

# Морфологічні особливості температурної та осмотичної реакції еритроцитів за наявності хлорпромазину

Н.М. Шпакова, К.А. Семіонова, І.Ф. Коваленко, Н.А. Єршова, Н.В. Орлова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; [starling.nataly@gmail.com](mailto:starling.nataly@gmail.com)

*Вивчали вплив хлорпромазину на постгіпертонічний лізис еритроцитів з наступною оцінкою температурної залежності морфологічних особливостей клітин. Встановлена висока антигемолітична його активність в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів при 0, але не при 37°C. Максимальна антигемолітична активність речовини в ефективній концентрації (600 мкмоль/л) становила 77%. Еритроцити, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку і хлорпромазину (180 і 600 мкмоль/л), піддавали наступному нагріванню (6, 15, 24, 34°C). При використанні 600 мкмоль/л хлорпромазину клітини, що були отримані, змінювали форму (від стоматоцитів до сферостоматоцитів) і гемолізувалися. У разі застосування 180 мкмоль/л хлорпромазину еритроцити з ознаками стоматоцитозу набували особливостей, що властиві ехіноцитарним формам, при цьому їх кількість не зменшувалася. Ключові слова: еритроцити людини; постгіпертонічний шок; хлорпромазин; температура; стоматоцит; сферостоматоцит; ехіноцит.*

## ВСТУП

Актуальною задачею є розробка нових підходів до вирішення проблеми довготривалого зберігання клітин за умов заморожування. Цикл біотехнологічного процесу низькотемпературного консервування біологічного матеріалу складається з декількох етапів: підготовка до заморожування (еквілібрація з кріопротектором), заморожування, відігрівання, видалення кріопротекторів [1-3]. Вплив кріопошкоджувальних факторів на клітини на етапі, пов'язаному із відігріванням і видаленням кріопротекторів, можна моделювати за допомогою підходу, який полягає в перенесенні еритроцитів в ізотонічні умови з гіпертонічних середовищ при позитивних температурах, тобто вони піддаються дії постгіпертонічного шоку [4].

Раніше був показаний захисний ефект хлорпромазину щодо еритроцитів ссавців за умов дії різних видів стресу [5-7]. Зокрема, цей ефект був виявлений при гіпертонічному

шоці і гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів [6], за допомогою яких вивчають вплив факторів кріопошкодження, що діють на клітини на етапі їх заморожування. Оскільки постгіпертонічний шок еритроцитів моделює вплив факторів, які діють на етапі їх розморожування, було доцільно дослідити вплив хлорпромазину на постгіпертонічний лізис еритроцитів.

Хлорпромазин є першим синтезованим антипсихотиком (нейролептиком), який слугував основою для синтезу інших фенотіазинових і нефенотіазинових препаратів, а також і антидепресантів [8]. Він є похідним фенотіазину. Амфіфільність молекул хлорпромазину зумовлена наявністю у них гідрофільної і гідрофобної частин [9]. Остання представлена структурою фенотіазину, водночас гідрофільна – четвертинним пропіламіном. При фізіологічних значеннях рН пропіламіновий ланцюг молекул хлорпромазину є катіонним. Гідрофільно-гідрофобний баланс його молекул дає змогу їм при вбуду-

© Н.М. Шпакова, К.А. Семіонова, І.Ф. Коваленко, Н.А. Єршова, Н.В. Орлова

ванні в еритроцитарну мембрану перетинати гідрофобну ділянку ліпідного бішару [10]. Позитивний заряд молекул хлорпромазину зумовлює взаємодію як із негативно зарядженими фосфоліпідами внутрішнього моношару ліпідного бішару, так і з молекулами спектрину [11, 12], що проявляється в зміні форми еритроцитів [6, 10].

Мета нашої роботи – вивчити вплив хлорпромазину на розвиток постгіпертонічного лізису еритроцитів людини з наступною оцінкою температурної залежності морфологічних особливостей клітин.

