

Clorpromazina, L- carnitina y carbonato de litio: evaluacion de efectos eritroprotectores *in vitro* ante estrés mecánico y fotohemólisis uvb

Rossana Cortez, Cynthia Case, Ysa Carrera, Marina Cardona, Antonio Eblen-Zajjur

Dpto. Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, P.O. Box 3798, El Trigal, Valencia, Venezuela. aeblen@uc.edu.ve

RESUMEN

Se evaluaron los efectos eritroprotectores de: Clorpromazina (CPZ), L-Carnitina (LCN) y Carbonato de Litio (Li). A muestras de sangre de cobayos ($n=15$, 6mL; 1mL/vial) se añadió ringer (20 μ l), CPZ (20 μ l; 0,5mg.mL⁻¹), LCN (20 μ l; 4mg.mL⁻¹) o Li (20 μ l; 0,08mg.mL⁻¹) incubándose por 30, 60 y 90 min en rotación lenta, luego se sometieron a agitación calibrada por 10min, centrifugación (2500rpm, 15min) y determinación de Hemoglobina libre (HbL) en el sobrenadante por espectrofotometría a 415 nm. Otra serie de muestras ($n=5$), fueron sometidas a fotohemólisis con luz ultravioleta B (UVB) por 10 min, agregándoseles previamente Ringer ó LCN, comparándose con muestras sin adiciones (controles). En estrés mecánico la CPZ mostró valores de HbL mayores al Ringer a los 30min (Mann-Whitney; $Z=-3,8$; $p<0,001$); 60min ($Z=-3,6$; $p<0,001$) y 90min ($Z=-3,6$; $p<0,001$). La incubación con LCN ó Li mostró valores similares al ringer en todos los tiempos ($Z<2,56$; $p>0,05$) y significativamente menores que la CPZ ($Z>3,0$; $p<0,001$) sin diferencias entre LCN vs. Li ($Z<1,0$; $p>0,05$). En fotohemólisis UVB, la incubación con ringer mostró valores de HbL inferiores al control ($t=5,57$; $p<0,05$) y mucho menores que los de LCN ($t=18,06$; $p<0,001$). Las muestras controles presentaron menor HbL que aquellas con LCN ($t=3,44$; $p<0,05$). Los resultados indican que en estrés mecánico la CPZ tiene efecto hemolítico, mientras que la LCN y el Li no mostraron diferencias con el Ringer. En fotohemólisis UVB, la LCN no mostró efecto eritroprotector.

Palabras clave: Eritroprotección, Clorpromazina, L-Carnitina, Litio, Fotohemólisis, Estrés mecánico, UVB.

ABSTRACT

Clorpromazina, L-carnitina y carbonato de litio:evaluacion de efectos eritroprotectores *in vitro* ante estrés mecánico y fotohemólisis uvb

The erythroprotective effects of Chlorpromazine (CPZ), L-Carnitine (LCN) and Lithium Carbonate (Li) where tested. Blood samples from guinea pigs were used ($n=15$, 6mL; 1mL/vial) and ringer (20 μ l), CPZ (20 μ l; 0.5mg.mL⁻¹), LCN (20 μ l; 4mg.mL⁻¹) or Li (20 μ l; 0.08mg.mL⁻¹) were added and incubated by 30, 60 and 90 min in slow rotation, thereafter being agitated by 10min. Plasma quantification of free hemoglobin (HbL) was done by spectrophotometry at 415nm after centrifugation (2500rpm, 15min). In another series, blood samples

were irradiated with ultraviolet light B (UVB) during 10min; ringer or LCN were added following the same procedure described above. Under mechanical stress, CPZ showed greater values of HbL than ringer; at 30min (Mann-Whitney; $Z=-3.8$; $p<0.001$); 60min ($Z=-3.6$; $p<0.001$) and 90min ($Z=-3.6$; $p<0.001$). Incubation with LCN or Li showed values similar to the ringer at all the times ($Z<2.56$; $p>0.05$) and significantly lower than CPZ ($Z>3.0$; $p<0.001$) with no differences between LCN versus Li ($Z<1.0$; $p>0.05$). In UVB photohemolysis incubation with ringer showed less HbL than control samples ($t=5.57$; $p<0.05$) and much less than LCN incubation ($t=18.06$; $p<0.001$). Control samples showed lower HbL than those incubated with LCN ($t=3.44$; $p<0.05$). Data suggest that CPZ has a hemolytic effect under mechanical stress, whereas neither LCN nor Li showed any differences with the ringer. In UVB photohemolysis LCN did not show any erythroprotective effect.

