

УДК 57.043:615.21/.26:547.426.1:612.111

Е.А. Семионова, Н.Г. Землянских, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова\*

## Антигемолитическая эффективность хлорпромазина в условиях постгипертонического шока и при удалении глицерина из эритроцитов после размораживания

UDC 57.043:615.21/.26:547.426.1:612.111

### E.A. Semionova, N.G. Zemlyanskikh, N.V. Orlova, N.M. Shpakova\* Antihemolytic Efficiency of Chlorpromazine under Posthypertonic Shock and Glycerol Removal from Erythrocytes after Thawing

**Реферат:** В работе проведено сравнительное исследование влияния хлорпромазина на чувствительность эритроцитов человека к действию постгипертонического шока и на их устойчивость в процессе удаления глицерина из клеток, подвергнутых замораживанию-отогреву. Показано, что в условиях постгипертонического шока эритроцитов (0°C) хлорпромазин снижает уровень гемолиза в 3,7 раза, при этом в концентрации 600 мкмоль/л его максимальная антигемолитическая активность составляет (73 ± 6)%. Применение хлорпромазина при удалении глицерина из размороженных эритроцитов позволяет снизить повреждение клеток в 2,5–3 раза. Значения антигемолитической активности хлорпромазина в обоих случаях находятся в одном диапазоне. Результаты исследования эффективности хлорпромазина в модельном эксперименте и реальных условиях замораживания-отогрева эритроцитов (при удалении глицерина из клеток) позволяют сделать вывод о целесообразности использования указанной модели (постгипертонический шок) в дальнейших исследованиях.

**Ключевые слова:** эритроциты, человек, постгипертонический шок, криоконсервирование, удаление криопротектора, глицерин, хлорпромазин.

**Реферат:** У роботі проведено порівняльне дослідження впливу хлорпромазину на чутливість еритроцитів людини до дії постгіпертонічного шоку і на їх стійкість у процесі видалення гліцерину з клітин, які були піддані заморожуванню-відігріванню. Показано, що в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів (0°C) хлорпромазин знижує рівень гемолізу в 3,7 рази, при цьому в концентрації 600 мкмоль/л його максимальна антигемолітична активність становить (73 ± 6)%. Застосування хлорпромазину при видаленні гліцерину із розморожених еритроцитів дозволяє знизити пошкодження клітин у 2,5–3 рази. Значення антигемолітичної активності хлорпромазину в обох випадках знаходяться в одному діапазоні. Результати дослідження ефективності хлорпромазину в модельному експерименті і реальних умовах заморожування-відігрівання еритроцитів (при видаленні гліцерину з клітин) дозволяють зробити висновок про доцільність використання зазначеної моделі (постгіпертонічний шок) в подальших дослідженнях.

**Ключові слова:** еритроцити, людина, постгіпертонічний шок, криоконсервування, видалення криопротектора, гліцерин, хлорпромазин.

**Abstract:** The chlorpromazine effect on sensitivity of human erythrocytes to the action of posthypertonic shock and their resistance at glycerol removal from the cells exposed to freeze-thawing has been studied in our research. It has been shown that under conditions of posthypertonic shock of erythrocytes (at 0°C) the chlorpromazine reduced a hemolysis level in 3.7 times, and in case of 600 μmol/L concentration its maximum antihemolytic activity was (73 ± 6)%. The application of chlorpromazine during removal of glycerol from frozen-thawed erythrocytes enabled to reduce the cell damage by 2.5–3 times. The values of antihemolytic activity of chlorpromazine in both cases were quite similar. Results of the investigation of chlorpromazine efficiency in the model experiment and under the real conditions of erythrocyte freeze-thawing (under glycerol removal from the cells) allow to conclude about the applicability of this model (posthypertonic shock) in the further studies.

**Key words:** erythrocytes, human, posthypertonic shock, cryopreservation, cryoprotectant removal, glycerol, chlorpromazine.

Для криобиологии характерны исследования процессов, протекающих на разных этапах низкотемпературного консервирования биологических объектов [12, 14, 19, 20]. Это связано с необходимостью разработки новых методов криоконсервирования с учетом механизмов криоповреждения и криозащиты, в отличие от эмпирического подбора сред и условий замораживания-отогрева биологического объекта.

Studying the processes occurring at different stages of low-temperature preservation of biological objects is typical for cryobiology [2, 8, 13, 15]. This is because of a need in considering the mechanisms of cryoinjury and cryoprotection when developing new cryopreservation methods, in contrast to an empirical selection of the media, freezing and thawing conditions for a biological object.

Отдел криоцитологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Поступила 15.11.2016

Принята в печать 06.12.2016

Received November, 15, 2016

Accepted December, 06, 2016

© 2017 E.A. Semionova et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Несмотря на значительные достижения в изучении причин криоповреждения [13, 21], вопрос об основных факторах, которые влияют на жизнеспособность биологического объекта, подвергнутого замораживанию-отогреву, изучен недостаточно. Это обусловлено тем, что в замораживаемом биологическом материале различные процессы протекают фактически одновременно, поэтому в реальных условиях достаточно сложно исключить действие одних факторов криоповреждения с целью изучения других. Для определения вклада каждого из факторов в общее криоповреждение клеток используют следующие модели: гипертонический шок, гипертонический криогемолиз, гипотонический лизис, постгипертонический шок [8, 10, 22]. С помощью гипертонического шока и гипертонического криогемолиза изучают действие факторов криоповреждения, которое реализуется на этапе замораживания эритроцитов. В указанных модельных условиях амфифильные соединения, в частности хлорпромазин, защищают эритроциты от повреждения и проявляют высокую антигемолитическую активность [4, 5].

При размораживании криоконсервированных эритроцитов по мере таяния льда внеклеточная гипертоническая среда сменяется на изотоническую, вследствие чего развивается постгипертонический лизис эритроцитов [14]. Для моделирования факторов криоповреждения, которые действуют на этапе размораживания эритроцитов, а также при перенесении в кровеносное русло клеток, криоконсервированных под защитой проникающего криопротектора, используют постгипертонический шок эритроцитов [8].