## МЕТОДИКА

Для дослідження використовували еритроцити, отримані зі свіжозібраної крові людини. Кров чоловіків групи А (II)<sup>+</sup> заготовляли на гемоконсерванті «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням (центрифуга ОПн-3У4.2, 3000 об/хв, 3 хв) в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше ніж 4 год при 0°C. Усі середовища готували на фосфатному буфері (0,01 моль/л), рН 7,4. У роботі були використані хлорпромазин («Calbiochem», США), тритон X-100 («Merck», Німеччина) та реактиви вітчизняного виробництва.

Для розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів в результаті дії постгіпертонічного шоку [4, 13] клітини інкубували в гіпертонічному розчині (1,45 моль/л NaCl) протягом 20 хв, після чого переносили до ізотонічного середовища (0,15 моль/л NaCl) на 5 хв (при 37 або 0°C). Кінцевий гематокрит становив 0,4%. Рівень гемолізу еритроцитів визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм. За 100% приймали поглинання проби, в яку додавали тритон X-100 в концентрації 0,1%.

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

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

де  $\kappa$  – рівень гемолізу еритроцитів за відсутності амфіфільної речовини;  $a$  – мінімальний рівень гемолізу еритроцитів за наявності амфіфільної речовини.

Осмоляльність розчинів речовини визначали кріоскопічним методом із використанням осмометра ОМКА-1Ц-01 (Одеса, Україна). Морфологічний аналіз еритроцитів проводили методом світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа Axio Observer. Z1 виробництва фірми «Carl Zeiss» із термоприставкою (Німеччина). Швидкість нагрівання зразка клітин становив 1°C/хв. У роботі використано силіконізоване предметне та покривне скло. Для морфологічної оцінки особливостей форми та поверхневої архітектури еритроцитів застосовували загальноприйнятту класифікацію [14].

Статистичну обробку отриманих числових результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6,0» (StatSoft Inc., США). Їх представлено як медіана і інтерквартильний інтервал (Q1-Q3). Для перевірки статистичної значимості відмінностей досліджуваних числових показників використовували критерій Манна-Уїтні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення впливу різних концентрацій хлорпромазину на чутливість еритроцитів до дії постгіпертонічного шоку клітини перенесли із середовища дегідратації (1,45 моль/л NaCl) до середовища регідратації (0,15 моль/л NaCl) при 37 і 0°C.

Раніше було показано [15], що амфіфіли проявляють максимальну ефективність у середовищі в момент дії стресу на клітини

(тобто під час різкої зміни умов середовища). Грунтуючись на цих даних, при вивченні впливу постгіпертонічного шоку на клітини хлорпромазин додавали тільки в середовище регідратації перед внесенням еритроцитів.

Отримані результати представлені на рис. 1. При 37°C спостерігається збільшення рівня постгіпертонічного лізису еритроцитів із підвищенням концентрації хлорпромазину в середовищі (вище ніж 60 мкмоль/л), тобто в зазначених умовах проявляється пошкоджувальна дія амфіфільної сполуки (див. рис. 1, а).

При 0°C (див. рис. 1, б) залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів від концентрації хлорпромазину характеризується 3 ділянками. У разі збільшення концентрації амфіфілу поступове знижується рівень лізису клітин до мінімального значення. Потім,

