

ЕФЕКТИВНІСТЬ ХЛОРПРОМАЗИНУ В МОДЕЛЬНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАХ І ПРИ ВИДАЛЕННІ ГЛІЦЕРИНУ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ**О.О. Чабаненко¹, К.А. Сєміонова², Н.В. Орлова³, Н.М. Шпакова⁴**^{1,3,4}Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, вул. Переяславська, 23, Харків, 61016, Україна²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи 4, Харків, 61022, Україна

У трансфузійної медицині еритроцити зберігають охолодженими протягом не більш ніж 6 тижнів. В якості альтернативи, кріоконсервація дозволяє зберігати еритроцити протягом багатьох років. В наш час актуальною проблемою є розробка нових підходів до вирішення проблем довготривалого зберігання еритроцитів в умовах заморожування. Це є цінним підходом для довгострокового зберігання еритроцитів донорів з рідкісними групами крові та для військового контингенту. Тим не менш, накопичення запасів кріоконсервованих еритроцитів також може бути корисним у надзвичайних або клінічних ситуаціях, коли попит перевищує пропозицію [1].

Вплив кріопошкоджуючих факторів на клітини на одному з етапів процесу низькотемпературного консервування, пов'язаним із відігріванням і видаленням проникаючих кріопротекторів, вивчають за допомогою двох моделей: гіпотонічного лізису та постгіпертонічного шоку [2,3].

Раніше було показано, що амфіфільні сполуки знижують пошкодження клітин в умовах дії стресових факторів [4,5]. Зокрема, хлорпромазин знижує рівень пошкодження еритроцитів при гіпертонічному шоці та гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів [6]. Захисну дію хлорпромазину пов'язують зі здатністю його молекул вбудовуватися в мембрану і модифікувати її [6]. Таким чином, антигемолітична активність хлорпромазину визначається станом і властивостями еритроцитарних мембран.

Мета – порівняне вивчення ефективності хлорпромазину в умовах гіпотонічного і постгіпертонічного шоку еритроцитів людини та на етапі видалення гліцерину з клітин, що були кріоконсервовані.

Для здійснення гіпотонічного шоку еритроцити переносили у середовища (0,04-0,12 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4) при температурі 0°C. Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали перенесенням клітин із гіпертонічного розчину (1,75 моль/л NaCl) в ізотонічне середовище (0,15 моль/л NaCl) при 0°C. Кінцевий гематокрит складав 0,4%. Хлорпромазин додавали в гіпотонічне та ізотонічне середовища перед внесенням до них еритроцитів. Заморожування суспензії еритроцитів з гліцерином (15%) здійснювали шляхом швидкого занурення в рідкий азот (-196°C). Для видалення гліцерину з відігрітих клітин використовували NaCl у концентрації 0,6 моль/л (одноразово) і 0,15 моль/л (дворазово) у присутності хлорпромазину [7]. Рівень гемолізу еритроцитів визначали методом спектрофотометрії при довжині хвилі 543 нм.

Для оцінки і порівняння ефективності дії хлорпромазину використовували поняття максимальної антигемолітичної активності ($AG_{\text{макс}}$), яку обчислювали за формулою:

$$AG_{\text{макс}} = \frac{k - a}{k} \times 100 \% , \text{ де } k - \text{ величина гемолізу еритроцитів за відсутності}$$

амфіфільної речовини; a – мінімальна величина гемолізу еритроцитів у присутності хлорпромазину.

Ефективну концентрацію хлорпромазину визначали з концентраційних залежностей гіпотонічного шоку і постгіпертонічного шоку як концентрацію речовини, що відповідає середині діапазону концентрацій амфіфільної сполуки, в межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів.

Встановлено, що величина максимальної антигемолітичної активності хлорпромазину в умовах гіпотонічного шоку еритроцитів людини становить $69 \pm 6 \%$. Діапазон максимально захисних концентрацій хлорпромазину для еритроцитів людини складає 20 – 60 мкмоль/л, значення ефективної концентрації дорівнює 40 мкмоль/л.

В умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів хлорпромазин захищає клітини від ушкодження. При використанні хлорпромазину в ефективній концентрації (600 мкмоль/л) антигемолітична активність речовини складає $77 \pm 7 \%$

Для тривалого зберігання еритроцитів людини широко використовується кріоконсервування під захистом гліцерину, який є проникаючим кріопротектором. Перед трансфузією розморожених еритроцитів необхідним є етап відмивання клітин від гліцерину [8]. Це пов'язано з тим, що при перенесенні еритроцитів, насичених гліцерином, в кровоносне русло реципієнта або в ізотонічне середовище (0,15 моль/л NaCl), клітини руйнуються. Оскільки швидкість входу води вища, ніж швидкість виходу гліцерину з клітини, еритроцити набрякають і, досягши критичного гемолітичного об'єму, лізують. За своєю суттю багатоступеневе видалення гліцерину з еритроцитів є «інструментом» для зниження рівня постгіпертонічного лізису еритроцитів.

У ході поетапного видалення гліцерину з розморожених еритроцитів найбільший рівень ушкодження спостерігається при перенесенні клітин у перше ізотонічне середовище (гемоліз 25%). Використання хлорпромазину в концентрації, яка була ефективною при постгіпертонічному шоці, дозволяє знизити рівень гемолізу клітин в 2-3 рази. Антигемолітична активність речовини складає порядку 70%.

Таким чином, встановлена висока ефективність хлорпромазину при його застосуванні як у двох модельних експериментах (гіпотонічний шок і постгіпертонічний шок), так і при видаленні гліцерину з клітин, які були піддані кріоконсервуванню. При цьому у всіх випадках антигемолітична активність хлорпромазину була на рівні 70%, у той час як збіг значень ефективних концентрацій спостерігалось тільки при постгіпертонічному шоці та на етапі видаленні гліцерину з клітин, які були кріоконсервовані.

Оскільки захисний ефект хлорпромазину, який був виявлений у модельному експерименті (постгіпертонічний шок), встановлений і в реальних умовах заморожування-відігрівання еритроцитів (при видаленні гліцерину з клітин), слід говорити про відповідності цієї моделі і доцільності її застосування в подальших експериментах.

Література

1. The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties / S. Henkelman, J.W. Lagerberg, R. Graaff [et al.] // *Transfusion*. – 2010. – Vol. 50, № 11. – P. 2393-2401.
2. Hypotonic Lysis of Mammalian Erythrocytes in Chlorpromazine Presence / E.A. Semionova, N.A. Iershova, N.V. Orlova, N.M. Shpakova // *Eastern European Scientific Journal*. – 2016. – № 2. – P. 7–17
3. Peculiarities of Posthypertonic Lysis in Erythrocytes of Several Mammals / E.A. Semionova, N.A. Yershova, S.S. Yershov [et al.] // *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 73-83.
4. Ершова Н.А. Влияние фенилгидразина и алкилсульфатов на осмотическую чувствительность эритроцитов млекопитающих / Н.А. Ершова, Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова // *Доповіді НАН України*. – 2012. – № 6. – С. 129-133.
5. Application of alkyl sulfates and heat treated erythrocytes in hypertonic cryohemolysis / N.M. Shpakova, N.A. Iershova, N.V. Orlova [et al.] // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – Vol.8, № 3. – P. 129–136.
6. Вплив катіонних та аніонних амфифільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців / С.С. Єршов, Н.А. Писаренко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова // *Фізіологічний журнал*. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 78–84.
7. Sumida S. Cryopreservation, cryosurgery, cryovaccination and cryoimmunology,

transfusion, transplantation, cell and tissue culture, and basis of regenerative therapy / S. Sumida // *Low temperature medicine*. – 2014. – Vol. 40, № 4. – P. 69–130.

8. Frozen blood products: clinically effective and potentially ideal for remote Australia / A. Holey, D.C. Marks, L. Johnson [et al.] // *Anaesth. Intensive Care*. – 2013. – Vol. 41, № 1 – P. 10–19.