$9,28 \pm 1,68$	$1,40 \pm 0,10^*$
0,5%	$3,31 \pm 0,21$	$10,66 \pm 0,54$	$1,44 \pm 0,02^*$
1%	$3,02 \pm 0,16$	$9,88 \pm 2,52$	$1,57 \pm 0,04^*$

Примітка: * - достовірно відрізняється від відповідного контролю, при $p < 0,05$

Хоча ДМСО і 1,2-ПД проникають крізь мембрани еритроцитів однаково швидко, проте вони характеризуються суттєво різними коефіцієнтами розподілу між гідрофобною фазою і водою (0,247 та 0,076 відповідно). Раніше [9,10] було показано, що молекули кріопротекторів можуть проникати як через білкові гідрофільні канали, так і через ліпідний бішар. Відсоткове співвідношення потоків речовин цими шляхами відрізняється внаслідок відмінності фізико-хімічних та геометричних параметрів, зокрема їхню гідрофільності або гідрофобності. ДМСО, з одного боку, виявляє виражені гідрофільні властивості (розчинність, висока енергія Н-зв'язку з молекулами води). З іншого боку, наявність у молекулі 2-х метильних груп забезпечує його здатність взаємодіяти з ліпідними компонентами мембран, про що свідчить значення коефіцієнта розподілу ДМСО в системі «неполярна фаза–вода» ($K_p=0,247$) [10]. Високу швидкість дифузії гідрофільного 1,2-ПД в еритроцити людини можна пояснити малими розмірами його молекули (діаметр $3,7\text{\AA}$, об'єм $53,7\text{\AA}^3$), і стверджувати, що основний шлях його транспорту в клітину – білкові водні канали[9].

Гліцерин є найбільш гідрофільним із відомих кріопротекторів. Його коефіцієнт розподілу між гідрофобною фазою та водою становить лише 0,005 [11,12], що на порядок менше, ніж у етиленгліколю ($K = 0,04$) та 1,2-ПД ($K = 0,076$) [9]. Через це його проникнення крізь ліпідний бішар мембран надзвичайно утруднене. Висока гідрофільність також забезпечує міцний зв'язок молекул гліцерину з гідратною оболонкою.

У мембранах еритроцитів людини існують спеціальні канали, утворені білком AQP3, через які гліцерин проникає в клітини [13]. AQP3 демонструє більш складну поведінку, ніж можна було б очікувати від фізичної пори. Сьогодні вважається, що механізм опосередкованого AQP3 транспорту

гліцерину включає утворення послідовних водневих зв'язків між молекулою гліцерину та білком [14].

Зміни коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для кріопротекторів у присутності ПВС, ймовірно, зумовлені його впливом на стан мембрани. При цьому різні напрями змін проникності для ДМСО та 1,2-ПД порівняно з гліцерином відображають відмінні механізми їх проникання. ДМСО та 1,2-ПД можуть проходити через мембрану як ліпідним шляхом, так і білковими каналами. Натомість гліцерин проникає в клітини через каналний білок AQP3 за механізмом, що включає розрив водневих зв'язків молекул гліцерину з водою та послідовне формування водневих зв'язків із AQP3 [13, 14].

Автори роботи [15] показали, що під час формування сфероїдів з МСК на субстраті з ПВС збільшується текучість клітинних мембран. Зміна текучості клітинної мембрани може вплинути на її проникність для малих молекул. Крім того, гідрофільний полімер, який має гідроксильні групи, може конкурувати з гліцерином за молекули води, зменшуючи таким чином енергію зв'язку молекул гліцерину зі своєю гідратною оболонкою, що полегшить розрив водневих зв'язків молекул гліцерину з водою та формування водневих зв'язків із AQP3.

На наступному етапі роботи було проведено дослідження цитотоксичної дії розчинів ПВС на еритроцити до процедури заморожування. В таблиці 2 наведено показники значення гемолізу та гематокриту в суспензії еритроцитів людини до заморожування, отримані після експозиції в розчинах ПВС протягом 60 хв. за температури 20 °С.