В отличие от гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих, исследованию которых посвящены многочисленные работы [2–4], явление постгипертонического шока эритроцитов млекопитающих изучено в меньшей степени, при этом результаты единичны и разрознены [6, 19].

Постгипертонический шок (ПГШ), как и любая другая модель, дает приближенное описание реального процесса. Несмотря на то, что эта модель используется в течение длительного времени [6, 8], представляет интерес выяснить, в какой степени связаны между собой модель и реальное явление (постгипертоническое повреждение клеток при размораживании и удалении проникающего криопротектора из них) и насколько возможен перенос выводов, полученных с помощью модели, на действительность.

Оценка соответствия (адекватности) модели существующей системе проводится посредством сравнения результатов, полученных в обоих

Despite the convincing achievements made during investigation of the cryoinjury causes [4, 16], the main factors affecting the viability of a biological object, exposed to freeze-thawing, are not completely clear. This is due to the fact that freezing of biological specimens is accompanied with almost simultaneous occurrence of several processes, thus in reality it is quite difficult to separate the effects of certain factors of cryoinjury to study others. To determine the contribution of each factor into a cell cryodamage the following models could be used: hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis, hypotonic lysis, posthypertonic shock [18–20]. The action of cryodamage factors occurring at the freezing stage of erythrocytes was studied by means of hypertonic shock and cryohemolysis. Amphiphilic compounds, in particular, chlorpromazine, protect erythrocytes from a damage under these conditions and exhibit a high antihemolytic activity [5, 10].

Thawing of cryopreserved erythrocytes results in an alternation of extracellular hypertonic medium to isotonic one and in such way in the development of hypertonic lysis of erythrocytes [8]. Simulation of the cryodamage factors existing during thawing of erythrocytes as well as following the transfer into bloodstream of cells cryopreserved under protection of penetrating cryoprotectant, could be provided by the posthypertonic shock of erythrocytes [18].

Unlike hypertonic shock and hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes described elsewhere [3, 5, 6] the phenomenon of posthypertonic shock of mammalian erythrocytes has not been completely studied yet, and the results are single and diverse [13, 14].

Like any other model, the posthypertonic shock (PHS), provides only approximate description of a real process. This model has been used for a long time [14, 18], nevertheless it is interesting to find out to what extent the model and a real phenomenon (posthypertonic cell damage during freeze-thawing and removal of penetrating cryoprotectant from them) are related and how to extrapolate precisely the model-based conclusions into reality.

The evaluation of an adequacy of the model to real situations could be assessed by comparing the results obtained in both cases. Antihemolytic agent chlorpromazine (CP) was chosen as an indicator of the cell state. Based on the stated above it is expedient to study the effects of CP under PHS conditions as well as during freeze-thawing of cells and removal of penetrating cryoprotectant. However, it is not possible to check the effectiveness of CP during thawing of erythrocytes due to the technical complexity of the substance administration directly at this stage. Therefore, we can study and compare the effect of this compound



случаях. Для этого в качестве детектора состояния клеток был выбран антигемолитический агент хлорпромазин (ХПР). Исходя из вышеизложенного следует изучить эффекты ХПР в условиях ПГШ, а также на этапах размораживания клеток и удаления из них проникающего криопротектора. Однако проверить эффективность ХПР при отогреве эритроцитов невозможно из-за технической сложности введения вещества непосредственно на этом этапе. Поэтому мы можем изучить и сопоставить влияние данного соединения на клетки в условиях ПГШ и на этапе удаления криопротектора из размороженных эритроцитов. В качестве проникающего криопротектора был выбран глицерин, который широко используется для криоконсервирования эритроцитов человека [1, 14, 15, 17, 18] и который необходимо удалять из размороженных клеток для предотвращения их повреждения при трансфузии.

Исходя из вышеизложенного целью работы было сравнительное изучение влияния хлорпромазина на устойчивость эритроцитов человека в условиях постгипертонического шока и на этапе удаления глицерина из клеток, подвергнутых замораживанию-отогреву.

### Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» («Биофарма», Украина).

После удаления плазмы эритроциты трижды центрифугировали при 3000 об/мин (центрифуга «ОПн-3У4.2», Кыргызстан) в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (NaCl 0,15 моль/л; фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0°C. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4. В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Исходную суспензию эритроцитов получали добавлением осадка клеток к физиологическому раствору в отношении 1:10.

Постгипертонический шок осуществляли перенесением эритроцитов из гипертонического раствора (среда дегидратации) в изотонический (среда регидратации) при 37 или 0°C. Концентрация NaCl в среде дегидратации составляла 1,75 моль/л, в среде регидратации – 0,15 моль/л. Эритроциты инкубировали в среде дегидратации в течение 20 мин, в среде регидратации – 5 мин. Конечный гематокрит – 0,4%. Хлорпромазин находился в среде регидратации перед внесением эритроцитов.

on cells under PHS and at stage of cryoprotectant removal from frozen-thawed erythrocytes. Glycerol was chosen as a penetrating cryoprotectant; it is used widely for the cryopreservation of human erythrocytes [1, 7, 8, 11, 12] and has to be removed from the thawed cells to prevent their damage during transfusion.

Based on the abovementioned, the research aim was a study of chlorpromazine effect on resistance of human erythrocytes under posthypertonic shock and at the stage of glycerol removal from the cells exposed to freeze-thawing.

### Materials and methods

The research was conducted in erythrocytes from human blood, preserved with Glugicir hemopreservative (Biofarma, Ukraine). After the plasma removal the erythrocytes were thrice washed by centrifugation (centrifuge OPN-3U4.2, Kyrgyzstan) at 3000 rpm for 3 min in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/L NaCl; 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 7.4). Buffy coat layer and supernatant were aspirated. Erythrocytes were stored as a dense sediment not longer as 4 hrs under 0°C. All the media were prepared with 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 7.4. In the research we used the home-produced reagents of ‘chemically pure’ and ‘chemically pure for analysis’ grades.

The initial suspension of erythrocytes was obtained by addition of the cell sediment to physiological saline in the ratio of 1:10.

