

# Вплив амфифільних сполук на форму та ериптоз еритроцитів людини в умовах постгіпертонічного шоку

О.Є. Ніпот, Н.А. Єршова, О.О. Чабаненко, П.М. Зубов, Н.М. Шпакова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; e-mail: nipotel71@gmail.com

*Пошук захисних речовин та вивчення їх впливу на еритроцити при розморожуванні сприяють підвищенню кількості та якості життєздатних клітин після циклу кріоконсервування. Вивчали вплив постгіпертонічного шоку та амфифільних сполук на форму та ознаки ериптозу еритроцитів людини. Використовували метод протокової цитофлуориметрії, який дає змогу аналізувати два параметри одночасно, що підвищує ефективність досліджень. Форму оцінювали за коефіцієнтом сферичності ( $SphI$ ), ериптоз – за переходом фосфатидилсерину на зовнішню поверхню мембрани. Показано, що децилсульфат натрію і хлорпромазин зменшують рівень гемолізу еритроцитів в умовах постгіпертонічного шоку у 3,6 та 4,2 рази відповідно. Для хлорпромазину діапазон захисних концентрацій становить 500–700 мкмоль/л, для децилсульфату натрію – 200–600 мкмоль/л. При застосуванні децилсульфату натрію (200 та 400 мкмоль/л) зберігалася форма клітин ( $SphI$  не відрізняється від контролю), а при дії хлорпромазину (600 мкмоль/л) вона змінювалася у напрямку сферичної ( $SphI$  зменшувався вдвічі). Дослідження рівня зв'язування Annexin V FITC з фосфатидилсерином у зовнішньому шарі мембрани виявило концентраційнозалежне зростання флуоресценції при використанні децилсульфату натрію, що свідчить про порушення асиметрії бішара. Так, використання 200 мкмоль/л речовини збільшувало кількість клітин, що зв'язували Annexin V FITC у 10 разів, а 400 мкмоль/л – у 60 разів. Натомість, дія хлорпромазину (600 мкмоль/л) не змінювала розподіл фосфатидилсерину. Порівняння двох параметрів життєздатності клітин –  $SphI$  та зв'язування анексіну – дало змогу обрати умови, що є оптимальними для використання досліджених захисних речовин. Так, хоча дія хлорпромазину не викликала екстерналізацію фосфатидилсерину, вона значно змінювала форму клітин. Вплив децилсульфату натрію не призводив до морфологічних змін, а менша з досліджених концентрацій (200 мкмоль/л) незначно змінювала розподіл фосфатидилсерину. Отже, за умов рівного захисту клітин від постгіпертонічного гемолітичного пошкодження, у захисних цілях доцільно використовувати найменшу з ефективних концентрацій децилсульфату натрію (200 мкмоль/л). Це забезпечує збереження форми клітини та мінімальний вплив на асиметрію мембрани.*

*Ключові слова: еритроцит; постгіпертонічний шок; амфифільні сполуки; коефіцієнт сферичності; фосфатидилсерин; протокова цитофлуориметрія.*

## ВСТУП

Наразі дослідження кріоконсервування еритроцитів сфокусовані переважно на розробці нових середовищ заморожування і зовсім мало приділяється уваги розморожуванню клітин. Для розморожування та видалення кріопротекторів використовуються переважно сольові середовища без протекторних до-

мішок. Пошук ефективних захисних речовин, які можна додавати до відмивних розчинів може підвищити кількість та якість клітин, що є життєздатними після циклу кріоконсервування.

Постгіпертонічний шок є моделлю осмотичного стресу під час розморожування клітин. У процесі охолодження ріст кристалів льоду видалляє воду з позаклітинного середо-

вища, концентруючи позаклітинний розчин і створюючи осмотичну рушійну силу для зневоднення клітин. Танення льоду під час нагрівання повертає процес у протилежний бік [1, 2]. За теорією Muldrew [3] під час дегідратації у клітині накопичується надлишок іонів натрію. Це спричиняє перевищення можливості клітини збільшувати об'єм та її руйнування у процесі регідратації. У модельному експерименті еритроцити людини піддаються постгіпертонічному лізису, який відбувається під час ресуспендування в ізотонічному розчині після попереднього впливу гіпертонічних середовищ. Показана відповідність моделі постгіпертонічного шоку і процесів розморожування та видалення кріопротектора у плані пошкодження клітин та дії захисних речовин [4].