Key words: Erythroprotection, Chlorpromazine, L-Carnitine, Lithium, Photohemolysis, Mechanical Stress, UVB.

INTRODUCCIÓN

El comportamiento de los glóbulos rojos (GR) sometidos a condiciones de flujo sanguíneo no fisiológicas ha sido intensamente estudiado (5,7,14,16,18) en especial en el área de órganos artificiales y circulación extracorpórea (22). Varios modelos experimentales de hemólisis mecánica ó inducida por luz ultravioleta han sido desarrollados para evaluar los efectos eritroprotectores de diversos fármacos (5, 7,14,16,18,20).

El estrés mecánico genera en los GR cambios estructurales y bioquímicos con un aumento en el consumo de glucosa y oxígeno (24). Por otra parte, la luz ultravioleta tipo B (UVB) induce, en forma dependiente de la dosis y de la intensidad de la radiación, la peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas con producción de radicales libres de oxígeno y disminución de la fluidez de la membrana (4,7), reducción de su estabilidad eléctrica (19), alteraciones de las proteínas inmersas en la bicapa (14,23) y finalmente una intensa hemólisis.

Se han descrito varias drogas con acción eritroprotectora, la L-Carnitina (LCN) es un constituyente natural del organismo que interviene en el transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria para su β oxidación, ella favorece la glucólisis, aumentando la energía disponible en la célula. Se encuentra en los GR a niveles comparables al plasma (11), cumple funciones de modulación del recambio de los fosfolípidos de membrana incrementando la estabilidad de la misma (1). Se ha descrito un efecto acelerador de la fragilidad osmótica con niveles séricos bajos de LCN (28). El mecanismo por el cual esta sustancia favorece la estabilidad de la membrana podría ser mediante el aflojamiento del empaquetamiento molecular de las cabezas polares de los fosfolípidos, modificando la dinámica molecular de una región estrecha del esqueleto de glicerol (2). Se sugiere además, que favorece

la interacción proteína-proteína en el citoesqueleto (6) y la dispersión de los GR en una acción mediada por los grupos sulfidrilo de la membrana (17).

La Clorpromazina (CPZ), una fenotiacina de efecto antisicótico, tranquilizante, estomatocitogénica (15), tiene un efecto controversial sobre los GR, ya que parece incrementar la estabilidad mecánica en fantasmas de GR ó en contraste, hemolizar por abrir microporos en la membrana en función de la dosis empleada (15).

El Litio (Li), un modulador del inositol trifosfato, ha sido estudiado por su permeabilidad a través de la membrana de los GR (31,37), sin embargo, su acción directa sobre la membrana no ha sido establecida, a pesar de ser ésta el principal sitio de unión del Li, describiéndose una unión débil con la carbonmonoxihemoglobina, el 2-3 difosfoglicerato, la espectrina y el ATP (31,37).

En el presente estudio se evalúa comparativamente el efecto eritroprotector de LCN, CPZ y Li ante el estrés mecánico y la irradiación UVB de GR de cobayos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron quince (n=15) cobayos machos, adultos (800 gr), anestesiados con tiobarbital sódico (60 mg.Kg⁻¹ ip). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca (6ml) en 100 ì L de heparina sódica, y distribuida en olicuotas de 1000 ì L.

Estrés mecánico Las olicuotas de sangre fueron tratadas con (concentración final): Ringer (20 ì L), CPZ (0,5mg.mL⁻¹), LCN (4mg.mL⁻¹) ó Li (0,08mg.mL⁻¹) incubados a 24°C, en rotación lenta (20 rpm) por 30, 60 y 90 min. Luego, se sometieron a estrés mecánico en un agitador vórtex (Labline, SM[®]) a intensidad 6/7 del máximo por 10 min, se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min. El grado de hemólisis se determinó como la concentración de hemoglobina libre (HbL) en el sobrenadante cuantificada por duplicado mediante espectrofotometría de transmitancia (expresada en %) a 415nm.

Fotohemólisis UVB A viales con muestras de sangre de 1000µL se les añadió Ringer o LCN en los volúmenes ya descritos, dejándose una muestra control. Estos viales fueron incubados en rotación lenta y simultáneamente expuestos directamente a la luz UVB generada por una lámpara de cuarzo (Hanovia[®]) a una distancia de 15 cm por 10 min, luego fueron centrifugados, determinándose la HbL en el sobrenadante.\

Estadística Las lecturas de HbL se expresaron con medidas de tendencia central y de dispersión (media aritmética±desviación estándar y error estándar). Las comparaciones entre los valores obtenidos con cada sustancia o condición fueron realizadas mediante el test de Mann-Whitney para distribuciones no paramétricas y t-Student para las paramétricas. El nivel de significación se fijó en $p<0,05$.