Posthypertonic shock was initiated by transferring the erythrocytes from hypertonic solution (dehydration media) into isotonic one (rehydration medium) at 37 or 0°C. The concentration of NaCl in the dehydration medium was 1.75 mol/L and in rehydration medium did 0.15 mol/L. Erythrocytes were incubated in dehydration medium for 20 min and in rehydration solution they were held for 5 min. The final hematocrit was 0.4%. Chlorpromazine was in rehydration medium prior to mixing with erythrocytes.

Freezing was done with erythrocytes obtained from blood of three donors. Cryopreservative solution was added to erythrocytes in the ratio of 1:1, thereafter the suspension was incubated for 20 min at room temperature (22°C). The composition of cryopreservative consisted of glycerol (30%), mannitol (4%), NaCl (150 µmol/L), phosphate buffer (10 µmol/L), pH 7.4 [1]. The cell suspension was frozen in 2.0 ml vials (Eppendorf, USA) down to –196°C by rapid plunging into liquid nitrogen, thawed in a water bath (42°C) with a constant shaking until the solid phase disappearance.

Thawed cell suspension was centrifuged and the supernatant was removed. Glycerol was removed from erythrocytes according to the following protocol [17, 22]: the 1<sup>st</sup> stage represented washing with an equal



Для замораживания использовали эритроциты, полученные из крови трех доноров. Раствор криоконсерванта добавляли к эритромассе в отношении 1 : 1, после чего суспензию инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре (22°C). В состав криоконсерванта входили глицерин (30%), маннитол (4%), NaCl (150 ммоль/л), фосфатный буфер (10 ммоль/л), pH 7,4 [1]. Клеточную суспензию замораживали в пробирках емкостью 2,0 мл («Eppendorf», США) до температуры –196°C путем быстрого погружения в жидкий азот, размораживали в водяной бане (42°C) при постоянном покачивании пробирок до исчезновения твердой фазы.

Размороженную клеточную суспензию центрифугировали и убрали надосадок. Глицерин из эритроцитов удаляли по следующей схеме [7, 23]: этап 1 – отмывка равным объемом раствора NaCl (600 ммоль/л); этапы 2 и 3 – отмывка равными объемами изотонического раствора NaCl (150 ммоль/л; pH 7,4).

Хлорпромазин добавляли в отмывочные среды перед внесением клеток (гематокрит – 0,4 %). Контролем служили эритроциты в соответствующих отмывочных средах, не содержащих ХПР.

Уровень гемолиза эритроцитов в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 («Merck», Германия) в концентрации 0,1%.

Зависимости постгипертонического гемолиза эритроцитов от концентрации ХПР в среде получали при 37 и 0°C. Из них определяли размеры «плато» концентраций вещества, значение эффективной концентрации и рассчитывали величину максимальной антигемолитической активности ХПР. «Плато» – это диапазон концентраций ХПР, при которых наблюдается минимальный уровень гемолиза эритроцитов. Эффективная концентрация вещества соответствовала середине указанного «плато».

Значение максимальной антигемолитической активности амфифильного соединения рассчитывали по формуле

$$AG_{\text{макс}} = \frac{k - a}{k} \times 100 \%,$$

где  $k$  – величина гемолиза эритроцитов при отсутствии амфифильного вещества;  $a$  – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Статистическую обработку полученных экспериментальных результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Значимость раз-

volume of NaCl solution (600  $\mu\text{mol/L}$ ); the 2<sup>nd</sup> and the 3<sup>rd</sup> stages involved washing with equal volumes of NaCl isotonic solution (150  $\mu\text{mol/L}$ ; pH 7.4).

Chlorpromazine was added to washing media before introducing the cells (hematocrit was 0.4%). The control erythrocytes were treated by the same washing media but without CP.

Erythrocyte hemolysis level in supernatant was spectrophotometrically measured at 543 nm. Absorption of erythrocytes sample mixed with 0.1% triton X-100 (Merck, Germany) was assumed as 100% hemolysis.

Dependencies of erythrocyte posthypertonic hemolysis vs. CP concentrations in the media were obtained at 37 and 0°C. They were used to determine the sizes of substance concentrations ‘plateau’, the value of effective concentration and value of maximum antihemolytic activity of CP. ‘Plateau’ was considered as a range of CP concentrations, associated with the minimum level of erythrocyte hemolysis. Effective concentration of the substance corresponds to the mid-point of this ‘plateau’.

A value of maximum antihemolytic activity of amphiphilic compound was calculated by the formula

$$AH_{\text{max}} = \frac{k - a}{k} \times 100 \%,$$

where  $k$  was the value of erythrocyte hemolysis without amphiphilic substance;  $a$  was the minimum value of erythrocyte hemolysis with amphiphilic substance.

The obtained data were statistically processed using Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA). The normality of distribution was tested using Shapiro-Wilk criterion. The significance of differences between the samples was evaluated by the parametric method using Student’s t-test. The experimental data were presented as the mean value of quantitative indices ( $M$ )  $\pm$  standard error of the arithmetic mean ( $m$ ).

## Results and discussion

Thawing the erythrocytes is accompanied with a sharp decrease in environmental osmolality which renders a damaging effect on the cells. The effect of this factor can be simulated by transferring cells from hypertonic into isotonic conditions at positive temperatures.

When describing the factors affecting the cells both at the stage of warming and removal of penetrating cryoprotectant, one uses the terms ‘posthypertonic shock’, ‘posthypertonic hemolysis’, ‘posthypertonic lysis’. The last one appears most often in scientific publications [13, 14], and it is used by the researchers both to indicate the effects on cells and to describe the result of this influence, that certainly complicates



личий между полученными выборками оценивали параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента. Экспериментальные данные представляли как среднее арифметическое значение количественных показателей ( $M$ )  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического ( $m$ ).

