

ВПЛИВ ДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ ТА ХЛОРПРОМАЗИНУ НА ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

О. О. Чабаненко, Н. А. Єршова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова
chabanenkoolena@gmail.com

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна

У роботі вивчали вплив децилсульфату натрію і хлорпромазину на чутливість еритроцитів щура і кролика до постгіпертонічного шоку. Постгіпертонічний шок є стресовою дією, якої зазнають клітини під час перенесення з гіпертонічного (середовище дегідратації) до фізіологічного розчину (середовище регідратації). Використання постгіпертонічного шоку еритроцитів дозволяє вивчати вплив чинників кріопшкодження, які діють на етапі розморожування клітин, а також за перенесення в кровоносне русло еритроцитів, кріоконсервованих з використанням проникаючого кріопротектора. Показано, що за 0 °С рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів щура та кролика не відрізняється і становить 60 %, тоді як за 37 °С еритроцити кролика стійкіші до постгіпертонічного шоку, ніж клітини щура. Встановлено, що вплив амфіфілів на еритроцити тварин в умовах постгіпертонічного шоку залежить від температури. За 37 °С захисного ефекту досліджуваних амфіфільних сполук не виявлено. Проведення постгіпертонічного шоку еритроцитів за 0 °С з використанням як аніонного децилсульфату натрію, так і катіонного хлорпромазину дозволяє значно знизити рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів обох видів. При цьому негативно заряджений децилсульфат натрію проявляє більшу антигемолітичну активність для еритроцитів кролика (70 %), ніж щура (56 %). Позитивно заряджений хлорпромазин ефективніший для еритроцитів щура. Припускається, що виявлений захисний ефект амфіфільних сполук в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів за 0 °С пов'язаний зі станом еритроцитарної мембрани при низькій температурі. У зазначених умовах компоненти мембрани менш рухливі і молекули амфіфільних сполук, вбудовуючись в бішар, здатні «зафіксувати» мікрodefекти, що утворилися на етапі дегідратації, і запобігти їх збільшенню до розмірів гемолітичної пори на етапі регідратації.

Ключові слова: ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК, ЕРИТРОЦИТИ ССАВЦІВ, АМФІФІЛЬНІ СПОЛУКИ, ХЛОРПРОМАЗИН, ДЕЦИЛСУЛЬФАТ НАТРІЮ

EFFECT OF SODIUM DECYL SULFATE AND CHLORPROMAZINE ON POSTHYPERTONIC SHOCK OF MAMMALIAN RED BLOOD CELLS

О. О. Chabanenko, N. A. Yershova, N. V. Orlova, N. M. Shpakova
chabanenkoolena@gmail.com

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavskaya str., Kharkiv 61016, Ukraine

The effect of sodium decyl sulfate and chlorpromazine on the sensitivity of rat and rabbit red blood cells to post-hypertonic shock has been studied in this research. Post-hypertonic shock has a stressful impact on cells when they are transferred from hypertonic (dehydration medium) into a physiological solution (rehydration medium). The use of post-hypertonic shock of red blood cells allows the investigation of the influence of cryopreservation factors, acting at the stage of cell thawing as well as when transferring into the bloodstream of red blood cells cryopreserved under the protection of penetrating cryoprotective agent. It has been shown that at 0 °C the level of post-hypertonic lysis of rat and rabbit red blood cells does not differ and is 60 %, at the same time at 37 °C, rabbit red blood cells are more resistant to post-hypertonic shock than rat's cells. It has been established that the effect of amphiphiles on red blood cells of animals in post-hypertonic shock depends on temperature. At 37 °C the protective effect of the studied amphiphilic compounds was not detected. The performance of post-hypertonic shock of erythrocytes at 0 °C using both anionic sodium decyl sulfate and cationic chlorpromazine significantly reduces the level of post-hypertensive lysis of red blood cells of both species. At the same time, negatively charged sodium decyl sulfate exhibits higher anti-hemolytic activity for rabbit erythrocytes (70 %) versus the rat ones (56 %). Positively charged chlorpromazine is more effective for rat erythrocytes. The revealed protective effect of amphiphilic compounds during post-hypertonic shock of red blood cells at 0 °C is assumed to be related to the state of red blood cell membrane at low tempera-

ture. Under these conditions, the membrane components are less mobile and molecules of amphiphilic compounds, building-into the bilayer, can "fix" the microdefects formed during the dehydration stage and prevent against their increasing up to the hemolytic pore size at the rehydration stage.

