

••• ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН •••  
••• PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS •••

УДК: 544.722.14:57.086.13:612.111.083.332

**Вплив амфіфільних сполук на постгіпертонічний шок еритроцитів  
людини**

**О.О.Чабаненко, Н.А.Єршова, Н.В.Орлова, Н.М.Шпакова**

При розморожуванні криоконсервованих еритроцитів, по мірі танення льоду позаклітинне гіпертонічне середовище змінюється на ізотонічне, внаслідок чого розвивається постгіпертонічний лізис клітин. В експериментальних умовах постгіпертонічний шок еритроцитів моделює вплив факторів крипошкодження, які діють на етапі розморожування еритроцитів, а також при перенесенні в кровеносне русло клітин, криоконсервованих під захистом проникаючого криопротектора. Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали перенесенням клітин з гіпертонічного розчину, що містить 1,65 моль/л NaCl (середовище дегідратації), в ізотонічний розчин, що містить 0,15 моль/л NaCl (середовище регідратації), при температурі 0°C. Вивчали вплив представників різних класів амфіфільних сполук (аніонний децилсульфат натрію, неіонний децил- $\beta$ ,D-глюкопіранозид і катіонний хлорпромазин) на чутливість еритроцитів людини до постгіпертонічного шоку. Амфіфільні речовини додавали в середовище регідратації перед внесенням в нього клітин. Показано, що в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів всі досліджувані амфіфільні речовини при використанні в ефективних концентраціях проявляють високу антигемолітичну активність (на рівні 70%). Порівняльне вивчення ефективності амфіфільних речовин в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів показало відмінність в розмірі плато (діапазон концентрацій амфіфільних сполук, в межах яких спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів). Так, встановлено, що для неіонного децил- $\beta$ ,D-глюкопіранозиду плато в 3 рази більше, ніж для аніонного децилсульфату натрію і катіонного хлорпромазину. Виявлена мінімальна ефективна концентрація для децилсульфату натрію і максимальна – для децил- $\beta$ ,D-глюкопіранозиду в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів. Передбачається, що виявлений захисний ефект амфіфільних сполук в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів пов'язаний з їх здатністю вбудовуватися в мембрану. Це призводить до збільшення площі поверхні мембрани і, отже, критичного гемолітичного об'єму клітини, що дозволяє їй набухати до більшого об'єму.

**Ключові слова:** *постгіпертонічний шок; еритроцити людини; амфіфільні речовини.*

**Impact of amphiphilic compounds on post-hypertonic shock of human  
erythrocytes**

**O.O.Chabanenko, N.A.Yershova, N.V.Orlova, N.M.Shpakova**

When the cryopreserved erythrocytes are thawed, with the ice melting the extracellular hypertonic medium changes to isotonic one, resulting in post-hypertonic cell lysis development. Under experimental conditions, the post-hypertonic shock of erythrocytes simulates the influence of cryodamage factors, acting at the erythrocyte thawing stage, as well as when the cells, cryopreserved under protection of penetrating cryoprotectant are transferred into bloodstream. Post-hypertonic shock of erythrocytes was carried out by transferring the cells from a hypertonic solution contained 1.65 mol/l NaCl (dehydration medium) into an isotonic one with 0.15 mol/l NaCl (rehydration medium) at 0°C. The effect of specimens of various classes of amphiphilic compounds (anionic sodium decyl sulfate, non-ionic decyl- $\beta$ ,D-glucopyranoside, and cationic chlorpromazine) on the human erythrocyte sensitivity to post-hypertonic shock, was studied. Amphiphilic substances were supplemented into rehydration medium prior to cell introduction into it. It was shown that under post-hypertonic shock of erythrocytes, all the studied amphiphilic substances, when used in efficient concentrations, manifested a high anti-hemolytic activity (at the level of 70%). A comparative study of the efficiency of amphiphilic substances under post-hypertonic shock of erythrocytes showed differences in size of the plateau (the concentration range of amphiphilic compound, within the limits of which the minimum level of erythrocyte hemolysis was observed). Thus, it was found that for non-ionic decyl- $\beta$ ,D-glucopyranoside the plateau was 3 times more than for anionic sodium decyl sulfate and cationic chlorpromazine. The minimum efficient concentration for sodium decyl sulfate and the maximum one for decyl- $\beta$ ,D-glucopyranoside under post-hypertonic shock of erythrocytes were revealed. It is assumed that the revealed protective effect of amphiphilic compounds under post-hypertonic shock of erythrocytes is associated with their capability to

integrate into membrane. This entails an increase in the surface area of the membrane and, therefore, the critical hemolytic volume of cell, which allows it to swell to a larger volume.