### Результаты и обсуждение

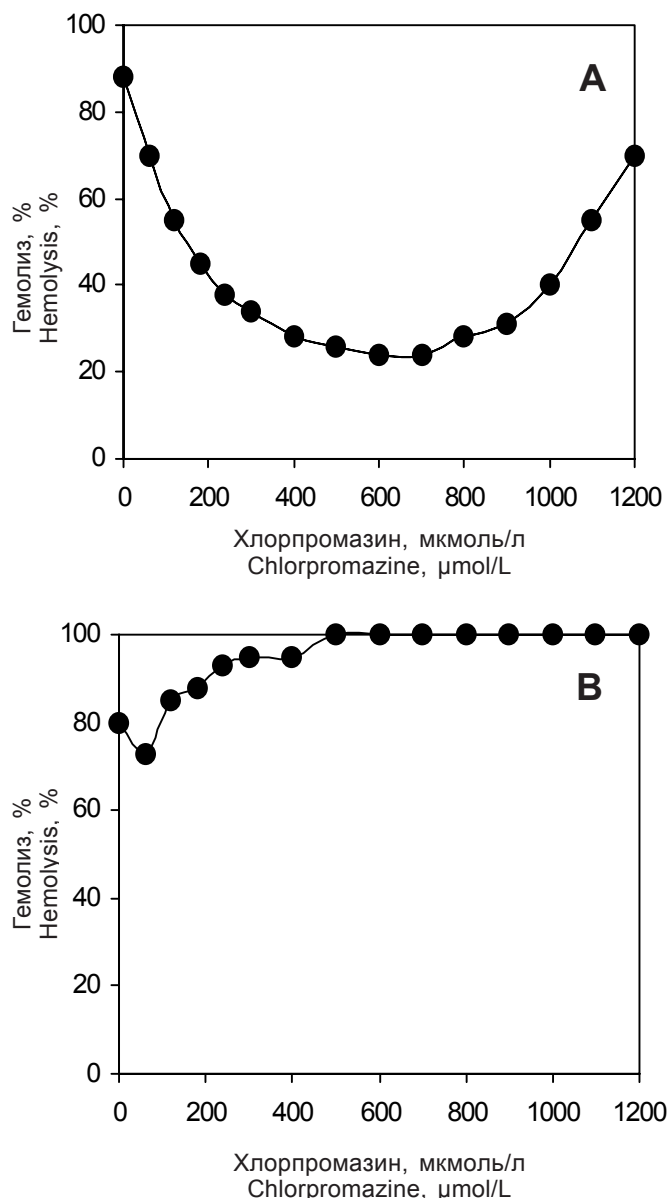
В процессе размораживания эритроцитов повреждающее действие на клетки оказывает резкое снижение осмоляльности окружающей среды. Влияние указанного фактора на клетки можно моделировать их перенесением из гипертонических условий в изотонические при положительных температурах.

При описании факторов, действующих на клетки как на этапе отогрева, так и при удалении из них проникающего криопротектора, используют термины: «постгипертонический шок», «постгипертонический лизис», «постгипертонический гемолиз». Чаще всего в научной литературе встречается термин «постгипертонический лизис» [6, 19], причем исследователи применяют его как для обозначения собственно воздействия на клетки, так и для описания результата этого воздействия, что, несомненно, усложняет восприятие экспериментального материала. В нашей работе для обозначения действия на клетки резкого снижения осмоляльности среды от гипертонических до изотонических значений мы использовали термин «постгипертонический шок», а для описания повреждения эритроцитов в результате действия ПГШ – «постгипертонический лизис» или «постгипертонический гемолиз».

Для развития постгипертонического лизиса (ПГЛ) эритроцитов необходимы два последовательных этапа: дегидратация и регидратация клеток. С целью выполнения данного условия эритроциты переносили из среды 1,75 моль/л NaCl (этап дегидратации) в среду 0,15 моль/л NaCl (этап регидратации) при 37 или 0°C. Хлорпромазин в разных концентрациях вносили в среду регидратации.

На рис. 1 представлены зависимости уровня ПГЛ эритроцитов от концентрации ХПР при 37 и 0°C. Видно, что при 0°C уровень гемолиза эритроцитов в отсутствие ХПР составляет 88%. Добавление ХПР в среду регидратации позволило снизить уровень ПГЛ клеток (максимально в 3,7 раза). Однако такой защитный эффект ХПР наблюдался только при температуре 0°C.

Эффективность ХПР оценивали, используя полученную концентрационную зависимость постгипертонического гемолиза эритроцитов при 0°C (рис. 1). Для этого определяли величину макси-



**Рис. 1.** Влияние хлорпромазина на уровень гемолиза эритроцитов человека, перенесенных из 1,75 моль/л в 0,15 моль/л NaCl при температуре 0 (А) и 37°C (В).

**Fig. 1.** Chlorpromazine effect on hemolysis level of human erythrocytes transferred from 1.75 mol/L to 0.15 mol/L NaCl at 0 (A) and 37°C (B).

the understanding of described experiments. In our research we used the term ‘posthypertonic shock’ to define the action of a sharp decrease in medium osmolality from hypertonic to isotonic values on the cells; and with the term ‘posthypertonic lysis’ or ‘posthypertonic hemolysis’ we described the erythrocyte injury as a result of PHS.

Development of posthypertonic lysis (PHL) of erythrocytes requires two consequent stages: cell dehydration and rehydration. To do this the erythrocytes were transferred from 1.75 mol/L NaCl medium (dehydration stage) into 0.15 mol/L NaCl solution

мальной антигемолитической активности и значение эффективной концентрации ХПР. Так, в условиях ПГШ эритроцитов (0°C) максимальная антигемолитическая активность данного вещества в эффективной концентрации (600 мкмоль/л) достигала (73 ± 6)%, а в концентрации 180 мкмоль/л (при которой еще сохраняется барьерная функция мембраны по отношению к ионам феррицианида [9]) – (49 ± 4)%.

Для длительного хранения эритроцитов человека широко используется криоконсервирование под защитой глицерина, который является проникающим криопротектором. Перед трансфузией размороженных эритроцитов необходим этап отмывки клеток от глицерина [16]. Это связано с тем, что при перенесении эритроцитов, насыщенных глицерином, в кровеносное русло реципиента или изотоническую среду (0,15 моль/л NaCl), клетки будут разрушаться. Поскольку скорость входа воды выше, чем скорость выхода глицерина из клетки, эритроциты набухают и при достижении критического гемолитического объема лизируют. По своей сути многоступенчатая отмывка эритроцитов от глицерина является «инструментом» для снижения уровня ПГЛ эритроцитов.

