

УДК 544.722.14:547.426.1:612.111:57.086.13

О.О. Чабаненко^{1*}, Н.А. Єршова¹, Н.В. Орлова¹,
О.П. Лаптії², Н.М. Шпакова¹

Амфифільні сполуки як антигемолітичні агенти: проблеми і перспективи

UDC 544.722.14:547.426.1:612.111:57.086.13

О.О. Chabanenko^{1*}, N.A. Yershova¹, N.V. Orlova¹,
O.P. Laptiy², N.M. Shpakova¹

Amphiphilic Compounds as Antihemolytic Agents: Problems and Prospects

Реферат: У роботі досліджено вплив поверхнево активних речовин, які належать до різних класів амфифільних сполук (катіонний трифторперазин (ТФП), аніонний децилсульфат натрію (С10) та неіонний децил-β, D-глюкопіранозид (ДГП)), на рівень пошкодження еритроцитів людини під час дії постгіпертонічного шоку (ПГШ) та видалення гліцерину із клітин, заморожених до -196°C . Усі амфифільні сполуки в низьких концентраціях (за яких антигемолітична активність дорівнює приблизно 45% в умовах ПГШ клітин) проявляють однакову ефективність при видаленні гліцерину з розморожених клітин. Встановлено, що серед амфифільних сполук в ефективних концентраціях максимальну антигемолітичну активність (АГмакс) проявляють ДГП (74%) під час видалення гліцерину із розморожених клітин та С10 (74%) в умовах ПГШ еритроцитів, у той час як показники АГмакс активності ТФП сумірні в обох вищевказаних випадках. Особливістю прояву ефективності С10 за умов дегліцеринізації кріоконсервованих еритроцитів є майже однакова антигемолітична активність при використанні в обох концентраціях. Методом протокової цитофлуориметрії показано, що кількість аннексин-мічених клітин як у фізіологічному розчині, так в умовах ПГШ залежить від концентрації С10.

Ключові слова: заморожування, кріопротектор, еритроцити, постгіпертонічний шок, гліцерин, дегліцеринізація, амфифільні сполуки.

Abstract: In this research the effect of surface-active substances belonging to different classes of amphiphilic compounds (cationic trifluoperazine (TFP), anionic sodium decyl sulfate (C10) and nonionic decyl-β, D-glucopyranoside (DGP)) on the level of damage of human erythrocytes during posthypertonic shock (PHS) and glycerol removal from cells frozen to -196°C was studied. All amphiphilic compounds in low concentrations (at which the antihemolytic activity is approximately 45% under the conditions of PHS cells) show the same efficiency when removing glycerol from thawed cells. It was established that among amphiphilic compounds in effective concentrations the maximum antihemolytic (AHmax) activity was shown by DGP (74%) during the removal of glycerol from thawed cells and C10 (74%) under conditions of PHS of erythrocytes, while the AHmax activity indicators of TFP were comparable in both cases. A feature of the effectiveness of C10 under the conditions of deglycerolization of cryopreserved erythrocytes is almost the same AH when used in both concentrations. The method of flow cytometry showed that the amount of annexin-labeled cells depended on the concentration of C10 both in physiological solution and under PHS conditions.

Key words: freezing, cryoprotective agent, erythrocytes, posthypertonic shock, glycerol, deglycerolization, amphiphilic compounds.

Наразі єдиним підходом для довгострокового зберігання компонентів крові є кріоконсервування [9, 19, 29]. За умов зберігання при наднизьких температурах клітини не пошкоджуються, тому що уповільнюється їх метаболізм, і, як наслідок, метаболіти не втрачаються [9, 11]. Оскільки клітини перебувають у стабільному стані, то їх можна зберігати впродовж багатьох років. Відкриття гліцерину як кріопротектора стало основою для заморожування клітин, що може забезпечити запаси донорської крові через збільшення попиту на

Currently, cryopreservation is the only approach for long-term storage of blood components [3, 17, 28]. During storage at ultra-low temperatures, cells are not damaged, because their metabolism slows down, and, as a result, there is no loss of metabolites [3, 6]. Since the cells are in a stable state, they can be stored for many years. The discovery of glycerol as a cryoprotective agent (CPA) laid the basis for freezing the cells, that can provide supplies of donor blood due to its increased demand in extreme situations. In addition, the use

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: chabanenkoolena@gmail.com

Надійшла 04.01.2024

Прийнята до друку 22.02.2024

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² State Biotechnological University, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: chabanenkoolena@gmail.com

Received January, 04, 2024

Accepted February, 22, 2024

неї в екстремальних ситуаціях. Крім того, застосування гліцерину для криоконсервування компонентів крові дозволяє підтримувати запаси аутологічних клітин та донорських еритроцитів з рідкісними фенотипами [4, 11, 19, 28].

Для швидкого заморожування еритроцитів людини використовують криоконсерванти на основі гліцерину, в складі яких його об'ємна частка становить 30 і 40%. Заморожену еритромасу зберігають у рідкому азоті (-196°C) протягом 10 років. Повільне заморожування еритроцитів донорської крові та їхнє подальше зберігання здійснюються в морозильних повітряних камерах, які забезпечують помірно низькі температури (від -40 до -80°C). При зберіганні еритромаси за -80°C використовують 57%-й розчин гліцерину, а за помірної температури -40°C — гліцерин у кінцевій концентрації приблизно 40% [1].

Гліцерин — проникний криопротектор, тому після розморожування еритроцитів необхідне його видалення з клітин. Дегліцеринізація еритроцитів супроводжується видаленням пошкоджених клітин, вільного гемоглобіну, калію та/або білка [30], тому стан суспензії еритроцитів перед трансфузією більш якісний, ніж після гіпотермічного зберігання, протягом якого втрачається 2,3-дифосфогліцерат, АТФ та ін., що, зокрема, супроводжується зниженням функціональної активності еритроцитів та зміною їхньої здатності до деформації та агрегації [10, 13, 27]. Для видалення гліцерину з розморожених еритроцитів розроблені та застосовуються декілька методик, але вони потребують подальшого вдосконалення [7, 20–22].

Показано, що катіонна амфифільна сполука (хлорпромазин, ХПР) здатна знижувати гемолиз еритроцитів при видаленні гліцерину з розморожених клітин [26]. Враховуючи цей факт, доцільно було з'ясувати ефективність амфифільних сполук, які відносяться до різних класів поверхнево активних речовин [8], на етапі видалення гліцерину з криоконсервованих еритроцитів.

Мета роботи — порівняльний аналіз ефективності катіонного трифторперазину, аніонного децилсульфату натрію і неіонного децил- β ,D-глюкопіранозиду на етапі дегліцеринізації еритроцитів людини, попередньо заморожених до -196°C під захистом гліцерину (15%).

Матеріали та методи

Для дослідження використовували еритроцити, отримані зі свіжозібраної крові групи А (II)⁺ чоловіків. Кров була надана Харківським обласним центром служби крові. Еритроцити люди-

of glycerol for cryopreservation of blood components makes it possible to maintain the stocks of autologous cells and donor erythrocytes with rare phenotypes [6, 17, 21, 27].

For quick freezing of human erythrocytes, the cryopreservatives based on glycerol are applied, in which its volume fraction is 30 and 40%. Frozen erythromass is stored in liquid nitrogen (-196°C) for 10 years. Erythrocytes of donor blood are slowly frozen and further storage in freezing air chambers, providing moderately low temperatures (from -40 to -80°C). Also a 57% glycerol solution is used to store the erythromass at -80°C , and at a moderate temperature of -40°C , glycerol in a final concentration of approximately 40% is applied [9].

Glycerol is a permeable CPA, so after erythrocytes' warming it is necessary to remove it from the cells. Deglycerolization of erythrocytes is accompanied by the removal of damaged cells, free hemoglobin, potassium and/or protein [29], so the state of the erythrocyte suspension before transfusion is of higher quality than after hypothermic storage, during which 2,3-diphosphoglycerate, ATP, *etc.* are lost that, in particular, is accompanied by a reduced functional activity of erythrocytes and a change in their ability to deform and aggregate [7, 10, 26]. Several techniques have been developed and exploited to remove glycerol from thawed erythrocytes, but they require further improvement [1, 18–20].

