

УДК 612.111.014.43.083.332:544.722.14

Е.А. Семионова, Е.А. Чабаненко, Н.В. Орлова, П.М. Зубов, Н.М. Шпакова*

К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов

UDC 612.111.014.43.083.332:544.722.14

Е.А. Semionova, E.A. Chabanenko, N.V. Orlova, P.M. Zubov, N.M. Shpakova* About Mechanism of Antihemolytic Action of Chlorpromazine Under Posthypertonic Stress in Erythrocytes

Реферат: В работе исследовали антигемолитический эффект хлорпромазина (ХПР) в условиях постгипертонического шока (ПГШ) эритроцитов человека в зависимости от присутствия вещества на разных этапах эксперимента (предобработка, дегидратация, регидратация), а также методом проточной цитофлуориметрии изучали влияние ХПР на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах эритроцитов. Показано, что предобработка эритроцитов ХПР в концентрации 180 мкмоль/л не позволяет веществу проявить антигемолитический эффект в условиях ПГШ эритроцитов. Установлено, что ХПР в концентрации 100–300 мкмоль/л не вызывает трансбислое перераспределение молекул фосфатидилсерина в мембранах эритроцитов. Защитный эффект ХПР реализуется при перенесении клеток из среды дегидратации (1,75 моль/л NaCl) в среду регидратации (0,15 моль/л NaCl), содержащую ХПР, т. е. в момент действия стресса. Следовательно, механизм антигемолитического действия ХПР в условиях ПГШ эритроцитов связан с реорганизацией мембраны при встраивании в нее молекул вещества.

Ключевые слова: эритроциты, человек, постгипертонический шок, предобработка, дегидратация, регидратация, хлорпромазин, фосфатидилсерин.

Реферат: У роботі досліджували антигемолітичний ефект хлорпромазину (ХПР) в умовах постгіпертонічного шоку (ПГШ) еритроцитів людини залежно від присутності речовини на різних етапах експерименту (попередня обробка, дегідратація, регідратація), а також методом проточної цитофлуориметрії вивчали вплив ХПР на перерозподіл фосфатидилсерину в мембранах еритроцитів. Показано, що попередня обробка еритроцитів ХПР у концентрації 180 мкмоль/л не дозволяє речовині проявити антигемолітичний ефект в умовах ПГШ еритроцитів. Встановлено, що ХПР у концентраціях 100–300 мкмоль/л не викликає трансбішаровий перерозподіл молекул фосфатидилсерину в мембранах еритроцитів. Захисний ефект ХПР реалізується після перенесення клітин із середовища дегідратації (1,75 моль/л NaCl) до середовища регідратації (0,15 моль/л NaCl), яке містить ХПР, тобто в момент дії стресу. Отже, механізм антигемолітичної дії ХПР в умовах ПГШ еритроцитів пов'язаний із реорганізацією мембрани під час вбудовування в неї молекул речовини.

Ключові слова: еритроцити, людина, постгіпертонічний шок, попередня обробка, дегідратація, регідратація, хлорпромазин, фосфатидилсерин.

Abstract: The research was performed to reveal an antihemolytic effect of chlorpromazine (CPZ) under posthypertonic stress (PHS) of human erythrocyte depending on the substance presence at different stages of experiment (pre-treatment, dehydration, rehydration) as well as the effect of CPZ on the redistribution of phosphatidylserine in erythrocyte membrane bilayer. It has been shown that pre-treatment of erythrocytes with CPZ at a concentration of 180 $\mu\text{mol/L}$ did not lead to antihemolytic effect of the substance under PHS of erythrocytes. It has been established that CPZ under concentration of 100–300 $\mu\text{mol/L}$ did not cause a transbilayer redistribution of phosphatidylserine molecules in erythrocyte membranes. Protective effect of CPZ was implemented following transfer of the cells from the dehydration medium (1.75 mol/L NaCl) into rehydration one (0.15 mol/L NaCl), containing CPZ, i. e. at the moment of stress action. Consequently, the mechanism of antihemolytic action of CPZ under PHS of erythrocytes was associated with the membrane reorganization during an incorporation of the substance molecules into it.

Key words: erythrocytes, human, posthypertonic stress, pre-treatment, dehydration, rehydration, chlorpromazine, phosphatidylserine.

Эритроциты в ответ на действие стрессовых факторов могут реагировать изменением морфологических характеристик клеток при сохранении целостности плазматической мембраны. В случае превышения определенного порогового значения стрессового фактора нарушается барьерная функ-

Erythrocytes exposed to the effect of stress factors can react to the altered morphological characteristics of cells nevertheless maintaining the integrity of plasma membrane. However if a specific threshold value of the stress factor is exceeded, the membrane barrier function will become compromised, and the cells will

Отдел криоцитологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: journal@cryo.org.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: journal@cryo.org.ua

Поступила 11.07.2017

Принята в печать 31.07.2017

Received July, 11, 2017

Accepted July, 31, 2017

© 2017 E.A. Semionova et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ция мембраны, и клетки теряют внутриклеточные микро- и макромолекулы в результате формирования трансмембранных гемолитических пор [1, 2, 32]. Использование хлорпромазина (ХПР) позволяет предотвратить разрушение клеток при действии различных стрессовых факторов, в частности гипо- и гипертонических сред, холодового шока и др. [4, 5, 10, 17, 18, 33].

Ранее нами была изучена антигемолитическая активность ХПР при температурно-осмотическом шоке эритроцитов человека в зависимости от условий введения амфифильного соединения [12]. Было показано, что предварительная инкубация клеток с ХПР не влияет на их чувствительность к действию гипертонического стресса и холодового шока, в то время как присутствие вещества в среде при резком изменении условий (осмоляльности и температуры) значительно повышает устойчивость клеток.

Гипертонический стресс и холодовой шок моделируют влияние на клетки повреждающих факторов, действующих на этапе замораживания [3, 19]. В процессе таяния льда при размораживании криоконсервированных эритроцитов внеклеточная гипертоническая среда изменяется на изотоническую, в результате может развиваться постгипертонический лизис эритроцитов. Постгипертонический шок (ПГШ) является моделью влияния на эритроциты стрессовых факторов в условиях размораживания [6, 7, 28] и заключается в действии на клетки резкого снижения осмоляльности среды от гипертонических значений до изотонических. Следует отметить, что в реальных условиях при отогреве замороженных эритроцитов тоничность внеклеточной среды (по отношению к внутриклеточной) изменяется сложным образом, в то время как используемая модель (ПГШ) ограничена изучением последовательного действия на клетки гипертонического и изотонического (физиологического) растворов. В гипертонической среде происходит обезвоживание клеток, а при последующем переносе в изотоническую среду наблюдается вход в них воды, соответственно данные периоды называются этапами дегидратации и регидратации клеток. Указанным этапам (которые представляют собой собственно ПГШ) может предшествовать предобработка эритроцитов (инкубирование клеток в физиологическом растворе).