Исходя из того, что ХПР проявлял эффективность в условиях модельного эксперимента (ПГШ), для проверки адекватности модели мы исследовали влияние вещества на размороженные эритроциты в условиях удаления из них криопротектора. Для этого важно выяснить, будет ли на этапе отмывки клеток от глицерина проявляться защитный эффект ХПР, установленный с использованием модельного подхода (рис. 1), и при наличии положительного результата необходимо сравнить эффективность ХПР в обоих случаях.

Удаление глицерина из клеток происходит поэтапно [1, 7, 23]. Сначала размороженные и осажденные эритроциты переносят в среду, содержащую 0,6 моль/л NaCl, затем их подвергают последовательному двукратному отмыванию физиологическим раствором. В данной работе ХПР в концентрациях 180 и 600 мкмоль/л присутствовал на каждом этапе отмывания клеток от глицерина, причем эритроциты вносили в среды, которые уже содержали амфифильное вещество.

На рис. 2 представлены результаты применения ХПР на этапах удаления глицерина из суспензии эритроцитов, подвергнутых замораживанию-отогреву. В работе использовали эритроциты, полученные от трех доноров.

После размораживания клеток уровень гемолиза не превышал 7%. При использовании на этапе 1 гипертонического раствора (0,6 моль/л NaCl) уровень гемолиза составлял 1–2%. Применение фи-

(rehydration stage) at 37 or 0°C. Chlorpromazine at various concentrations was added to the rehydration medium.

Fig. 1 demonstrates the dependences of PHL level of erythrocyte concentrations at 37 and 0°C. It can be seen that the haemolysis level of erythrocytes without PHL made 88% at 0°C. Addition of the CP to rehydration medium enabled to reduce the PHL level of cells (up to 3.7 times). However, this protective effect of CP was observed only at 0°C.

Efficiency of chlorpromazine was evaluated using the obtained concentration dependence of posthypertonic erythrocyte hemolysis at 0°C (Fig. 1). For this purpose the maximum antihemolytic activity and the effective concentration of CP were determined. It was found that under PHS conditions in erythrocytes (at 0°C) the maximum antihemolytic activity of this substance in effective concentration (600 μmol/L) reached (73 ± 6)% and in concentration of 180 μmol/L (the membrane barrier function to the ferricyanide ions is still present at this concentration [23]) it was (49 ± 4)%.

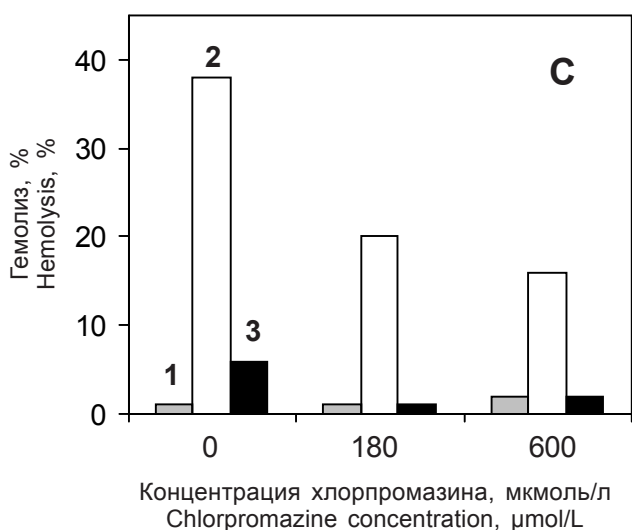
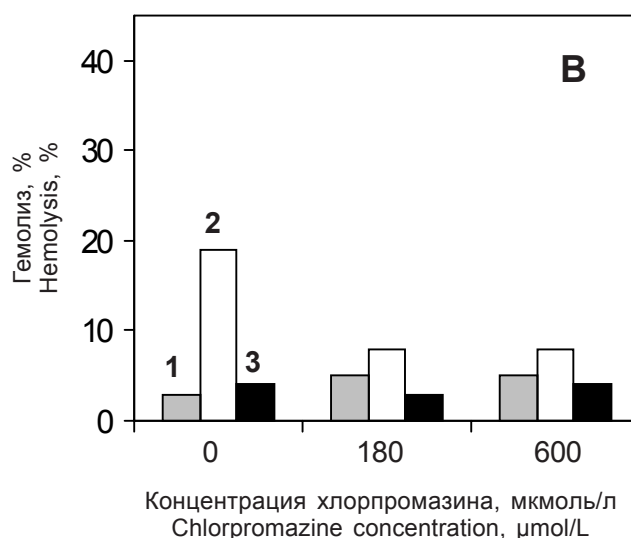
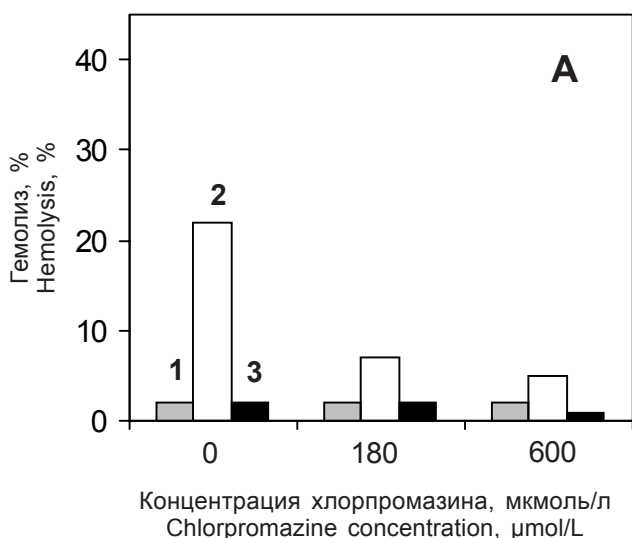
Long-term storage of human erythrocytes widely involves the cryopreservation under protection of a penetrating cryoprotectant glycerol. Washing the cells from glycerol should be performed prior to transfusion of the thawed erythrocytes [9]. This is due to the fact that transfer of the erythrocytes saturated with glycerol into the recipient's bloodstream or isotonic medium (0.15 mol/L NaCl) will result in destruction of the cells. Water influx rate is higher than that of glycerol exiting out of cell, so erythrocytes swell and lyse after reaching the critical hemolytic volume. Thus, a multistage cell removal of glycerol is a 'tool' to reduce the PHL level of erythrocytes.