Cationic amphiphilic compound (chlorpromazine, CPR) has been shown to reduce hemolysis of erythrocytes when removing glycerol from the warmed cells [25]. Considering this fact, it was expedient to find out the effectiveness of amphiphilic compounds belonging to different classes of surfactants [2] at the stage of removing glycerol from cryopreserved erythrocytes.

The purpose of this research was to comparatively analyze the effectiveness of cationic trifluoperazine, anionic sodium decyl sulfate, and nonionic decyl- β ,D-glucopyranoside at the stage of deglycerolization of human erythrocytes pre-frozen to -196°C under the protection of glycerol (15%).

Materials and methods

For the study, erythrocytes obtained from freshly collected blood of group A (II)⁺ men were used. The blood was provided by the Kharkiv Regional Blood Service Center. Human erythrocytes were precipitated by serial centrifugation at 3,000 rpm (centrifuge OPn-3U4.2 'Dastan', Kyrgyzstan) twice and once at 1,500 rpm for 3



ни осаджували шляхом серійного центрифугування при 3000 об/хв (центрифуга ОПн-3У4.2 «Дастан», Киргистан) дворазово і одноразово при 1500 об/хв упродовж 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатний буфер, рН 7,4). Для кріоконсервування еритроцитів використовували кріоконсервант, розрахований на об'єм 1000 мл, такого складу: 300 мл гліцерину; 40 г маніту; 7 г натрію хлориду; 0,3 г натрію фосфату двозаміщеного. Кріоконсервант додавали крапельно до еритроцитів у співвідношенні 1:1 (за масою) при постійному перемішуванні за температури 20–22°C упродовж не більше 10 хв. Для еквілібрації еритроцитів з кріоконсервантом суспензію залишали на 5–10 хв за постійного перемішування. Кінцева концентрація гліцерину становила 15%. Зразки суспензії еритроцитів заморожували в поліетиленових ампулах об'ємом 2,0 мл шляхом занурення у рідкий азот (–196°C), розморожували — у водяній ванні (40–42°C) при постійному погоджуванні продовж 2–3 хв до зникнення твердої фази. Для видалення кріопротектора застосовували сольові розчини, які додавали до еритроцитів у співвідношенні 1:1. Після ретельного перемішування суспензію центрифугували. На першому етапі дегліцеринізації (середовище 1) застосовували розчин NaCl у концентрації 0,6 моль/л, на другому і третьому етапах — 0,15 моль/л NaCl (середовища 2 і 3 відповідно) [1].

Постгіпертонічний шок (ПГШ) еритроцитів здійснювали шляхом ізотермічного їх перенесення з гіпертонічного розчину (середовище дегідратації; 1,65 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатний буфер, рН 7,4) в ізотонічний (середовище регідратації; 0,15 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатний буфер, рН 7,4) за температури 0°C. Час інкубування еритроцитів у середовищах дегідратації становив 20 хв, регідратації — 5 хв [25].

Вміст гемоглобіну у супернатанті визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм і виражали у відсотках по відношенню до 100%-го гемолізу еритроцитів. За 100% приймали поглинання в пробах, в які додавали детергент тритон X-100 у концентрації 0,1%. Гематокрит у досліджуваних зразках становив 0,4%.

У роботі досліджували амфифільні сполуки, які належать до різних класів поверхнево активних речовин: катіонних, аніонних та неіонних. В якості катіонної амфифільної сполуки використовували трифторперазин (ТФП), аніонної — децилсульфат натрію (С10) та неіонної — децил- β ,D-глюкопіранозид (ДГП).

min in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate buffer, pH 7.4). For cryopreservation of erythrocytes, a cryopreservative designed for a volume of 1,000 ml was used, with the following composition: 300 ml of glycerol; 40 g of mannitol; 7 g of sodium chloride; 0.3 g of disubstituted sodium phosphate. The cryopreservative was added dropwise to erythrocytes in a ratio of 1:1 (m/m) with constant stirring at 20–22°C for not longer than 10 min. For equilibration of erythrocytes with cryopreservative, the suspension was left for 5–10 min with constant stirring. The final concentration of glycerol was 15%. Samples of erythrocyte suspension were frozen in 2.0 ml polyethylene ampoules by immersion in liquid nitrogen (–196°C), warmed in a water bath (40–42°C) with constant shaking for 2–3 min until the solid phase disappeared. To remove the CPA we used salines, which were added to erythrocytes in a 1:1 ratio. After thorough mixing, the suspension was centrifuged. At the first stage of deglycerolization (medium 1), a NaCl solution was used at a concentration of 0.6 mol/L, at the second and third stages – 0.15 mol/L NaCl (media 2 and 3, respectively) [9].

Posthypertonic shock (PHS) of erythrocytes was initiated by isothermal transferring them from a hypertonic solution (dehydration medium; 1.65 mol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate buffer, pH 7.4) to an isotonic solution (rehydration medium; 0.15 mol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate buffer, pH 7.4) at a temperature of 0°C. The incubation time of erythrocytes in dehydration media was 20 min, the rehydration one made 5 min [24].

Hemoglobin content in the supernatant was spectrophotometrically determined at a 543 nm wavelength and expressed as a percentage in relation to 100% hemolysis of erythrocytes. 100% was assumed as absorption in samples to which Triton X-100 detergent was added at a concentration of 0.1%. The hematocrit in the studied samples was 0.4%.

Amphiphilic compounds that belong to different classes of surfactants: cationic, anionic, and nonionic were studied in the work. Trifluoperazine (TFP) was used as a cationic amphiphilic compound, sodium decyl sulfate (C10) as an anionic compound, and decyl- β ,D-glucopyranoside (DGP) as a nonionic compound.

To evaluate and compare the effectiveness of the studied amphiphilic compounds under the conditions of erythrocyte PHS, the following concepts were used: antihemolytic (AH) activity, maximum antihemolytic (AH_{max}) activity, plateau and effective concentrations [5]. The AH of amphiphilic



Для оцінки і порівняння ефективності дії досліджуваних амфифільних сполук за умов ПГШ еритроцитів користувалися поняттями: антигемолітична (АГ) активність, максимальна антигемолітична (АГ_{макс}) активність, плато і ефективні концентрації [5]. Антигемолітичну активність (АГ) амфифільних сполук визначали як відсоток зниження гемолізу клітин у присутності речовин по відношенню до гемолізу в пробі, що не містить амфифіл, і розраховували за формулою:

$$АГ = \frac{k-a}{k} \times 100\%,$$

де k — величина гемолізу еритроцитів при відсутності амфифільних речовин; a — величина гемолізу еритроцитів у присутності амфифільних речовин.

Під час розрахування значення АГ_{макс} активності в наведеній формулі показник a відповідає мінімальній величині гемолізу еритроцитів у присутності амфифільних речовин.

Плато визначали як діапазон концентрацій амфифільних сполук, в межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів, а ефективну концентрацію — як концентрацію речовини, що відповідає середині плато.

Методом протокової цитофлуорометрії оцінювали порушення асиметрії мембран еритроцитів за допомогою набору «Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit» (Becton Dickinson, США) [25]. Експеримент проводили у двох варіантах. У першому варіанті еритроцити людини інкубували 20 хв за температури 0°C у фізіологічному розчині, який містив 180 або 400 мкмоль/л C10. Контролем були клітини, які інкубували у фізіологічному розчині за відсутності C10. У другому варіанті еритроцити людини піддавали дії ПГШ (за температури 0°C), при цьому амфифільна сполука була присутня у середовищі регідратації перед внесенням в нього клітин. Контролем були еритроцити після дії ПГШ за відсутності амфифільної сполуки.

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США). Експериментальні дані представлені у вигляді медіани (Me). Статистичну значущість відмінностей досліджуваних числових показників перевіряли з використанням Т-критерію Вілкоксона. Відмінності вважали значущими при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Після розморожування рівень гемолізу еритроцитів не перевищував 5%. Значення гемолізу еритроцитів під час процедури поетапного

compounds was determined as a percentage of the decrease in hemolysis of cells in the presence of substances in relation to hemolysis in a sample that did not contain an amphiphile, and was calculated according to the formula:

$$AH = \frac{k-a}{k} \times 100\%,$$

where k is the value of hemolysis of erythrocytes with no amphiphilic substances; and a the value of hemolysis of erythrocytes with amphiphilic substances.

