

УДК: 547.787.2 + 535.33/34

Исследование влияния 1,2-пропандиола на мембраны эритроцитов методом флуоресцентных зондов Е.М.Корниенко, Е.А.Посохов

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
pea717171@mail.ru*

Влияние криопротектора 1,2-пропандиола на мембраны эритроцитов человека было исследовано при помощи набора флуоресцентных зондов – орто-гидроксипроизводных оксазола и оксадиазола. Показано, что флуоресцентные зонды на основе орто-гидроксипроизводных оксазола могут использоваться в качестве индикаторов изменений физико-химических свойств и структуры мембраны под действием 1,2-пропандиола: установлено, что начальная концентрация 1,2-пропандиола, вызывающая изменения структуры мембраны эритроцита человека, составляет 5 об.%. Показано, что при воздействии 1,2-пропандиола изменения в мембранах эритроцитов происходят в полярных областях мембраны, в то же время, воздействие этого криопротектора не приводит к изменениям в гидрофобных областях мембран эритроцитов. Полученные сведения могут оказаться полезными для выбора оптимальных условий криопротектирования.

Ключевые слова: эритроциты, биомембрана, криопротектор, 1,2-пропандиол, флуоресцентные зонды.

Дослідження впливу 1,2-пропандіолу на мембрани еритроцитів методом флуоресцентних зондів Є.М.Корнієнко, Є.О.Посохов

Вплив криопротектора 1,2-пропандіолу на мембрани еритроцитів людини було досліджено за допомогою набору флуоресцентних зондів – орто-гідроксипохідних оксазолу й оксадіазолу. Продемонстровано, що флуоресцентні зонди на основі орто-гідроксипохідних оксазолу можуть використовуватися як індикатори змін фізико-хімічних властивостей і структури мембрани під дією 1,2-пропандіолу: встановлено, що початкова концентрація 1,2-пропандіолу, яка спричиняє зміни структури мембрани еритроцита людини, складає 5 об.%. Продемонстровано, що під впливом 1,2-пропандіолу зміни в мембранах еритроцитів відбуваються в полярних областях мембрани, в той же час, вплив цього криопротектора не спричиняє зміни у гідрофобних областях мембран еритроцитів. Отримані відомості можуть виявитися корисними для вибору оптимальних умов криопротектування.

Ключові слова: еритроцити, біомембрана, криопротектор, 1,2-пропандіол, флуоресцентні зонди.

The study of 1,2-propanediol influence on red cell membranes by method of fluorescent probes Ye.M.Kornienko, Ye.O.Posokhov

The influence of cryoprotectant 1,2-propanediol on human red cell membranes has been studied by use of the set of fluorescent probes – ortho-hydroxy derivatives of oxazole and oxadiazole. It has been shown that fluorescent probes on the base of ortho-hydroxy derivatives of oxazole can be used as indicators of the changes of physico-chemical properties and structure of red cell membranes under the action of 1,2-propanediol: it has been found that the initial concentration of 1,2-propanediol, which causes the changes in the structure of human red cell membranes, is 5 vol.%. It has been shown that under the influence of 1,2-propanediol the changes occur in polar regions of the membranes, while no changes occur in hydrophobic regions of red cell membranes. The obtained findings may be useful for choice of optimal conditions for cryoprotecting.

Key words: red blood cells, biomembrane, cryoprotector, 1,2-propanediol, fluorescent probes.

Введение

1,2-пропандиол (1,2-Пд) – проникающий криопротектор (Давыдова, Гордиенко, 2009; Компаниец и др., 1990; Компаниец, Иванова, 1990; Межидов, 1999) представитель ряда полиолов, обладающий высокой эффективностью при замораживании клеток (Шраго и др., 1987; Луговой и др., 1988). Для успешного криоконсервирования клеток, как правило, требуются значительные концентрации

криопротекторов (от единиц до нескольких десятков массовых процентов (Fuller et al., 2004; Gallagher et al., 2003). Криопротекторы не являются инертными к эритроцитам, вызывая нарушения структуры и физических свойств фосфолипидного бислоя плазматических мембран, влияя на функционирование ферментных систем и изменяя гидратацию биомакромолекул (Arakawa et al., 1990; Delaunay, 2004; Bruce et al., 2005; Корниенко, 2012).

