МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ



MODERN ACHIEVEMENTS OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

ХАРКІВ
2016

ISSN 2519-2655
УДК 615.1
С 89

Редакційна колегія:
академік НАН України Черних В.П., проф. Гладух Є.В.,
проф. Стрельников Л.С., проф. Половко Н.П., доц. Манський О.А.,
доц. Калюжна О.С., доц. Шпичак О.С.

С 89 **Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології** : збірник наукових праць. – Х.: Вид-во НФаУ, 2016. – 764 с.
ISSN 2519-2655

Збірник містить матеріали V Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (18 листопада 2016 р.).

Розглянуто теоретичні та практичні аспекти розробки, виробництва, контролю якості, стандартизації та реалізації лікарських засобів на сучасному етапі.

Для широкого кола магістрантів, аспірантів, докторантів, співробітників фармацевтичних та біотехнологічних підприємств, фармацевтичних фірм, викладачів вищих навчальних закладів.

Редколегія не завжди поділяє погляди авторів статей
Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей
Матеріали подаються мовою оригіналу

ISSN 2519-2655
УДК 615.1
©НФаУ, 2016

УДК 57.043:615.21/.26:547.426.1:612.111

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХЛОРПРОМАЗИНА НА ЭТАПЕ УДАЛЕНИЯ ГЛИЦЕРИНА ИЗ ЗАМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Семионова Е.А., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков, Украина

Введение. В настоящее время длительное хранение клеток крови и её компонентов возможно в условиях низкотемпературного криоконсервирования. Наиболее эффективным является метод низкотемпературного хранения эритроцитов с использованием проникающего криопротектора глицерина [5]. Однако при перенесении размороженных эритроцитов в кровяное русло, клетки подвергаются постгипертоническому лизису. В этом случае для предотвращения развития постгипертонического лизиса используют многоступенчатую отмывку клеток от глицерина, которая заключается в постепенном снижении осмоляльности окружающей клетки среды. Предложенная методика многоступенчатого удаления глицерина из эритроцитов человека не безупречна, т.к. сопровождается гибелью части клеток.

Постгипертонический шок эритроцитов моделирует влияние факторов криоповреждения, которые действуют на этапе размораживания эритроцитов, а также при перенесении в кровеносное русло клеток, которые были криоконсервированы под защитой проникающего криопротектора. Постгипертонический шок осуществляется в результате переноса клеток в изотонические условия из гипертонических сред при положительных температурах. Постгипертонический лизис представляет собой повреждение эритроцитов, подвергнутых действию постгипертонческого шока.

Хлорпромазин представляет собой катионное амфифильное соединение, являющееся производным фенотиазина. Хлорпромазин способен защищать эритроциты при действии на них разных факторов криоповреждения. Так, был показан антигемолитический эффект хлорпромазина в условиях гипертонического шока, гипертонического криогемолиза, гипотонического лизиса эритроцитов человека [3, 4].

Цель исследования. Изучить влияние хлорпромазина на чувствительность эритроцитов человека к действию постгипертонического шока и оценить эффективность хлорпромазина на этапе удаления глицерина из клеток, подвергнутых замораживанию-отогреву.

Методы исследования. Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгицир» («Биофарма», Украина). Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Эритроциты выделяли из крови по стандартной методике [1] и хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при 0 ºС. Все среды готовили на фосфатном буфере (0,01 моль/л), pH 7,4.

Постгипертонический лизис эритроцитов осуществляли перенесением клеток из гипертонического раствора (1,75 моль/л NaCl) в изотоническую среду (0,15 моль/л NaCl) при 37 или 0 ºС. Конечный гематокрит – 0,4 %. Хлорпромазин добавляли в изотоническую среду перед внесением в нее эритроцитов.

Замораживание суспензии клеток с глицерином (15 %) осуществляли путем быстрого погружения в жидкий азот (–196 ºС). Отогрев производили при +40 °С с постоянным покачиванием. Удаление глицерина из отогретых клеток проводили по методу [2]. Хлорпромазин вносили в отмывочные среды перед внесением эритроцитов. Уровень гемолиза эритроцитов определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм.

Значение максимальной антигемолитической активности хлорпромазина рассчитывали по формуле:

$$АГ_{макс} = \frac{к - a}{к} \times 100\ \%\text{, где}$$

к – величина гемолиза эритроцитов в отсутствии амфифильного вещества;

а – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Плато эффективных концентраций определяли как диапазон концентраций хлорпромазина, в пределах которого наблюдается минимальный уровень гемолиза эритроцитов, а эффективную концентрацию – как концентрацию вещества, соответствующую середине плато. В этой концентрации хлорпромазин оказывает максимальное антигемолитическое действие.

Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое значение количественных показателей (M) ± стандартная ошибка среднего арифметического (m).