When calculating the value of АН_{макс} activity in the given formula, the index a corresponded to the minimum value of hemolysis of erythrocytes in the presence of amphiphilic substances.

The plateau was defined as the concentration range of amphiphilic compounds within which the minimum level of erythrocyte hemolysis was observed, and the effective concentration was defined as the concentration of the substance corresponding to the middle of the plateau.

The asymmetry of erythrocyte membranes was assessed by means of flow cytometry using the ‘Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit’ (Becton Dickinson, USA) [24]. The experiment was performed in two versions. In the first one, human erythrocytes were incubated for 20 min at a temperature of 0°C in a physiological solution containing 180 or 400 μmol/L C10. The control was cells, incubated in physiological solution in the absence of C10. In the second variation, human erythrocytes were exposed to PHS (at a temperature of 0°C), while the amphiphilic compound was present in the rehydration medium before introducing cells into it. The control was erythrocytes after the effect of PHS in the absence of an amphiphilic compound.

The obtained experimental results were statistically processed using the ‘Statistica 6.0’ software (StatSoft Inc., USA). Experimental data were presented as median (Me). The significance of the differences of the studied numerical indices was verified with the Wilcoxon T-test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

After warming, the level of erythrocyte hemolysis did not exceed 5%. The value of hemolysis of erythrocytes during the procedure of stepwise removal of glycerol from cells using saline media is shown in Fig. 1. It can be seen that when media 1 (0.6 mol/L NaCl) and 3 (0.15 mol/L NaCl) were used, the level of erythrocyte hemolysis did not exceed ~7%. At the second stage of removing



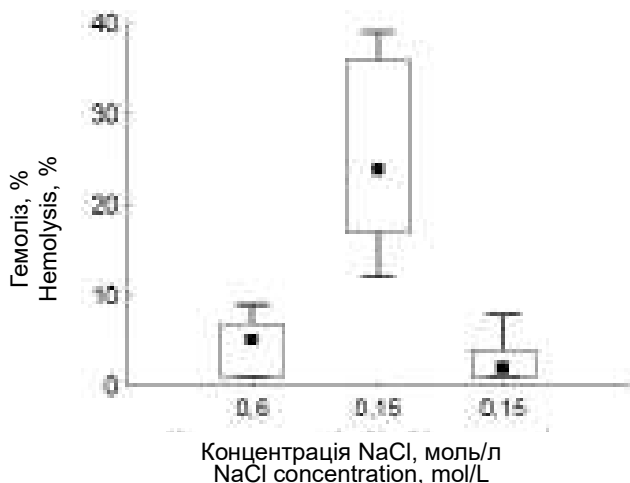


Рис. 1. Рівень гемолізу розморожених еритроцитів в процесі видалення гліцерину (15%) методом серійного центрифугування за допомогою сольових розчинів за температури 20–22°C. ■ — медіана, □ — інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), I — максимальне та мінімальне значення.

Fig. 1. Level of hemolysis of thawed erythrocytes when removing glycerol (15%) by serial centrifugation using salines at 20–22°C. ■ — is the median, □ — interquartile range (Q1–Q3), I — maximum and minimum values.

видалення гліцерину з клітин із використанням сольових середовищ наведено на рис. 1. Видно, що у разі застосування середовищ 1 (0,6 моль/л NaCl) і 3 (0,15 моль/л NaCl) рівень гемолізу еритроцитів не перевищував ~7%. На другому етапі видалення гліцерину з клітин (середовище 2) спостерігається більш значне пошкодження еритроцитів.

Показано, що катіонний ХПР здатен знижувати гемоліз еритроцитів за умов модельного експерименту ПГШ [25] та при видаленні гліцерину з розморожених клітин [26]. Постгіпертонічний шок моделює вплив на еритроцити фактора, що діє в процесі розморожування еритроцитів, тобто коли знижується осмоляльність середовища до ізотонічних значень [12, 16, 17, 23]. Для визначення ефективності інших амфифільних сполук за умов ПГШ еритроцитів використовували катіонний ТФП, аніонний С10 і неіонний ДГП [5, 6]. Амфифільні речовини додавали в середовище регідратації перед внесенням в нього клітин. При варіюванні концентрації амфифілів були отримані залежності постгіпертонічного гемолізу (ПГГ) клітин для кожної сполуки [5, 6]. Типову залежність ПГГ еритроцитів від концентрації амфифільної сполуки (на прикладі ТФП) наведено на рис. 2. Видно, що гемолітична залежність характеризується наявністю трьох ділянок: зі збіль-

glycerol from cells (medium 2), more significant damage to erythrocytes was observed.

Cationic CPR has been shown to be capable of reducing hemolysis of erythrocytes under the conditions of a model experiment of PHS [24] and when removing glycerol from thawed cells [25]. Posthypertonic shock simulates the effect on erythrocytes of a factor that acts in the process of thawing erythrocytes, that is, when the osmolality of the medium decreases to isotonic values [8, 13, 14, 22]. To determine the effectiveness of other amphiphilic compounds under the conditions of erythrocyte PHS, cationic TFP, anionic C10, and nonionic DGP were used [4, 5]. Amphiphilic substances were added to the rehydration medium before introducing cells into it. By varying the concentration of amphiphiles, dependences of posthypertonic hemolysis (PHH) of cells were obtained for each compound [4, 5]. A typical dependence of erythrocyte PHH on the concentration of an amphiphilic compound (using TFP as an example) is shown in Fig. 2. It can be seen that the hemolytic dependence is characterized by the presence of three areas: with an increase in the

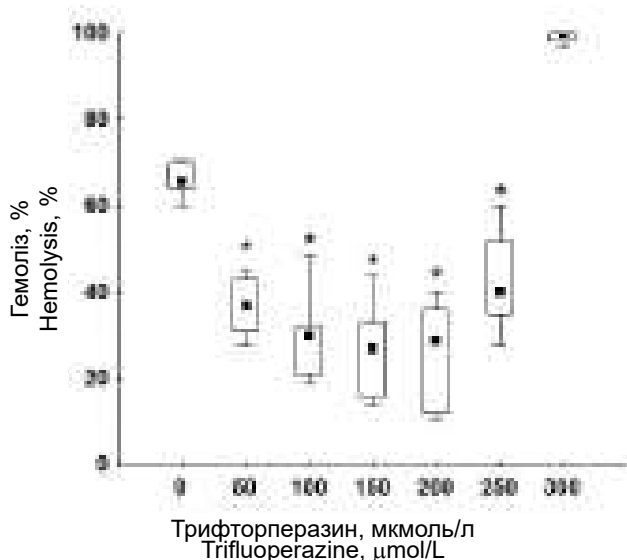


Рис. 2. Залежності рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації трифторперазину в середовищі регідратації (0°C); ■ — медіана, □ — інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), I — максимальне та мінімальне значення. * — відмінності значущі порівняно з результатами за відсутності амфифільних сполук, $p < 0,05$.

Fig. 2. Dependencies of posthypertonic hemolysis level of human erythrocytes on concentration of trifluoperazine in rehydration medium (0°C). ■ — median, □ — interquartile range (Q1–Q3), I — maximum and minimum values. * — differences are significant compared to the results with no absence of amphiphilic compounds, $p < 0.05$.

Таблиця 1. Значення антигемолітичної активності і концентрацій амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів людини за температури 0°C, $n = 7$

Title 1. Values of antihemolytic activity and concentrations of amphiphilic compounds under the conditions of PHS of human erythrocytes at 0°C, $n = 7$

Амфіфільна сполука Amphiphilic compound	Розмір плато, мкмоль/л Plateau size, $\mu\text{mol/L}$	Концентрація, мкмоль/л Concentration, $\mu\text{mol/L}$	Антигемолітична активність, % Antihemolytic activity, %	Максимальна антигемолітична активність, % Maximum antihemolytic activity, %
С10	200–600	180	48 (45–56)	–
		400	–	74 (66–78)
ТФП TFP	100–200	50	44 (39–47)	–
		150	–	60 (45–77)
ДГП DGP	400–1600	200	41 (38–46)	–
		600	–	62 (61–70)

Примітка: Значення антигемолітичної активності представлені у вигляді медіани (Me), інтерквартильного інтервалу (Q1–Q3).