Keywords: POST-HYPERTONIC SHOCK, RED BLOOD CELLS, AMPHIPHILIC COMPOUNDS, CHLOROPROMAZINE, SODIUM DECYL SULPHATE

На сьогодні проблема низькотемпературного збереження біологічних об'єктів лишається актуальною. Останнім часом проводиться багато досліджень, спрямованих на розробку протоколів кріоконсервування компонентів крові [1, 8]. Зберігання еритроцитів за наднизьких температур ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) супроводжується зупинкою біологічних реакцій і, як наслідок, відсутністю кріопошкоджень клітин. Основні процеси, які порушують життєдіяльність клітин, відбуваються на етапах їх заморожування і розморожування, коли змінюються температура та осмолярність середовища [7].

На етапі заморожування клітини пошкоджуються внаслідок спільної дії зміни температури і підвищення осмолярності розчину за рахунок виморожування води та утворення льоду. Дослідженню впливу на клітини цих факторів кріопошкоджень з використанням модельного підходу, а саме гіпертонічного шоку і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів, присвячено багато робіт [5, 17]. Натомість фактори кріопошкоджень, які діють на етапі відігріву заморожених клітин, вивчені менше. У процесі розморожування біологічних об'єктів відбувається танення льоду і гіпертонічне середовище змінюється на ізотонічне. За цих умов розвивається постгіпертонічний лізис (ПГЛ) еритроцитів, зумовлений інкубуванням клітин в гіперосмолярних розчинах з подальшим перенесенням в ізотонічне середовище. Для пояснення механізмів ПГЛ еритроцитів К. Muldrew [12] запропонував гіпотезу, в якій припустив, що утворення позаклітинного льоду в процесі заморожування клітин спричиняє втрату клітинної води і це призводить до збільшення концентрації іонів у клітині. Цитоплазматичні білки зв'язують внутрішньоклітинні іони, що обумовлює зниження їх кількості в цитоплазмі і, як наслідок, збільшення надходження іонів з позаклітинного середовища. При розморожуванні еритроцитів вода проникає у внутрішньоклітинне

середовище і білки звільняють іони у відповідь на розведення цитоплазми. Підвищення вмісту внутрішньоклітинних вільних іонів провокує додатковий вхід води в клітини, що призводить до їх набухання. Лізис еритроцитів відбувається за перевищення межі пружності плазматичної мембрани при досягненні критичного вмісту внутрішньоклітинної води.

Постгіпертонічний шок (ПГШ) — стресова дія, якої зазнають клітини під час перенесення з гіпертонічного (середовище дегідратації) до фізіологічного розчину (середовище регідратації). Постгіпертонічний шок еритроцитів людини вивчений досить добре [3, 14, 15], на відміну від еритроцитів ссавців, зокрема клітин кролика і щура. Еритроцити цих тварин мають різну температурно-осмотичну чутливість, що корегується за допомогою амфифільних сполук, які належать до різних класів [6, 18, 20]. У зв'язку з цим, становить інтерес вивчити вплив представників аніонних і катіонних амфифільних сполук на чутливість еритроцитів тварин до дії ПГШ.

Мета роботи: провести порівняльне дослідження впливу децилсульфату натрію і хлорпромазину на чутливість еритроцитів кролика та щура до дії постгіпертонічного шоку.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на еритроцитах самців 12-місячних кроликів та щурів 6-місячного віку. Кількість тварин кожного виду в експериментах дорівнювала 7. Тварини утримувалися за стандартних умов віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ. Забір крові здійснювали з використанням розчину гепарину, у кроликів (*Oryctolagus cuniculus*) — з крайової вени вуха, у щурів (*Rattus norvegicus*) — з хвостової вени. Для фіксації щурів використовували універсальну камеру О. Х. Когана. Дослідження виконували відповідно до закону України «Про захист

тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) при дотриманні вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Кров центрифугували, відбирали плазму, після чого еритромасу двічі відмивали за допомогою центрифугування при 3000 об/хв (центрифуга «ОПн-3У4.2», Киргизстан) протягом 3 хв в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl). Лейкоцитарну плівку і супернатант відбирали аспірацією.