В недавно опубликованной работе мы показали, что использование ХПР в условиях ПГШ эритроцитов человека позволяет снизить уровень их гемолитического повреждения [8]. Действие ХПР на клетки проявляется как на макроуровне (в изменении формы эритроцитов [5, 14, 30]), так и на микроуровне. В последнем случае изменения, вызванные действием ХПР, затрагивают как непосред-

lose intracellular micro- and macromolecules through the formed transmembrane hemolytic pores [4, 11, 26]. The use of chlorpromazine (CPZ) can prevent the destruction of cells under the action of various stress factors, in particular hypo- and hypertonic media, cold shock, *etc.* [6–8, 14, 27, 30].

Previously we have studied an antihemolytic activity of CPZ under the conditions of temperature-osmotic shock of human erythrocytes [32]. It has been shown that the pre-incubation of cells with CPZ does not affect their sensitivity to the action of hypertonic stress and cold shock, while the presence of the substance in the medium after the transfer from the differing conditions (osmolality and temperature) significantly increases the stability of the cells.

Experiments with hypertonic stress and cold shock simulate the effect of damaging factors acting during the freezing on the cells [9, 12]. Melting of ice during thawing of cryopreserved erythrocytes results in changes of the extracellular hypertonic medium to isotonic one, as a result, posthypertonic lysis of erythrocytes may develop. Posthypertonic stress (PHS) is a model of an influence of stress factors on erythrocytes under thawing conditions [21, 23, 28] and simulates the effect on the cells of a sharp decrease in the medium osmolality from hypertonic values to isotonic ones. It should be noted that under real conditions, when frozen erythrocytes are warmed, the tonicity of extracellular medium (with respect to intracellular one) changes in more complicated manner, while the used model (PHS) represents a sequential effect on cells of hypertonic and isotonic (physiological) solutions. Cells dehydrate in a hypertonic environment, and subsequent transfer to the isotonic medium results in water influx, these are called the stages of dehydration and rehydration of cells respectively. These stages (being actually PHS) can be preceded by pre-treatment of red blood cells (incubation of cells in a saline).

In a recently published report, we have shown that the use of CPZ during PHS of human erythrocytes allowed to reduce the level of hemolytic damage [29]. The effect of CPZ on cells was manifested both at the macrolevel (in the change in the erythrocyte shape [2, 14, 24]) and at the microlevel. In the latter case, the changes caused by the action of the CPZ affected both the erythrocyte membrane itself and metabolic status of a cell. It was shown that this substance influenced the state of membrane phospholipids [20, 34]. In addition, the CPZ can enhance auto-oxidation of hemoglobin, activate caspase 3, and also alter intracellular content of ATP and amount of reduced glutathione [8]. It is known that CPZ is an inhibitor of calmodulin [16, 19], in addition, this substance can affect the closure of membrane pore in erythrocyte ghosts [18].

The possible mechanism of antihemolytic action of CPZ during PHS of erythrocytes is not clear. Under



ственно саму эритроцитарную мембрану, так и метаболический статус клетки. Показано, что данное вещество влияет на состояние мембранных фосфолипидов [27, 35]. Кроме того, ХПР может усиливать автоокисление гемоглобина, активировать каспазу 3, а также изменять внутриклеточное содержание АТФ и восстановленного глутатиона [18]. Известно, что ХПР является ингибитором кальмодулина [23, 26], кроме того это вещество может оказывать влияние на замыкание мембранной поры в эритроцитарных телях [25].

Вопрос о возможном механизме антигемолитического действия ХПР при ПГШ эритроцитов мало изучен. В условиях ПГШ реакция клеток на присутствие ХПР на том или ином этапе (предобработка, дегидратация, регидратация) позволит приблизиться к пониманию возможного механизма антигемолитического действия ХПР. Представляло интерес выяснить, каким путем реализуется защитное действие ХПР: за счет биохимической модификации клеток (для которой необходимо продолжительное предварительное инкубирование клеток с ХПР) либо изменение состояния мембраны в момент действия стресса. В условиях ПГШ эритроцитов, предварительно обработанных ХПР, проявление его антигемолитической активности будет свидетельствовать о том, что защитный механизм связан с биохимической модификацией клеток, которая заключается, в первую очередь, в ингибировании кальмодулина – цитоплазматического белка, участвующего в формировании клеточного ответа на внешние воздействия [16, 20, 31, 36]. Кроме того, ХПР может влиять на характер трансбислойного распределения липидов [15, 24]. В случае проявления антигемолитической активности ХПР при перенесении клеток в среды дегидратации и регидратации, содержащие амфифил, можно считать, что механизм его защитного действия обусловлен быстропротекающими процессами в мембране.

Таким образом, целью данной работы было изучение антигемолитического эффекта хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов человека в зависимости от присутствия вещества на разных этапах эксперимента и исследование влияния хлорпромазина на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах эритроцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Материалы и методы

В работе исследовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» («Биофарма», Украина).

После удаления плазмы эритроциты трижды центрифугировали при 3000 об/мин (центрифуга

the conditions of PHS, the cell can respond to the presence of CPZ at one of stages (pre-treatment, dehydration, rehydration) and these observations could allow us to reveal a possible mechanism of antihemolytic effect of CPZ. In particular, it was of interest to clarify which way the protective effect of CPZ is implemented: via biochemical modification of cells (which requires a relatively long term pre-incubation of cells with CPZ) or the changes in the state of membrane during stress onset. In other words the manifestation of CPZ antihemolytic activity during PHS of the erythrocytes pre-treated with the substance will indicate that its protective mechanism is associated with biochemical modification of cells, and this will be associated rather with inhibition of calmodulin, a cytoplasmic protein involved into formation of a cellular response to external influences [5, 10, 25, 35]. In addition, CPZ can affect the transbilayer distribution of lipids [3, 17]. In the case of manifested CPZ antihemolytic activity when cells are transferred into dehydration and rehydration media containing amphiphile, the mechanism of its protective action will be due to rapid processes in the membrane.

Thus the research aim was to study an antihemolytic effect of chlorpromazine under conditions of posthypertonic stress of human erythrocytes depending on the substance presence at different stages of experiment and to investigate by flow cytometry the influence of chlorpromazine on redistribution of phosphatidylserine in erythrocyte membranes.

Materials and methods

The research was performed in the erythrocytes, derived from human blood, procured with the Glyugitsir hemopreservative (Biopharma, Ukraine).

After plasma removal the erythrocyte mass was centrifuged three times at 3,000 rpm (centrifuge OPn-3U4.2, Kyrgyzstan) for 3 min in a 10-fold volume of physiological solution (NaCl 0.15 mol/L, phosphate buffer 0.01 mol/L, pH 7.4). The leukocyte layer and supernatant were removed by aspiration. Erythrocytes were stored as a dense sediment for not longer than 4 hrs at 0°C. To obtain an 'initial' suspension of erythrocytes, the cell pellet was added to physiological solution in 1:10 ratio. All the media used in the research were prepared in phosphate buffer of 0.01 mol/L, pH 7.4.