Note: Antihemolytic activity values are presented as median (Me), interquartile range (Q1–Q3).

шенням концентрації ТФП спостерігається поступове зниження рівня пошкодження клітин, після чого залежність виходить на плато і за подальшого підвищення концентрації амфіфілу рівень ПГГ еритроцитів зростає. Отже, у низьких концентраціях ТФП захищає еритроцити від пошкодження за умов ПГШ, а у високих — чинить літичну дію на клітини. Подібну подвійність дії амфіфільних речовин описано Н.А. Єршовою та співавт. [2], К.А. Ріске та співавт. [24].

З гемолітичних залежностей, отриманих для ТФП, ДГП і С10, були визначені розміри плато (відповідають діапазону концентрації амфіфільної сполуки, в якому спостерігається мінімальний рівень ПГГ клітин) та розраховані величини $AG_{\text{макс}}$ активності. Перелічені вище характеристики ефективності амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів наведено в табл. 1. Амфіфільні сполуки представлені в двох концентраціях — високих і низьких. Високі (ефективні) концентрації амфіфілів були визначені з відповідних плато, тоді як вибір низьких концентрацій амфіфілів зумовлений їхньою AG активністю на рівні 45% (табл. 1).

Оскільки ТФП, С10 і ДГП проявляли високу AG активність за умов ПГШ еритроцитів (табл. 1), у подальших експериментах з дослідження дегліцеринізації розморожених еритроцитів застосовували перелічені сполуки в концентраціях, наведених в табл. 1.

concentration of TFP, a gradual decrease in the level of cell damage is observed, after which the dependence reaches a plateau, and with a further increase in the amphiphile concentration, the level of erythrocyte PNH increases. Therefore, at low concentrations, TFP protects erythrocytes from damage under PHS conditions, and at high concentrations, it exerts a lytic effect on cells. A similar dual action of amphiphilic substances is described by N.A. Yerzhova *et al.* [30], K.A. Riske *et al.* [23].

From the hemolytic dependences obtained for TFP, DGP and C10, the dimensions of the plateau were determined (corresponding to the concentration range of the amphiphilic compound, in which the minimum level of PHS of cells is observed) and the values of AH_{max} activity were calculated. The above-listed characteristics of the effectiveness of amphiphilic compounds under the conditions of erythrocyte PHS are presented in Table 1. Amphiphilic compounds are presented in two concentrations – high and low. High (effective) concentrations of amphiphiles were determined from the corresponding plateaus, while the choice of low concentrations of amphiphiles is due to their AH activity at the level of 45% (Table 1).

Since TFP, C10, and DGP showed high antihemolytic activity under the PHS conditions of erythrocyte (Table 1), in subsequent experiments



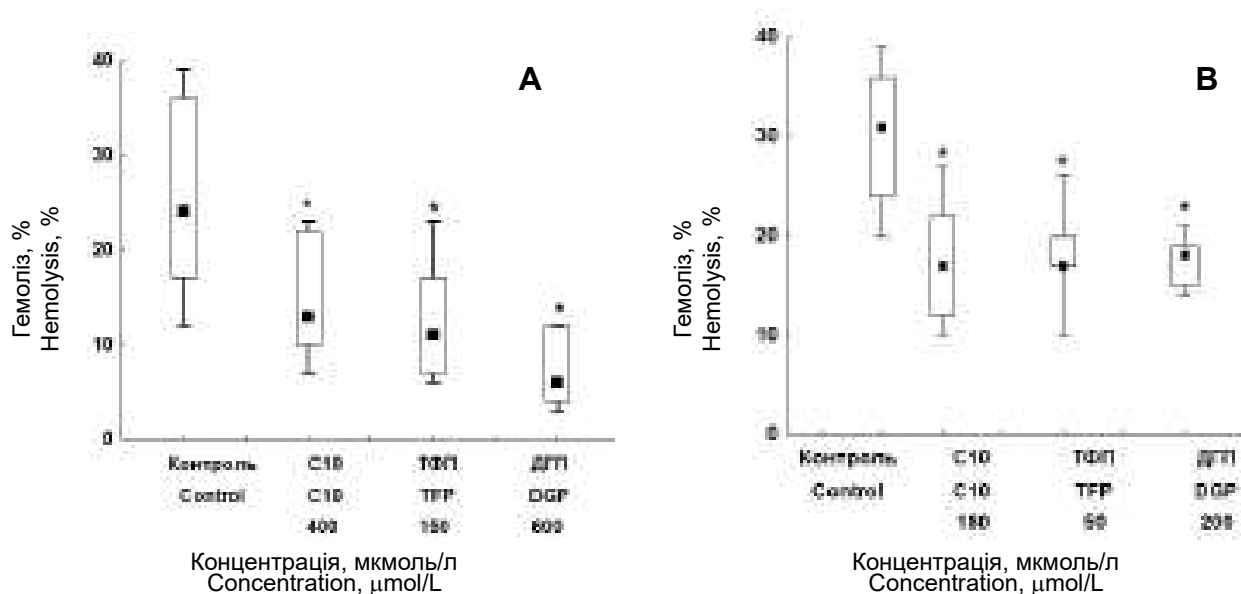


Рис. 3. Вплив амфіфільних сполук в високих (А) та низьких (В) концентраціях на рівень гемолізу еритроцитів при видаленні гліцерину із розморожених клітин за умов використання середовища 2 (0,15 моль/л NaCl). Температура 20–22°C. ■ — медіана, □ — інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), I — максимальне та мінімальне значення. * — відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Fig. 3. Effect of amphiphilic compounds in high (A) and low (B) concentrations on level of erythrocyte hemolysis during removal of glycerol from thawed cells when using medium 2 (0.15 mol/l NaCl). The temperature is 20–22°C. ■ – median, □ – interquartile range (Q1–Q3), I – maximum and minimum values. * – differences are significant compared to the control, $p < 0.05$.

Виходячи з того, що на етапі дегліцеринізації значне пошкодження еритроцитів спостерігається у середовищі 2 (див. рис. 1), амфіфільні сполуки вносили саме в це середовище перед додаванням в нього клітин. З рис. 3 видно, що в високих концентраціях C10 і ТФП знижують рівень гемолізу еритроцитів в 2 рази, в той час як неіонний ДГП є більш ефективним і знижує рівень пошкодження клітин в 4 рази. Всі амфіфільні сполуки в низьких концентраціях практично однаково знижують рівень гемолізу клітин (рис. 3).

Грунтуючись на результатах, наведених на рис. 3, були розраховані величини АГ активності ТФП, C10, ДГП при застосуванні в високих і низьких концентраціях (табл. 2). Відмінностей в ефективності амфіфільних сполук при низьких концентраціях не виявлено. Амфіфільні сполуки (у високих концентраціях) можна розташувати в ряду за збільшенням їхньої АГ_{макс} активності: C10 < ТФП < ДГП, тобто найбільш ефективним є неіонний ДГП. Різна ефективність амфіфільних сполук, що виявлена за умов дегліцеринізації розморожених клітин, ймовірно, обумовлена особливостями фізико-хімічних властивостей речовин, які використовували. Можливо, що відсутність заряду і гідрофільно-гідрофобний баланс амфіфільних молекул ДГП дозволяють більш успішно запобігти розвитку мембранних

on the study of deglycerolization of thawed erythrocytes, the listed compounds were used in the concentrations given in Table. 1.

Based on the fact that at the stage of deglycerolization significant damage of erythrocytes is observed in medium 2 (see Fig. 1), amphiphilic compounds were introduced into this medium before adding cells to it. Fig. 3 shows that in high concentrations C10 and TFP reduce the level of erythrocyte hemolysis by 2 times, while nonionic DGP is more effective and reduces the level of cell damage by 4 times. All amphiphilic compounds in low concentrations almost equally reduce the level of hemolysis of cells (Fig. 3).