Амфіфільні речовини широко використовуються у медицині як антипсихотичні препарати, домішки до розчинів у аналітичних системах, системах штучного кровообігу для зменшення поверхневого натягу, запобігання адсорбції біомолекул на межах розділу. Так, Тритон X-100 у концентрації 70–110 мкмоль/л знижує пошкодження клітин, а при підвищенні до 500 мкмоль/л діє навпаки. Така двофазність характерна для багатьох поверхнево-активних речовин. Її пов'язують зі здатністю збільшувати площу поверхні клітини при вбудовуванні амфіфільної сполуки. Оскільки пошкодження при постгіпертонічному шоці зумовлене перевищенням критичного гемолітичного об'єму, застосування амфіфільних сполук у певній концентрації може мати захисний ефект [5–8].

Важливим аспектом кріоконсервації є моніторинг життєздатності клітин, що збереглися. Важливо досліджувати параметри – коефіцієнт сферичності (SphI), який відображає форму клітин, та транслокацію фосфатидилсерину в мембрані, що є маркером ериптозу. Відомо, що форма тісно пов'язана зі здатністю до деформації та реологічними властивостями еритроцитів [9, 10]. Зміни реології можуть сприяти порушенням мікро-

циркуляції та забезпечення тканин киснем [11]. Фосфатидилсерин у нормі розташований на внутрішньому боці мембрани. Втрата здатності еритроцитів утримувати його там свідчить про порушення нормального функціонування клітин і є сигналом для видалення їх із кровотоку [12]. Умови, які виникають при кріоконсервації та моделюються під час постгіпертонічного шоку, а саме гіперосмолярність та вплив захисних сполук потенційно здатні змінювати як форму клітин, так і асиметричне розподілення фосфоліпідів у мембрані [13, 14]. Ефективним методом, який надає інформацію про обидва параметри є протокова цитофлуориметрія. З її допомогою можна проаналізувати велику кількість клітин одночасно [15, 16].

Мета нашої роботи – дослідити вплив хлорпромазину та децилсульфату натрію на рівень гемолізу, форму та порушення асиметрії мембрани еритроцитів людини, що були піддані постгіпертонічному шоку.

## МЕТОДИКА

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з донорської крові людини. Кров чоловіків групи А (II)+ була надана Харківським обласним центром служби крові. Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали центрифугуванням при 1000g протягом 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl – 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер – 0,01 моль/л, рН 7,4). Постгіпертонічний шок здійснювали ізотермічним перенесенням еритроцитів з гіпертонічного розчину (1,75 моль/л NaCl) у фізіологічний розчин при 0°C. Хлорпромазин та децилсульфат натрію (0–1400 мкмоль/л) додавали перед внесенням клітин. Вміст гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометрично. Для оцінки кількості еритроцитів з екстерналізацією фосфатидилсерину використовували набір «Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit» («Becton Dickinson», США), який включає

анексин V, кон'югований з флуорохромом – флуоресцеїнізотиоціанатом (Annexin V FITC) і зв'язуючий буфер анексин V. Вимірювання проводили на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США).

Результати оцінювали за допомогою програмного забезпечення «CELLQuestPro» («Becton Dickinson», США) та «Flowing Software 2.5.1» («Turku Bioscience», Фінляндія). Для всіх зразків обчислювали середнє арифметичне значення і середньоквадратичну помилку ( $M \pm m$ ). Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження постгіпертонічного шоку еритроцитів людини при температурі 0°C (табл. 1) показало, що додавання в середовище регідратації амфифільної сполуки значно знизило рівень гемолізу клітин (3-4 рази). З отриманих результатів видно, що зі збільшенням концентрації поступово знижується рівень