**Key words:** *post-hypertonic shock; human erythrocytes; amphiphilic compounds.*

## **Влияние амфифильных соединений на постгипертонический шок эритроцитов человека**

**Е.А.Чабаненко, Н.А.Єршова, Н.В.Орлова, Н.М.Шпакова**

При размораживании криоконсервированных эритроцитов, по мере таяния льда внеклеточная гипертоническая среда сменяется на изотоническую, вследствие чего развивается постгипертонический лизис клеток. В экспериментальных условиях постгипертонический шок эритроцитов моделирует влияние факторов криоповреждения, которые действуют на этапе размораживания эритроцитов, а также при перенесении в кровеносное русло клеток, криоконсервированных под защитой проникающего криопротектора. Постгипертонический шок эритроцитов осуществляли перенесением клеток из гипертонического раствора, содержащего 1,65 моль/л NaCl (среда дегидратации), в изотонический раствор, содержащий 0,15 моль/л NaCl (среда регидратации), при температуре 0°C. Изучали влияние представителей различных классов амфифильных соединений (анионный децилсульфат натрия, неионный децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозид и катионный хлорпромазин) на чувствительность эритроцитов человека к постгипертоническому шоку. Амфифильные вещества добавляли в среду регидратации перед внесением в нее клеток. Показано, что в условиях постгипертонического шока эритроцитов все исследуемые амфифильные вещества при использовании в эффективных концентрациях проявляют высокую антигемолитическую активность (на уровне 70%). Сравнительное изучение эффективности амфифильных веществ в условиях постгипертонического шока эритроцитов показало различие в размере плато (диапазон концентраций амфифильного соединения, в пределах которого наблюдается минимальный уровень гемолиза эритроцитов). Так, установлено, что для неионного децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозид плато в 3 раза больше, чем для анионного децилсульфата натрия и катионного хлорпромазина. Выявлена минимальная эффективная концентрация для децилсульфата натрия и максимальная – для децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозид в условиях постгипертонического шока эритроцитов. Предполагается, что выявленный защитный эффект амфифильных соединений в условиях постгипертонического шока эритроцитов связан с их способностью встраиваться в мембрану. Это приводит к увеличению площади поверхности мембраны и, следовательно, критического гемолитического объема клетки, что позволяет ей набухать до большего объема.

**Ключевые слова:** *постгипертонический шок; эритроциты человека; амфифильные соединения.*

### **Введение**

Процесс низкотемпературного консервирования состоит из нескольких стадий: подготовка биологического материала (насыщение проникающим криопротектором), замораживание, хранение, размораживание и удаление проникающего криопротектора. На каждом из указанных этапов развивается целый комплекс событий, которые в той или иной мере будут определять результирующий успех низкотемпературного хранения биологического материала.

В настоящее время в криобиологии является актуальным исследование процессов, протекающих на разных этапах низкотемпературного консервирования биологических объектов (Henkelman et al., 2010). Постгипертонический шок эритроцитов (ПГШ) моделирует влияние факторов криоповреждения, которые действуют на этапе размораживания эритроцитов, а также при перенесении в кровеносное русло клеток, криоконсервированных под защитой проникающего криопротектора. При размораживании криоконсервированных эритроцитов, по мере таяния льда внеклеточная гипертоническая среда сменяется на изотоническую (Zou et al., 2015), вследствие чего развивается постгипертонический лизис клеток (ПГЛ). Модель «ПГШ» предполагает изучение чувствительности эритроцитов при их перенесении из гипертонических условий в изотонические.

Использование модельного подхода при исследовании криоповреждающих факторов, которые действуют на этапе замораживания биологических объектов, позволило выявить антигемолитическую активность амфифильных соединений, относящихся к разным классам поверхностно-активных веществ (ПАВ). Так, они защищают эритроциты от повреждения в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза, а также гипотонического шока (Шпакова, 2014; Iershov et al., 2007; Semionova et al., 2016b).