Based on the results shown in Fig. 3, the values of AH activity of TFP, C10, and DGP were calculated when applied in high and low concentrations (Table 2). Differences in the effectiveness of amphiphilic compounds at low concentrations were not found. Amphiphilic compounds (in high concentrations) can be arranged in a series according to the increase of their AH_{max} activity: C10 < TFP < DGP, *i. e.* nonionic DGP is the most effective. The different effectiveness of amphiphilic compounds revealed under the conditions of deglycerolization of warmed cells is probably due to the peculiarities of the physicochemical properties of the substances used. It is possible that the lack of charge and the hydrophilic-hydrophobic ba-

Таблиця 2. Значення антигемолітичної активності амфіфільних сполук після видалення гліцерину із криоконсервованих еритроцитів у середовищі 2 (0,15 моль/л NaCl) за температури 20–22°C, $n = 7$

Title 2. Values of antihemolytic activity of amphiphilic compounds after removal of glycerol from cryopreserved erythrocytes in medium 2 (0.15 mol/L NaCl) at 20–22°C, $n = 7$

Амфіфільна сполука Amphiphilic compound	Концентрація, мкмоль/л Concentration, $\mu\text{mol/L}$	Антигемолітична активність, % Antihemolytic activity, %
С10	180	45 (39–49)
	400	42 (41–50)
ТФП TFP	50	33 (31–35)
	150	52 (42–63)
ДГП DGP	200	39 (35–46)
	600	74 (50–83)

Примітка: Значення антигемолітичної активності представлені у вигляді медіани (Me), інтерквартильного інтервалу (Q1–Q3).

Note: Antihemolytic activity values are presented as median (Me), interquartile range (Q1–Q3).

дефектів до розміру гемолітичних пор при видаленні гліцерину з розморожених клітин.

В умовах дегліцеринізації криоконсервованих еритроцитів особливістю прояву ефективності аніонного С10 є майже однакові значення його АГ активності в обох концентраціях (табл. 2), за дії ПГШ вони відрізняються (див. табл. 1). Тому доцільним було дослідити стан еритроцитарної мембрани з додаванням С10 в обох концентраціях методом протокової цитофлуориметрії. Аніонний С10 проявляє найбільшу ефективність (74%) порівняно з ТФП і ДГП за умов ПГШ клітин (див. табл. 1). Крім того, саме при застосуванні С10 (в обох концентраціях) на відміну від ТФП і ДГП клітини, які збереглися після дії ПГШ (0°C) та додавання амфіфільної сполуки, виявляли стійкість до подальшого підвищення температури (від 10 до 37°C) [6].

Стан еритроцитарної мембрани оцінюють за зміною трансмембранного розподілу фосфатидилсерину (ФС), який є маркерним фосфоліпідом внутрішнього моношару ліпідного бішару [24]. Для аналізу клітин з порушеною асиметрією мембрани (за ФС) методом протокової цитофлуориметрії застосовують аннексин V, кон'югований з флуорохромом флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC), який має високу спорідненість до ФС.

Результати проведених досліджень еритроцитів людини методом протокової цитофлуориметрії показали, що вміст контрольних ерит-

ланс of amphiphilic DGP molecules can more successfully prevent the development of membrane defects to the size of hemolytic pores when removing glycerol from thawed cells.

In the conditions of deglycerolization of cryopreserved erythrocytes, a feature of the manifestation of the effectiveness of anionic C10 is almost the same values of its AH activity in both concentrations (Table 2), while under the PHS action they differ (see Table 1). Therefore, it was advisable to investigate the condition of the erythrocyte membrane with the addition of C10 in both concentrations by the method of flow cytometry. Anionic C10 shows the greatest efficiency (74%) compared to TFP and DGP under the conditions of PHS of cells (see Table 1). In addition, precisely when using C10 (in both concentrations), in contrast to TFP and DGP, the cells that survived after the PHS effect (0°C) and the addition of an amphiphilic compound showed resistance to a further rise in temperature (from 10 to 37°C) [4].

The condition of the erythrocyte membrane is assessed by changes in the transmembrane distribution of phosphatidylserine (PS), which is a marker phospholipid of the inner monolayer of the lipid bilayer [23]. Annexin V, conjugated with the fluorochrome fluorescein isothiocyanate (FITC), which has a high affinity for PS, is used to analyze cells with disturbed membrane asymmetry (according to PS) by the flow cytometry.



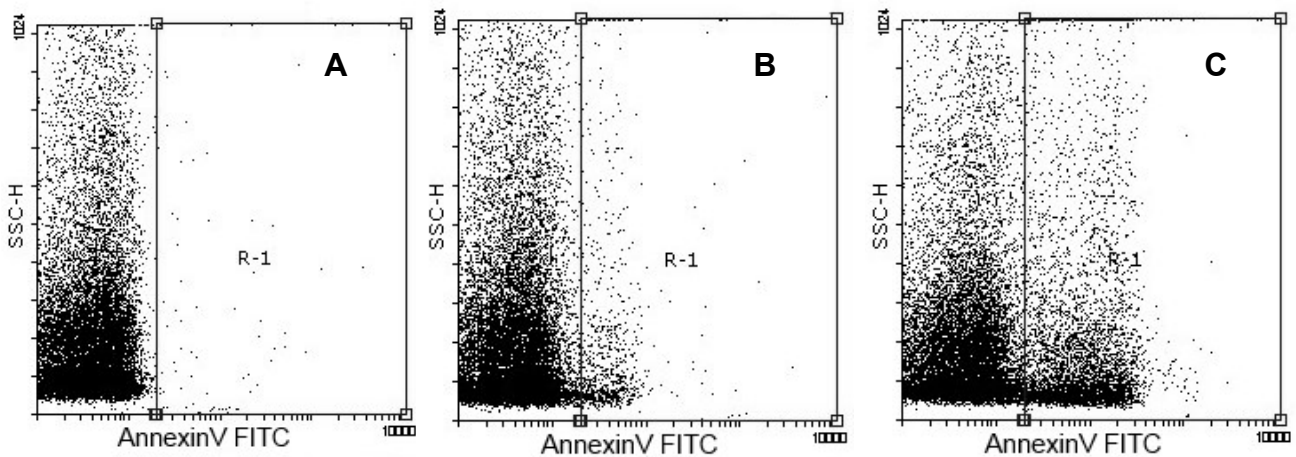


Рис. 4. Цитограми еритроцитів людини у присутності C10 у фізіологічному розчині при 0°C: **A** — контроль, **B** — 180 мкмоль/л C10, **C** — 400 мкмоль/л C10 (вісь абсцис — інтенсивність флуоресценції аннексін V FITC в умовних одиницях).

Fig. 4. Cytograms of human erythrocytes with C10 in physiological solution at 0°C: **A** – control, **B** – 180 μmol/L C10, **C** – 400 μmol/L C10 (abscissa axis is the fluorescence intensity of Annexin V FITC in conventional units).

роцитів (за відсутності амфіфілу), що зв'язали аннексин V, становив 0,34% (рис. 4). У разі застосування аніонного C10 (у фізіологічному розчині) кількість позитивно мічених клітин значною мірою залежить від концентрації амфіфільної сполуки: якщо C10 в низькій концентрації (180 мкмоль/л) викликає появу 4,32% аннексин-мічених клітин, то у високій (400 мкмоль/л) — 22,6% (рис. 4).

У разі проведення ПГШ еритроцитів при 0°C із додаванням C10 в низькій концентрації відсоток позитивно мічених клітин був незначно вище (5,77%), в той час як використання високої концентрації C10 збільшувало кількість аннексин-мічених клітин (38,3%) порівняно з відповідними показниками у фізіологічному розчині (рис. 5).

Отже, з підвищенням концентрації аніонного C10 відсоток позитивно мічених клітин збільшується, що свідчить про перерозподіл ФС із внутрішнього на зовнішній моношар ліпідного бішару еритроцитарних мембран людини. Слід зазначити, що при використанні низької концентрації C10 в обох варіантах проведення експерименту (у фізіологічному розчині та за умов ПГШ еритроцитів) цей показник відрізняється незначно.