Известно, что полиолы способны модифицировать липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, в мембране изменять поверхностный потенциал (Коваленко и др., 2009; Линник и др., 2010), проникая в клетку двумя альтернативными путями (непосредственно диффузией в липидный бислой и через аквапорины). Механизм защитного действия 1,2-Пд при криоконсервировании заключается в препятствии образования и роста кристаллов льда из внутриклеточной воды, сохраняя, таким образом, целостность клетки (Николенко, 1989; Компаниец и др., 1989). Однако недостаточно изучены концентрационные эффекты 1,2-Пд, приводящие к изменению в липидном бислое мембран эритроцитов (Коваленко и др., 2009).

Сведения о воздействии криопротектора на липидные мембраны являются полезными для выбора оптимальных условий криопротектирования: подбора оптимального криопротектора, подбора оптимальных концентраций криопротектирования. Это и обусловило проведение настоящего исследования по изучению влияния 1,2-Пд на состояние мембран эритроцитов человека.

Одним из подходов, позволяющих производить оценку степени влияния криопротектора на состояние липидного бислоя и определять топологию распределения в нем криопротектора, является использование флуоресцентных зондов, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами и достаточно быстро реагируют на микроокружение (Dyubko et al., 2006; Корниенко, Посохов, 2011; Корниенко, Посохов, 2012).

Целью исследования явилось изучение влияния 1,2-Пд на мембраны эритроцита методом флуоресцентных зондов. В качестве флуоресцентных зондов использовались орто-гидроксипроизводные оксазола и оксадиазола.

Материалы и методы

В настоящей работе были проведены измерения флуоресценции зондов **D7** (2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-N(CH₃)₂-фенил)-1,3,4-оксадиазол), **D1** (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазол); **O1O** (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол); **O6O** (2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-фенил-фенил)-1,3-оксазол); **PH7** (2-(2'-ОН-фенил)-9,10-фенантр-1,3-оксазол) в физиологических растворах, содержащих эритроциты, модифицированные 1,2-Пд. Эритроциты мужчин II группы Rh (+), получаемые из эритроцитарной массы, приготовленной ХОЦСК на глицериновом консерванте, непосредственно перед экспериментом четырёхкратно отмывались путем центрифугирования 3 мин при 3000 об/мин. в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl) при комнатной температуре 20–22°C. Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Модификацию клеток осуществляли 40-минутной экспозицией эритроцитов с 1,2-Пд путем смешивания с соответствующей криоконсервирующей средой 1:1 (гематокрит 40–45 %). Плотность клеток в суспензии характеризовалась величиной пропускания (%T), при котором учитывалось рассеяние света: пропускание света через суспензию клеток при длине волны 545 нм находилось в пределах 70–75 %. Флуоресцентные зонды растворяли в ацетонитриле до начальной концентрации 2·10⁻⁴ моль/л. 10 мкл ацетонитрильного раствора каждого зонда добавляли к 2 мл суспензии эритроцитов. Конечная концентрация каждого из зондов в суспензии исследуемых мембран – 1·10⁻⁶ моль/л, таким образом, молярное отношение липид/зонд составляло 1000:1. Измерение спектров флуоресценции производилось на спектрофлуориметре «Hitachi 850» через 1 час после прибавления зондов к раствору клеток. Спектры флуоресценции зондов измеряли в области 340–600 нм при ширине щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции 5 и 5 нм соответственно, и длине волны возбуждения 330 нм. В качестве контрольного образца использовали клетки, не подвергавшиеся действию 1,2-Пд.

Результаты исследований

Для исследования влияния 1,2-пропандиола на мембраны эритроцитов нами использовались флуоресцентные зонды **D7**, **D1**, **O1O**, **O6O**, **PH7**, успешно применявшиеся ранее для исследований биомембран (Посохов и др., 1999, 2001; Посохов, 2011, 2012; Posokhov et al., 2013).