При изучении особенностей развития постгипертонического лизиса эритроцитов человека в присутствии положительно заряженного амфифильного соединения хлорпромазина (ХПР) был выявлен его антигемолитический эффект (Semionova et al., 2017). Катионные ПАВ, к которым относится ХПР, встраиваются в эритроцитарную мембрану и преимущественно распределяются во внутреннем монослое липидного бислоя. Характер указанного распределения обусловлен электростатическим взаимодействием между положительно заряженными амфифильными молекулами ХПР и отрицательно заряженными компонентами внутреннего монослоя мембраны. В пользу этого (распределение во внутреннем монослое бислоя) свидетельствуют особенности трансформации эритроцитов по типу дискоцит-стоматоцит (Manaargadoo-Catin et al., 2015).

Представляло интерес исследовать развитие ПГЛ эритроцитов в присутствии амфифильных соединений, относящихся к разным классам поверхностно-активных веществ, которые различаются по физико-химическим свойствам.

Цель работы: провести сравнительное изучение влияния представителей различных классов амфифильных соединений (анионный децилсульфат натрия, неионный децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозид и катионный хлорпромазин) на чувствительность эритроцитов человека к постгипертоническому шоку.

### Материалы и методы исследования

В работе были использованы следующие реактивы: децилсульфат натрия («СинтезПАВ», Россия), хлорпромазин гидрохлорид, децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозид («Calbiochem», США), тритон X-100 («Мерск», Германия) и реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Все среды были приготовлены на фосфатном буфере (0,01 моль/л, pH 7,4). Осмоляльность растворов определяли криоскопическим методом с использованием осмометра ОМКА-1Ц-01 («Медлабортехника», Украина).

В работе исследовали эритроциты человека, полученные из донорской крови по стандартной методике (Semionova et al., 2016b). После удаления плазмы эритроциты трижды центрифугировали при 3000 об/мин (центрифуга «ОПН-ЗУ4.2», Кыргызстан) в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией.

Постгипертонический шок эритроцитов осуществляли перенесением клеток из гипертонического раствора, содержащего 1,65 моль/л NaCl (среда дегидратации), в изотонический раствор, содержащий 0,15 моль/л NaCl (среда регидратации), при температуре 0°C. Продолжительность инкубирования эритроцитов в среде дегидратации 20 мин, в среде регидратации – 5 мин. Амфифильные вещества добавляли в среду регидратации перед внесением в нее клеток (Semionova et al., 2017). Конечный гематокрит составлял 0,4%. Количество вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%.

Для того чтобы оценить и сравнить эффективность действия исследованных амфифильных соединений в условиях ПГШ эритроцитов, использовали понятия максимальной антигемолитической активности, плато и эффективных концентраций. Антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как процент снижения гемолиза клеток в присутствии веществ по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил. Значение максимальной антигемолитической активности амфифильного соединения рассчитывали по формуле:  $A_{Г_{\max}} = ((k - a) / k) \times 100\%$ , где  $k$  – величина гемолиза эритроцитов при отсутствии амфифильного вещества;  $a$  – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Плато определяли как диапазон концентраций амфифильного соединения, в пределах которого наблюдается минимальный уровень гемолиза эритроцитов, а эффективную концентрацию ( $S_{AG_{\max}}$ ) – как концентрацию вещества, соответствующую середине плато.

Статистическую обработку полученных экспериментальных результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft Inc., США). Экспериментальные данные представляли как среднее арифметическое значение количественных показателей ( $M$ )  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического ( $m$ ).

### Результаты

Для развития ПГЛ эритроцитов млекопитающих важным является этап дегидратации, поскольку концентрация хлорида натрия в среде и продолжительность инкубирования в ней определяют уровень гемолиза клеток при перенесении в изотонические среды (Semionova et al., 2016a). При исследовании эффективности амфифильных соединений в условиях ПГШ эритроцитов в качестве среды дегидратации использовали 1,65 моль/л NaCl, для того чтобы исходный уровень ПГЛ клеток составлял 60–70 %.