У роботі використані реактиви: децилсульфат натрію (*СинтезЛАВ*, Росія), хлорпромазин гідрохлорид (*Calbiochem*, США), тритон X-100 (*Merck*, Німеччина) та реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» і «чда». Всі середовища були приготовлені на фосфатному буфері (0,01 моль/л, рН 7,4). Осмоляльність розчинів визначали кріоскопічним методом з використанням осмометру ОМКА-1Ц-01 (*Медлабортехніка*, Україна).

Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали за температури 37 і 0 °С перенесенням еритромаси (200 мкл) в 2,0 мл гіпертонічного розчину (середовище дегідратації; 1,65 моль/л NaCl), з якого ізотермічно перенесли аліквоту (50 мкл) в 1,0 мл фізіологічного розчину (середовище регідратації, 0,15 моль/л NaCl). Тривалість інкубування еритроцитів у середовищах дегідратації 20 хв, регідратації — 5 хв. Амфіфільні речовини додавали в середовище регідратації перед внесенням клітин [15]. Кінцевий гематокрит становив 0,4 %. Рівень гемолізу в пробах визначали спектрофотометрично відповідно до кількості гемоглобіну у супернатанті, а саме вимірювали кількість поглинутого світла за довжини хвилі 543 нм, що відповідає поглинанню молекул гемоглобіну [19]. За 100 % приймали поглинання проби, в яку додавали детергент тритон X-100 у концентрації 0,1 %.

Для оцінювання та порівняння ефективності дії амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів використовували поняття максимальної антигемолітичної активності, плато

і ефективних концентрацій. Плато — це діапазон концентрацій амфіфільної сполуки, в межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів, а ефективна концентрація ($C_{AG\max}$) — відповідає середині плато. Антигемолітичну активність амфіфільних сполук виражали як відсоток зниження гемолізу клітин в присутності речовини відносно гемолізу в пробі, що не містить амфіфіл. Значення максимальної антигемолітичної активності амфіфільних сполук розраховували за формулою:

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

де k — величина гемолізу еритроцитів за відсутності амфіфільної речовини;

a — мінімальна величина гемолізу еритроцитів у присутності амфіфілу.

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми *Statistica 6.0* (*StatSoft Inc.*, США). Експериментальні дані представлені як медіана результатів (Me) і ступінь розсіювання у вигляді інтерквартильного інтервалу ($Q1-Q3$), або як середнє арифметичне значення кількісних показників (M) \pm стандартна помилка середнього арифметичного (m). Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних числових показників використовували критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали значущими при $P < 0,01$ і $P < 0,05$.

Результати й обговорення

Рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів ссавців визначається якісним і кількісним складом середовища дегідратації, тривалістю інкубування в ньому та температурою [15]. Зазвичай як середовище дегідратації використовують NaCl у концентрації 1,25–2,0 моль/л. Інкубація клітин у цих середовищах дегідратації не призводить до розвитку гемолізу еритроцитів, проте спостерігається зневоднення і стиснення клітин, в результаті чого в мембрані можуть утворюватися мікродефекти і перерозподілятися внутрішньо- та позаклітинні іони [16]. Подальше перенесення клітин в середовище регідратації супроводжується різким

зниженням осмолярності позаклітинного розчину і входом води в клітину. У результаті клітини набухають і за досягнення критичного гемолітичного об'єму лізують. Етап регідратації дозволяє «проявити» дефекти, які утворилися в клітинній мембрані на етапі дегідратації [15].

У роботі вивчали вплив температури на ПГЛ еритроцитів кролика та щура. За 0 °С еритроцити тварин не відрізняються за рівнем ПГЛ (рис. 1), тоді як за 37 °С отримані статистично значущі відмінності: еритроцити кролика більш стійкі, ніж клітини щура. Це узгоджується з даними, що були отримані для інших видів стресу [5, 16, 17].

Виявлені відмінності в чутливості еритроцитів кролика та щура до дії ПГШ, напевно, зумовлені характеристиками дифузійної водної проникності їх плазматичних мембран. Відомо, що за 37 °С дифузійна водна проникність еритроцитів щура становить $17,5 \times 10^3$ см/хв, а клітин кролика — $13,5 \times 10^3$ см/хв [2]. Така висока водна проникність еритроцитів щура призводить до різкого входу води в клітини в момент їх перенесення із середовища дегідратації в середовище регідратації, внаслідок чого клітини швидко набухають і при досягненні критичного гемолітичного об'єму лізують. Той факт, що за 0 °С не виявлено відмінностей в рівні ПГЛ еритроцитів досліджуваних видів ссавців, можливо, пов'язаний з тим, що за низької температури мембрани клітин кролика і щура не відрізняються за показниками дифузійної водної проникності [2].