Таблиця 2. Вплив ПВС з м.м. 9 кДа на гемоліз еритроцитів

Досліджена речовина	Концентрація, %	Гемоліз, %	Гематокрит, %
Контроль	—	0,01±0,01	40,0±2,1
ПВС	0,1	0,02±0,01	41,6±2,0
	0,2	0,02±0,01	43,1±3,1
	0,5	0,01±0,01	43,0±4,1
	1	0,02±0,01	34,4±2,0

Як видно з таблиці 2, після 60 хв експозиції еритроцитів у розчинах ПВС з молекулярною масою 9 кДа гемоліз не змінюється достовірно порівняно з контролем, тоді як показник гематокриту зазнає незначного зниження при використанні 1 %-го розчину.

Полівініловий спирт – синтетичний водорозчинний полімер аліфатичного ряду, що має гідроксильні групи, вважається фізіологічно нейтральною речовиною. Так, методом атомно-силової мікроскопії [16] було показано, що досліджені в роботі полікатіонні полімери (полі-L-лізин, поліетиленімін та діетиламіноетилдекстран) та сфероподібні дендримери поліамідоаміну викликають утворення та/або розширення вже існуючих дефектів у нанесених бішарах 1,2-диміристоїл-sn-гліцери-3-фосфохоліну у діапазоні концентрацій 1 - 3 мкг/мл, тоді як нейтральні лінійні поліетиленгліколь та полівініловий спирт, що містять гідроксили, не індують утворення та не збільшують розмір вже існуючих дефектів в тому ж діапазоні концентрацій. Це узгоджується з нашими даними про те, що експозиція еритроцитів людини в розчинах ПВС протягом 60 хв не спричиняє їх гемолізу.

Зменшення гематокриту суспензії еритроцитів за незмінної кількості клітин в ній може бути пов'язано зі зменшенням об'єму клітин внаслідок їхнього сплюснення за дії компонентів розчину. Так, ПВС, змінюючи текучість клітинної мембрани, може впливати також і на взаємодію мембрани з цитоскелетом [15], що в свою чергу спричиняє зміну форму клітин. Іншим чинником, який впливає на величину гематокриту суспензії, може бути часткове екранування поверхневого заряду клітин молекулами полімеру, що призведе до щільнішої упаковки клітин за однакових режимів центрифугування. Для з'ясування, який з розглянутих механізмів спричинює зменшення величини гематокриту при збільшенні концентрації ПВС до 1 %, необхідно провести додаткові дослідження.

Отже, ПВС з молекулярною масою 9 кДа демонструє відсутність значущої цитотоксичної дії та може вважатися безпечним для еритроцитів людини під час заморожування.

Висновки

1. Присутність ПВС у концентрації 0,1 % достовірно підвищує коефіцієнт проникності мембран еритроцитів людини для молекул диметилсульфоксиду та 1,2-пропандіолу. Це дозволяє скоротити час насичення еритроцитів цими кріопротекторами перед заморожуванням, що в свою чергу зменшує загальний час процедури кріоконсервування.
2. ПВС у концентраціях 0,1–1,0 % підвищує коефіцієнт проникності мембран еритроцитів для молекул гліцерину, що зменшує час насичення клітин кріопротектором і скорочує тривалість процедури еквілібрації в кріозахисному розчині.
3. Проведені дослідження з визначення показників цитотоксичного впливу розчинів ПВС на еритроцити до заморожування показали, що ПВС з м. м. 9 кДа є нетоксичною речовиною для еритроцитів донорської крові людини і може використовуватися під час кріоконсервування.

Інформація про джерела фінансування. Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи відділу низькотемпературного консервування Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України “Теоретичне та експериментальне дослідження електричних характеристик клітинних мембран на етапах кріоконсервування та їх взаємозв’язку зі здатністю клітин до адгезії на плоских поверхнях та в об’ємних конструкціях”(№ державної реєстрації 0121U108756).

Інформація про конфлікт інтересів. Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Література

1. Liang Y, Binlin C, Kongying Z, Lixia R, Xiaoyan Y. Development of macromolecular cryoprotectants for cryopreservation of cell. Am. J. Macromol. Rapid commun. 2024;45(19):2400309. DOI: [10.1002/marc.202400309](https://doi.org/10.1002/marc.202400309).
2. Panagiotis G, Kinney N, Kontopoulou I, et al. Poly(vinyl alcohol) Molecular Bottlebrushes Nucleate Ice. Biomacromolecules. 2022;23(12):5285-5296. DOI: [10.1021/acs.biomac.2c01097](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01097).
3. Yuying H, Xiangjian L, Wenqian Z, Jiangming C, Xiaoxiao C, Songwen T. Inulin can improve red blood cell cryopreservation, stabilizing cell membranes and inhibiting ice recrystallization. ACS Biomater. Sci. Eng. 2024;10(2):851-62. DOI: [10.1021/acsbiomaterials.3c01463](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01463).