В данной работе использовали амфифильные соединения, относящиеся к разным классам ПАВ, которые различаются по физико-химическим свойствам. Анионные амфифилы представлены децилсульфатом натрия (ДС), катионные – хлорпромазином (ХПР), неионные – децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозидом (ДГП). Амфифильные соединения представляют собой молекулы, содержащие гидрофильную и гидрофобную части, благодаря чему они легко встраиваются в плазматическую мембрану (Managadoo-Catin et al., 2015; Tacheva et al., 2019; Sblano et al., 2012).

Развитие детергентного лизиса эритроцитов связывают со способностью амфифильных молекул к мицеллообразованию. Амфифилы при использовании в низких концентрациях существуют в виде истинных растворов. С увеличением концентрации ПАВ их дифильные молекулы или ионы ассоциируют друг с другом и образуют мицеллы. Концентрацию ПАВ, при которой в растворе возникает большое количество мицелл и изменяются свойства раствора, называют критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). В отличие от ДС и ХПР, которые характеризуются близкими значениями ККМ ( $3,3 \times 10^{-2} > 2,2 \times 10^{-2}$  моль/л соответственно), эта величина для ДГП на порядок ниже ( $2,2 \times 10^{-3}$  моль/л) (Castro et al., 2005; Sblano et al., 2012). Однако именно ДГП приводит к развитию гемолиза при использовании в достаточно высокой концентрации (выше 1600 мкмоль/л).

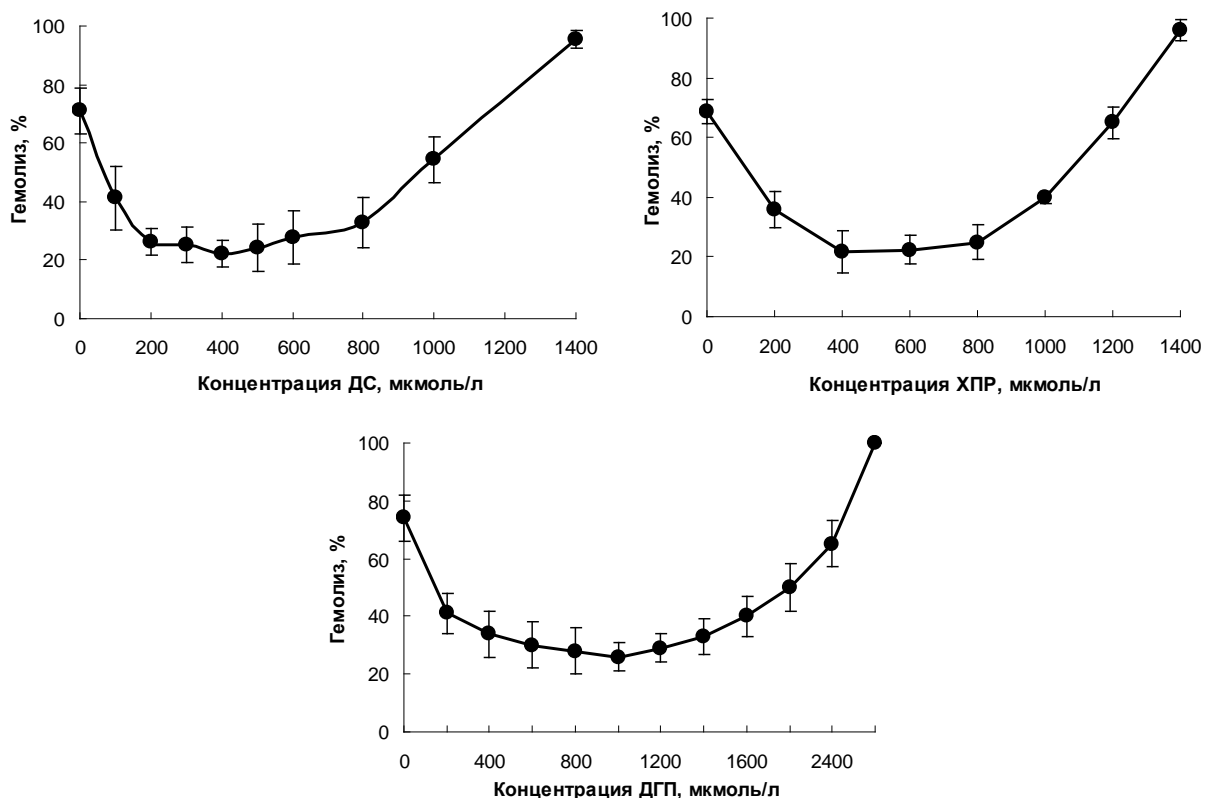


Рис. 1. Зависимость уровня постгипертонического гемолиза эритроцитов человека от концентрации амфифильных соединений

Для количественной оценки эффективности действия исследованных амфифильных соединений в условиях ПГШ эритроцитов из представленных зависимостей (рис. 1) были рассчитаны величины антигемолитической активности, размеры плато и значения эффективных концентраций веществ и представлены в табл. 1.