Posthypertonic stress was performed by transferring erythrocytes from the hypertonic solution (dehydration stage, 1.75 mol/L NaCl) to isotonic (rehydration stage, 0.15 mol/L NaCl) at 0°C. The final hematocrit was 0.4%. The scheme of experiment is shown in Fig. 1. Posthypertonic stress of erythrocytes was preceded by a stage of pre-incubation of cells (pre-treatment stage). Chlorpromazine (Calbiochem, USA) was added to the medium at different stages of the experiment before introducing red blood cells. In the case



«ОПн-3У4.2», Кыргызстан) в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (NaCl 0,15 моль/л; фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0°C. Для получения «исходной» суспензии эритроцитов осадок клеток добавляли к физиологическому раствору в отношении 1:10. Все используемые в работе среды готовили на фосфатном буфере 0,01 моль/л, pH 7,4.

Постгипертонический шок осуществляли перенесением эритроцитов из гипертонического раствора (этап дегидратации, 1,75 моль/л NaCl) в изотонический (этап регидратации, 0,15 моль/л NaCl) при 0°C. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Постгипертоническому шоку эритроцитов предшествовал этап предварительной инкубации клеток (этап предобработки). В качестве контроля использовали эритроциты в условиях ПГШ без применения ХПР («Calbiochem», США). Хлорпромазин добавляли в среды на разных этапах эксперимента перед внесением в них эритроцитов. В случае предварительного инкубирования клеток с ХПР (при его отсутствии на последующих этапах ПГШ) концентрация вещества на этапах дегидратации и регидратации была незначительной (в результате разбавления).

Уровень гемолиза эритроцитов в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 («Merck», Германия) в концентрации 0,1%.

Значение антигемолитической активности (АГ) хлорпромазина рассчитывали по формуле:

$$AG = \frac{k - \alpha}{k} \times 100\%,$$

где k – величина гемолиза эритроцитов в отсутствие ХПР; α – величина гемолиза эритроцитов в присутствии ХПР.

Эритроциты человека подвергали 10-минутной инкубации в физиологическом растворе (конечный гематокрит 0,4%) с ХПР (100, 200 и 300 мкмоль/л) при 37°C. Осадок эритроцитов, полученный в результате центрифугирования, анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Для оценки количества эритроцитов с нарушенной асимметрией клеточной мембраны использовали набор «Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit» («Becton Dickinson», США), включающий аннексин V, конъюгированный с флуорохромом – флуоресцеинизотиоцианатом (Annexin V FITC), и буфер. Клетки ресуспендировали в указанном растворе буфера для окрашивания до концентрации 1×10^6 кл/мл. В соответствии с протоколом Annexin V FITC к

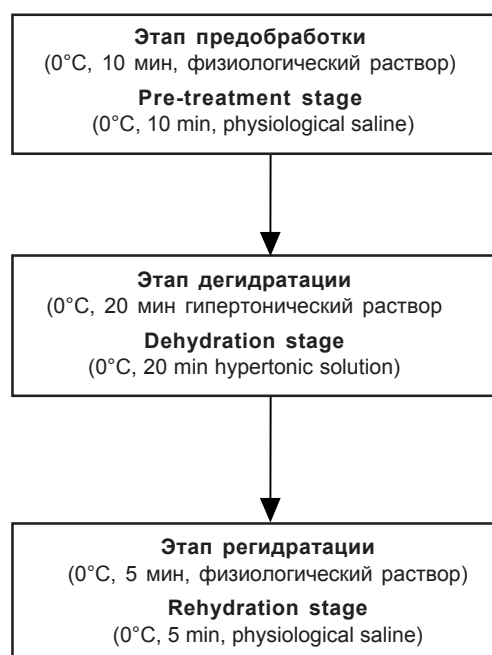


Рис. 1. Схема эксперимента
Fig. 1. The experiment scheme

of pre-incubation of cells with CPZ (when it was absent at following stages of PHS), the concentration of substance at the dehydration and rehydration stages was insignificant (as a result of dilution). Control erythrocytes underwent PHS without the CPZ presence.

The level of hemolysis of erythrocytes in the supernatant was determined by spectrophotometric method at 543 nm. The absorption of the sample supplemented with 0.1% Triton X-100 (Merck, Germany) was assumed as 100%.

The value of antihemolytic activity (AH) of chlorpromazine was calculated by the formula:

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

where k – hemolysis of erythrocytes without CPZ; α – hemolysis of erythrocytes with CPZ.

Erythrocytes were subjected to a 10-min incubation in physiological saline (final hematocrit 0.4%) with CPZ (100, 200 and 300 $\mu\text{mol/L}$) at 37°C. The erythrocyte sediment obtained as a result of centrifugation was analyzed by flow cytometry. Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Becton Dickinson, USA) (Annexin V, conjugated with fluorochrome fluorescein isothiocyanate (Annexin V FITC), and buffer) was used to estimate the amount of red blood cells with an impaired asymmetry of the cell membrane. Cells were resuspended in the buffer solution for staining. In accordance with the Annexin V FITC protocol, 5 μl of Annexin V FITC were added to 100 μl of cell suspension (1×10^6 cells/ml), mixed and incu-



100 мкл клеточной суспензии (1×10^6 кл/мл) добавляли 5 мкл Annexin V FITC, перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. По истечении времени инкубирования в каждую пробирку добавляли по 400 мкл рабочего раствора буфера для окрашивания и проводили измерение на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Интенсивность флуоресценции измеряли на флуоресцентном канале FL1 при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны эмиссии 530 нм. Количество аннексин-меченных клеток определяли в нижнем правом квадранте цитограмм. Для минимизации ошибки в пробе анализировали 100 000 событий. Результаты измерения оценивали с помощью программного обеспечения «CELLQuest Pro» («Becton Dickinson»).

Статистическую обработку полученных экспериментальных результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Для проверки статистической значимости различий исследуемых числовых показателей использовали критерии Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Хлорпромазин проявляет антигемолитическую активность в широком концентрационном диапазоне при 0°C [8]. Выбор концентрации ХПР для

bated for 15 min at room temperature in the dark. When incubation time finished, 400 μl of the handling solution of the buffer were added to each tube and the measurement was carried out with FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson). The fluorescence intensity was measured in FL1 fluorescent channel at an excitation wavelength of 488 nm and 530 nm emission wavelength. The content of Annexin-labeled cells was determined in the lower right quadrant of the cytograms. To minimize the error in the sample, 100,000 events were analyzed. The results were evaluated using the CELLQuest Pro software (Becton Dickinson).

The obtained experimental results were statistically processed by means of Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA). To check the statistical significance of the differences in between samples, the Mann-Whitney criteria were used.

Results and discussion

Chlorpromazine exhibits an antihemolytic activity within a wide concentration range at 0°C [29]. The choice of CPZ concentration for this study was based on the results of investigating the barrier properties of erythrocyte membranes in the presence of CPZ by EPR spectroscopy [36]. The studies carried out using the TEMPON probe in combination with potassium

ferricyanide, not penetrating into intact cells, allowed us to distinguish two ranges of amphiphile concentrations. In particular, at high concentrations of CPZ (300–700 $\mu\text{mol/L}$), barrier properties of erythrocyte membranes (for ferricyanide ions) were compromised, but at low concentrations (50–200 $\mu\text{mol/L}$) they were preserved. On the basis of these data, we used in the study the CPZ at a concentration of 180 $\mu\text{mol/L}$.