Выбор флуоресцентных зондов **D7**, **D1**, **O1O**, **O6O**, **PH7** (набор орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола) для исследования влияния 1,2-пропандиола на физико-химические свойства биомембран обусловлен тем фактом, что флуоресцентные характеристики этих зондов зависят от физико-химических свойств их микроокружения: от водородосвязывающей способности (т.е. способности к образованию водородных связей), полярности и вязкости микроокружения (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

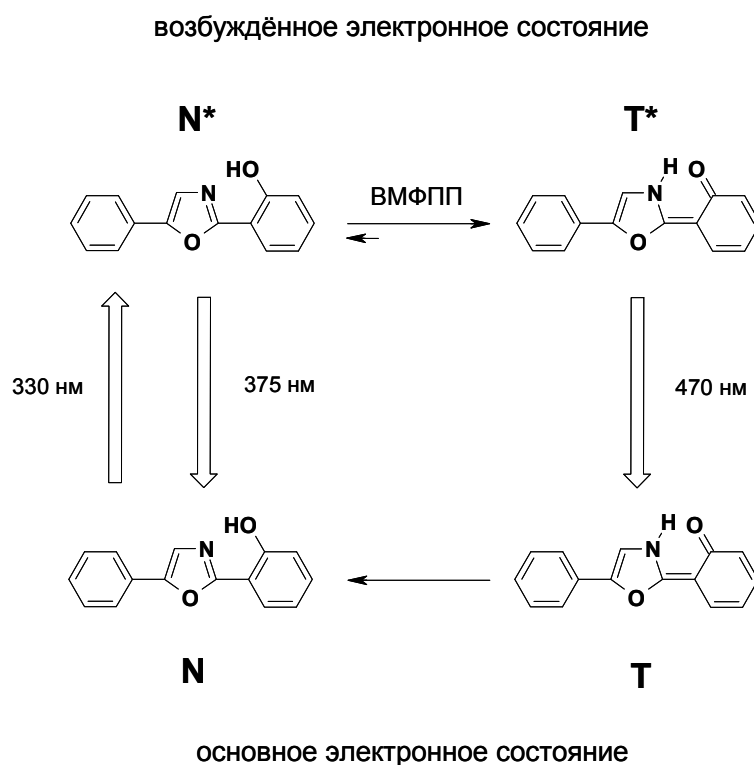


Рис. 1. Схема внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) в 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазоле (зонд O1O)

Примечания: стрелка, направленная вверх, представляет электронное возбуждение, а стрелки, направленные вниз, представляют испускание света (флуоресценцию). Соответствующие максимумы флуоресценции представлены в нанометрах

В возбужденном состоянии для орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола характерно протекание реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) (рис. 1): гидроксильная группа в орто-положении бокового бензольного кольца выступает в роли протодонора, а атом азота оксазольного (оксадиазольного) цикла – в роли протонакцептора. Результатом реакции ВМФПП является образование фототаутомерной формы (T^*), флуоресцирующей в существенно более длинноволновой области по сравнению с исходной формой (N^*) (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

Наличие двухполосной флуоресценции позволяет проводить ратиометрические измерения, т.е. использовать отношение интенсивностей флуоресценции фототаутомерной формы (I_{T^*}) и исходной формы (I_{N^*}) в качестве параметра для оценки физико-химических свойств среды. Использование ратиометрических флуоресцентных проб позволяет исключить как погрешности измерений, связанные с девиацией концентрации флуоресцентной пробы (например, неравномерным содержанием флуоресцентной пробы в различных мембранах), так и погрешности измерений, связанные с девиацией настроек флуоресцентной техники (девиации интенсивности источника

возбуждающего излучения, изменения в фокусировке, изменения в чувствительности фотодетектора и т.д.) (Shapiro, 1995).

Для настоящего исследования были отобраны соединения, различающиеся по своей липофильности (Посохов и др., 1999, 2001; Посохов, 2011, 2012). Ожидается, что области локализации отобранных зондов в мембране различны и соответствуют липофильности зондов (рис. 2) (Посохов и др., 1999, 2001; Посохов, 2011, 2012; Добрецов, 1989). Ожидаемая локализация и ориентация **D7**, **D1**, **O10**, **O60**, **PH7** на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах (Посохов и др., 1999, 2001; Посохов, 2011, 2012) и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в липидных мембранах (Добрецов, 1989): зонд **D7** – в области полярных головок фосфолипидов и в области глицериновых остатков фосфолипидов; зонд **D1** – в области глицериновых остатков фосфолипидов; зонд **O10** – в области глицериновых остатков фосфолипидов и в области карбонильных групп фосфолипидов; зонд **O60** – в области карбонильных групп фосфолипидов и в области метиленовых цепочек фосфолипидов; зонд **PH7** – в области метиленовых цепочек фосфолипидов и в центре бислоя (рис. 2).