пошкодження клітин і після певного мінімуму гемоліз знову зростає. Для хлорпромазину діапазон захисних концентрацій становить 500–700 мкмоль/л, для децилсульфату натрію – 200–600 мкмоль/л. Амфипатичні речовини здатні змінювати форму клітин, об'єм та площу поверхні, можуть викликати перерозподіл фосфоліпідів між внутрішнім та зовнішнім моношаром мембрани [7, 8, 16, 17]. Тому було доцільним перевірити стан клітин, що збереглися після дії постгіпертонічного шоку під захистом амфифільних сполук. Дослідження проводили за допомогою протокової цитофлуориметрії. Були обрані концентрації речовин, які є середніми серед тих, які забезпечували мінімальне пошкодження клітин – 600 мкмоль/л хлорпромазину, 400 мкмоль/л децилсульфату натрію. Для останнього у зв'язку з широким діапазоном захисних концентрацій була додана концентрація 200 мкмоль/л – мінімальна захисна.

На рисунку представлено гістограми розподілу еритроцитів за параметром прямого світлорозсіювання FSC.

Унікальною особливістю еритроцитів че-

**Таблиця 1. Рівень постгіпертонічного пошкодження еритроцитів людини під захистом амфифільних сполук при температурі 0°C ( $M \pm m$ ; n = 6)**

Концентрація, мкмоль/л	Хлорпромазин	Децилсульфат натрію
0	71±5*	71±5*
100	44±4*	35±7*
200	32±2*	24±2
300	27±3*	24±3
400	24±2*	21±2
500	18±4	22±4
600	17±3	23±3
700	18±2	32±4*
800	25±3*	41±3*
900	31±5*	52±5*
1000	54±7*	61±7*
1100	65±8*	69±8*
1200	76±9*	82±9*
1400	96±3*	95±2*

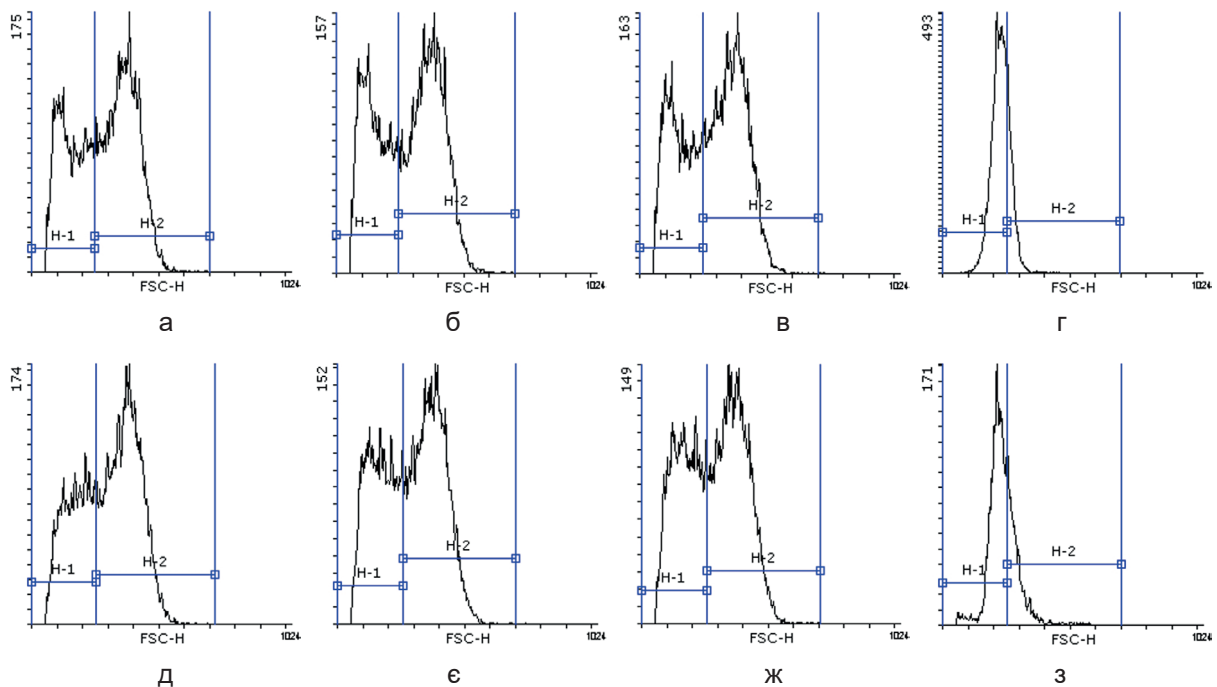
\*P < 0,05 порівняно з мінімальним рівнем гемолізу.