Considering the fact that CP demonstrated the efficiency in a model experiment (PHS), we have checked an adequacy of the model assessing the substance effect on thawed erythrocytes during removal of cryoprotectant. In this regard it is important to determine whether a protective effect, revealed using the model approach, would be manifested at the stage of cell washing of glycerol (Fig. 1), and, in case of a positive outcome, to compare the effectiveness of CP in both cases.

Removal of glycerol from cells occurs stepwise [1, 17, 22]. Firstly, thawed and sedimented erythrocytes are transferred into the medium containing 0.6 mol/L NaCl, and then they are exposed to double washing with physiological solution. In our research, the CP at concentrations of 600 and 180 μmol/L was present at each stage of cell washing of glycerol, the erythrocytes were transferred into the media which already comprised the amphiphilic substance.

Fig. 2 presents the results of CP application at the stages of glycerol removal from erythrocyte suspension





**Рис. 2.** Влияние хлорпромазина на уровень гемолиза эритроцитов трех разных доноров (А, В, С) при удалении глицерина из размороженных клеток с использованием отмывочных сред: 1 – 0,6 моль/л NaCl; 2 и 3 – 0,15 моль/л NaCl.

**Fig. 2.** Chlorpromazine effect on erythrocyte hemolysis of three different donors (A, B, C) at glycerol removal from thawed cells with washing media: the 1 is 0.6 mol/L NaCl, 2 and 3 are 0.15 mol/L NaCl.

физиологического раствора на этапе 2 приводило к значительному повреждению клеток. Установлено, что уровень гемолиза эритроцитов двух доноров составлял примерно 20% (рис. 2, А, В), а третьего донора – 38% (рис. 2, С). По-видимому, это обусловлено индивидуальными особенностями клеток крови доноров. Применение физиологического раствора на этапе 3 сопровождалось незначительным повреждением клеток (до 5%).

Присутствие ХПР на этапах удаления криопротектора не приводило к дополнительному гемолитическому повреждению эритроцитов (рис. 2). Напротив, в том случае, когда наблюдалось значительное повреждение контрольных клеток (этап 2), ХПР снижал уровень гемолиза эритроцитов всех доноров в 2,5–3 раза (рис. 2, столбик 2). Следует отметить, что степень уменьшения гемолитического повреждения эритроцитов одного из доноров не зависела от используемой концентрации ХПР (рис. 2, В), в то время как для

exposed to freeze-thawing. We used the erythrocytes obtained from three donors. Hemolysis level did not exceed 7% after cell thawing. When using a hypertonic solution (0.6 mol/L NaCl) at the 1<sup>st</sup> stage the hemolysis level was 1–2%. Application of physiological solution at the 2<sup>nd</sup> stage led to a significant cell damage. The level of erythrocyte hemolysis in two donors was approximately 20% (Fig. 2A, B) and in the 3<sup>rd</sup> donor it was 38% (Fig. 2C). This was likely due to the individual characteristics of donors' blood cell. The use of physiological solution at the 3<sup>rd</sup> stage resulted in a damage of small cell fraction (up to 5%).

The presence of CP at the stages of cryoprotectant removal did not result in additional damage of hemolytic erythrocytes (Fig. 2). In contrast, when there was a significant damage of the control cells (the 2<sup>nd</sup> stage), CP reduced the hemolysis level of erythrocytes for all the donors in 2.5–3 times (Fig. 2, column 2). It should be noted that the level of hemolytic damage reduction in erythrocytes of one donor did not depend on the used CP concentrations (Fig. 2, B), while the cells of other two donors (Fig. 2; A, C) showed a tendency to decrease the hemolysis level at a high concentration of the substance. The found values of CP antihemolytic activity (at concentrations of 180 and 600 µmol/L) at the stage of cryoprotectant removal from the cells at the 2<sup>nd</sup> stage are presented in the Table. An analysis of the results (see Fig. 1, Table) showed that the values

клеток двух других доноров (рис. 2, А, С) была характерна тенденция к снижению уровня гемолиза при высокой концентрации вещества. Рассчитанные величины антигемолитической активности ХПР (в концентрациях 180 и 600 мкмоль/л) при удалении криопротектора из клеток на этапе 2 представлены в таблице. Сравнительный анализ результатов (см. рис. 1, таблица) показал, что значения антигемолитической активности ХПР в условиях модельного эксперимента (ПГШ) находятся в диапазоне величин, полученных при удалении криопротектора из размороженных клеток трех доноров (этап 2).

Несмотря на то, что влияние ХПР в концентрациях 180 и 600 мкмоль/л на барьерную функцию мембран эритроцитов (в физиологической среде) различное [9], в данных экспериментальных условиях ХПР в обеих концентрациях проявляет высокую эффективность (таблица).

Следует отметить, что концентрация ХПР, при которой наблюдался его максимальный защитный эффект в условиях ПГШ эритроцитов и регистрировался высокий уровень антигемолитической активности при отмывании глицерина (таблица), гораздо выше эффективных концентраций ХПР, установленных в условиях гипертонического шока, гипертонического криогемолиза и гипотонического лизиса эритроцитов [4, 5, 22]. Вероятно, размер мембранных дефектов, образующихся в последнем случае, меньше, и достаточно небольшого количества амфифильного соединения для предотвращения их развития до гемолитических пор. Совпадение параметров эффективности ХПР (величины максимальной антигемолитической активности и концентраций) в условиях ПГШ и при отмывании от глицерина эритроцитов, подвергнутых криоконсервированию, позволяет предположить, что механизмы действия амфифила в указанных условиях имеют общие черты.