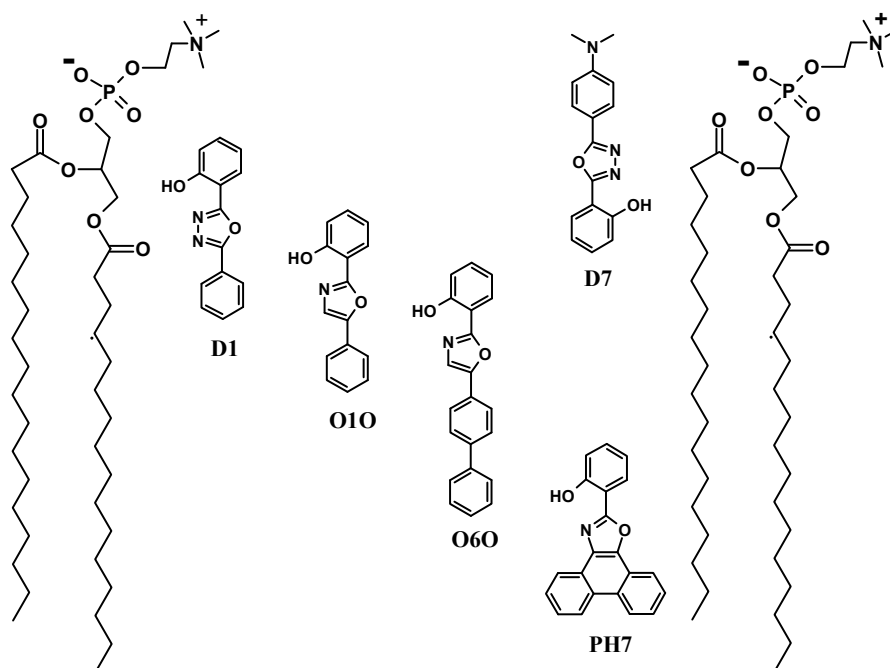


Рис. 2. Ожидаемая локализация и ориентация флуоресцентных зондов **D7**, **D1**, **O10**, **O60**, **PH7** на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах (Посохов и др., 1999, 2001; Посохов, 2011, 2012) и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в липидных мембранах (Добрецов, 1989)

Примечание: для обозначения локализации зондов показаны две молекулы фосфатидилхолина из внешнего монослоя.

Флуоресцентные зонды **D1** и **D7** практически не флуоресцируют в водной среде, однако имеют заметную флуоресценцию при их встраивании в мембраны (интенсивность флуоресценции зондов **D1** и **D7** возрастает в десятки раз при попадании зондов в гидрофобную среду (Посохов и др., 1999)). Было установлено, что в случае зондов **D1** и **D7** в суспензии эритроцитов не происходит возрастания флуоресценции этих зондов за 1 час инкубации (не показано). По-видимому, зонды **D1** и **D7** либо не встраиваются в мембраны эритроцитов за 1 час инкубации (т.е. остаются в буфере), либо встраиваются в мембраны эритроцитов, но, вследствие значительной гидратации мембран эритроцитов в области локализации зондов **D1** и **D7** (полярная область мембраны), возрастания их флуоресценции не происходит. Таким образом, зонды **D1** и **D7** не позволяют производить мониторинг изменений в мембранах эритроцитов под действием 1,2-Пд.