To determine the stage of the PHS, responsible for implementation of an antihemolytic effect of CPZ, the experiment protocol was chosen in such a way that the substance was introduced into the medium at different stages and in various combinations (Fig. 2).

The efficiency of amphiphilic compounds is usually expressed as an index of antihemolytic activity. The values of antihemolytic activity of CPZ under conditions of PHS of human erythrocytes, depending on the CPZ presence at different stages of the experiment, are shown in Fig. 2.

Chlorpromazine is an inhibitor of calmodulin [16, 19]. The calmodulin signal system, interacting with other signaling systems of the cell, participates in the formation of a cellular response to external influences [5, 10,

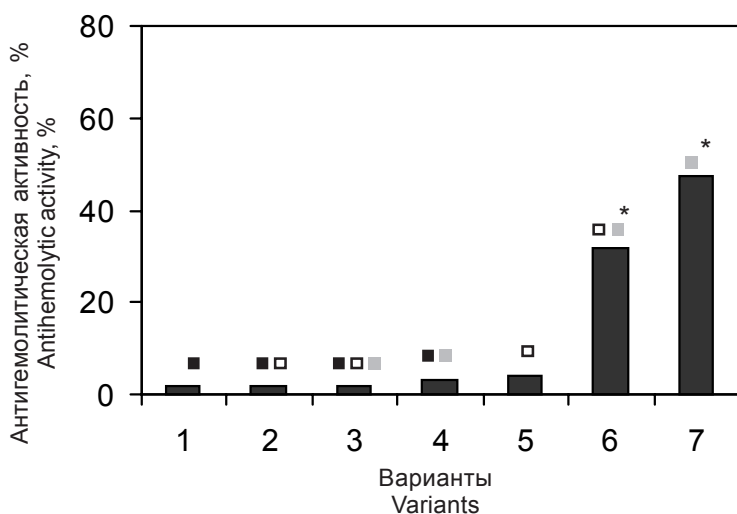


Рис. 2. Антигемолитическая активность ХПР (180 мкмоль/л) в условиях переноса эритроцитов из среды, содержащей 1,75 моль/л NaCl, в среду 0,15 моль/л NaCl; температура 0°C ; ХПР на разных этапах эксперимента: предобработка – ■; дегидратация – □; регидратация – ■. * – статистически значимые различия по сравнению с вариантами 1–5 ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7.

Fig. 2. Antihemolytic activity of CPZ (180 $\mu\text{mol/L}$) when erythrocytes were transferred from a medium containing 1.75 mol/L NaCl to the one of 0.15 mol/L NaCl; temperature 0°C . The CPZ presence at various stages of the experiment: pre-treatment – ■; dehydration – □; rehydration – ■. * – statistically significant differences if compared with the variants 1–5 ($p < 0.05$), the number of observations in each group made 7.

проведения данного исследования основан на результатах работы по изучению барьерных свойств эритроцитарных мембран в присутствии ХПР методом ЭПР-спектроскопии [9]. Проведенные исследования с помощью зонда ТЕМПОН в комбинации с феррицианидом калия, который не проникает в нативные клетки, позволили выделить два диапазона концентраций амфифила. Так, при высоких концентрациях ХПР (300–700 мкмоль/л) барьерные свойства мембран эритроцитов (по отношению к ионам феррицианида) нарушались, а при низких концентрациях (50–200 мкмоль/л) сохранялись. Исходя из этих данных, в работе мы использовали ХПР в концентрации 180 мкмоль/л.

Для определения этапа ПГШ, ответственного за реализацию антигемолитического эффекта ХПР, была выбрана такая постановка эксперимента, при которой вещество вносили в среду на разных этапах и в различных сочетаниях (рис. 2).

Эффективность амфифильных соединений, как правило, выражают в виде величин антигемолитической активности. Значения антигемолитической активности ХПР в условиях ПГШ эритроцитов человека в зависимости от присутствия ХПР на разных этапах эксперимента представлены на рис. 2.

Хлорпромазин является ингибитором кальмодулина [23, 26]. Кальмодулиновая сигнальная система, взаимодействуя с другими сигнальными системами клетки, участвует в формировании клеточного ответа на внешние воздействия [16, 20, 31, 36]. Хлорпромазин как ингибитор кальмодулина может модифицировать кальмодулин-зависимые системы клетки, изменяя либо взаимодействие кальмодулина с компонентами цитоскелета, либо активность кальмодулин-зависимых киназ, в частности, спектринкиназы. В результате блокирования кальмодулина изменяется уровень фосфорилирования белков цитоскелета, их ионное окружение и содержание АТФ в клетке [23, 26].

Существует большая вероятность того, что механизм антигемолитического действия ХПР в усло-

25, 35]. Chlorpromazine can modify calmodulin-dependent cell systems, changing either the interaction of calmodulin with cytoskeleton components, or the activity of calmodulin-dependent kinases, in particular, spectrinase. Calmodulin blockade could result in altered level of phosphorylation of cytoskeleton proteins, their ionic environment, and the content of ATP in the cell [16, 19].