Таким образом, ХПР проявляет эффективность при криоконсервировании эритроцитов под защитой глицерина за счет уменьшения потери клеток на этапе удаления глицерина. Поскольку защитный эффект ХПР, выявленный в модельном эксперименте (действие ПГШ на клетку при 0°C), показан и в реальных условиях замораживания-отогрева эритроцитов, можно говорить о высокой степени соответствия используемой модели и целесообразности ее применения для изучения механизма действия факторов криповреждения на клетки. О правомерности использования модельного подхода свидетельствуют и ранее полученные результаты [11]. Так, с целью скрининга условий добавления непроницающего криопротектора на этапе, предшествующем замораживанию клеток, был

Значения антигемолитической активности хлорпромазина при удалении глицерина из криоконсервированных эритроцитов с использованием среды, содержащей 0,15 моль/л NaCl (этап 2)

The values of chlorpromazine antihemolytic activity during glycerol removal from cryopreserved erythrocytes using the medium, containing 0.15 mol/l NaCl (the 2<sup>nd</sup> stage)

Концентрация хлорпромазина, мкмоль/л Chlorpromazine concentration, μmol/l	Антигемолитическая активность, % Antihemolytic activity, %		
	Донор 1 Donor 1	Донор 2 Donor 1	Донор 3 Donor 1
180	68	58	47
600	77	58	58

of CP antihemolytic activity in a model experiment (PHS) were within the range, obtained when the cryoprotectant was removed from the thawed cells of three donors (the 2<sup>nd</sup> stage).

Despite the fact that effect of CP in concentrations of 180 and 600 μmol/L on the barrier function of erythrocyte membranes (in physiological medium) was different [23], in our experimental conditions both concentrations of CP were highly efficient (Table).

It should be noted that concentration of CP possessing the maximum protective effect under PHS of erythrocytes and providing a high level of antihemolytic activity during glycerol removal (Table) was much higher than the effective CP concentrations in case of hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis and hypotonic lysis of erythrocytes [5, 10, 19]. Probably, the size of membrane defects formed in the latter case was smaller and that amount of amphiphilic compounds was sufficient to prevent their transformation in hemolytic pores. Coincidence in CP efficiency parameters (the values of maximum antihemolytic activity and concentrations) both for PHS and removing of glycerol from the frozen-thawed erythrocytes suggested that mechanisms of amphiphile action under given conditions have common features.

Thus, CP is efficient during cryopreservation of erythrocytes under glycerol protection in terms of reduced the cell loss at the stage of cryoprotectant removal. Whereas the protective effect of CP, revealed in the model experiment (PHS in cell suspension at 0°C), was also found under real conditions of erythrocyte freeze-thawing, it was possible to suggest a high adequacy of the used model and its applicability to study the effect of cryoinjury factors on cells. The previously obtained results testify the possible application of the model approach as well [21]. In particular, screening of the better conditions for adding





использован гипертонический шок эритроцитов. Модельный подход позволил определить оптимальную комбинацию условий, которая была успешно применена при низкотемпературном консервировании эритроцитов млекопитающих [11].

В результате проведенной экспериментальной работы установлено, что в условиях ПГШ эритроцитов и при удалении глицерина из отогретых клеток ХПР проявлял высокую эффективность (определяемую по величинам антигемолитической активности и значениям эффективных концентраций). Поскольку данное вещество является представителем большого класса амфифильных соединений, можно допустить, что указанный модельный подход (ПГШ) позволит выявить из обширного ряда веществ, характеризующихся дифильностью, и другие высоко эффективные соединения при удалении криопротектора из клеток, подвергнутых криоконсервированию.

### Выводы

Показана высокая эффективность ХПР в условиях ПГШ эритроцитов и на этапе удаления глицерина из размороженных клеток. При этом антигемолитическая активность ХПР (600 мкмоль/л) в условиях ПГШ эритроцитов составляет (73 ± 6)% и находится в диапазоне величин, полученных при удалении глицерина из размороженных клеток (58–77%). Аналогичная ситуация выявлена и при использовании ХПР в концентрации 180 мкмоль/л: значение антигемолитической активности ХПР в условиях ПГШ составляет (49 ± 4)% и находится в диапазоне величин (47–68%), полученных при удалении криопротектора.

### Литература

1. Аграненко В.А., Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова Л.И. и др. Методы долговременного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии: Метод. рекомендации. – М.: МЗ СССР, 1980. – 47 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк., 1987. – 81 с.
3. Гордієнко Є.О., Товстяк В.В. Фізика біомембран: підручник. – К.: Наук. думка, 2009. – 272 с.
4. Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфипатов // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 1. – С. 21–27.
5. Ершов С.С., Писаренко Н.А., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Вплив катіонних та аніонних амфифільних сполук на гіпертонічний криогемоліз еритроцитів ссавців // Фізіолог. журн. – 2007. – Т. 53, №6. – С. 78–84.
6. Пателарос С.В., Сычичкова О.П. Осмотическое поведение эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Проблемы криобиологии. – 1994. – №3. – С. 35–40.

the non-penetrating cryoprotectant before cell freezing was performed using hypertonic shock of erythrocytes. The model approach allowed to determine the optimal combination of conditions, that has been successfully used during low-temperature preservation of mammalian erythrocytes [21].

Thus, the results of our experiments demonstrated a high efficiency of CP during PHS of erythrocytes and glycerol removal from thawed cells (determined by antihemolytic activity and effective concentrations). Since this substance belongs to a large class of amphiphilic compounds, the model (PHS) could be capable of revealing other highly-effective compounds for using at cryoprotectant removal from the cryopreserved cells among a broad range of diphilic substances.

### Conclusions

A high efficiency of CP under PHS of erythrocytes at the stage of glycerol removal from the thawed cells has been shown. Antihemolytic activity of CP (in concentration of 600 μmol/L) in the conditions of erythrocyte PHS made (73 ± 6)% and was within the range of the values, obtained during glycerol removal from the thawed cells (58–77%). The same was found when using CP at concentration of 180 μmol/L: antihemolytic activity value of CP under PHS made (49 ± 4)% and was within the range of the values (47–68%), obtained at the cryoprotectant removal.