Таблица 1.

**Значения максимальной антигемолитической активности ( $A_{G_{max}}$ ), эффективных концентраций ( $C_{эф}$ ) и размер плато амфифильных соединений в условиях ПГШ эритроцитов человека**

Вещество	$A_{G_{max}}$ , %	$C_{эф}$ , мкмоль/л	Размер плато, мкмоль/л
ДС	$69 \pm 5$	400	200–600
ДГП	$65 \pm 5$	1000	400–1600
ХПР	$68 \pm 5$	600	400–800

Плато – это диапазон концентраций амфифильного соединения, при которых наблюдается минимальный уровень гемолиза. По размеру плато заряженные амфифилы (ДС и ХПР) не отличаются, хотя для ХПР плато несколько сдвинуто в сторону более высоких значений концентрации амфифила. Для неионного ДГП концентрационное плато гораздо шире (в 3 раза). Несмотря на указанные различия в размерах плато для исследуемых веществ, существуют его участки, которые перекрываются, т.е. являются общими (400–600 мкмоль/л) для всех изучаемых амфифилов. Поскольку значения эффективных концентраций соответствуют середине плато, то они будут определяться его размерами (шириной) и положением по оси абсцисс. Соответственно, самая высокая эффективная концентрация характерна для ДГП (1000 мкмоль/л), а самая низкая – для ДС (400 мкмоль/л).

Из данных табл. 1 видно, что в условиях ПГШ эритроцитов все исследуемые амфифильные вещества (при использовании в указанных эффективных концентрациях) проявляют высокую антигемолитическую активность (на уровне 70%).

В отличие от молекул ХПР, которые встраиваются во внутренний монослой липидного бислоя мембраны и вызывают трансформацию клеток по типу дискоцит – стоматоцит, молекулы ДС и ДГП распределяются во внешнем монослое, о чем свидетельствует изменение формы эритроцитов от дискоцитов к эхиноцитам (Manaargadoo-Catin et al., 2015). Поскольку все исследуемые вещества проявляют высокую антигемолитическую активность (~70%) в условиях ПГШ эритроцитов, можно сделать вывод о том, что эффективность амфифилов не зависит от их трансмембранного распределения, которое определяется физико-химическими свойствами веществ, относящихся к разным классам ПАВ.

Известно, что в гипертонических растворах эритроциты сжимаются в результате выхода из них воды, что проявляется в изменении формы и уменьшении объема клеток. Предполагают, что кренирование эритроцитов может сопровождаться частичным откреплением цитоскелета от мембраны, что индуцирует образование микродефектов, через которые в клетку входят внеклеточные вещества (Piety et al., 2016; Mukhopadhyay et al., 2002). При последующем перенесении таких эритроцитов в среду регидратации клетки набухают в результате входа в них воды и лизируют при достижении значений критического гемолитического объема (Muldrew, 2008; Benga, 2013).

Можно предположить, что выявленный защитный эффект амфифильных соединений в условиях ПГШ эритроцитов связан с их способностью встраиваться в мембрану и увеличивать площадь ее поверхности, в результате чего увеличивается критический гемолитический объем клетки, что позволяет ей набухать до большего объема.

### Выводы

Сравнительное изучение влияния представителей различных классов амфифильных соединений на чувствительность эритроцитов человека к постгипертоническому шоку показало, что анионный децилсульфат натрия и неионный децил- $\beta$ ,D-глюкопиранозид проявляют высокую антигемолитическую активность, как и катионный хлорпромазин (на уровне 70%).



Установлено 3-кратное увеличение размера плато неионного децил-β,D-глюкопиранозида по сравнению с децилсульфатом натрия и хлорпромазином. Выявлена минимальная эффективная концентрация для децилсульфата натрия и максимальная – для децил-β,D-глюкопиранозида.

