

## Хлорпромазин и постгипертонический шок как модель повреждения криоконсервированных клеток при их отогреве

Е.А. Чабаненко<sup>1</sup>, Е.А. Семионова<sup>2</sup>, Н.М. Шпакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Chlorpromazine and Posthypertonic Stress as Model of Damage in Cryopreserved Cells During Thawing

O.O. Chabanenko<sup>1</sup>, E.A. Semionova<sup>2</sup>, N.M. Shpakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Для моделирования факторов криповреждения, которые действуют на этапе размораживания эритроцитов, а также при перенесении в кровеносное русло клеток, криоконсервированных под защитой проникающего криопротектора, используют постгипертонический шок эритроцитов (ПГШ). Поскольку эритроциты млекопитающих характеризуются различной устойчивостью к действию ПГШ [Е.А. Семионова и др., 2016], для исследования были выбраны «устойчивые» эритроциты кролика и «неустойчивые» клетки человека. Ранее была показана эффективность хлорпромазина (ХПР) в условиях разных видов стресса эритроцитов млекопитающих [Н.М. Шпакова, 2014; Е.А. Семионова *et al.*, 2016].

Цель работы – изучение влияния ХПР на чувствительность эритроцитов человека и кролика к действию ПГШ.

Постгипертонический шок осуществляли перенесением эритроцитов из среды дегидратации в среду регидратации (0,15 моль/л NaCl) при 37 и 0°C. Для получения одинакового уровня исходного повреждения эритроцитов (~70%) при ПГШ в качестве среды дегидратации для эритроцитов человека использовали 1,45 моль/л NaCl, а для клеток кролика – 2,0 моль/л NaCl. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Замораживали суспензию эритроцитов с глицерином (15%) путем погружения в жидкий азот (–196°C). Для удаления глицерина из отогретых клеток использовали NaCl в концентрации 0,6 моль/л (однократно) и 0,15 моль/л (двукратно). Уровень гемолиза эритроцитов определяли методом спектрофотометрии при длине волны 543 нм.

Добавление ХПР в среду регидратации позволило снизить уровень постгипертонического гемолиза клеток человека и кролика (максимально в 3 раза) при 0°C. Защитный эффект ХПР при 37°C не выявлен. Для оценки эффективности ХПР определяли значения его эффективных концентраций (600 и 500 мкмоль/л для эритроцитов человека и кролика соответственно) и максимальной антигемолитической активности (73 и 55% для эритроцитов человека и кролика соответственно).

Для проверки адекватности модели ПГШ исследовали влияние ХПР на размороженные эритроциты человека при поэтапном удалении из них глицерина. Максимальный уровень повреждения наблюдался при перенесении клеток в первую изотоническую среду (гемолиз 25%). Хлорпромазин в эффективной при ПГШ концентрации снижал уровень гемолиза клеток в 3 раза. Антигемолитическая активность ХПР составляла порядка 70%.

Совпадение параметров эффективности ХПР в условиях ПГШ и при отмывании от глицерина размороженных эритроцитов человека позволяет предположить, что механизмы действия амфифила имеют общие черты.

Posthypertonic stress (PHS) of red blood cells is used to simulate the cryodamage factors, acting at the stage of red blood cell freeze-thawing, as well as when transferring the cells, cryopreserved with penetrating cryoprotectant, back into bloodstream. Since the mammalian red blood cells are characterised by different resistance to PHS effect [E.A. Semionova *et al.*, 2016], the ‘resistant’ rabbit red blood cells and ‘non-resistant’ human cells were selected for the study. The efficiency of chlorpromazine (CPR) under different stress types in mammalian red blood cells was demonstrated previously [N.M. Shpakova, 2014; E.A. Semionova *et al.*, 2016].

This research was aimed to study the CPR effect on human and rabbit red blood cell sensitivity to PHS effect.

Posthypertonic stress was simulated by transferring red blood cells from dehydration medium into rehydration one (0.15 mol/l NaCl) at 37 and 0°C. To obtain the equal level of red blood cell initial damage (~70%) under PHS we used the dehydration media with 1.45 mol/l NaCl and 2.0 mol/l NaCl for human and rabbit red blood cells, respectively. The final hematocrit was 0.4%. Red blood cell suspension was frozen with glycerol (15%) by immersion into liquid nitrogen (–196°C). To remove glycerol out of the thawed cells we used 0.6 mol/l (once) and 0.15 mol/l (twice) NaCl solution. The level of red blood cell hemolysis was determined spectrophotometrically at a 543 nm wavelength.

The CPR supplemented to rehydration medium enabled reducing the level of posthypertonic stress in human and rabbit cells (3 times maximum) at 0°C. No protective effect of CPR at 37°C was revealed. To assess the CPR efficiency we have determined the values of its efficient concentrations (600 and 500 μmol/l for human and rabbit red blood cells, respectively) and the maximum antihemolytic activity (73 and 55% for human and rabbit red blood cells, respectively).

To check the PHS model adequacy we studied the CPR effect on human frozen-thawed red blood cells during gradual glycerol removal. The maximum damaging effect was observed when transferring red blood cells into the first isotonic medium (25% hemolysis). The use of CPR in efficient concentration for PHS, enabled a three-times reduction of cell hemolysis level. An antihemolytic activity of CPR was about 70%.

The matching of parameters of CPR efficiency under PHS and during glycerol wash-out of human frozen-thawed red blood cells suggested the similarity of the amphiphilic substance effect in both cases.