### References

1. Agranenko V.A., Vinograd-Finkel F.R., Fedorova L.I. et al. Methods of a long-term storage in frozen state for erythrocytes to be transfused [method. recommendations] Moscow: Ministry of Health Care of USSR; 1980.
2. Baust J.G., Gao D., Baust J.M. Cryopreservation. An emerging paradigm change. *Organogenesis* 2009; 5(3): 90–96.
3. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Freezing and cryoprotection. Moscow: Vysshaya Shkola; 1987.
4. Chian R.C. Chapter 1: Cryobiology: an overview. In: Chian R.C., Quinn P., editors. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 1–9.
5. Dunayevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Some possible methods of increasing red blood cell stability to the action of cold and osmotic effects after application of cation amphipates. *Probl Cryobiol* 1995; (1): 21–26.
6. Gordienko E.A., Tovstyak V.V. Physics of biological membranes: a tutorial. Kyiv: Nauk Dumka; 2009.
7. Greer N. Freezing under pressure: a new method for cryopreservation. *Cryobiology* 2015; 70(1): 66–70.
8. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E., editors. *Life in the frozen state*. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press; 2004.
9. Holey A., Marks D.C., Johnson L. et al. Frozen blood products: clinically effective and potentially ideal for remote Australia. *Anaesth Intensive Care* 2013; 41(1): 10–19.
10. Iershov S.S., Pysarenko N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Effect of cationic and anionic amphiphilic compounds on hypertonic



7. Семенова Н.В., Федорова Л.И., Виноградов В.Л. и др. Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания // Гематология и трансфузиология. – 1986. – №10. – С. 42–52.
8. Семионова Е.А., Ершова Н.А., Ершов С.С. и др. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 73–83.
9. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биол. мембраны. – 2005. – Т. 22, №4. – С. 327–335.
10. Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Ніпот О.Є., Александрова Д.І. Порівняльне вивчення дії механічного стресу на еритроцити людини і тварин // Фізіолог. журнал. – 2015. – Т. 61, №3. – С. 75–80.
11. Пат. № 50069, Україна, МПК 8 G 01 N 33/48. Спосіб визначення температурних умов інкубування еритроцитів з ПЕО-1500 / Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, Д.І. Александрова, О.М. Денисова: № у 2009 11892; заявл. 20.11.2009; опубл. 25.05.2010, Бюл. №10.
12. Baust J.G., Gao D., Baust J.M. Cryopreservation. An emerging paradigm change // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, №3. – P. 90–96.
13. Chian R.C. Cryobiology: an overview. In: Fertility Cryopreservation / Ed. by R.C. Chian, P. Quinn. – Cambridge: Cambridge University Press, 2010. – P. 1–9.
14. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E. Life in the frozen state. – Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2004. – 672 p.
15. Greer N. Freezing under pressure: a new method for cryopreservation // Cryobiology. – 2015. – Vol. 70, №1. – P. 66–70.
16. Holey A., Marks D.C., Johnson L. et al. Frozen blood products: clinically effective and potentially ideal for remote Australia // Anaesth. Intensive Care. – 2013. – Vol. 41, №1. – P. 10–19.
17. Leikens C.C., de Korte D., Lagerberg J.W. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol // Vox Sang. – 2015. – Vol. 108, №3. – P. 219–225.
18. Lusianti R.E., Benson J.D., Acker J.P., Higgins A.Z. Rapid removal of glycerol from frozen-thawed red blood cells // Biotechnol. Prog. – 2013. – Vol. 29, №3. – P. 609–620.
19. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis // Cryobiology. – 2008. – Vol. 57, №3. – P. 251–256.
20. Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, №3 (Suppl). – P. S36–S44.
21. Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future // Transfus. Med. Rev. – 2005. – Vol. 19, №2. – P. 127–142.
22. Semionova E.A., Iershova N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence // EESJ. – 2016. – №2. – P. 7–17.
23. Sumida S. Cryopreservation, cryosurgery, cryovaccination and cryoimmunology, transfusion, transplantation, cell and tissue culture, and basis of regenerative therapy // Low Temperature Medicine. – 2014. – Vol. 40, №4. – P. 69–130.
- cryohemolysis of mammalian red blood cells. Fiziol Zh. 2007; 53(6): 78–84.
11. Leikens C.C., de Korte D., Lagerberg J.W. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. Vox Sang 2015; 108(3): 219–225.
12. Lusianti R.E., Benson J.D., Acker J.P., Higgins A.Z. Rapid removal of glycerol from frozen-thawed red blood cells. Biotechnol Prog 2013; 29(3): 609–620.
13. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. Cryobiology 2008; 57(3): 251–256.
14. Patelaros S.V., Synchronikova O.P. Osmotic behavior of red blood cells during posthypertonic lysis. Probl Cryobiol 1994; (3): 35–40.
15. Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. Cryobiology 2010; 60(3) (Suppl): S36–S44.
16. Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. Transfus Med Rev 2005; 19(2): 127–142.
17. Semionova N.V., Fedorova L.I., Vinogradov V.L. et al. Comparative study of cryopreserved erythroconcentrates at different ways of washing. Hematologiya i Transfuziologiya 1986; (10): 42–52.
18. Semionova E.A., Yershova N.A., Yershov S.S. et al. Peculiarities of posthypertonic lysis in erythrocytes of several mammals. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 73–83.
19. Semionova E.A., Iershova N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. EESJ 2016; (2): 7–17.
20. Shpakova N.M., Orlova N.V., Nipot E.E., Alexandrova D.I. Comparative study of mechanical stress effect on human and animal erythrocytes. Fiziol Zh 2015; 61(3): 75–80.
21. Shpakova N.M., Orlova N.V., Alexandrova D.I., Denisova O.M., inventors. Method for determining temperature conditions of erythrocytes incubating with PEO-1500. Patent of Ukraine 50069. 2010 May 25.
22. Sumida S. Cryopreservation, cryosurgery, cryovaccination and cryoimmunology, transfusion, transplantation, cell and tissue culture, and basis of regenerative therapy. Low Temperature Medicine 2014; 40(4): 69–130.
23. Tsybmal L.V., Orlova N.V., Shpakova N.M. Modification of the structure-functional state of erythrocyte membranes by chlorpromazine. Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology 2005; 22(4): 327–335.