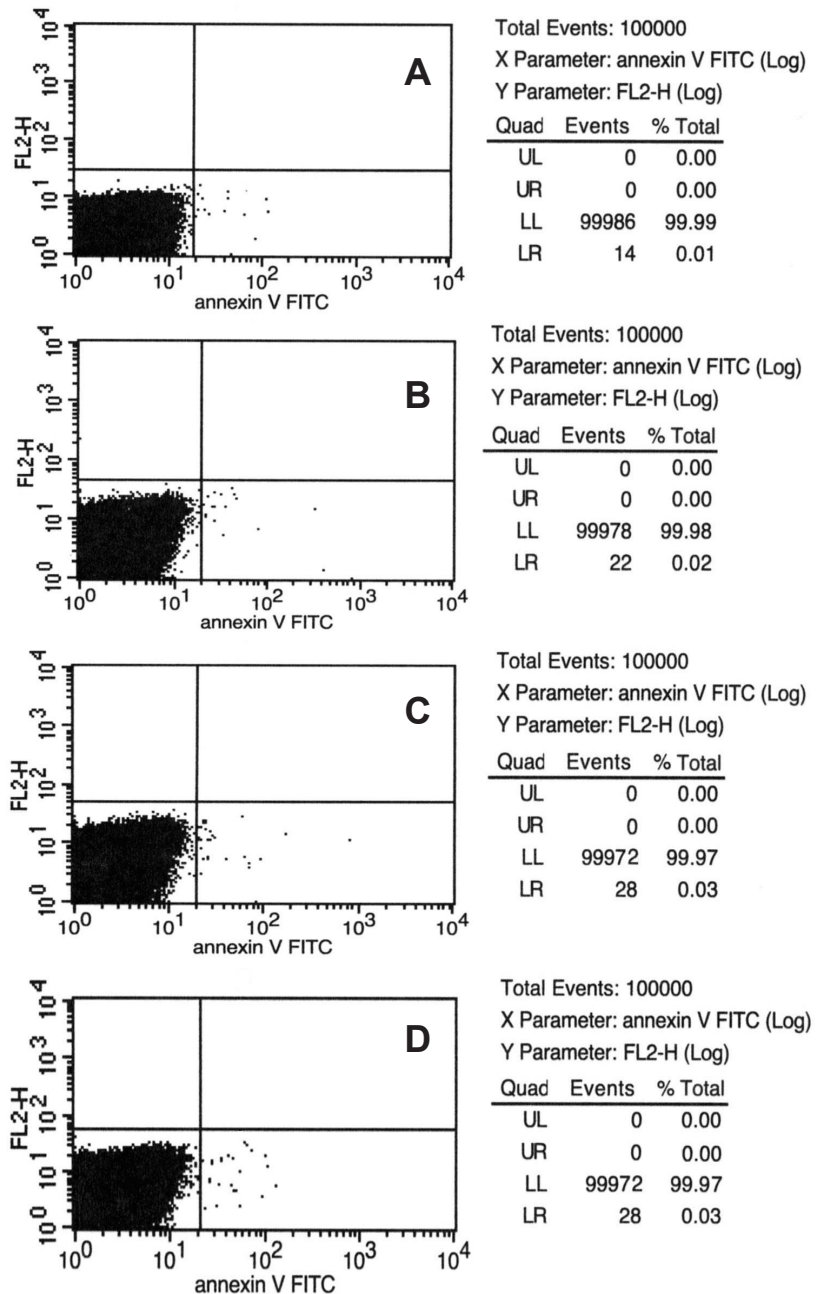


Рис. 3. Цитограмма эритроцитов человека после обработки хлорпромазином (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции аннексин V-FITC в относительных единицах): **А** – контроль; **В–Д** – ХПР в концентрации 100, 200 и 300 мкмоль/л соответственно. Приведены данные одного из трех экспериментов.

Fig. 3. Cytoqram of human erythrocytes after treatment with CPZ (abscissa – fluorescence intensity of annexin V-FITC in relative units): **A** – control; **B–D** – chlorpromazine at a concentration of 100, 200 and 300 μmol/L, respectively. The data of one of three experiments are demonstrated.



виях стресса связан с ингибированием кальмодулина, если при предварительном инкубировании эритроцитов с ХПР реализуется его защитное действие в условиях ПГШ.

После инкубирования эритроцитов с ХПР только на этапе предобработки антигемолитическая активность амфифильного соединения в условиях ПГШ не выявлена (рис. 2, вариант 1). Аналогичные результаты (отсутствие антигемолитической активности ХПР) были получены для всех возможных вариантов присутствия вещества на этапах дегидратации и регидратации при обязательном условии предобработки им клеток (рис. 2, варианты 2–4). Таким образом, добавление ХПР на этапе предобработки клеток не обеспечивало его защитное действие в условиях ПГШ эритроцитов человека (рис. 2). Данный факт свидетельствует в пользу того, что механизм антигемолитического действия ХПР не связан с предварительной модификацией клеток.

Введение ХПР в среды на этапах дегидратации и регидратации в различных комбинациях приводило к развитию его антигемолитической активности в том случае, когда вещество находилось в среде регидратации (рис. 2, варианты 6–7). Следует отметить, что ХПР проявлял максимальную эффективность только на этапе регидратации (рис. 2, вариант 7), при этом его антигемолитическая активность составляла 48%.

Таким образом, для проявления антигемолитического эффекта ХПР в условиях ПГШ эритроцитов необходимо выполнение следующих условий: во-первых, вещество должно присутствовать на этапе регидратации, во-вторых, обязательно отсутствовать на этапе предварительной обработки клеток. Антигемолитическая активность ХПР проявляется в момент резкого изменения условий окружающей среды и, по-видимому, наблюдаемый эффект реализуется на уровне плазматической мембраны.

Было показано, что ХПР влияет на мембранные фосфолипиды, изменяя их состояние в области полярных головок и жирнокислотных цепей [22, 35], причем эти эффекты могут быть обратимыми [22]. На основании вышеописанных данных можно полагать, что «мишенью» действия ХПР в условиях ПГШ являются мембранные фосфолипиды.

В условиях ПГШ эритроцитов на этапе дегидратации в плазматических мембранах клеток формируются микродефекты [11], которые на последующем этапе регидратации увеличиваются до размера гемолитических пор. Присутствие ХПР в среде регидратации предотвращает развитие этого процесса за счет способности вещества влиять на липиды и вызывать их реорганизацию при встраивании в эритроцитарную мембрану [13, 18, 22, 29, 34].

Тот факт, что при предварительной обработке клеток хлорпромазином вещество (в любых комби-

The mechanism of antihemolytic action of CPZ under stress conditions could be associated with the inhibition of calmodulin, if pre-incubation of erythrocytes with CPZ is followed by protective effect under the PHS conditions.

After the incubation of erythrocytes with CPZ present only at the stage of pre-treatment, we have not found any antihemolytic activity of amphiphilic compound under the conditions of following PHS (Fig. 2, variant 1). Similar absence of antihemolytic activity of CPZ was obtained for all possible variants of the substance presence at the stages of dehydration and rehydration in case of cell pre-treatment with CPZ (Fig. 2, variants 2–4). Thus, the addition of CPZ at the stage of cell pretreatment did not cause any protective effect under the PHS of human erythrocytes (Fig. 2). This evidences to the fact that the mechanism of antihemolytic action of HPZ is rather not associated with the preliminary modification of cells.

The introduction of CPZ into media at the stages of dehydration and rehydration in various combinations allowed to appear the antihemolytic activity in the case when the substance was in the rehydration medium (Fig. 2, variants 6–7). It should be noted that CPR showed a maximum efficiency only at the stage of rehydration (Fig. 2, variant 7), where its antihemolytic activity was 48%.

Thus, the antihemolytic effect of CPZ under the PHS of erythrocytes could be provided if the following conditions are met: first, the substance must be present at the rehydration stage, and secondly, it must be absent during the pre-treatment of the cells. The antihemolytic activity of CPZ is manifested during sharp changes in environmental conditions and, apparently, the observed effect is realized at the level of the plasma membrane.

It has been shown that CPZ affects membrane phospholipids, changing their state in the area of polar heads and fatty acid chains [15, 34], and these effects can be reversible [15]. Based on the above-described data, it can be assumed that the membrane phospholipids are the target of the CPZ action under conditions of PHS.

Erythrocyte PHS is accompanied with formation of microdefects in cell plasma membrane at the dehydration stage [31], and at the following rehydration these could develop up to the size of hemolytic pores. The presence of CPZ in the rehydration medium prevents the development of this process due to the ability of the substance to exert an influence on the lipids and cause their reorganization when incorporated into the erythrocyte membrane [1, 8, 15, 22, 33].