RESULTADOS

Estrés Mecánico. La incubación con CPZ mostró valores de HbL mayores a la incubación con ringer en todos los tiempos: 30min ($Z=-3,8$; $p<0,001$; $+77,8\%$); 60min ($Z= -3,6$; $p<0,001$; $+83,9\%$); 90min ($Z= -3,6$; $p<0,001$; $84,2\%$).

En la Figura 1 se presenta la predominancia de los valores de HbL (menor transmitancia) resultante de la incubación con CPZ, lo que corresponde a una disminución del 84,2% de la cantidad de HbL obtenido con el Ringer, la LCN y el Li.

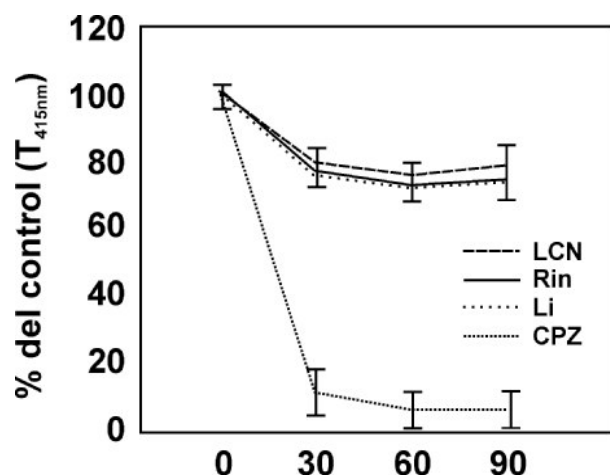
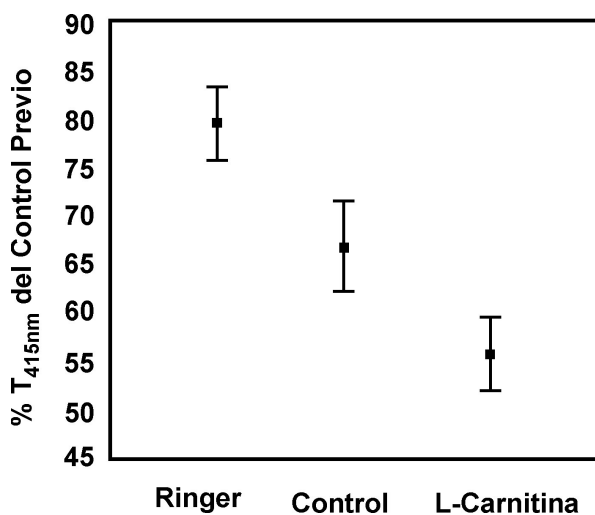


Figura 1 Cinética de HbL en plasma medida por espectrofotometría a 415 nm expresadas como porcentaje del control inicial $\pm$ desviación estándar, en muestras de sangre de cobayo incubadas hasta 90min con ringer (20 μ L/mL), CPZ (0,5 mg/mL), LCN (4 mg/mL) ó Li (0,08 mg/mL) y sometidos a vibración en vórtex por 10 minutos.

Este efecto fue notable ya a los 30 minutos de incubación. Los resultados al incubar con LCN o Li no mostraron diferencias con el Ringer ($Z=<2,56$; $p>0,05$). No se observaron diferencias entre los niveles de HbL al incubar con LCN y Li ($Z=<1,0$; $p>0,05$).

Fotohemólisis UVB En las incubaciones con LCN y ringer comparados con los controles, el ringer presentó niveles de HbL menores que la incubación control (sin aditivos) ($t=5,57$; $p<0,01$; $-15,7\%$) y menores que con LCN ($t=3,44$; $p<0,034$; $-16,4\%$) siendo significativa la diferencia entre Ringer y LCN ($t=18,06$; $p<0.0003$; Figura 2).

Figura 2 Valores de transmitancia de la HbL en plasma (media aritmética $\pm$ desviación estándar) medidos por espectrofotometría a 415nm obtenidos en muestras de sangre de cobayo incubadas en rotación lenta con ringer (20uL/mL), LCN (4 mg/mL) ó sin adición, y sometidos simultáneamente a fotohemólisis por irradiación UVB.