рез їхню двояковогнуту форму є бімодальний розподіл сигналів FSC (див. рисунок, а), який є результатом випадкової орієнтації еритроцитів у потоці [19]. Додавання децилсульфату натрію до нативних клітин (див. рисунок, б, в) та за умов постгіпертонічного шоку (див. рисунок, є, ж) зберігає бімодальний розподіл сигналу, отже, і двояковогнуту форму клітин. При зміні морфології еритроцитів у бік більш сферичної форми розподіл FSC поступово наближається до моноmodalного [20]. Клітини, що збереглися після постгіпертонічного шоку втрачають характерний бімодальний розподіл (див. рисунок, д), що свідчить про втрату двояковогнутої форми. При використанні хлорпромазину як з нативними клітинами, так і за умов геморалогічного шоку спостерігається моноmodalний розподіл, характерний для

форми, що близька до сферичної (див. рисунок, г, з).

Для усіх отриманих гістограм був обчислений SphI за методикою, представленій у праці Piagnerelli і співавторів [15], які показали, що зниження співвідношення медіан розподілу корелює зі зростанням сферичності еритроцитів. У межах контрольного бімодального розподілу було виділено два регіони H1 і H2. Межа між ними була середнім значенням між двома модами популяцій. Медіанні значення M1 і M2 були розраховані для кожного регіону, SphI вираховували як співвідношення медіан (M2:M1).

Результати, представлені у табл. 2, свідчать про зниження SphI на 17% для клітин, що збереглися після постгіпертонічного гемолізу, що підтверджує зміни у гістограмах



Гістограми прямого світлорозсіювання (FSC), що ілюструють розподіл еритроцитів. За віссю абсцис – показники прямого світлорозсіювання (FSC) при довжині хвилі лазера 488 нм. За віссю ординат – кількість клітин. H1, H2 – зони, обрані для розрахунку коефіцієнта сферичності SphI. а – нативні клітини (контроль); б – нативні клітини і 200 мкмоль/л децилсульфату натрію; в – нативні клітини і 400 мкмоль/л децилсульфату натрію; г – нативні клітини і 600 мкмоль/л хлорпромазину; д – клітини, що збереглися після постгіпертонічного гемолізу (ПГЛ); є – ПГЛ і 200 мкмоль/л децилсульфату натрію; ж – ПГЛ і 400 мкмоль/л децилсульфату натрію; з – ПГЛ і 600 мкмоль/л хлорпромазину

Таблиця 2. Значення медіан розподілу (відн. од.) та коефіцієнта сферичності (SphI) еритроцитів людини

Схема досліджу	Me	Me H1	Me H2	SphI
Нативні клітини (контроль)	296±18	149 ± 9	366 ± 15	2,46 ± 0,15
Нативні клітини і децилсульфат натрію				
200 мкмоль/л	295 ± 21	140 ± 11	368 ± 19	2,63 ± 0,22
400 мкмоль/л	296 ± 16	145 ± 15	366 ± 22	2,52 ± 0,14
Нативні клітини і хлорпромазин (600 мкмоль/л)	230 ± 14*	218 ± 16*	268 ± 17*	1,23 ± 0,11*
Клітини, що збереглися після постгіпертонічного гемолізу (ПГЛ)	314 ± 15	178 ± 14*	376 ± 15	2,11 ± 0,10*
ПГЛ і децилсульфат натрію				
200 мкмоль/л	297 ± 17	162 ± 13	371 ± 12	2,29 ± 0,19
400 мкмоль/л	292 ± 22	165 ± 17	367 ± 16	2,22 ± 0,21
ПГЛ і хлорпромазин (600 мкмоль/л)	231 ± 19*	214 ± 14*	282 ± 18*	1,32 ± 0,13*

\*P < 0,05 порівняно з мінімальним рівнем гемолізу.