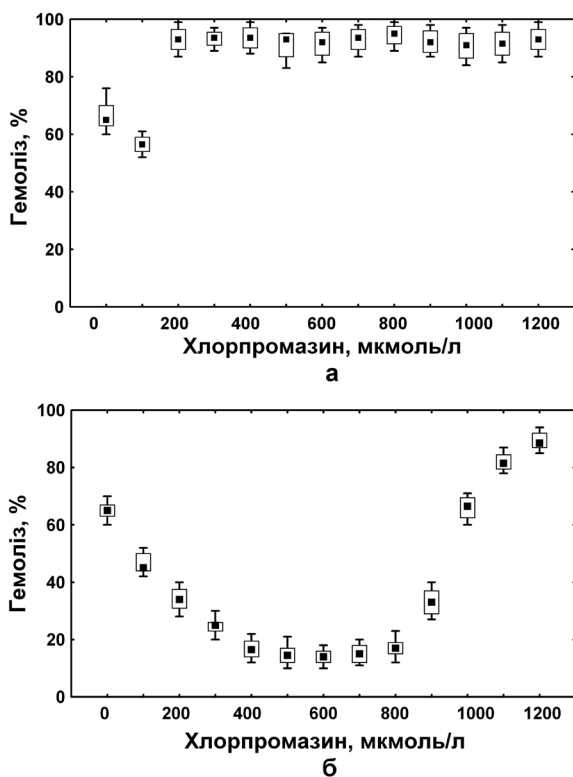


Рис. 1. Залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини від концентрації хлорпромазину при 37 (а) і 0°C (б): середовище дегідратації – 1,45 моль/л NaCl; середовище регідратації – 0,15 моль/л NaCl (° – медіана, □ – інтерквартильний інтервал (Q1 – Q3), I – максимальне-мінімальне значення)

незважаючи на подальше збільшення концентрації амфіфілу, мінімальний рівень гемолізу не змінювався; лише згодом спостерігали підвищення пошкодження клітин. У низьких концентраціях хлорпромазин захищає еритроцити від ушкодження в умовах постгіпертонічного шоку, водночас у високих – сполука проявляє літичну дію на клітини. Подібний подвійний ефект амфіфільних речовин показаний у працях інших авторів [6, 16].

З отриманої концентраційної залежності гемолізу еритроцитів при 0°C були визначені розміри плато і значення ефективної концентрації, а також розраховано максимальну антигемолітичну активність ( $AG_{\text{макс}}$ ), яка характеризує ефективність дії амфіфільної сполуки, що досліджувалась. Розміри плато відображають діапазон концентрацій речовини, в межах якого спостерігається мінімальний лізис клітин. Як ефективну концентрацію амфіфільної сполуки використовували таку, що відповідає середині плато. У цій концентрації амфіфіл проявляв максимальну антигемолітичну дію.

З рис. 1, б видно, що плато знаходиться в межах 400-800 мкмоль/л хлорпромазину, і в ефективній концентрації (600 мкмоль/л) речовина проявляє максимальну антигемолітичну активність, яка становить 77%. Для наступних досліджень було обрано 2 концентрації хлорпромазину – 600 (як ефективна) і 180 мкмоль/л (антигемолітична активність якої дорівнює 48%) (див. рис.1, б). Вибір останньої зумовлений тим, що при використанні хлорпромазину в концентраціях, що не перевищують 200 мкмоль/л, зберігається бар'єрна функція еритроцитарної мембрани (відносно іонів фериціаніду), як було показано за допомогою метода електронного парамагнітного резонансу із застосуванням зонда ТЕМПОН [16].

Враховуючи отримані дані при вивченні захисної дії хлорпромазину за умов гіпертонічного шоку і кріогемолізу, а також гіпотонічного лізису еритроцитів, використання амфіфілу в концентраціях вищих за

180-200 мкмоль/л призводить до розвитку детергентного лізису клітин [5, 6], водночас при постгіпертонічному шоці еритроцитів ефективна його концентрація хлорпромазину значно вища і дорівнює 600 мкмоль/л. Тому важливо було перевірити наскільки виявлений захисний ефект речовини за умови дії постгіпертонії на клітини є стабільним при застосуванні її як у високій (600 мкмоль/л), так і низькій (180 мкмоль/л) концентраціях.