Відомо, що амфіфільні сполуки, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин, проявляють високу антигемолітичну активність стосовно еритроцитів у разі гіпертонічного шоку та гіпертонічного кріогемолізу [5, 16, 17]. Становило інтерес дослідити ефективність амфіфільних сполук — таких, як аніонний децилсульфат натрію (ДС) і катіонний хлорпромазин (ХПР) за умов ПГШ еритроцитів тварин за різних температур. Обидві амфіфільні сполуки в концентраціях від 100 до 1400 мкмоль/л не знижували рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів тварин за температури 37 °С.

Проведення ПГШ еритроцитів за 0 °С з використанням ДС (рис. 2) виявило, що

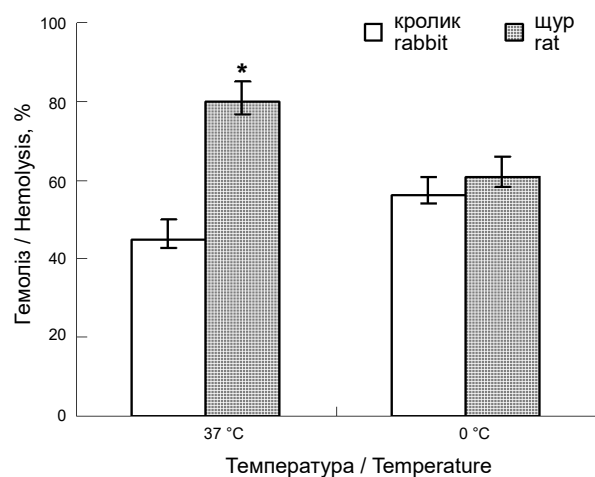


Рис. 1. Вплив температури на рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів кролика та щура.

* — статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами кролика ($P < 0,01$; $n = 7$)

Fig. 1. Effect of temperature on posthypertonic hemolysis level of rabbit and rat red blood cells.

* — statistically significant differences compared to rabbit red blood cell ($P < 0.01$; $n = 7$)

додавання до середовища регідратації амфіфілу дозволяє знизити рівень ПГЛ еритроцитів кролика і щура. Отримані гемолітичні залежності від концентрації амфіфільної речовини характеризуються трьома ділянками: зі збільшенням концентрації ДС до 200 мкмоль/л спостерігається поступове зниження рівня ушкодження клітин, після чого залежність виходить на плато і при подальшому підвищенні концентрації ДС більше 400–600 мкмоль/л гемоліз еритроцитів зростає. Незважаючи на те, що характер концентраційних залежностей схожий для еритроцитів обох видів ссавців, спостерігаються відмінності у довжині плато: для еритроцитів кролика воно охоплює діапазон 200–600 мкмоль/л, тоді як для клітин щура характерне більш вузьке плато — 200–400 мкмоль/л.

За використання ХПР за умов ПГШ еритроцитів тварин були отримані концентраційні залежності, представлені на рис. 3. Видно, що ХПР має виражену захисну дію за умов ПГШ еритроцитів обох видів ссавців. Слід зазначити, що для еритроцитів щура ця катіонна амфіфільна сполука проявляє більшу ефективність, ніж для клітин кролика. Плато для клітин обох видів ссавців перекриваються і охоплюють діапазон від 200 до 700 мкмоль/л ХПР.

Наведені залежності ПГЛ еритроцитів кролика та щура від концентрації амфифільної речовини (рис. 2, 3) свідчать про те, що вони двояким чином впливають на клітини: в низьких концентраціях проявляють захисний ефект, у високих — здійснюють літичну дію на клітини.

Для порівняльного аналізу ефективності дії ДС і ХПР за умов ПГШ еритроцитів з представлених на рис. 2 і 3 залежностей були розраховані величини антигемолітичної активності і значення ефективних концентрацій речовин (табл.).