The fact that during the preliminary treatment of cells with CPZ the substance (in any combination) does not show any antihemolytic effect under the

нациях) не проявляет антигемолитический эффект в условиях ПГШ эритроцитов (рис. 2), свидетельствует о некоторых изменениях в мембране на этапе предобработки, которые, возможно, связаны с фосфолипидами мембран. Исходя из физико-химических свойств молекул ХПР (в которых сбалансированы гидрофобная и гидрофильная части) и характера их локализации в эритроцитарной мембране [9, 34], а также учитывая тот факт, что «мишенью» ХПР являются фосфолипиды [22, 35], представляло интерес изучить влияние данного вещества на асимметричное трансбислое распределение фосфолипидов на примере фосфатидилсерина. Методом проточной цитофлуориметрии было исследовано состояние эритроцитарной мембраны при действии ХПР в концентрациях и временных интервалах, при которых он проявлял защитное действие в условиях ПГШ [8].

Степень нарушения асимметрии мембраны определяли по экспонированию на поверхности клеток фосфатидилсерина, который является маркерным фосфолипидом внутреннего монослоя липидного бислоя. С этой целью использовали Ca^{2+} -зависимый белок аннексин V (молекулярная масса 35–36 кДа), который обладает высоким сродством к фосфатидилсерину [37]. Аннексин V, конъюгированный с флуорохромом флуоресцеинизотиоцианатом, сохраняет высокое сродство к данному фосфолипиду, поэтому используется как чувствительная метка для анализа клеток с нарушенной асимметрией мембраны методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты проведенных нами исследований эритроцитов человека методом проточной цитофлуориметрии показали, что содержание контрольных эритроцитов (в отсутствие ХПР), связавших аннексин V, составляло 0,01% (рис. 3). При инкубировании клеток с ХПР в концентрациях 100, 200 и 300 мкмоль/л содержание позитивно меченных клеток практически не изменялось и составляло 0,02–0,03%. Данный факт свидетельствует о том, что ХПР в указанных концентрациях при непродолжительном инкубировании с эритроцитами человека не вызывает трансбислое перераспределение фосфатидилсерина в плазматических мембранах.

Полученные результаты согласуются с данными исследования Н. Hagerstrand и соавт. [21]. Было установлено, что положительно заряженные амфифильные соединения в отличие от амфифилов, относящихся к классам неионных и отрицательно заряженных, не нарушают асимметрию эритроцитарной мембраны. По мнению S. Ficarra и соавт. [18], ХПР приводит к экспонированию фосфатидилсерина на поверхности эритроцитов (продолжительность инкубирования клеток с веществом составляла 2 ч). В указанных эксперимен-

conditions of PHS of erythrocytes (Fig. 2), indicates the appearance of some changes in membrane during the pre-treatment stage, which may be associated with membrane phospholipids. Proceeding from the physical and chemical properties of the CPZ molecules (a balance between hydrophobic and hydrophilic parts) and their localization in erythrocyte membrane [33, 36], and also considering the fact that phospholipids are the target of CPZ [15, 34], it was of interest to study the effect of this substance on the asymmetric transbilayer distribution of phospholipids, e. g. phosphatidylserine. Using flow cytometry we have investigated the state of the erythrocyte membrane under the action of CPZ in concentrations considering the time intervals under which it exhibited a protective effect under the conditions of the PHS [29].

The rate of membrane asymmetry disorder was assessed by presence of phosphatidylserine on the cell surface, which is a specific phospholipid normally present in the inner monolayer of the lipid bilayer. Ca^{2+} -dependent protein Annexin V (molecular weight 35–36 kDa), which has a high affinity to phosphatidylserine [37] was used for this purpose. Annexin V, conjugated with fluorochrome fluorescein isothiocyanate, retains a high affinity for this phospholipid, therefore it is used as a sensitive marker for the analysis of cells with disturbed membrane asymmetry by flow cytometry.

The results of our studies of human erythrocytes showed that the content of annexin V⁺ erythrocytes in the control (in the absence of CPZ) was 0.01% (Fig. 3). Incubation of cells with CPZ at concentrations of 100, 200 and 300 $\mu\text{mol/L}$ did not result in any significant changes in the content of positively labeled cells (0.02–0.03%). This fact indicates that the CPZ in these concentrations does not cause a transbilayer redistribution of phosphatidylserine in plasma membranes following short-time incubation with human erythrocytes.

The results obtained are consistent with the data reported by H. Hagerstrand *et al.* [13]. It was found that positively charged amphiphilic compounds, do not compromise the asymmetry of the erythrocyte membrane unlike the nonionic or negatively charged amphiphiles. According to S. Ficarra *et al.* [8], CPZ provokes the exposure of phosphatidylserine on the surface of erythrocytes (the duration of incubation of cells with the substance was 2 h). Under these experimental conditions the effect was 1%. Longer incubation of human and mouse erythrocytes with CPZ (48 h) resulted in the eryptosis of these mammalian cells [3, 17]. In this case, the exposure of phosphatidylserine on an outer surface of the membrane even of the control cells (without the addition of CPZ) increased significantly (approximately 4–5 times).

In our experiments the pre-incubation of cells with CPZ did not lead to a transmembrane redistribution



тальных условиях этот эффект составлял 1%. Однако продолжительное инкубирование эритроцитов человека и мыши с ХПР (48 ч) приводило к эриптозу клеток этих млекопитающих [15, 24]. При этом экспонирование фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны даже контрольных клеток (без добавления ХПР) значительно увеличилось (примерно в 4–5 раз).

В наших экспериментальных условиях предварительная инкубация клеток с ХПР не приводила к трансмембранному перераспределению фосфатидилсерина (эриптозу), однако отрицательно влияла на результат антигемолитического действия ХПР в условиях ПГШ. Таким образом, при ПГШ проявляются скрытые изменения в мембранах, которые произошли на этапе предварительной инкубации клеток с ХПР. Для более полного обсуждения полученного эффекта необходимы дополнительные исследования.

Полученные в работе результаты о влиянии ХПР на эритроциты в условиях ПГШ (см. рис. 2) и анализ литературных данных о действии ХПР на мембранные фосфолипиды [22, 34, 35] свидетельствуют о том, что в основе механизма антигемолитической активности ХПР в условиях ПГШ эритроцитов лежат быстротекущие процессы реорганизации мембраны (при встраивании и распределении амфифильных молекул в ней), а не биохимическая модификация клеток.

Выводы

Тот факт, что предобработка эритроцитов ХПР не позволяет веществу проявить антигемолитический эффект, свидетельствует о том, что механизм защитного действия ХПР в условиях ПГШ эритроцитов не зависит от биохимической модификации клеток. Изменения в мембране под действием ХПР на этапе предобработки клеток не приводят к трансбислойному перераспределению молекул фосфатидилсерина. Защитный эффект ХПР реализуется на этапе регидратации, т. е. в момент резкого изменения условий среды (1,75 → 0,15 моль/л NaCl). Следовательно, механизм антигемолитического действия ХПР в условиях ПГШ эритроцитов связан с реорганизацией мембраны при встраивании в нее молекул вещества.