Як контроль стану еритроцитів після дії на них постгіпертонічного шоку і хлорпромазину, використовували зміну температури у бік її підвищення. Після дії на клітини постгіпертонії і хлорпромазину при 0°C їх нагрівали і витримували протягом 30 хв при різних значеннях температури. Отримані результати представлені на рис. 2. Видно, що рівень гемолітичного пошкодження контрольних клітин (за відсутності хлорпромазину) не залежить від зміни температури. Аналогічні властивості еритроцитів були при використанні речовини у низькій концентрації (180 мкмоль/л). Таким чином, вони стійкі до наступного підвищення температури. Зовсім інше спостерігали при застосуванні хлорпромазину у концентрації 600 мкмоль/л. Наразі в процесі підвищення температури від 25 до 37°C рівень гемолізу клітин зростає і сягає

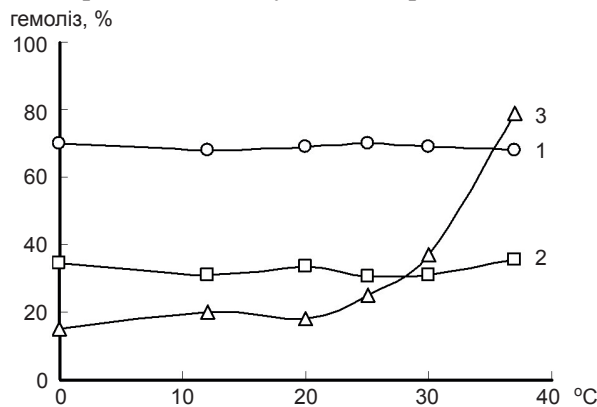


Рис. 2. Вплив температури на гемоліз еритроцитів, які попередньо підлягали дії постгіпертонічного шоку при 0°C: 1 – контроль; 2 і 3 – хлорпромазин, 180 мкмоль/л і 600 мкмоль/л відповідно.

$P < 0,05$  порівняно з відповідним показником при температурі 0°C

значень, отриманих для контрольних еритроцитів. Отже, еритроцити, що «вижили» після дії постгіпертонічного шоку за наявності 600 мкмоль/л хлорпромазину (0°C), чутливі до підвищення температури у вищезазначеному діапазоні.

Таким чином, температура проявляє подвійний характер дії хлорпромазину (600 мкмоль/л) на клітини за умов впливу постгіпертонії: при низьких значеннях температури зберігається захисний ефект речовини, а при високих – проявляється літичний (детергентний ефект).

Визначення гемолізу еритроцитів відображає пошкодження клітин у всій популяції. Реакцію окремих клітин на підвищення температури і наявність хлорпромазину, який викликає зміну форми клітин за типом дискоцит-стоматоцит [10], можна оцінити при використанні світлової мікроскопії. На рис. 3 і 4 представлені результати впливу температури на еритроцити, які збереглися після дії постгіпертонічного шоку за наявності хлорпромазину (при 0°C).

Контрольні еритроцити (клітини, які були піддані дії постгіпертонічного шоку без додавання хлорпромазину) при 6°C представлені сфероехіноцитами, для яких характерне збільшення ознак ехіноцитозу в процесі підвищення температури до 34°C. При цьому кількість клітин в зразку не змінюється (рис. 3).

Клітини за наявності хлорпромазину (180 і 600 мкмоль/л; рис. 4) представлені стоматоцитами (6°C). В процесі нагрівання еритроцитів при використанні речовини в низькій концентрації на їх поверхні поступово з'являються «шипи», властиві ехіноцитарним формам (див. рис. 4, I), а в високій – клітини набувають ознаки сферостоматоцитів (див. рис. 4, II). В останньому випадку різко скорочується кількість клітин у полі зору, так що при 24°C цілі клітини в зразку відсутні.

Таким чином, для клітин, що «вижили» після дії постгіпертонічного шоку і високої концентрації хлорпромазину (600 мкмоль/л),

характерно різке зниження їх кількості в процесі нагрівання, тобто вони нестабільні при зміні температури. За умов нагрівання еритроцитів при низькій концентрації хлорпромазину (180 мкмоль/л), число клітин не змінюється, що дає змогу говорити про їх стабільність.