розподілу клітин (див. рисунок, а, д). Додавання хлорпромазину до нативних клітин, призводить до більш суттєвого зниження SphI (вдвічі), що свідчить про значну трансформацію форми клітин у бік сферичності. Це також корелює з гістограмами прямого світлорозсіювання (див. рисунок, г, з). Отже, децилсульфат натрію у досліджених концентраціях не впливає на форму еритроцитів і сприяє їй збереженню в умовах постгіпертонічного шоку. Натомість дія хлорпромазину призводить до значної трансформації форми у бік сферичної.

Існує взаємозв'язок морфологічних змін, спроможності до деформації та життєздатності еритроцитів. Основним фактором, що впливає на здатність клітин до механічного розтягування є мережа цитоскелета. Для різних морфологій еритроцитів можуть спостерігатися відмінності в щільності цитоскелетних білків, перш за все спектрину [21]. Осмотичний стрес та дія амфіфільних сполук порушують механіку мембрани, зменшуючи вертикальні взаємодії ліпідного бішару та цитоскелетної мережі і ступінь розтягування мембрани [7, 22]. Зниження здатності до деформованості змінює реологію еритроцитів, що сприяє порушенням мікроциркуляції. Тож нормальна форма збережених

клітин має важливе значення для запобігання або зменшення несприятливих наслідків, пов'язаних з трансфузією.

У табл. 3 представлені обчислені результати зв'язування Annexin V FITC V з фосфатидилсерином, експонованим на зовнішній поверхні клітини. Видно, що контрольні еритроцити та клітини, які збереглися в умовах постгіпертонічного шоку не відрізняються за рівнем зв'язування Annexin V FITC. Застосування децилсульфату натрію призводило до збільшення кількості клітин з аномально високим рівнем флуоресценції, що свідчить про перехід фосфатидилсерину на зовнішній моношар. Хлорпромазин не викликає екстерналізацію фосфатидилсерину, тому не спостерігається зростання флуоресценції клітин.

Відомо, що фосфоліпіди асиметрично розподілені у мембрані еритроцитів. Асиметрія плазматичної мембрани відіграє критичну роль у функціонуванні мембранних білків і у взаємодіях із цитоскелетом, впливаючи на механічні властивості клітини та відіграючи ключову роль у цілісності еритроцитів [12]. Фосфатидилсерин здебільшого локалізується в цитоплазматичному шарі мембрани, але в процесі старіння еритроцитів та при деяких патологічних станах він переміщується на

Таблиця 3. Зв'язування Annexin V FITC з еритроцитами людини (у відсотках)

Схема досліджу	Кількість клітин, що не зв'язували Annexin V FITC	Кількість клітин, що зв'язували Annexin V FITC
Нативні клітини (контроль)	99,57 ± 0,28	0,43 ± 0,3
Нативні клітини і децилсульфат натрію		
200 мкмоль/л	95,59 ± 2,08*	4,41 ± 1,89*
400 мкмоль/л	75,37 ± 3,04*	24,63 ± 2,35*
Нативні клітини і хлорпромазин (600 мкмоль/л)	99,77 ± 0,11	0,23 ± 0,09
Клітини, що збереглися після постгіпертонічного гемолізу (ПГЛ)	98,72 ± 0,82	1,28 ± 0,792
ПГЛ і децилсульфат натрію		
200 мкмоль/л	93,96 ± 2,44*	6,04 ± 1,44*
400 мкмоль/л	60,95 ± 4,49*	39,05 ± 4,75*
ПГЛ і хлорпромазин (600 мкмоль/л)	97,78 ± 2,06	2,12 ± 1,89

\*P < 0,05 порівняно з мінімальним рівнем гемолізу.

зовнішній шар. В еритроцитах цей процес опосередковує фагоцитоз макрофагами та видалення з кровотоку [13, 23]. Отже, збереження асиметричного розподілу фосфоліпідів під час використання захисних речовин є важливим аспектом в аналізі, чи є клітина життєздатною.