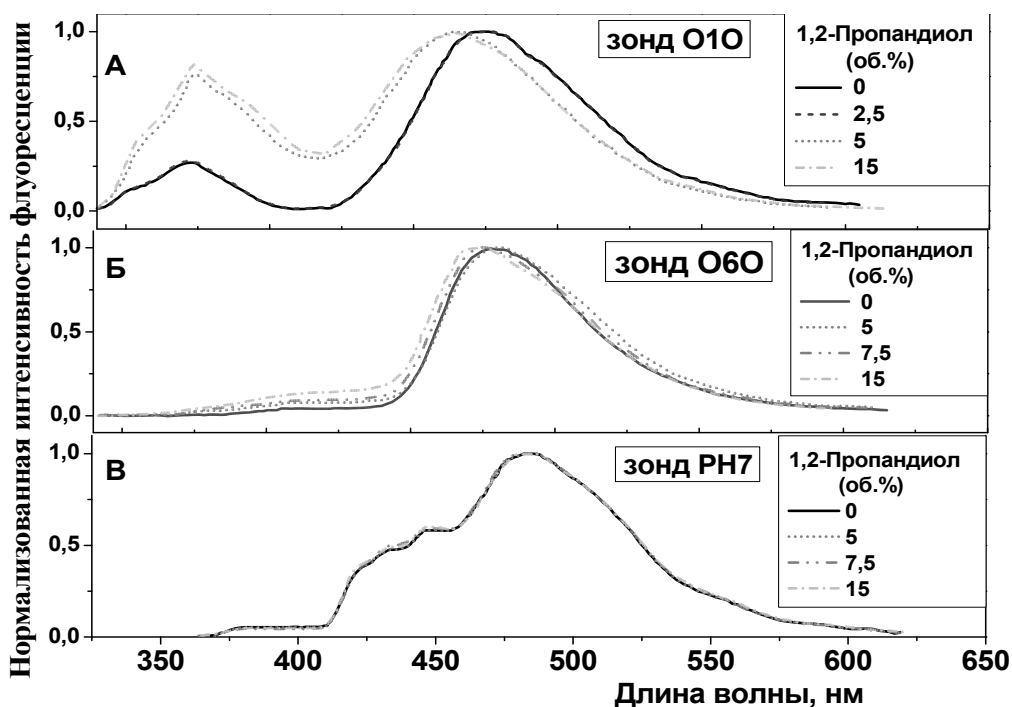


Рис. 3. Спектры флуоресценции зондов O10 (А), O60 (Б), PH7 (В) в растворах, содержащих контрольные эритроциты и подвергшиеся воздействию (0 об.%, 2,5 об.%, 5 об.%, 7,5 об.%, 15 об.%) 1,2-пропандиола

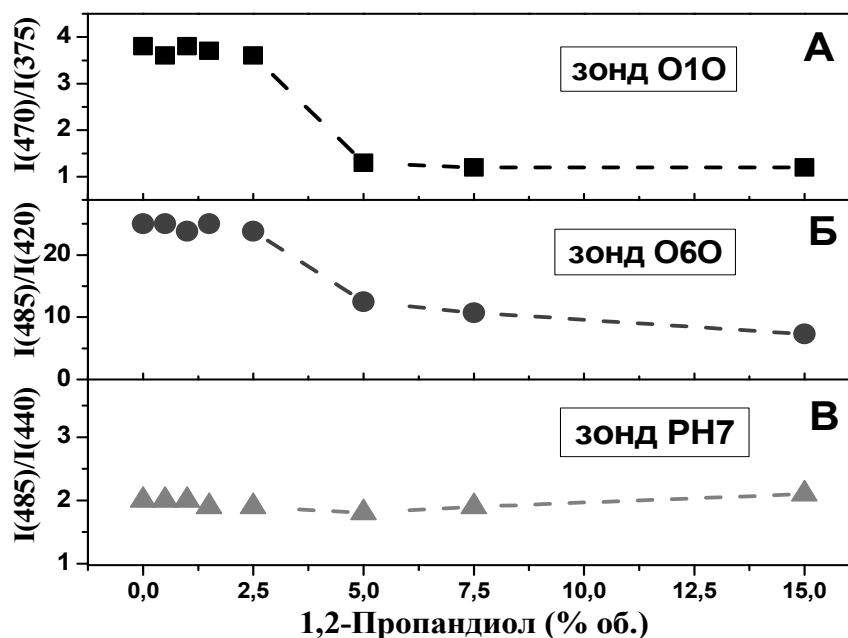


Рис. 4. Зависимость соотношения интенсивностей таутомерной и исходной формы I^*/I для зондов O10 (А), O60 (Б), PH7 (В) от концентрации криопротектора 1,2-пропандиола

В результате воздействия 1,2-пропандиола на эритроциты наблюдалось заметное увеличение интенсивности коротковолновой полосы флуоресценции нормальной формы (I_{N^*}) и гипсохромный сдвиг полосы флуоресценции фототауомера (T^*) для зондов **O1O**, **O6O**. В тоже время, в случае зонда **PH7** не наблюдалось заметных изменений его спектра флуоресценции при воздействии 1,2-Пд на эритроциты. Увеличение интенсивности коротковолновой полосы флуоресценции нормальной формы (I_{N^*}) и гипсохромный сдвиг полосы флуоресценции фототауомера (T^*) зондов **O1O**, **O6O** свидетельствует об увеличении полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения этих зондов в мембранах эритроцитов, подвергнувшихся действию 1,2-Пд. Обсуждаемое увеличение полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения зондов **O1O**, **O6O** может быть вызвано как накоплением растворителя 1,2-Пд в области локализации этих зондов, так и увеличением гидратированности микроокружения зондов **O1O**, **O6O** в результате нарушения упаковки мембран эритроцитов под действием 1,2-Пд. Влияние возрастания концентрации криопротектора 1,2-Пд на соотношение интенсивностей тауомерной и исходной формы I_T/I_{N^*} для зондов **O1O**, **O6O**, **PH7** показано на рис. 4.