#### Список литературы / References

- Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців. Автореф. дис. ... доктора биол. наук. – Харків, 2014. – 44с. /Shpakova N.M. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species. Abstract of Ph.D. thesis (Biology). – Kharkiv, 2014. – 44p./
- Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel // Eur. Biophys. J. – 2013. – Vol.42 (1). – P. 33–46.
- Castro E., Taboada P., Barbosa S., Mosquera V. Size control of styrene oxide- ethylene oxide diblock copolymer aggregates with classical surfactants: DLS, TEM, and ITC study // Biomacromolecules. – 2005. – Vol.6. – P. 1438–1447.
- Henkelman S., Lagerberg J.W., Graaff R. et al. The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties // Transfusion. – 2010. – Vol.50 (11). – P. 2393–2401.
- Iershov S.S., Pysarenko N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Effect of cationic and anionic amphiphilic compounds on hypertonic cryohemolysis of mammalian red blood cells // Fiziolohichniy zhurnal. – 2007. – Vol.53 (6). – P. 78–84.
- Manaargadoo-Catin M., Ali-Cheri A., Pougna J-L., Perrin C. Hemolysis by surfactant – a review // Advances in Colloid and Interface Science. – 2015. – Vol.228. – P. 1–16.
- Mukhopadhyay R., Lim H.W.G., Wortis M. Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing // Biophys. J. – 2002. – Vol.82 (4). – P. 1756–1772.
- Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic // Cryobiology. – 2008. – Vol.57 (3). – P. 251–256.
- Piety N.Z., Reinhart W.H., Poureau P.H. et al. Shape matters: the effect of red blood cell shape on perfusion of an artificial microvascular network // Transfusion. – 2016. – Vol.56 (4). – P. 844–851.
- Sblano C., Micelli S., Notarachille G., Meleleo D. Effect of n-octyl-β-D-glucopyranoside on human and rat erythrocyte // The Open Biology Journal. – 2012. – Vol.5 (1). – P. 1–5.
- Semionova E.A., Yershova N.A., Yershov S.S., Orlova N.V. Peculiarities of posthypertonic lysis in erythrocytes of several mammals // Probl. Cryobiol. Cryomed. – 2016a. – Vol.26 (1). – P. 73–83.
- Semionova E.A., Iershova N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence // Eastern European Scientific Journal. – 2016b. – No. 2. – P. 7–17.
- Semionova E.A., Chabanenko E.A., Orlova N.V. et al. About mechanism of antihemolytic action of chlorpromazine under posthypertonic stress in erythrocytes // Probl. Cryobiol. Cryomed. – 2017. – Vol.27 (3). – P. 219–229.
- Tacheva B., Paarvanova B., Ivanov I.T. et al. Drug exchange between albumin nanoparticles and erythrocyte membranes // Nanomaterials (Basel). – 2019. – Vol.9 (1). – P. 47–61.
- Zou L., Ding W., Sun S. et al. Fatigue damage to pig erythrocytes during repeated swelling and shrinkage // Cryobiology. – 2015. – Vol.71 (2). – P. 210–215.

**Представлено: О.В.Шаповалова / Presented by: O.V.Shapovalova**

**Рецензент: Л.В.Коба / Reviewer: L.V.Koba**

*Подано до редакції / Received: 10.06.2019*

**Про авторів:** О.О.Чабаненко – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, chabanenkoolena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1977-3495>

Н.А.Єршова – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, ershas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9332-6752>

Н.В.Орлова – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, NataliaOrlova1965@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6569-9906>

Н.М.Шпакова – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, starling.nataly@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0148-7522>

**About the authors:** O.O.Chabanenko – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, chabanenkoolena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1977-3495>

N.A.Yershova – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, ershbas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9332-6752>

N.V.Orlova – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, NataliaOrlova1965@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6569-9906>

N.M.Shpakova – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, starling.nataly@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0148-7522>

**Об авторах:** Е.А.Чабаненко – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, chabanenkoolena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1977-3495>

Н.А.Ершова – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, ershbas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9332-6752>

Н.В.Орлова – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, NataliaOrlova1965@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6569-9906>

Н.М.Шпакова – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, starling.nataly@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0148-7522>