DISCUSION

En estrés mecánico, la LCN y el Li mostraron mayor efecto eritroprotector que la CPZ, sin diferencias entre estos en los tres tiempos de incubación. Este resultado coincide con reportes previos para LCN (1,17). Los resultados con Li sugieren un efecto eritroprotector no reportado previamente, mientras que la CPZ mostró el efecto hemolizante ya reportado a dosis menores (27). En el modelo de fotohemólisis UVB, el ringer mostró menor hemólisis que la sangre sin dilución y en ambos casos menor que la adición de LCN, lo que sugiere que el estrés mecánico por agitación y la fotohemólisis UVB generan procesos diferentes de lesión en la membrana eritrocitaria dada la respuesta diferencial ante la LCN además de confirmar la presencia de factores protectores plasmáticos innatos (5).

La LCN no mostró diferencias con el ringer cuando se sometió a los GR a hemólisis mecánica, sin embargo, las mediciones mostraron que los niveles de HbL obtenidos fueron relativamente bajos en ambos y, por lo tanto, sugieren un efecto eritroprotector; lo cual confirma reportes *in vivo* en las cuales se atribuye a la LCN un efecto estabilizador de la membrana del GR (33), en fantasmas de GR (17) o en eritrocitos almacenados a bajas temperaturas por tiempo prolongado (1). La LCN induce un aflojamiento del empaquetamiento molecular de las cabezas polares de los fosfolípidos (2), produciendo mayor fluidez y menor rigidez a la membrana (33), dando mayor capacidad de deformación y amortiguación del movimiento dado por la vibración. Además, la LCN favorece la interacción proteína-proteína del citoesqueleto (6) mejorando la resistencia a la turbulencia (32) manteniendo la forma del GR.

Los resultados con CPZ sugieren un efecto hemolítico, lo cual contrasta con algunas publicaciones que le atribuyen un efecto eritroprotector mediante el incremento de la resistencia de la membrana (16) y la regulación de la estabilidad mecánica de la misma (15) dependiente de la dosis, describiéndose para el primero un máximo efecto a concentraciones de 10^{-4} M, independientemente de las condiciones experimentales (16) esto contrasta con la mayor dosis probada en el presente estudio. Sin embargo, una acción lítica sobre los GR, también ha sido descrita, proponiéndose que la CPZ actuaría abriendo pequeñas hendiduras de aproximadamente 14Å de ancho y de longitud variable en la bicapa lipídica (27). Otras acciones de la CPZ sobre los GR son: redistribución de los lípidos de membrana (39), un efecto estomatocitogénico dosis, hematocrito y pH dependiente asociado a un incremento en el contenido de cationes monovalentes y de cloruro en el GR (13), interacción directa con proteínas de membrana como la aminofosfolípido traslocasa (39), enzima responsable de la traslocación dependiente de ATP de la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina en la membrana, con lo que contribuye a mantener la asimetría de la misma (34) generando un amplio espectro de efectos físicos y estructurales. Nuestros resultados podrían explicarse al considerar que la dosis utilizada de CPZ ($20\mu\text{L}$; $0,5\text{mg.mL}^{-1}$) se encuentra dentro del rango hemolítico.

El Li mostró un efecto eritroprotector similar a la LCN durante el estrés mecánico que no ha sido reportado previamente. La mayoría de los estudios realizados con Li y GR se orientan a su acción intracelular en eritrocitos de pacientes con enfermedades psiquiátricas (3,40). No obstante, se ha demostrado que la membrana es el principal sitio de unión del Li y que su interacción con las proteínas es débil (31,37). Debido a su efecto modulador sobre el inositol 3-fosfato (IP_3) media la apertura de canales de Ca^{++} en la membrana, componente importante de los requerimientos energéticos de la célula, dado que, en condiciones de estrés, el Ca^{++} , la glucosa y las proteínas se requieren para restaurar la forma biconcava (26) o para iniciar la cascada de activación de la muerte celular programada.

El efecto eritroprotector de la LCN en GR sometidos a estrés mecánico no fue observado en el modelo de fotohemólisis UVB, esto probablemente es producto del mecanismo diferente de injuria, donde la LCN no ofrecería protección ante la peroxidación lipídica o incluso podría ejercer un efecto acelerador del daño producido por la irradiación mediante un efecto fotosensibilizante, lo que explicaría los mayores niveles de HbL obtenidos. Por lo tanto, la acción estabilizadora de la LCN quedaría sobrepasada por el proceso de estrés oxidativo fotoinducido en la membrana que llevaría a la peroxidación lipídica, mecanismo propuesto para la mayoría de las drogas que inducen fotosensibilidad (42), no obstante, se requiere una mayor investigación al respecto.