Наиболее значительное уменьшение соотношения I_T/I_{N^*} для **O1O** и **O6O** наблюдалось в интервале концентраций 1,2-Пд 2,5–5,0 об. %. Соотношение I_T/I_{N^*} для **PH7** не изменялось при воздействии 1,2-Пд (рис. 4).

Таким образом, показано, что ряд флуоресцентных зондов, составленный из орто-гидроксипроизводных оксазола (**O1O**, **O6O**, **PH7**), может быть использован в качестве индикатора изменений структуры мембран под действием криопротектора 1,2-Пд и, следовательно, может быть использован в криобиологии. Установлено, что начальная концентрация 1,2-Пд, вызывающая изменения в мембранах эритроцитов человека, составляет 5 об.%. Показано, что при воздействии 1,2-Пд изменения в мембранах эритроцитов происходят в областях локализации зондов **O1O** и **O6O**, т.е. в достаточно полярных областях мембраны: предположительно, в области глицериновых остатков фосфолипидов и в области карбонильных групп фосфолипидов. В то же время, воздействие 1,2-Пд не приводит к изменениям в области локализации зонда **PH7**, т.е. в более гидрофобных областях мембран эритроцитов: предположительно, в области метиленовых цепочек фосфолипидов и в центре бислоя.

Список литературы

- Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, №3. – С. 261–272. /Davydova Ye.V., Gordiyenko O.I. Vliyaniye temperatury na pronitsayemost' membran eritrotsitov dlya krioprotektorov s razlichnoy stepen'yu gidrofobnosti // Problemy kriobiologii. – 2009. – Т.19, №3. – С. 261–272./
- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277с. /Dobretsov G.Ye. Fluorescentnyye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov. – М.: Nauka, 1989. – 277с./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А. Реакция фотопереноса протона в ряду орто-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола в полистирольных пленках // Теор. эксперим. хим. – 1999. – Т.35, №6. – С. 357–361. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A. Reaktsiya fotoperenosa protona v ryadu orto-gidroksi proizvodnykh 2,5-diaril-1,3-oksazola i 2,5-diaril-1,3,4-oksadiazola v polistirolnykh plenkakh // Teor. eksperiment. khim. – 1999. – Т.35, №6. – С. 357–361./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М. и др. Реакция фотопереноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-окси-производных 2,5-диарил-оксазола // Хим. высок. энерг. – 1997. – Т.31, №6. – С. 395–402. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A., Shershukov V.M. i dr. Reaktsiya fotoperenosa protona v vobuzhdyonnom sostoyanii v rjadu orto-oksi-proizvodnykh 2,5-diarilokksazola // Khim. vysok. energ. – 1997. – Т.31, №6. – С. 395–402./
- Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2009. – Вип.10, №878. – С. 109–116. /Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P. Mekhanizm transporta DMSO, glitserina i etilenglikolya cherez membrany eritrotsitov krysy i krolika // Visnyk Kharkivsk'ogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2009. – Vyp.10, №878. – С. 109–116./
- Компаниец А.М., Иванова И.А. Криопротекторные свойства веществ ряда полиолов при замораживании тромбоцитов // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. – Харьков: Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины, 1990. – С. 94–98. /Kompaniyets A.M., Ivanova I.A. Krioprotekturnyye svoystva veshchestv ryada poliologov pri zamorazhivanii trombotsitov // Fiziko-khimicheskiye svoystva i biologicheskoye deystviye krioprotektorov. – Khar'kov: In-t probl. kriobiologii i kriomeditsiny, 1990. – С. 94–98./
- Компаниец А.М., Коший С.В., Иванова И.А. Монометиловый эфир глицерина: цитотоксичность и криозащитная эффективность при замораживании тромбоцитов // Физико-химические свойства и