При дослідженні ефективності катіонного ТФП були отримані досить близькі значення його AH_{\max} активності в умовах ПГШ еритроцитів і на етапі дегліцеринізації розморожених клітин (60 і 52% відповідно) (табл. 1 і 2). Це узгоджується з даними Е.А. Семіоновна та співавт. [26]. При вивченні ефективності позитивно зарядженої амфіфільної сполуки ХІР (в ефективній концентрації 600 мкмоль/л) в модельному експе-

The results of studies of human erythrocytes by flow cytometry showed that the content of control erythrocytes (in the absence of amphiphile) that bound annexin V was 0.34% (Fig. 4). In the case of using anionic C10 (in physiological solution), the number of positively labeled cells largely depends on the concentration of the amphiphilic compound: if C10 at a low concentration (180 μmol/L) causes the appearance of 4.32% of annexin-labeled cells, then at a high concentration (400 μmol/L) — 22.6% (Fig. 4).

In the case of conducting erythrocyte PHS at 0°C with the addition of C10 in a low concentration, the percentage of positively labeled cells was slightly higher (5.77%), while the use of a high concentration of C10 increased the number of annexin-labeled cells (38.3%) compared to corresponding indices in physiological solution (Fig. 5).

Therefore, with an increased concentration of anionic C10, the percentage of positively labeled cells increases, which indicates the redistribution of PS from the inner to the outer monolayer of the lipid bilayer of human erythrocyte membranes. It should be noted that when using a low concentration of C10 in both variants of the experiment (in physiological solution and under the PHS conditions of erythrocytes), this index differs slightly.

When studying the effectiveness of cationic TFP, quite close values of its AH_{\max} activity were obtained in the conditions of erythrocyte PHS and at the stage of deglycerolization of warmed cells (60 and 52%, respectively) (Tables 1 and 2). This is consistent with the data of E.A. Semionova et al. [25]. When studying the effectiveness of the

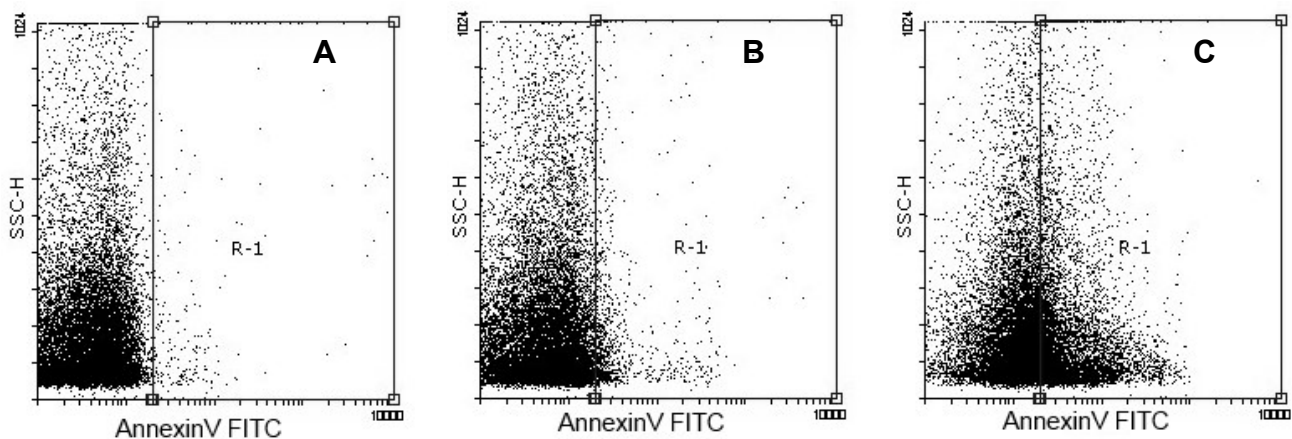


Рис. 5. Цитограми еритроцитів людини після дії постгіпертонічного шоку при 0°C у присутності C10 у середовищі регідратації: **A** — контроль, **B** — 180 мкмоль/л C10, **C** — 400 мкмоль/л C10 (вісь абсцис — інтенсивність флуоресценції аннексін V FITC в умовних одиницях). Середовище дегідратації — 1,65 моль/л NaCl.

Fig. 5. Cytograms of human erythrocytes after exposure of posthypertonic shock at 0°C with C10 in the rehydration medium: **A** — control, **B** — 180 μmol/L C10, **C** — 400 μmol/L C10 (abscissa axis is the fluorescence intensity of Annexin V FITC in conventional units). The dehydration medium is 1.65 mol/L NaCl.

рименті (за умов ПГШ клітин) і при видаленні гліцерину з розморожених еритроцитів були отримані сумірні значення AG_{\max} активності (~73%) в обох випадках.

На відміну від катіонних похідних фенотіазину (ХПР і ТФП), після застосування неіонного ДГП і аніонного C10 виявлено відмінності в їхній ефективності за умов модельного експерименту і на етапі видалення гліцерину з розморожених клітин.

Вищезазначені відмінності в прояві АГ активності амфифільних сполук можуть бути пов'язані з різним трансмембранним розподілом їхніх молекул [14]. Катіонні амфифільні сполуки, прояв антигемолітичної активності яких не залежить від характеру проведення експерименту (ПГШ або процедура дегліцеринізації), вбудовуються і розподіляються у внутрішньому моношарі ліпідного бішару еритроцитарних мембран (що на клітинному рівні проявляється в трансформації клітин за типом дискоцит-стомацит [3, 14].

Для неіонних і аніонних амфифільних сполук, які вбудовуються і розподіляються в зовнішньому моношарі ліпідного бішару (що на клітинному рівні проявляється в трансформації еритроцитів за типом дискоцит-ехіноцит [14], прояв АГ активності істотно залежить від зміни стану еритроцитарної мембрани, що відбувається в циклі заморожування-розморожування клітин. Під час криоконсервування на клітини впливає ряд криопошкоджуючих факторів: формування кристалів льоду, зміна температури, рН, тоничності середовища тощо [12]. За умов прове-

positively charged amphiphilic compound CPR (at an effective concentration of 600 μmol/L) in a model experiment (under the conditions of PHS of cells) and when removing glycerol from thawed erythrocytes, comparable values of AH_{\max} activity (~73%) were obtained in both cases.

Unlike cationic derivatives of phenothiazine (CPR and TFP), after the use of nonionic DGP and anionic C10, differences in their effectiveness were found under the conditions of a model experiment and at the stage of removing glycerol from thawed cells.

The above-mentioned differences in the manifestation of AH activity of amphiphilic compounds may be associated with different transmembrane distribution of their molecules [11]. Cationic amphiphilic compounds, the manifestation of antihemolytic activity of which does not depend on the nature of the experiment (PHS or deglycerolization), are embedded and distributed in the inner monolayer of the lipid bilayer of erythrocyte membranes (which at the cellular level manifests itself in the transformation of cells of the discocyte-stomatocyte type [11, 16].

For nonionic and anionic amphiphilic compounds that are embedded and distributed in the outer monolayer of the lipid bilayer (which is manifested at the cellular level in the transformation of erythrocytes according to the discocyte-echinocyte type [11], the manifestation of AH activity significantly depends on the change in the state of the erythrocyte membrane, which occurs in the freezing-thawing cycle of cells. During cryopreservation, cells are affected by a number



дення експерименту ПГШ, який по визначенню моделює вплив на клітини тільки одного фактора кріопшкодження (дія якого реалізується на етапі розморожування клітин), — зниження тоничності середовища.

Крім того, різниця прояву АГ активності C10 і ДГП за умов ПГШ еритроцитів та при видаленні гліцерину також в деякій мірі може бути пов'язана з впливом гліцерину на еритроцитарну мембрану [15, 18]. У роботі Y. Korniyenko та співавт. [18] з використанням набору флуорофорів, що мають різну локалізацію в ліпідному бішарі, досліджено вплив проникних кріопротекторів (гліцерин, диметилсульфоксид, 1,2-пропандіол) на мембрани еритроцитів людини. Показано, що дія кріопротекторів реалізується в полярній зоні ліпідного бішару еритроцита, що проявляється в збільшенні її гідратації та не зачіпає найбільш гідрофобну зону. Слід зазначити, що катіонні амфіфіли як стоматогенні сполуки перетинають гідрофобну зону та переважно розподіляються у внутрішньому моношарі.