Основные результаты. Уровень постгипертонического лизиса эритроцитов, которые были перенесены из среды, содержащей 1,75 моль/л NaCl, в изотонический раствор составляет 93 ± 3 %. В том случае, когда в среду, содержащую 0,15 моль/л NaCl, вносили хлорпромазин, уровень постгипертонического лизиса эритроцитов максимально снижался в 3 раза. Указанный защитный эффект хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов человека установлен при 0 ºС, но не при 37 ºС. При использовании хлорпромазина в концентрациях 180 и 600 мкмоль/л антигемолитическая активность вещества составляет 44 и 68 % соответственно (см таблицу 1).

Наиболее распространенным и широко используемым для продолжительного хранения эритроцитов человека является метод криоконсервирования под защитой глицерина (15 %).

Таблица 1

Уровень антигемолитической активности хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов (0 ºС) и при удалении глицерина из отогретых клеток (2 этап) (M ± m, n = 6)

Концентрация хлорпромазина, мкмоль/л	Антигемолитическая активность, %	
	Постгипертонический шок	Удаление глицерина из эритроцитов
180	44 ± 6	58 ± 8
600	68 ± 5	64 ± 8

Схема повреждения эритроцитов после замораживания (до -196 ºС под защитой глицерина) и последующего отогрева, а также многоэтапного удаления глицерина из клеток представлена на рисунке 1.

Перед трансфузией размороженных эритроцитов из них необходимо удалить криопротектор. Для удаления глицерина из отогретых клеток используют отмывочные среды, содержащие NaCl в концентрации 0,6 моль/л однократно (1 этап) и 0,15 моль/л двукратно (2 и 3 этапы) [2].

В ходе многоэтапного удаления глицерина из размороженных эритроцитов человека наибольший уровень повреждения клеток наблюдается на 2 этапе при помещении их в первую изотоническую среду (гемолиз 20 %) (рисунок 1 в). На данном этапе использование хлорпромазина в концентрациях, эффективных при постгипертонческом шоке (180 и 600 мкмоль/л), позволяет снизить уровень гемолиза клеток в 2,5-3 раза. Антигемолитическая активность вещества составляет порядка 60 % и не зависит от используемой концентрации амфифила (таблица 1).

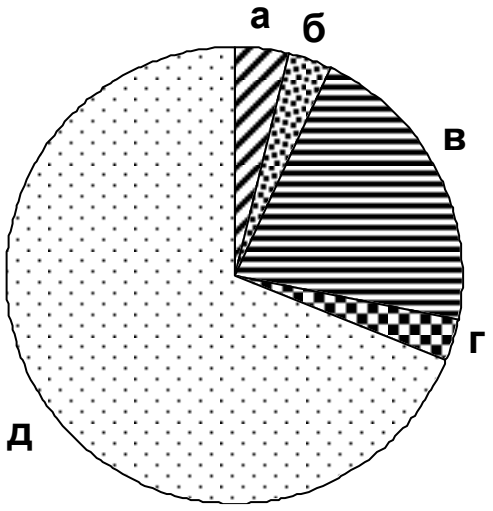


Рис. 1. Гемолитическое повреждение эритроцитов после замораживания (до -196 ºС под защитой глицерина) и последующего отогрева (**а**), а также удаления глицерина из клеток с использованием отмывочных сред: 0,6 моль/л NaCl на 1-ом этапе (**б**), 0,15 моль/л NaCl на 2-ом и 3-ем этапах (**в** и **г** соответственно), **д** – сохранившиеся эритроциты.

Как видно из данных, представленных на рисунке 1(**б** и **г**), процесс удаления глицерина из размороженных эритроцитов на 1-ом и 3-ем этапах приводит к незначительному гемолизу эритроцитов (не более 6 %), поэтому эффективность хлорпромазина была незначительной.

Выводы. Таким образом, хлорпромазин позволяет повысить эффективность метода замораживания эритроцитов с использованием глицерина. Поскольку защитный эффект хлорпромазина, выявленный в модельном эксперименте (постгипертонический шок эритроцитов человека при 0 ºС), показан и в реальных условиях замораживания-отогрева эритроцитов, в частности на этапе удаления глицерина из клеток, следует говорить об адекватности используемой модели и целесообразности её применения в дальнейших экспериментах.

Список литературы

1. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих / Е. А. Семионова, Н. А. Ершова, С. С. Ершов [и др.] // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, № 1. – С. 73-83.

2. Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания / Н. В. Семёнова, Л. И. Фёдорова, В.Л.Виноградов [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 1986. – № 10. – С. 42-52.

3. Шпакова Н. М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: Автореф. дис…доктора біол. наук. – 2014. – 44 с.

4. 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.

5. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation / C. T. Wagner, M. L. Martowicz, S. A. Livesey [et al.] // Cryobiology. – 2002. – Vol. 45, № 2. – P. 153-166.