биологическое действие криопротекторов. – Харьков: Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины, 1990. – С. 59–63. /Kompaniyets A.M., Koshiy S.V., Ivanova I.A. Monometilovyy efir glitserina: tsitotoksichnost' i krio-zashchitnaya effektivnost' pri zamorazhivanii trombotsitov // Fiziko-khimicheskiye svoystva i biologicheskoye deystviye krioprotektorov. – Khar'kov: In-t probl. kriobiologii i kriomeditsiny, 1990. – S. 59–63./

Компаниец А.М., Коший С.В., Иванова И.А., Луговой В.И. Влияние веществ ряда полиолов на морфофункциональные свойства тромбоцитов. Рукопись депонирована в ВИНТИ, N 6037-В. 89 дел. от 28.09.89. – 13с. /Kompaniyets A.M., Koshiy S.V., Ivanova I.A., Lugovoy V.I. Vliyaniye veshchestv ryada polioloov na morfofunktsional'nyye svoystva trombotsitov. Rukopis' deponirovana v VINITI, N 6037-V. 89 del. ot 28.09.89. – 13s./

Корниенко Е.М. Исследование кинетики детергентного гемолиза эритроцитов, модифицированных ДМСО // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2012. – Вип.15, №1008. – С. 171–176. /Korniyenko Ye.M. Issledovaniye kinetiki detergentshogo gemoliza eritrotsitov, modifitsirovannykh DMSO // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2012. – Vyp.15, №1008. – S. 171–176./

Корниенко Е.М., Посохов Е.А. Локализация проникающего криопротектора диметилсульфоксида в мембране эритроцитов: исследование методом флуоресцентных зондов. // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2011. – Вип.14, №971. – С. 135–139. /Korniyenko Ye.M., Posokhov Ye.A. Lokalizatsiya pronikayushchego krioprotektora dimetilsul'foksida v membrane eritrotsitov: issledovaniye metodom fluorescentnykh zondov // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2011. – Vyp.14, №971. – S. 135–139./

Корнієнко Є.М., Посохов Є.О. Спосіб визначення мембранотропної активності криопротектора. Пат. 71516 Україна. UA, МПК G 01 N 33/483, G 01 N 33/483. Опубл. 10.07.2012, Бюл. №13. /Korniyenko Ye.M., Posokhov Ye.O. Sposib vyznachennya membranotropnoi aktyvnosti krioprotektora. Pat. 71516 Ukraina. UA, MPK G 01 N 33/483, G 01 N 33/483. Opubl. 10.07.2012, Byul. №13./

Линник Т.П., Дюбко Т.С., Мартынюк И.Н., Терещенко А.В. Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха // Пробл. криобиологии. – 2010. – Т.20, №1. – С. 34–46. /Linnik T.P., Dyubko T.S., Martynyuk I.N., Tereshchenko A.V. Vzaimodeystviye krioprotektorov s liposomami iz summarnykh lipidov spermiyev petukha // Probl. kriobiologii. – 2010. – T.20, №1. – S. 34–46./

Луговой В.И., Олейник С.Т., Компаниец А.М. Функциональная полноценность тромбоцитов при различных режимах замораживания // Моделирование криобиологических процессов. – Харьков: Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины, 1988. – С. 167–173. /Lugovoy V.I., Oleynik S.T., Kompaniyets A.M. Funktsional'naya polnotsennost' trombotsitov pri razlichnykh rezhimakh zamorazhivaniya // Modelirovaniye kriobiologicheskikh protsessov. – Khar'kov: In-t probl. kriobiologii i kriomeditsiny, 1988. – S. 167–173./

Межидов С.Х. Проницаемость эритроцитов и структурно-функциональный стан компонентів їх цитоплазми на етапах криоконсервування. Дис. ... д-ра біол. наук / 03.00.19 – криобіологія і криомедицина. – Харків, 1999. – 319с. /Mezhidov S.Kh. Pronyknist' erytrotsytiv do krioprotektoriv i strukturno-funktsional'nyy stan komponentiv ikh tsytoplazmy na etapakh kriokonservuvannya. Dys. ... d-ra biol. nauk / 03.00.19 – kriobiologiya i kriomeditsina. – Kharkiv, 1999. – 319s./

Николенко А.В. Влияние глицерина, диметилсульфоксида и 1,2-ПД на показатели функциональной активности тромбоцитов // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. – Киев: Наук, думка, 1989. – С. 45–48. /Nikolenko A.V. Vliyaniye glitserina, dimetilsul'foksida i 1,2-PD na pokazateli funktsional'noy aktivnosti trombotsitov // Teoreticheskiye i prakticheskiye aspekty sovremennoy kriobiologii. – Kiyev: Nauk, dumka, 1989. – S. 45–48./