При перенесенні клітин в гіпертонічне середовище (етап дегідратації) внутрішньоклітинна вода виходить з еритроцитів, в результаті чого вони стискаються, і, як наслідок, плазматична мембрана деформується за типом вигину (утворюються «спікули і вм'ятини») [17]. Така деформація мембрани (у середовищі дегідратації, 1,45 моль/л NaCl) не супроводжується порушенням її цілісності, про що свідчить відсутність гемолітичного пошкодження клітин [6]. На цьому етапі в еритроцити можуть проникати позаклітинні іони, тому при перенесенні клітин в ізотонічний розчин (етап регідратації) в них увійде більше води, ніж було видалено на стадії дегідратації [13]. В результаті набухання клітини її плазматична мембрана розтягується аж до механічного руйнування [18].

Виявлений захисний ефект хлорпромазину може бути зумовлений його амфифільною природою. Внаслідок розподілу його молекул під час вбудовування до еритроцитарної мембрани збільшується її площа поверхні [19]. Це дає змогу клітинам без руйнування сягати більших значень критичного гемолітичного об'єму в результаті входу води на етапі регідратації. Однак той факт, що захисний ефект хлорпромазину спостерігається тільки при 0°C (див. рис. 1), дає можливість висунути інше припущення щодо механізму його дії.

Встановлено, що критичним етапом у розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів є етап регідратації [4], коли формуються трансмембранні гемолітичні пори. Антигемолітична активність хлорпромазину при дії на клітини постгіпертонії (див. рис. 1, б) зумовлена впливом речовини на процес формування трансмембранних пор. У момент дії стресового чинника хлорпромазин вбудовується та розподіляється в мембрані, розупорядковуючи її [10, 20], і, тим самим, запобігає утворенню пори, розміри якої подібні таким молекули гемоглобіну.

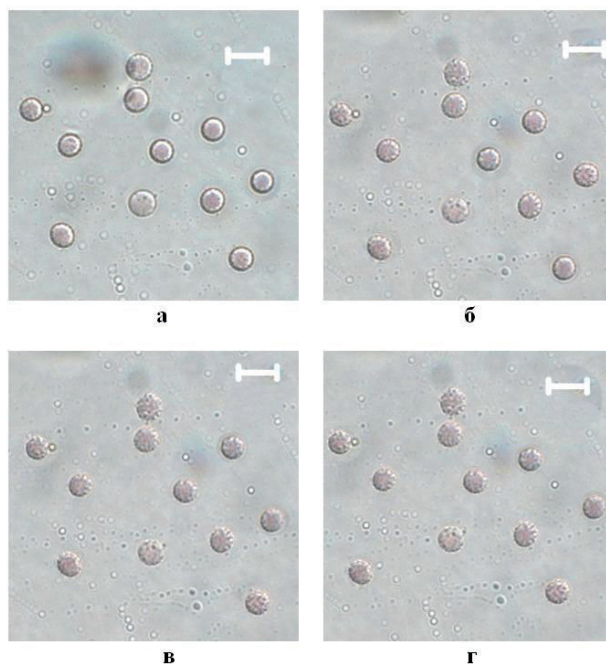


Рис. 3. Вплив температури на еритроцити, які попередньо підлягали дії постгіпертонічного шоку при 0°C: а – 6°C; б – 15°C; в – 24°C; г – 34°C (—|— – шкала 10 мкм)