## ВИСНОВКИ

Результати, отримані в роботі, свідчать про важливість урахування різнобічних параметрів життєздатності збережених клітин. Речовини, які потенціально можуть використовуватися як протекторні домішки при розморожуванні еритроцитів, а саме децилсульфат натрію (200 та 400 мкмоль/л) і хлорпромазин (600 мкмоль/л) зменшують пошкодження еритроцитів в умовах постгіпертонічного шоку приблизно на одному рівні (3,6 та 4,2 раза відповідно). Але при дослідженні параметрів життєздатності клітин після постгіпертонічного шоку були отримані різні результати для цих речовин. Так, дія децилсульфату натрію за обох концентрацій сприяла збереженню форми клітин (SphI не змінюється), але збільшувала кількість еритроцитів, що зв'язують Annexin V FITC у 10 (200 мкмоль/л) та 60

(400 мкмоль/л) разів, тобто вбудовування його у мембрану приводить до порушення асиметрії бішару. При дослідженні хлорпромазину (600 мкмоль/л) було показане значне зменшення SphI, що свідчить про зміну форми в напрямку сферичної. Водночас не змінювалася асиметрія клітинної мембрани. Таким чином, при аналізі двох параметрів життєздатності клітин – SphI та зв'язування анексину – можна обрати умови, що є оптимальними для їх використання. А саме, за умов рівного захисту клітин від постгіпертонічного гемолітичного пошкодження, доцільно використовувати меншу з досліджених концентрацій децилсульфату натрію (200 мкмоль/л). Це забезпечує збереження форми клітини та мінімальний вплив на асиметрію мембрани.

*Робота виконана в межах наукової тематики НДР: «Вивчення механізмів кріопошкодження еритроцитів ссавців на моделі постгіпертонічного шоку і після розморожування» (державний реєстраційний номер: 0119U100441) відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.*

*The authors of this study 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.*

**O.E. Nipot, N.A. Yershova, O.O. Chabanenko, P.M. Zubov, N.M. Shpakova**

## **EVALUATION OF THE FORM AND DISTRIBUTION OF PHOSPHATIDYLSERINE IN HUMAN ERYTHROCYTES EXPOSED TO POSTHYPERTONIC SHOCK UNDER THE PROTECTION OF AMPHIPHILIC COMPOUNDS**

*Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv; e-mail: nipotel71@gmail.com*

The search for protective substances that can be used during red blood cell thawing and the study of their effects on red blood cells contribute to increasing the number and quality of viable cells after the cryopreservation cycle. We studied the effect of posthypertonic shock and amphiphilic compounds on the shape and eryptosis of human erythrocytes. The method of flow cytometry was used, this allows analyzing two parameters simultaneously, which increases the efficiency of research. The shape was assessed by the sphericity index (SphI), and eryptosis by the redistribution of phosphatidylserine to the membrane outer surface. It has been shown that sodium decylsulfate and chlorpromazine reduce erythrocyte damage in posthypertonic shock by 3.6 and 4.2 times, respectively. Sodium decylsulfate helps to preserve the shape of cells (SphI coefficient remains the same), while when chlorpromazine is used, the shape changes towards spherical (SphI coefficient changes 2 times). The study of the level of Annexin V FITC binding to phosphatidylserine in outer layer of membrane revealed a concentration-dependent increase in fluorescence when sodium decylsulfate was used, indicating a disorder of the bilayer asymmetry. In contrast, chlorpromazine did not change the distribution of phosphatidylserine. Comparison of two parameters of cell viability - the sphericity coefficient and annexin binding - allowed us to choose the conditions that are optimal for the use of the studied protective substances. Namely, it is advisable to use the lowest effective concentration of sodium decylsulfate (200 mcml/l) for protective purposes. This ensures the preservation of the cell shape and minimal impact on the membrane asymmetry.

Key words: erythrocyte; posthypertonic shock; amphiphilic compounds; sphericity coefficient; phosphatidylserine; flow cytometry.