Посохов Е.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований мембран клеток обонятельного анализатора крыс // Вісник Харківського національного університету. Серія: «Хімія». – 2011. – Вип.20 (43), №976. – С. 92–99. /Posokhov Ye.A. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-oksazola i 2,5-difenil-1,3,4-oksadiazola v kachestve fluorescentnykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy membran kletok obonyatel'nogo analizatora krys // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu. Seriya: «Khimiya». – 2011. – Vyp.20 (43), №976. – S. 92–99./

Посохов Е.А., Абманова Н.А., Бойко Т.П., Дорошенко А.О. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований // Вісник Харківського національного університету. Серія: «Хімія». – 1999. – Вип.4 (27), №454. – С. 188–190. /Posokhov Ye.A., Abmanova N.A., Boyko T.P., Doroshenko A.O. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-oksazola i 2,5-difenil-1,3,4-oksadiazola v kachestve fluorescentnykh zondov dlya mediko-biologicheskikh issledovaniy // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu. Seriya: «Khimiya». – 1999. – Vyp.4 (27), №454. – S. 188–190./

Посохов Е.А., Бойко Т.П., Бевзюк Д.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран // Вісник Харківського національного університету. Серія: «Хімія». – 2001. – Вип.7 (30), №532. – С. 192–194. /Posokhov Ye.A., Boyko T.P., Bevzyuk D.A. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-oksazola i 2,5-difenil-1,3,4-oksadiazola v kachestve fluorescentnykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy model'nykh biomembran // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu. Seriya: «Khimiya». – 2001. – Vyp.7 (30), №532. – S. 192–194./

- Посохов Є.О. Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран. Пат. 68871 UA, МПК G 01 N 33/483, G 01 N 33/483. Оpubл. 10.04.2012, Бюл. №7. /Posokhov Ye.O. Nabir fluorescentnykh zondiv dlya vyznachennya fiziko-himichnykh vlastyivostey lipidnykh membran. Pat. 68871 UA, MPK G 01 N 33/483, G 01 N 33/483. Opubl. 10.04.2012, Byul. №7./
- Шраго М.Л., Ханина Л.А., Коций С.В. и др. Криопротектор. – Авторское свидетельство 1298203 (СССР). Оpubл. в Б.И. – 1987. – №11. /Shrago M.L., Khanina L.A., Koshchiy S.V. i dr. Krioprotektor. – Avtorskoye svidetel'stvo 1298203 (SSSR). Opubl. v B.I. – 1987. – №11./
- Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. Basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology. – 1990. – Vol.27, Issue 4. – P. 401–415.
- Bruce L.J., Robinson H.C., Guizouarn H. et al. Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1 // Nat. Genet. – 2005. – Vol.37. – P. 1258–1263.
- Delaunay J. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations // Semin. Hematol. – 2004. – Vol.41. – P. 165–172.
- Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A. Radiationless deactivation of excited phototautomer form and molecular structure of ES IPT- compounds // Photochem. Photobiol. Sci. – 2002. – T.1. – P. 92–99.
- Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A. et al. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole // Journ. Phys. Org. Chem. – 2000. – Vol.13. – P. 253–265.
- Dyubko T.S., Onishchenko E.V., Pivovarenko V.G. Influence of freezing and low molecular weight cryoprotectants on microsomal membrane structure: a study by multiparametric fluorescent probe // J. Fluoresc. – 2006. – Vol.16. – P. 817–823.
- Fuller B.J., Benson E.E., Lane N. Life in the frozen state. – New York: CRC Press, 2004. – 672p.
- Gallagher P.G., Chang S.H., Rettig M.P. et al. Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis // Blood. – 2003. – Vol.101, №11. – P. 4625–4627.
- Posokhov Ye.O., Tkachenko A.S., Korniyenko Ye.M. Influence of carrageenan (E407) on the membrane of enterocytes investigated by fluorescent probes // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип.1, Т.1 (98). – С. 229–233.
- Shapiro H.M. Flow cytometry. – NY: Science, 1995. – 542p.

Представлено: Н.І.Іванова / Presented by: N.I.Ivanova
Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko
Подано до редакції / Received: 06.03.2014