Литература

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др. Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – №2. – С. 25–32.
2. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Механизмы защиты клеток от повреждения вне- и внут-

of phosphatidylserine (eryptosis), nevertheless it arrested the CPZ antihemolytic effect under following PHS. Thus, PHS provokes the development of latent changes occurred in the membranes during the pre-incubation of cells with CPZ. To reveal deeper machinery of the effect more research is needed.

The revealed effect of CPZ on erythrocytes under conditions of PHS (see Fig. 2) and reported previously action of CPZ on membrane phospholipids [15, 33, 34] indicate that the mechanism of antihemolytic activity of CPZ under erythrocyte PHS is associated with rapid processes of membrane reorganization (integration and distribution of amphiphilic molecules in it), rather than with biochemical modification of cells.

Conclusions

The fact that the pre-treatment of erythrocytes did not allow the substance to exhibit an antihemolytic effect indicated that the mechanism of protective effect of CPZ under the conditions of PHS of erythrocytes did not depend on biochemical modification of cells. Changes in membrane under the action of CPZ during pre-treatment of cells did not lead to a transbilayer redistribution of phosphatidylserine molecules. Protective effect of CPZ was implemented at the rehydration stage, *i. e.* at the moment of a sharp change in environmental conditions (1.75 → 0.15 mol/L NaCl). Consequently, the mechanism of CPZ antihemolytic action under conditions of PHS of erythrocytes was associated with the membrane reorganization caused by an incorporation of the substance molecules into it.

References

1. Ahyayauch H., Bennouna M., Alonso A., Goni F.M. Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena. *Langmuir* 2010; 26(10): 7307–7313.
2. Ahyayaucha H., Gallego M., Casis O., Bennouna M. Changes in erythrocyte morphology induced by imipramine and chlorpromazine. *J Physiol Biochem* 2006; 62(3): 199–205.
3. Akel A., Hermle T., Niemoeller O.M. et al. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol* 2006; 532(1): 11–17.
4. Belous A.M., Bondarenko V.A., Babijchuk L.A. et al. The common mechanism of damage of cell subjected to thermal shock, freezing and posthypertonic lysis. *Kriobiologiya* 1985; (2): 25–32.
5. Carafoli E., Krebs J. Why calcium? How calcium became the best communicator. *J Biol Chem* 2016; 291(40): 20849–20857.
6. Dunayevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Some possible methods of increasing red blood cell stability to the action of cold and osmotic effects after application of cation amphipates. *Probl Cryobiol* 1995; (1): 21–26.
7. Enomoto A., Takakuwa Y., Manno S. et al. Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1512(2): 285–290.
8. Ficarra S., Russo A., Barreca D. et al. Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality:



- рикеточным льдом // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 9–44.
3. Гордієнко Є.О., Товстяк В.В. Фізика біомембран: підручник. – К.: Наук. думка, 2009. – 272 с.
 4. Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфипатов // Проблемы криобиологии. – 1995. – №1. – С. 21–27.
 5. Ершов С.С., Писаренко Н.А., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Вплив катіонних та аніонних амфифільних сполук на гіпертонічний криогемоліз еритроцитів ссавців // Фізіолог. журнал. – 2007. – Т. 53, №6. – С. 78–84.
 6. Олейник О.А., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде // Проблемы криобиологии. – 2003. – №3. – С. 21?29.
 7. Семионова Е.А., Ершова Н.А., Ершов С.С. и др. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 73–83.
 8. Семионова Е.А., Землянских Н.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая эффективность хлорпромазина в условиях постгипертонического шока и при удалении глицерина из эритроцитов после размораживания // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2017. – Т. 27, №1. – С. 51–60.
 9. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биол. мембраны. – 2005. – Т. 22, №4. – С. 327–335.
 10. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия. – 1991. – Т. 56, №12. – С. 2125–2130.
 11. Шпакова Н.М., Ершов С.С., Ніпот О.Є. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів K^+ і розвитком гемолітичного пошкодження еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного криогемолізу // Біологія тварин. – 2008. – Т. 10, №1–2. – С. 164–170.
 12. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гипертоническом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – Т. 60, №10. – С. 1624–1631.
 13. Ahyayauch H., Bennouna M., Alonso A., Goni F.M. Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena // Langmuir. – 2010. – Vol. 26, №10. – P. 7307–7313.
 14. Ahyayaucha H., Gallego M., Casis O., Bennouna M. Changes in erythrocyte morphology induced by imipramine and chlorpromazine // J. Physiol. Biochem. – 2006. – Vol. 62, №3. – P. 199–205.
 15. Akel A., Hermle T., Niemoeller O.M. et al. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 532, №1–2. – P. 11–17.
 16. Carafoli E., Krebs J. Why calcium? How calcium became the best communicator // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291, №40. – P. 20849–20857.
 17. Enomoto A., Takakuwa Y., Manno S. et al. Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1512, №2. – P. 285–290.
 18. Ficarra S., Russo A., Barreca D. et al. Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality: activation of metabolism and membrane perturbation // Oxid. Med. Cell Longev. – 2016. – Vol. 2016. – 2394130.
 19. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E., editors. Life in the frozen state. – Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press; 2004. – 672 p.
 - activation of metabolism and membrane perturbation // Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 2394130.
 9. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E., editors. Life in the frozen state. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press; 2004.
 10. Gancedo J.M. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. Biol Rev Camb Philos Soc 2013; 88(3): 645–668.
 11. Gordienko E.A., Gordienko O.I., Kuleshova L.G., Rozanov L.F. Mechanisms of protecting cells from damage with extra- and intracellular ice In: Goltsev A.N., editor. Current problems of cryobiology and cryomedicine. Kharkiv, 2012. p.9-44.
 12. Gordienko E.A., Tovstiyak V.V. Physics of biological membranes: a tutorial. Kyiv: Nauk Dumka; 2009.
 13. Hagerstrand H., Holmstrom T.H., Bobrowska-Hagerstrand M. et al. Amphiphile-induced phosphatidylserine exposure in human erythrocytes. Mol Membr Biol 1998; 15(2): 89–95.
 14. Iershov S.S., Pysarenko N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Effect of cationic and anionic amphiphilic compounds on hypertonic cryohemolysis of mammalian red blood cells. Fiziol Zh 2007; 53(6): 78–84.
 15. Jiang Y.W., Gao G., Chen Z., Wu F.G. Fluorescence studies on the interaction between chlorpromazine and model cell membranes. New J Chem 2017; 41(10): 4048–4057.
 16. Kawamura H., Arai M., Togari A. Inhibitory effect of chlorpromazine on RANKL-induced osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells. Pharmacol Sci 2011; 117(1): 54–62.
 17. Koka S., Lang C., Boini K.M. et al. Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of Plasmodium berghe infected mice. Cell Physiol Biochem 2008; 22(1–4): 261–268.
 18. Lieber M.R., Steck T.L. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts. J Biol Chem 1982; 257(19): 11660–11666.
 19. Lubker C., Seifert R. Effects of 39 compounds on calmodulin-regulated adenylyl cyclases AC1 and bacillus anthracis edema factor. PLoS One 2015; 10(5): e0124017.
 20. Martins P.T., Velazquez-Campoy A., Vaz W.L. et al. Kinetics and thermodynamics of chlorpromazine interaction with lipid bilayers: effect of charge and cholesterol. J Am Chem Soc 2012; 134(9): P. 4184–4195.
 21. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. Cryobiology 2008; 57(3): 251–256.
 22. Nussio M.R., Sykes M.J., Miners J.O., Shapter J.G. Kinetics membrane disruption due to drug interactions of chlorpromazine hydrochloride. Langmuir 2009; 25(2): 1086–1090.
 23. Olejnik O.A., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Posthypertonic lysis of modified erythrocytes in citrate medium. Probl Cryobiol 2003; (1): 21–29.
 24. Reinhart W.H., Lubszy S., Thony S., Schulzki T. Interaction of injectable neurotropic drugs with the red cell membrane. Toxicol In Vitro 2014; 28(7): 1274–1279.
 25. Roy A., Ye J., Deng F., Wang Q.J. Protein kinase D signaling in cancer: A friend or foe? Biochim Biophys Acta 2017; 1868(1): 283–294.
 26. Rudenko S.V. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. Biochim Biophys Acta 2010; 1798(9): 1767–1778.
 27. Semionova E.A., Iershova N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. EESJ 2016; (2): 7–17.
 28. Semionova E.A., Yershova N.A., Yershov S.S., Orlova N.V., Shpakova N.M. Peculiarities of posthypertonic lysis in erythrocytes of several mammals. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 73–83.
 29. Semionova Y.A., Zemlyanskikh N.G., Orlova N.V., Shpakova N.M. Antihemolytic efficiency of chlorpromazine under posthypertonic shock and glycerol removal from erythrocytes after thawing. Probl Cryobiol Cryomed 2017; 27(1): 51–60.
 30. Shpakova N.M., Bondarenko V.A. The effect of chlorpromazine on the temperature and osmotic sensitivity of erythrocytes Biokhimiia (Moscow, Russia) 1991; 56(12): 2125–2130.
 31. Shpakova N.M., Ershov S.S., Nipot O.E. To the question about possible correlation between release of K^+ ions and development