Таблиця

Значення максимальної антигемолітичної активності (АГ_{макс}, %), ефективних концентрацій амфифільних сполук (САГ_{макс}, мкмоль/л) за ПГШ еритроцитів кролика та щура (M±m, n=7)

The values of maximum antihemolytic activity (АН_{макс}, %), effective concentrations (САН_{макс}, μmol/L) of amphiphilic compounds under PHS of rabbit and rat red blood cells (M±m, n=7)

Еритроцити / Red blood cells		Кролик Rabbit	Щур Rat
АГ _{макс} , %	ДС / DS	70±3	56±7*
АН _{макс} , %	ХПР / CPR	55±5	81±6*
САГ _{макс} , мкмоль/л	ДС / DS	500	500
САН _{макс} , μmol/L	ХПР / CPR	400	500

Примітка: * — статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами кролика.

Note: * — statistically significant differences compared to rabbit erythrocytes.

Видно, що за умов ПГШ негативно заряджений ДС ефективніший для еритроцитів кролика, ніж щура. Позитивно заряджений ХПР проявляє більшу антигемолітичну активність для еритроцитів щура.

Молекули амфифільних сполук мають дифільну природу, тобто містять гідрофобну і гідрофільну частини, завдяки чому легко вбудовуються в плазматичну мембрану так, що гідрофільна частина локалізується в гідрофільно-гідрофобній області мембрани, а гідрофобна частина — у вуглеводній зоні бішару [11]. Негативно заряджені молекули ДС вбудовуються в зовнішній моношар ліпідного бішару мембрани, про що свідчить зміна форми еритроцитів від дискоцитів до ехіноцитів [9]. Позитивно заряджений ХПР розподіляється у внутрішній моношар мембрани,

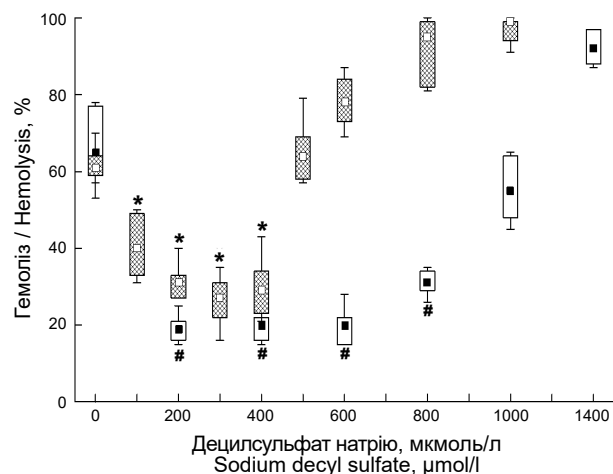


Рис. 2. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів кролика (■) та щура (□) від концентрації децилсульфату натрію в середовищі регідратації (0 °С). □ — медіана, □ — інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), I — максимальне та мінімальне значення. *, # — статистично значущі відмінності порівняно з даними за відсутності ДС (P<0,05; n=7)

Fig 2. Dependencies of posthypertonic hemolysis level of rabbit (■) and rat (□) red blood cells on sodium decyl sulfate concentration in rehydration medium (0 °C). □ — median, □ — interquartile range (Q1–Q3), I — maximum-minimum value. *, # — statistically significant differences compared with data in DS absence (P<0.05; n=7)

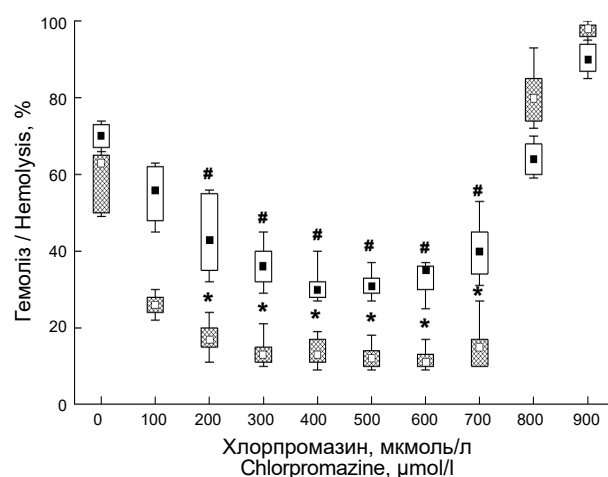


Рис. 3. Залежність рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів кролика (■) та щура (□) від концентрації хлорпромазину в середовищі регідратації (0 °С). □ — медіана, □ — інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), I — максимальне та мінімальне значення. *, # — статистично значущі відмінності порівняно з даними за відсутності ХПР (P<0,05; n=7)