4. Gao S. Development of icephilic active glycopeptides for cryopreservation of human erythrocytes. *Biomacromolecules*. 2022;23(2):530-42. DOI: [10.1021/acs.biomac.1c01372](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01372).
5. Інститут гематології та трансфузіології АМН України. Організація контролю якості консервованої донорської крові та її компонентів. Методичні рекомендації. Київ, 2006. 17 с. [Institute of Hematology and Transfusiology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine. Organization of quality control of preserved donor blood and its components. Methodological recommendations. Kyiv, 2006. 17 p.]
6. Гордієнко ЄО, Гордієнко ОІ, Гордієнко ЮЄ, Коваленко ІФ, видахідники; Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин. Патент України №. 41098А. 2001 Серп 15. [Gordienko EO, Gordienko OI, Gordienko YuE., Kovalenko IF. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, patent owner. Method for determining the permeability coefficient of erythrocytes for electrically neutral substances. Patent of Ukraine №. 41098A. 2001 Aug 15.]
7. Meyer RA. Light scattering from biological cells: dependence of backscatter radiation on membrane thickness and refractive index. *Appl. Opt.* 1979;18:585-588. DOI: [10.1364/AO.18.000585](https://doi.org/10.1364/AO.18.000585).
8. Gordienko EA, Gordienko OI, Gordienko YuE. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *CryoLetters*. 2003;24(4):229-244.
9. Gordiyenko OI, Linnik TP, Gordiyenko EO. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. *Bioelectrochemistry*. 2004;62(2):119-122. DOI: [10.1016/j.bioelechem.2003.08.003](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.08.003).
10. Коваленко ГВ, Коваленко ІФ, Лінник ТП. Механізм транспорту ДМСО, гліцерину та етиленгліколю крізь мембрани еритроцитів криси та кролика. Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія. 2009;10:109-116. [Kovalenko GV, Kovalenko IF, Linnik TP. Mechanisms of transport of DMSO, glycerol and ethylene-glycol through the membrane soft rat and rabbit erythrocytes. Bulletin of the V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology. 2009;10:109-116.]
11. Гордієнко ОІ, Гордієнко ЄО, Лінник ТП, Компанієць АМ. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів. Пробл. Кріобіол. 2002;4:9-15. [Gordiyenko OI, Gordiyenko EO, Linnik TP, Kompaniets AM. Mechanisms of cryoprotectants penetration through erythrocyte membranes. Probl. Cryobiol. 2002;4:9-15.]
12. Гордієнко ОІ, Коваленко СС, Коваленко ІФ. Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини. Пробл. Кріобіол. 2012;22(4):389-398. [Gordiyenko OI, Kovalenko SY, Kovalenko IF. Mechanisms of glycerol penetration through human erythrocyte membranes. Probl. Cryobiol. 2012;22(4):389-398.]
13. 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*. 2018;80:1-11. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.003).
14. Zeuthen T, Klaerke DA. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H(+). *J. Biol. Chem.* 1999;274:21631-21636. DOI: [10.1074/jbc.274.31.21631](https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21631).
15. Wong CW, Han HW, Hsu SH. Changes of cell membrane fluidity for mesenchymal stem cell spheroids on biomaterial surfaces. *World J. Stem Cells*. 2022;14(8):616-632. DOI: [10.4252/wjsc.v14.i8.616](https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i8.616).
16. Hong S, Pascale RL, Janus EK, Peters JL, Kober MM, Mohammad TI, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug. Chem* 2006;17(3):728-34. DOI: [10.1021/bc060077y](https://doi.org/10.1021/bc060077y).

Стаття надійшла 10.09.2025 р.

Контакти: Яна Гвоздюк yana.hvozdiuk@gmail.com