20. Gancedo J.M. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2013. – Vol. 88, №3. – P. 645–668.
21. Hagerstrand H., Holmstrom T.H., Bobrowska-Hagerstrand M. et al. Amphiphile-induced phosphatidylserine exposure in human erythrocytes // *Mol. Membr. Biol.* – 1998. – Vol. 15, №2. – P. 89–95.
22. Jiang Y.W., Gao G., Chen Z., Wu F.G. Fluorescence studies on the interaction between chlorpromazine and model cell membranes // *New J. Chem.* – 2017. – Vol. 41, №10. – P. 4048–4057.
23. Kawamura H., Arai M., Togari A. Inhibitory effect of chlorpromazine on RANKL-induced osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells // *Pharmacol. Sci.* – 2011. – Vol. 117, №1. – P. 54–62.
24. Koka S., Lang C., Boini K.M. et al. Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2008. – Vol. 22, №1–4. – P. 261–268.
25. Lieber M.R., Steck T.L. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257, №19. – P. 11660–11666.
26. Lubker C., Seifert R. Effects of 39 compounds on calmodulin-regulated adenylyl cyclases AC1 and bacillus anthracis edema factor // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, №5. – e0124017.
27. Martins P.T., Velazquez-Campoy A., Vaz W.L. et al. Kinetics and thermodynamics of chlorpromazine interaction with lipid bilayers: effect of charge and cholesterol // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134, №9. – P. 4184–4195.
28. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis // *Cryobiology.* – 2008. – Vol. 57, №3. – P. 251–256.
29. Nussio M.R., Sykes M.J., Miners J.O., Shapter J.G. Kinetics membrane disruption due to drug interactions of chlorpromazine hydrochloride // *Langmuir.* – 2009. – Vol. 25, №2. – P. 1086–1090.
30. Reinhart W.H., Lubszky S., Thony S., Schulzki T. Interaction of injectable neurotropic drugs with the red cell membrane // *Toxicol. In Vitro.* – 2014. – Vol. 28, №7. – P. 1274–1279.
31. Roy A., Ye J., Deng F., Wang Q.J. Protein kinase D signaling in cancer: A friend or foe? // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2017. – Vol. 1868, №1. – P. 283–294.
32. Rudenko S.V. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1798, №9. – P. 1767–1778.
33. Semionova E.A., Iershova N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence // *EESJ.* – 2016. – №2. – P. 7–17.
34. Song C., Holmsen H., Nerdal W. Existence of lipid microdomains in bilayer of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and 1-stearoyl-2-docosahexenoyl phosphatidylserine (SDPS) and their perturbation by chlorpromazine: a ¹³C and ³¹P solid-state NMR study // *Biophys. Chem.* – 2006. – Vol. 120, №3. – P. 178–187.
35. Suwalsky M., Villena F., Sotomayor C.P. et al. Human cells and cell membrane molecular models are affected in vitro by chlorpromazine // *Biophys. Chem.* – 2008. – Vol. 135, №1–3. – P. 7–13.
36. Takemoto-Kimura S., Suzuki K., Horigane S.I. et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease // *J. Neurochem.* – 2017. – Vol. 141, №6. – P. 808–818.
37. van Genderen H.O., Kenis H., Hofstra L. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1783, №6. – P. 953–963.
- of hemolytic damage of mammalian erythrocytes under hypertonic cryohemolysis. *Animal Biology* 2008; 10(1–2): 164–170.
32. Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A. Antihemolytic effect of chlorpromazine on erythrocytes in hyperosmotic and cold shock. *Biokhimiia (Moscow)* 1995; 60(10): 1624–1631.
33. Song C., Holmsen H., Nerdal W. Existence of lipid microdomains in bilayer of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and 1-stearoyl-2-docosahexenoyl phosphatidylserine (SDPS) and their perturbation by chlorpromazine: a ¹³C and ³¹P solid-state NMR study. *Biophys Chem* 2006; 120(3): 178–187.
34. Suwalsky M., Villena F., Sotomayor C.P. et al. Human cells and cell membrane molecular models are affected in vitro by chlorpromazine. *Biophys Chem* 2008; 135(1–3): 7–13.
35. Takemoto-Kimura S., Suzuki K., Horigane S.I. et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem* 2017; 141(6): 808–818.
36. Tsymbal L.V., Orlova N.V., Shpakova N.M. Modification of the structure-functional state of erythrocyte membranes by chlorpromazine. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology* 2005; 22(4): 327–335.
37. van Genderen H.O., Kenis H., Hofstra L. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(6): 953–963.