Fig 3. Dependencies of posthypertonic hemolysis level of rabbit (■) and rat (□) red blood cells on chlorpromazine concentration in rehydration medium (0 °C). □ — median, □ — interquartile range (Q1–Q3), I — maximum-minimum value. *, # — statistically significant differences compared with data in CPR absence (P<0.05; n=7)

що обумовлено електростатичною взаємодією молекул ХПР з аніонними фосфоліпідами, переважно з фосфатидилсерином. Внаслідок цього відбувається зміна еритроцитів за типом дискоцит — стоматоцит [4, 10].

Вочевидь, за умов ПГШ еритроцитів амфіфільні сполуки можуть здійснювати захисний ефект, збільшуючи площу поверхні мембрани в результаті їх вбудовування в ліпідний бішар. Це призводить до збільшення критичного гемолітичного об'єму клітини, що дозволяє їй набухати до більшого об'єму в середовищі регідратації.

Різна ефективність досліджуваних амфіфілів щодо еритроцитів тварин (табл.) можуть бути зумовлені відмінностями фосфоліпідного складу мембран еритроцитів цих видів ссавців. Згідно з рідинно-мозаїчною моделлю, мембрана еритроцита асиметрична [13]: внутрішній і зовнішній моношари плазматичних мембран відрізняються за вмістом фосфоліпідів. Внутрішній моношар ліпідного бішару збагачений аніонними фосфоліпідами. Аналіз фосфоліпідного складу плазматичних мембран еритроцитів досліджуваних тварин показав, що внутрішній моношар їх еритроцитарних мембран розрізняється за вмістом аніонних фосфоліпідів. Так, мембрани еритроцитів щура містять 29,5 % аніонних фосфоліпідів (фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидна кислота), тоді як для клітин кролика — 16,9 % [21]. Оскільки мембрана еритроцитів щура містить вдвічі більше аніонних фосфоліпідів, можна припустити, що виявлена висока антигемолітична активність ХПР для клітин щура пов'язана з більшою кількістю місць зв'язування молекул ХПР в їх мембранах.

Захисний ефект амфіфільних сполук (ДС і ХПР) за умов ПГШ еритроцитів тварин спостерігається за 0 °С, на відміну від температури 37 °С. Аналогічні результати раніше були отримані для ПГЛ еритроцитів людини, тобто ХПР проявляв антигемолітичний ефект за 0 °С [15]. Той факт, що захисний ефект амфіфільних сполук в умовах ПГШ еритроцитів ссавців виявлено тільки за 0 °С, дозволяє припустити, що для реалізації їх захисної дії компоненти мембрани повинні бути менш рухливі, щоб молекули амфіфільних сполук могли

вбудуватися в бішар, «зафіксувати» мікродефекти, які утворилися на етапі дегідратації, і запобігти їх збільшенню до розмірів гемолітичної пори на етапі регідратації.

Висновки

1. Еритроцити кролика стійкіші до постгіпертонічного шоку за 37 °С, ніж клітини щура. Рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів щура і кролика за 0 °С не відрізняється.

2. Децилсульфат натрію і хлорпромазин проявляють високу антигемолітичну активність за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів кролика та щура за 0 °С.

3. За умов постгіпертонічного шоку негативно заряджений ДС є більш ефективним для еритроцитів кролика, а позитивно заряджений ХПР — для клітин щура.

Перспективи подальших досліджень.

Дослідження будуть спрямовані на вивчення дії амфіфільних сполук різних класів на мембрану еритроцитів тварин.