Отже, ефекти стоматогенних сполук (катіонні ТФП і ХПР) не залежать від стану еритроцитарної мембрани, що формується під впливом факторів, які діють за умов видалення гліцерину з деконсервованих клітин або моделі ПГШ. У той самий час ехіноцитарні сполуки (аніонний C10, неіонний ДГП), молекули яких вбудовуються і розширюють зовнішній моношар мембрани, значною мірою реагують на зміни еритроцитарної мембрани, що і проявляється у відмінностях їхньої ефективності за вищезазначених умов.

Подальші дослідження у цьому напрямку стануть стимулом для пошуку та розширення використання тих речовин природного походження, які здатні знижувати рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів та бути ефективними на етапі видалення проникного кріопротектора з розморожених клітин та підґрунтям для розробки нових та удосконалення наявних протоколів кріоконсервування еритроцитів.

Висновки

Таким чином, основне пошкодження еритроцитів у циклі кріоконсервування під захистом 15%-го гліцерину спостерігається на етапі видалення кріопротектора з розморожених клітин з використанням сольового середовища 2 (0,15 моль/л NaCl). Застосування амфіфільних сполук, що належать до різних класів повернево активних речовин, дозволило зменшити пошкодження розморожених клітин на етапі дегліцеринізації. Всі амфіфільні сполуки в низьких концентраціях (за яких АГ активність до-

of cryodamaging factors: the formation of ice crystals, changes in temperature, pH, tonicity of the medium, *etc.* [8]. Under the conditions of conducting the PHS experiment, which by definition simulates the effect on cells only one factor of cryodamage (the action of which is implemented at the stage of thawing of cells) is a decrease in the medium tonicity.

In addition, the difference in the manifestation of AH activity of C10 and DGP under the PHS conditions of erythrocyte and when glycerol is removed may also be related to some extent to the effect of glycerol on the erythrocyte membrane [12, 15]. In the report of Y. Korniyenko *et al.* [15] using a set of fluorophores with different localization in the lipid bilayer, there was investigated the effect of permeable CPAs (glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol) on the membranes of human erythrocytes. It is shown that the effect of CPAs is implemented in the polar zone of the lipid bilayer of the erythrocyte, which is manifested in the increase of its hydration and does not affect the most hydrophobic zone. It should be noted that cationic amphiphiles as stomatogenic compounds cross the hydrophobic zone and are mainly distributed in the inner monolayer.

Therefore, the effects of stomatogenic compounds (cationic TFP and CPR) do not depend on the state of the erythrocyte membrane, which is formed under the influence of factors that act under the conditions of removal of glycerol from deconserved cells or the PHS model. At the same time, echinocytogenic compounds (anionic C10, nonionic DGP), the molecules of which are embedded and expand the outer monolayer of the membrane, largely respond to changes in the erythrocyte membrane, which is manifested in differences in their effectiveness under the above conditions.

Further investigations in this direction will be a stimulus for the search and expansion of the use of those substances of natural origin that are able to reduce the level of posthypertonic hemolysis of erythrocytes and be effective at the stage of removing the permeable CPA from thawed cells and the basis for the development of new and improvement of existing erythrocyte cryopreservation protocols.

Conclusions

Thus, the main damage of erythrocytes in the cycle of cryopreservation under the protection of 15% glycerol is observed at the stage of removing the CPA from thawed cells using salt medium 2 (0.15 mol/L NaCl). The use of amphiphilic compounds belonging to different classes of surfactants



рівнює приблизно 45% в умовах ПГШ клітин) проявляють однакову ефективність при видаленні гліцерину з розморожених клітин.

Показано, що серед амфифільних сполук (у високих концентраціях) найбільш ефективними при дегліцеринізації розморожених клітин є ДГП (74%), а за умов ПГШ еритроцитів — С10 (74%). Показники AH_{\max} активності ТФП сумірні в обох вищевказаних випадках.

Результати, отримані за допомогою методу протокової цитофлюориметрії свідчать про залежність трансбішарового перерозподілу ФС в еритроцитарних мембранах від концентрації амфифільної сполуки (С10). Отже, можна підібрати таку концентрацію амфифільної сполуки, за якої вона була здатна проявляти значну антигемолітичну активність і не впливати на трансмембранний перерозподіл ФС у мембрані.

made it possible to reduce damage to thawed cells at the stage of deglycerolization. All amphiphilic compounds in low concentrations (for which the AH activity is approximately 45% in the conditions of PHS of cells) show the same efficiency in removing glycerol from warmed cells.

It was shown that among amphiphilic compounds (in high concentrations) the most effective in deglycerinization of thawed cells are DGP (74%), and under the conditions of erythrocyte PHS — C10 (74%). The AH_{\max} indices of TFP activity are comparable in both of the above cases.

The results obtained using the method of flow cytometry indicate the dependence of the transbilayer redistribution of PS in erythrocyte membranes on the concentration of the amphiphilic compound (C10). Therefore, it is possible to choose such a concentration of the amphiphilic compound at which it would be able to show significant antihemolytic activity and not affect the transmembrane redistribution of PS in the membrane.

Література

1. Гольцев АМ, Новак ВЛ, Компанієць АМ, та ін. Кріоконсервування клітин донорської крові та їх довгострокове зберігання у низькотемпературних банках: методичні рекомендації. Харків; 2016. 35с.
2. Єршова НА, Чабаненко ОО, Шпакова НМ, та ін. Вплив трифторперазину та децилсульфату натрію на осмотичний шок еритроцитів людини та кролика. Фізіологічний журнал. 2022; 68 (1): 62–8.
3. Коваленко СЄ, Алексєєва ЛІ, Кулешова ЛГ, та ін. Можливі механізми антигемолітичної дії хлорпромазину. Проблеми кріобіології. 2006; 16 (2): 137–46.
4. Любич ВВ. Виробництво препаратів донорської крові в Україні та контроль їхньої якості. Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. Т. 39. Київ: «Гордон»; 2017. с. 99–104.
5. Чабаненко О, Єршова Н, Орлова Н, та ін. Вплив мембранотропних речовин на чутливість еритроцитів ссавців до дії постгіпертонічного шоку. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2020; 83: 31–8.
6. Чабаненко ОО, Орлова НВ, Шпакова НМ. Тестування стану еритроцитів людини після сумісної дії постгіпертонічного шоку та амфифільних сполук. Доповіді Національної академії наук України. 2021; (6): 120–5.
7. Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. J Blood Transfusion [Internet]. 2016 Dec 14 [cited 2023 Dec 22]; 2016: 4860284. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jbt/2016/4860284/>
8. Babajanzadeh B, Sherizadeh S, Ranji H. Detergents and surfactants: a brief review. Open Access J Sci. 2019; 3 (3): 94–9.
9. Bojic S, Murray A, Bentley BL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. BMC Biol [Internet]. 2021 Mar 24 [cited 2022 Jan 31]; 19: 56. Available from: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-021-00976-8>
10. Chang AL, Hoehn RS, Jernigan P, et al. Previous cryopreservation alters the natural history of the red blood cell storage lesion. Shock. 2016; 46 (3S): 89–95.