## **REFERENCES**

- Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 1953;10:414-26.
- Klbik I. On the involvement of cell volume regulation mechanisms in post-hypertonic lysis and slow-freezing injury of human erythrocytes and its broader cryobiological significance. *BioRxiv*. 2023 Apr 28:29.
- Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology*. 2008;57(3):251-56.
- Chabanenko O, Yershova N, Shpakova N. Adequacy of posthypertonic shock model to real cryopreservation conditions during deglycerolization of erythrocytes. Proceedings of the 57th annual meeting of the Society for Cryobiology «CRYO-2020». 21-23 July 2020, USA. *Cryobiology*. 2020; 97: 276.
- Orlova NV, Shpakova NM Mechanism of protective effect of amphiphilic compounds during hypertonic hemolysis of erythrocytes. *Fiziol Zh*. 2006;52(5):55-61. [Ukrainian].
- Yershova NA, Chabanenko OO, Shpakova NM, Nipot OE, Orlova NV. Effect of trifluoroperazine and sodium decyl sulfate on the posthypertensive shock of human and rabbit red blood cells. *Fiziol Zh*. 2022;68(1):62-8. [Ukrainian].
- Alvesa I, Stanevab G, Tessierac C, Salgadod GF, Nussac P. The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods. *Biochim Biophys Acta – Biomembran*. 2011;1808(8):2009-18.
- Habibi S, Lee HY, Moncada-Hernandez H, Gooding J, Minericka AR. Impacts of low concentration surfactant on red blood cell dielectrophoretic responses. *Biomicrofluidics*. 2019;13(5):054101.
- Braasch D. The relation between erythrocyte deformability, cell shape, and membrane surface tension. *Pflüg Arch*. 1969; 313:316-20.
- Geekiyana N, Sauret E, Saha S, Flower R, Gu Y. Modeling of red blood cell morphological and deformability changes during in-vitro storage. *Applied Sciences*. 2020; 10(9):3209.
- Ebrahimi S, Bagchi P. A computational study of red blood cell deformability effect on hemodynamic alteration in capillary vessel networks. *Sci Rep*. 2022;12; 4304.
- Bevers EM, Williamson PL. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol Rev*. 2016; 96: 605-45.
- Alghareeb SA, Alfihili MA, Fatima S. Molecular Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(6):5079.
- Hagerstrand H, Holmström TH, Bobrowska-Hägerstrand M, Eriksson JE, Isomaa B. Amphiphile-induced phosphatidylserine exposure in human erythrocytes. *Mol Membran Biol*. 1998; 15(2):89-95.
- Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, Vereers-traeten A, Piro P, Vincent JL, Vanhaeverbeek M. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J Clin Pathol*. 2007; 60(5):549-54.

16. Freikman I, Amer J, Ringel I, Fibach E. A flow cytometry approach for quantitative analysis of cellular phosphatidylserine distribution and shedding. *Anal Biochem.* 2009;393(1):111-6.
17. Shpakova NM, Semionova EA, Kovalenko IF, Iershova NA, Orlova NV. Morphological peculiarities of temperature and osmotic response of erythrocytes in presence of chlorpromazine. *Fiziol Zh.* 2017;63(5):62-9. [Ukrainian].
18. 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;2016:2394130.
19. Gienger J, Gross H, Ost V, Bär M, Neukammer J. Assessment of deformation of human red blood cells in flow cytometry: measurement and simulation of bimodal forward scatter distributions. *Biomed Opt Express.* 2019;10(9):4531-50.
20. Ghosh S, Chakraborty I, Chakraborty M, Mukhopadhyay A, Mishra R, Sarkar D. Evaluating the morphology of erythrocyte population: An approach based on atomic force microscopy and flow cytometry. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(4):671-81.
21. Huisjes R, Bogdanova A, Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, Wijk R. Squeezing for life – properties of red blood cell deformability. *Front Physiol.* 2018; 9: 656.
22. Lundbæk JA. Lipid bilayer-mediated regulation of ion channel function by amphiphilic drugs. *J Gen Physiol.* 2008;131(5):421-29.
23. Wesseling MC, Wagner-Britz L, Huppert H, Hanf B, Hertz L, Nguyen DB, Bernhardt I. Phosphatidylserine exposure in human red blood cells depending on cell age. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(4):1376-90.

*Матеріал надійшов  
до редакції 25.07.2023*