1. Acker J. P., Hansen A. L., Kurach J. D., Turner T. R., Croteau I., Jenkins C. A. A quality monitoring program for red blood cell components: *in vitro* quality indicators before and after implementation of semiautomated processing. *Transfusion*, 2014, vol. 54, issue 10, pp. 2534–2543. DOI: 10.1111/trf.12679.
2. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. *European Biophysics Journal*, 2013, vol. 42, pp. 33–46. DOI: 10.1007/s00249-012-0868-7.
3. Chabanenko O. O., Orlova N. V., Shpakova N. M. Glycerol and posthypertonic shock of erythrocytes when varying medium temperature and osmolality. *Cryobiology*, 2018, vol. 85, p. 179. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.10.223.
4. Chen J. Y., Brunauer L. S., Chu F. C., Hessel C. M., Gedde M. M., Huestis W. H. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 2003, vol. 1616, issue 1, pp. 95–105. DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00229-3.
5. Ershova N. A., Shpakova N. M., Orlova N. V. Effect of phenylhydrazine and alkylsulfates on osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 2012, no. 6, pp. 129–133. (in Russian)

6. 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, ID 2394130, 10 p. DOI: 10.1155/2016/2394130.
7. Fuller B. J., Benson E. E. (eds). *Life in the frozen state*. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., CRC Press, 2004, 672 p.
8. Henkelman S., Lagerberg J. W., Graaff R., Rakhorst G., Van Oeveren W. The effect of cryopreservation on red blood cell rheologic properties. *Transfusion*, 2010, vol. 50, issue 11, pp. 2393–2401. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02730.x.
9. Isomaa B., Hägerstrand H., Paatero G. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 1987, vol. 899, issue 1, pp. 93–103. DOI: 10.1016/0005-2736(87)90243-4.
10. Jiang Y.-W., Gao G., Chen Z., Wu F.-G. Fluorescence studies on the interaction between chlorpromazine and model cell membranes. *New Journal of Chemistry*, 2017, vol. 41, issue 10, pp. 4048–4057. DOI: 10.1039/C7NJ00037E.
11. Manaargadoo-Catin M., Ali-Cherif A., Pognas J.-L., Perrin C. Hemolysis by surfactant — a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2015, vol. 228, pp. 1–16. DOI: 10.1016/j.cis.2015.10.011.
12. Muldrew K., Schachar J., Cheng P., Rempel C., Liang S., Wan R. The possible influence of osmotic poration on cell membrane water permeability. *Cryobiology*, 2009, vol. 58, issue 1, pp. 62–68. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.10.129.
13. Nicolson G. L. The fluid — mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 2014, vol. 1838, issue 6, pp. 1451–1466. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019.
14. Oleynik O. A., Ramazanov V. V., Bondarenko V. A. Posthypertonic lysis of modified erythrocytes in citrate medium. *Problems of Cryobiology*, 2003, issue 3, pp. 21–29.
15. Semionova E. A., Chabanenko E. O., Orlova N. V., Zubov P. M., Shpakova N. M. About mechanism of antihemolytic action of chlorpromazine under posthypertonic stress in erythrocytes. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 2017, vol. 27, issue 3, pp. 219–229. DOI: 10.15407/cryo27.03.219.
16. Shpakova N. M., Ershov S. S., Nipot O. E. To the question about possible correlation between release of K⁺ ions and development of hemolytic damage of mammalian erythrocytes under hypertonic cryohemolysis. *The Animal Biology*, 2008, vol. 10, issue 1–2, pp. 164–170. (in Ukrainian) Available at: <http://archive.inenbiol.com.ua:8080/bt/2008/2/10.pdf>
17. Shpakova N. M., Iershova N. A., Orlova N. V., Iershov S. S., Synchykova O. P. Application of alkyl sulfates and heat treated erythrocytes in hypertonic cryohemolysis. *Biotechnologia Acta*, 2015, vol. 8, issue 3, pp. 129–136. DOI: 10.15407/biotech8.03.129.
18. Shpakova N.M., Orlova N.V., Yershov S.S. Correction of cold damage to mammalian erythrocytes by chlorpromazine to influence the dynamic structure of a membrane. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 367–373. DOI: 10.1134/S0006350919030205. (in Russian)
19. Sobotka H., Stewart C. P. *Advanced in clinical chemistry*. Vol. 8. London, New York, Academic Press, 1965, 335 p.
20. Tacheva B., Paarvanova B., Ivanov I. T., Tenchov B., Georgieva R., Karabaliev M. Drug exchange between albumin nanoparticles and erythrocyte membranes. *Nanomaterials*, 2019, vol. 9, issue 1, article 47, 14 p. DOI: 10.3390/nano9010047.
21. Virtanen J. A., Cheng K. H., Somerharju P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, vol. 95, issue 9, pp. 4964–4969. DOI: 10.1073/pnas.95.9.4964.