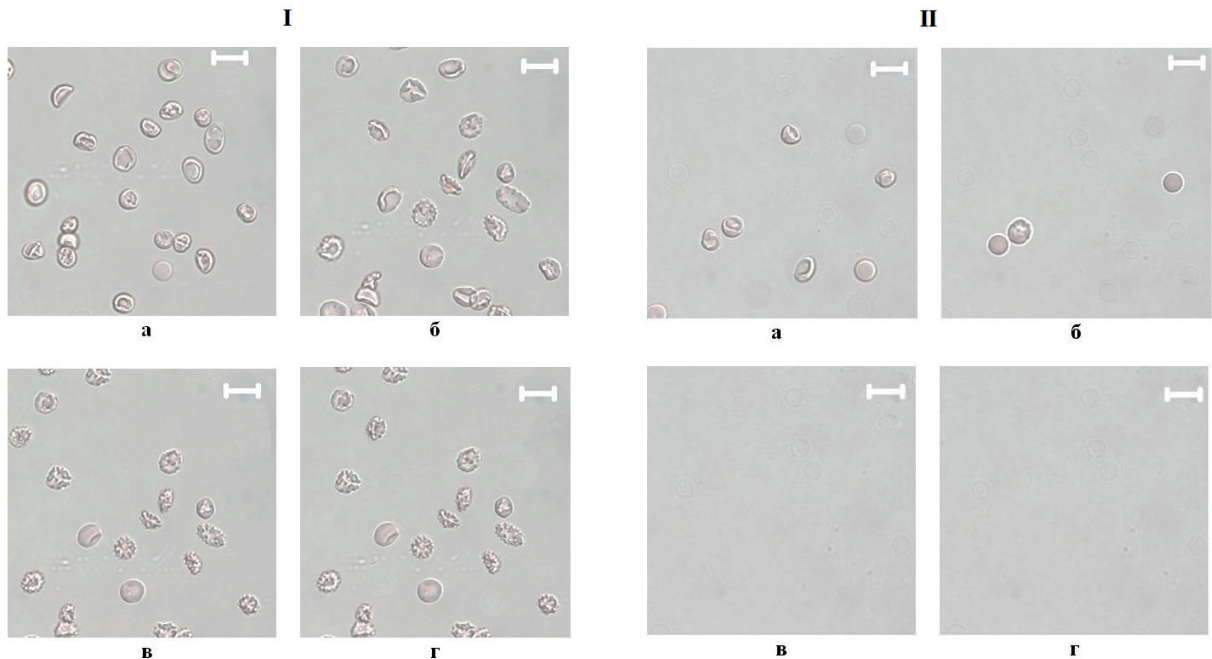


Рис. 4. Вплив температури на еритроцити, які попередньо підлягали дії постгіпертонічного шоку в присутності 180 (I) і 600 мкмоль/л (II) хлорпромазину (0°C): а – 6°C; б – 15°C; в – 24°C; г – 34°C (—|— – шкала 10 мкм)

У нашій роботі антигемолітична активність хлорпромазину виявлена тільки при 0°C (див. рис. 1). Раніше ми показали [5, 6], що ця речовина проявляє захисний ефект в умовах гіпотонічного лізису і гіпертонічного шоку еритроцитів як при 0, так і при 37°C, при чому в останньому випадку ефективність амфифільних сполук набагато вища. Вищезазначені відмінності у прояві ефективності хлорпромазину при різних стресових впливах на клітини можуть бути зумовлені їх різним станом. У разі гіпотонічного лізису і гіпертонічного шоку експеримент складається з одного етапу, тобто клітини відразу піддають дії того чи іншого стресового чинника (зокрема, різкій зміні концентрації солі у середовищі). Для розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів потрібні два етапи. Під час дегідратації клітин порушується бар'єрна функція мембрани для внутрішньоклітинних катіонів калію, яке пов'язують із утворенням трансмембранних дефектів [21]. Наступна зміна осмоляльності середовища (етап регідратації) може призводити до їх зростання

до розміру гемолітичних пор. Можливо, при 37°C вказаний процес настільки стрімкий, що хлорпромазин не здатний «утримувати» існуючий мікродфект у межах його розмірів. При 0°C всі процеси в мембрані дещо загальмовані, що і дає змогу молекулам хлорпромазину запобігати зростанню трансмембранного дефекту, який зародився на етапі дегідратації клітин.