References

1. Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. J Blood Transfusion. [Internet]. 2016 Dec 14 [cited 2023 Dec 22]; 2016: 4860284. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jbt/2016/4860284/>
2. Babajanzadeh B, Sherizadeh S, Ranji H. Detergents and surfactants: a brief review. Open Access J Sci. 2019; 3 (3): 94–9.
3. Bojic S, Murray A, Bentley BL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. BMC Biol. [Internet]. 2021 Mar 24 [cited 2022 Jan 31]; 19: 56. Available from: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-021-00976-8>
4. Chabanenko OO, Orlova NV, Shpakova NM. [Testing the state of human erythrocytes after combined action of posthypertonic shock and amphiphilic compounds]. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2021; (6): 120–5. Ukrainian.
5. Chabanenko O, Yershova N, Orlova N et al. [Impact of membranotropic compounds on the sensitivity of mammalian erythrocytes to the posthypertonic shock action]. Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2020; 83: 31–8. Ukrainian.
6. Chang A, Kim Y, Hoehn R, et al. Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. Blood Transfus. 2017; 15 (4): 341–7.
7. Chang AL, Hoehn RS, Jernigan P, et al. Previous cryopreservation alters the natural history of the red blood cell storage lesion. Shock. 2016; 46 (3 Suppl. 1): 89–95.
8. Fuller BJ, Benson EE, editors. Life in the frozen state. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press; 2004. 672 p.
9. Goltsev AM, Novak VL, Kompaniyets AM, et al. [Cryopreservation of donor blood cells and their long-term storage in



11. Chang A, Kim Y, Hoehn R, et al. Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. *Blood Transfus.* 2017; 15 (4): 341–7.
12. Fuller BJ, Benson EE, editors. *Life in the frozen state.* Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press; 2004. 672 p.
13. Isiksacan Z, D'Alessandro A, Wolf SM, et al. Assessment of stored red blood cells through lab-on-a-chip technologies for precision transfusion medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* [Internet]. 2023 July 26 [cited 2023 Nov 29]; 120 (32): e2115616120. Available from: <https://europepmc.org/article/med/37494421>
14. Isomaa B, Hägerstrand H, Paatero G. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 899 (1): 93–103.
15. Ivanov IT, Paarvanova BK. Effect of permeant cryoprotectants on membrane skeleton of erythrocytes. *Probl Cryobiol and Cryomed.* 2019; 29 (3): 237–45.
16. Klbik I. Is post-hypertonic lysis of human red blood cells caused by excessive cell volume regulation? *Cryobiology.* 2024; 114: 104795.
17. Klbik I. Post-hypertonic lysis of red blood cells and cell volume regulation. *Cryobiology.* 2023; 113: 104656.
18. Korniyenko Y, Posokhov Y. A set of fluorescent probes to study the influence of low molecular weight cryoprotectants on human erythrocyte membranes. *Kharkov University Bulletin. Chemical Series.* 2016; (26): 5–11.
19. Lagerberg JW. Frozen blood reserves. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* 4th ed. Book series: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 2180. New York: Humana Press; 2021. p. 523–38.
20. Lahmann JM, Sanchez CC, Benson JD, et al. Implications of variability in cell membrane permeability for design of methods to remove glycerol from frozen-thawed erythrocytes. *Cryobiology.* 2020; 92: 168–179.
21. Leikens CCM, de Korte D, Lagerberg JWM. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. *Vox Sang.* 2015; 108 (3): 219–25.
22. Liu X, Hu Y, Pan Y, et al. Exploring the application and mechanism of sodium hyaluronate in cryopreservation of red blood cells. *Mater Today Bio.* [Internet]. 2021 Nov 10 [cited 2023 Nov 22]; 12: 100156. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590006421000648>
23. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology.* 2008; 57 (3): 251–6.
24. Riske KA, Domingues CC, Casadei BR, et al. Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. *Biophys Rev.* 2017; 9: 649–67.
25. Semionova EA, Chabanenko OO, Orlova NV, et al. About mechanism of antihemolytic action of chlorpromazine under posthypertonic stress in erythrocytes. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27 (3): 219–29.
26. Semionova EA, Zemlyanskikh NG, Orlova NV, et al. Antihemolytic efficiency of chlorpromazine under posthypertonic shock and glycerol removal from erythrocytes after thawing. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27 (1): 51–60.
27. Sut C, Tariket S, Chou ML, et al. Duration of red blood cell storage and inflammatory marker generation. *Blood Transfusion.* 2017; 15 (2): 145–52.
28. Turner TR, Clarke G, Denomme GA, et al. Effect of cryopreservation on a rare McLeod donor red blood cell concentrate. *Immunohematology.* 2021; 37 (2): 78–83.
29. Wang Y, Gao S, Zhu K, et al. Integration of trehalose lipids with dissociative trehalose enables cryopreservation of human RBCs. *ACS Biomater Sci Eng.* 2023; 9 (1): 498–507.
- low-temperature banks: methodological recommendations]. *Kharkiv;* 2016. 35 p. Ukrainian.
10. Isiksacan Z, D'Alessandro A, Wolf SM, et al. Assessment of stored red blood cells through lab-on-a-chip technologies for precision transfusion medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Internet]. 2023 July 26 [cited 2023 Nov 29]; 120 (32): 2115616120. Available from: <https://europepmc.org/article/med/37494421>
11. Isomaa B, Hägerstrand H, Paatero G. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 899 (1): 93–103.
12. Ivanov IT, Paarvanova BK. Effect of permeant cryoprotectants on membrane skeleton of erythrocytes. *Probl Cryobiol and Cryomed.* 2019; 29 (3): 237–45.
13. Klbik I. Is post-hypertonic lysis of human red blood cells caused by excessive cell volume regulation? *Cryobiology.* 2024; 114: 104795.
14. Klbik I. Post-hypertonic lysis of red blood cells and cell volume regulation. *Cryobiology.* 2023. 113: 104656.
15. Korniyenko Y, Posokhov Y. A set of fluorescent probes to study the influence of low molecular weight cryoprotectants on human erythrocyte membranes. *Kharkov University Bulletin. Chemical Series.* 2016; (26): 5–11.
16. Kovalenko SE, Alekseyeva LI, Kuleshova LG, et al. Possible mechanisms of chlorpromazine antihemolytic effect. *Problems of Cryobiology.* 2006; 16 (2): 137–46.
17. Lagerberg JW. Frozen blood reserves. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* 4th ed. Book series: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 2180. New York: Humana Press; 2021. p. 523–38.
18. Lahmann JM, Sanchez CC, Benson JD, et al. Implications of variability in cell membrane permeability for design of methods to remove glycerol from frozen-thawed erythrocytes. *Cryobiology.* 2020; 92: 168–79.
19. Leikens CCM, de Korte D, Lagerberg JWM. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. *Vox Sang.* 2015; 108 (3): 219–25.
20. Liu X, Hu Y, Pan Y, et al. Exploring the application and mechanism of sodium hyaluronate in cryopreservation of red blood cells. *Mater Today Bio* [Internet]. 2021 Nov 10 [cited 2023 Nov 22]; 12: 100156. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590006421000648>
21. Lyubych VV. [Production of donor blood preparations in Ukraine and their quality control]. *Hematologia i perelyvannia krovi: mizhvidomchyi zbirnyk.* Vol 39: Kyiv: Hordon; 2017. p. 99–104. Ukrainian.
22. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology.* 2008; 57 (3): 251–6.
23. Riske KA., Domingues CC, Casadei BR, et al. Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. *Biophys Rev.* 2017; 9: 649–67.
24. Semionova EA, Chabanenko OO, Orlova NV, et al. About mechanism of antihemolytic action of chlorpromazine under posthypertonic stress in erythrocytes. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27 (3): 219–29.
25. Semionova EA, Zemlyanskikh NG, Orlova NV, et al. Antihemolytic efficiency of chlorpromazine under posthypertonic shock and glycerol removal from erythrocytes after thawing. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27 (1): 51–60.
26. Sut C, Tariket S, Chou ML, et al. Duration of red blood cell storage and inflammatory marker generation. *Blood Transfusion* 2017; 15 (2): 145–52.
27. Turner TR, Clarke G, Denomme GA, et al. Effect of cryopreservation on a rare McLeod donor red blood cell concentrate. *Immunohematology.* 2021; 37 (2): 78–83.
28. Wang Y, Gao S, Zhu K, et al. Integration of trehalose lipids with dissociative trehalose enables cryopreservation of human RBCs. *ACS Biomater Sci Eng.* 2023; 9 (1): 498–507.

30. Wong KA, Nsier N, Acker JP. Use of supernatant refractive index and supernatant hemoglobin concentration to assess residual glycerol concentration in cryopreserved red blood cells. *Clin Chim Acta*. 2009; 408 (1-2): 83–6.

29. Wong KA, Nsier N, Acker JP. Use of supernatant refractive index and supernatant hemoglobin concentration to assess residual glycerol concentration in cryopreserved red blood cells. *Clin Chim Acta*. 2009; 408 (1-2): 83–6.

30. Yershova NA, Chabanenko OO, Shpakova NM, et al. [Effect of trifluoroperazine and sodium decyl sulfate on posthypertensive shock of human and rabbit erythrocytes]. *Fiziol Zh*. 2022; 68 (1): 62–8. Ukrainian.