Підсумовуючи результати дослідження, можна зробити такі висновки. Хлорпромазин підвищує стійкість еритроцитів людини до дії постгіпертонічного шоку при 0°C. При 37°C захисний ефект речовини не виявлений. Еритроцити, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку і хлорпромазину (0°C), стійкі до наступного нагрівання (за рівнем гемолізу) при використанні речовини в низькій концентрації (180 мкмоль/л) і нестійкі в разі застосування її у високій концентрації (600 мкмоль/л). При цьому спостерігалася зміна форми клітин від стомато- до ехіноцитарної (при 180 мкмоль/л) і до сферостоматоцитарної (при 600 мкмоль/л).

*The authors of this study, N.M. Shpakova, E.A. Semionova, I.F. Kovalenko, N.A. Iershova, N.V. Orlova, confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**Н.М. Шпакова, Е.А. Семионова,  
И.Ф. Коваленко, Н.А. Ершова, Н.В. Орлова**

### **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕМПЕРАТУРНОЙ И ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ ХЛОПРОМАЗИНА**

Изучали влияние хлорпромазина на постгипертоничный лизис эритроцитов с последующей оценкой температурной зависимости морфологических особенностей клеток. Установлена высокая антигемолитическая его активность в условиях постгипертонического шока эритроцитов при 0, но не при 37°C. Максимальная антигемолитическая активность вещества в эффективной концентрации (600 мкмоль/л) составляла 77%. Эритроциты, сохранившиеся после действия постгипертонического шока и хлорпромазина (180 и 600 мкмоль/л), подвергали дальнейшему нагреванию (6, 15, 24, 34°C). При использовании 600 мкмоль/л хлорпромазина полученные клетки изменяли форму (от стоматоцитов к сферостоматоцитам) и гемолизировали, а при 180 мкмоль/л – эритроциты с признаками стоматоцитоза приобретали особенности, присущие эхиноцитарным формам, при этом их количество не уменьшалось. Ключевые слова: эритроциты человека; постгипертонический шок; хлорпромазин; температура, стоматоцит; сферостоматоцит; эхиноцит.

**N.M. Shpakova, E.A. Semionova, I.F. Kovalenko,  
N.A. Iershova, N.V. Orlova**

### **MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF TEMPERATURE AND OSMOTIC RESPONSE OF ERYTHROCYTES IN PRESENCE OF CHLOROPROMAZINE**

The effect of chlorpromazine on posthypertonic lysis of erythrocytes was studied with the assessment of the temperature dependence of morphological features of the cells. High antihemolytic activity of chlorpromazine under conditions of posthypertonic shock of erythrocytes was established at 0, but not at 37°C. When chlorpromazine (600  $\mu\text{mol/L}$ ) was used, its maximal antihemolytic activity amounted 77%. Erythrocytes survived posthypertonic shock and chlorpromazine (180 and 600  $\mu\text{mol/L}$ ), were subjected to subsequent heating (6, 15, 24,

34°C). In the presence of 600  $\mu\text{mol/L}$  chlorpromazine, the cells changed their shape (from stomatocytes to spherostomatocytes) and hemolyzed. When 180  $\mu\text{mol/L}$  chlorpromazine was used the red cells with the signs of stomatocytosis acquired the features inherent to echinocyte forms, while the number of cells was not decreased.

Key words: human erythrocytes; posthypertonic shock; chlorpromazine; temperature; stomatocyte; spherostomatocyte; echinocyte.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv;  
starling.nataly@gmail.com*

### **REFERENCES**

1. Fuller BJ, Lane N, Benson EE. Life in the frozen state. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press; 2004.
2. Graham JE, Meola DM, Kini NR, Hoffman AM. Comparison of the effects of glycerol, dimethylsulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cell. *Am J Vet Res* 2015;76(6):487-93. PubMed PMID: 26000595.
3. Pakhomova YuS, Kompaniets A, Kuleshova LG. Transformation of erythrocytes during cryopreservation with oxyethylated glycerol derivatives with  $n = 25$  and  $n = 30$  polymerization degree. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016; 26(4):349-60.
4. Semionova EA, Yershova NA, Yershov SS, Orlova N, Shpakova NM. Peculiarities of posthypertonic lysis in erythrocytes of several mammals. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016;26(1):73-83.
5. Semionova EA, Iershova NA, Orlova NV, Shpakova NM. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. *EESJ.* 2016;(2):7-17.
6. Yershov SS. Osmotic and temperature sensitivity of mammalian erythrocytes [dissertation]. Kharkiv: Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine; 2009. [Russian].
7. Ficarra S, Russo A, Barreca D, Giunta E, Galtieri A, Tellone E. Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality: activation of metabolism and membrane perturbation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 Jul [cited 2016 Aug 8]; 2016:[about 10 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992801/>
8. Dmitrieva TB, Krasnov VN, Neznanov NG, Semke VYA, Tiganov AS, editors. Psychiatry: national leadership. M.: GEOTAR-Media, 2011. [Russian].
9. Fridrihsberg DA. Course of Colloid Chemistry: a textbook for high schools. 3rd ed. St. Petersburg: Chemistry; 1995.
10. Reinhart WH, Lubszky S, Thöny S, Schulzki T. Interaction of injectable neurotropic drugs with the red cell membrane. *Toxicol In Vitro.* 2014 Oct;28(7):1274-9. PubMed PMID: 24997296.

11. Sikorski AF, Białkowska K. Interactions of spectrins with intrinsic membrane domain. *Cell Mol Biol Lett*. 1996; 1(1): 97-104. PubMed PMID: 9116763.61
12. Bennett V, Healy J. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends Mol. Med*. 2008; 14(1):28-36. PubMed PMID: 18083066.
13. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology*. 2008;57(3):251-6. PubMed PMID: 18845134.
14. Bessis M. Red cell shapes: An illustrated classification and its rationale. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1972;12(6):721-46. PubMed PMID: 4268780.
15. Shpakova NM, Pantaler ER, Bondarenko VA. Anti-hemolytic effect of chlorpromazine on erythrocytes in hyperosmotic and cold shock. *Biokhimiia*. 1995; 60(10):1624-31. [Russian]. PubMed PMID: 8555359.
16. Tsymbal LV, Orlova NV, Shpakova NM. Modification of the structural-functional state of erythrocyte membranes by chlorpromazine *Biologicheskie Membrany*. 2005; 22(4):327-35. [Russian].
17. Gordienko EA, Tovstyak VV. Physics of biological membranes: a tutorial. Kiev: Nauk. Dumka; 2009. [Ukrainian].
18. Gordienko EA, Gordienko YuE, Gordienko OI. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *Cryo Letters*. 2003 Jul-Aug;24(4):229-44. PubMed PMID: 12955170.
19. Białkowska K, Bobrowska-Hägerstrand M, Hägerstrand H. Expansion of phosphatidylcholine and phosphatidylserine/phosphatidylcholine monolayers by differently charged amphiphiles. *Z Naturforsch C*. 2001 Sep-Oct;56(9-10):826-30. PubMed PMID: 11724390.
20. Oberwagner W, Sauer T, Hermann A, Prohaska R, Müllner EW, Salzer U. Drug-induced endovesiculation of erythrocytes is modulated by the dynamics in the cytoskeleton/membrane interaction. *Blood Cells Mol Dis*. 2017; 64:15-22. PubMed PMID:28301811.
21. Shpakova NM, Ershov SS, Nipot OE. To the question about possible correlation between release of K<sup>+</sup> ions and development of hemolytic damage of mammalian erythrocytes under hypertonic cryohemolysis. *Animal Biology*. 2008;10(1-2):164-70. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до редакції 19.09.2016*