El alcance del presente estudio se limita a proponer que la LCN ($4mg.ml^{-1}$) y el Li ($0,08 mg.ml^{-1}$) tienen un efecto eritroprotector sobre GR incubados en los tiempos probados (30,60 y 90 min) a temperatura ambiente y sometidos a estrés mecánico con un efecto hemolítico de la CPZ ($0,5mg.ml^{-1}$). Por otro lado, en irradiación UVB, la LCN no posee efecto eritroprotector.

Agradecimientos: Los autores expresan su agradecimiento a María de los Ángeles Pinto y a Alexis Alvarado por la valiosa asistencia técnica prestada.

REFERENCIAS

1. Arduini, A., Holme, S., Sweeney, J.D., Dottori, S., Sciarroni, A.F., Calvani, M. Addition of L-Carnitine to additive solution-suspended red cells stored at 4 degrees C reduces in vitro hemolysis and improves in vivo viability. *Transfusion* 1997; 37: 166-74.
2. Arduini, A., Goubunov, N., Arrigoni-Martelli, E., Dottori, S., Malajoni, F., Federici, G. Effects of L-Carnitine and its acetate and propionate esters on the molecular dynamics of human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1146: 229-235.
3. Bramham, J., Riddell, F.G. The effect of lithium therapy upon the composition of the human erythrocyte membrane. *J Inorg Biochem* 1995; 57: 23-32.
4. Bruch, R.C., Thayer, W.S. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim Biophys Acta* 1983; 733: 216-222.
5. Butler, T., Bradley, C.A., Owensby, J.E. Plasma components protect erythrocytes against experimental haemolysis caused by mechanical trauma and hypotonicity. *Int J Exp Pathol* 1992; 73: 27-33.
6. Butterfield, D.A., Rangachari, A. Acetylcarnitine increases membrane cytoskeletal protein-protein interactions. *Life Sci* 1993; 52: 297-303.

7. Carini, M., Aldini, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P., Maffei, R. UVB- induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sci* 2000; 67: 1799-1814.
8. Chasis, J.A., Mohandas, N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol* 1986; 103: 343-350.
9. Chen, J.Y., Huestis, W.H. Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1323: 299-309.
10. Chi, Y., Mo, S. Mota de Freitas, D. $\text{Na}^+\text{-H}^+$ and $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ exchange are mediated by the same membrane transport protein in human red blood cells: an NMR investigation. *Biochemistry* 1996; 35:12433-12442.
11. Cooper, M.B., Forte, C.A., Jones, D.A. Carnitine and acetylcarnitine in red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 959: 100-105.
12. Corchs, J.L., Taborda, D., Mujica, G., Serrani, R.E. $\text{Na}^+\text{/Li}^+$ exchange kinetic characterization. Red blood cells from normotensive individuals. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 2000; 25: 75-79.
13. Cornelius, A.S., Reilly, M.P., Suzuki, M., Arakura, T., Horiuchi, K. The mechanism of chlorpromazine induced red blood cell swelling. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 205-210.
14. Dreval', V.I., Sichevskaia, L.V., Doroshenko, A.O., Roshal', A.D. Radiation induced changes in the structure of erythrocyte membrane proteins. *Biofizika* 2000; 45: 836-838.
15. Enomoto, A., Takakuwa, Y., Manno, S., Tanaka, A., Mohandas, N. Regulation of erythrocyte ghost membrane stability by chlorpromazine. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1512: 285-290.
16. Etienne, A., Hecquet, F., Clostre, F., Defuidis, F.V. Comparative effects of an extract of ginko biloba and chlorpromazine on the in vitro osmotic fragility of rat erythrocytes. *J Pharmacol* 1982; 13: 291-298.
17. Fritz, I.B., Wong, K., Burdzy, K. Clustering of erythrocytes by fibrinogen is inhibited by carnitine: evidence that sulfhydryl groups on red blood cell membranes are involved in carnitine actions. *J Cell Physiol* 1991; 149: 269-276.
18. Gavelia, N.V., Puchova, T.V., Parnev, O.M., Vladimirov, IUA. Electrical breakdown of erythrocyte membranes during UV-radiation. *Biofizika* 1984; 29: 155-156.
19. Gorbenko, G.P., Krupin, V.D., Tovstiak, V.V. Effect of radiation on the structural state of erythrocyte membranes. *Biofizika* 1993; 38: 699-702.
20. Kameneva, M.V., Antaki, J.F., Yeleswarapu, K.K., Watach, M.J., Griffith, B.P., Borovetz, H.S. Plasma protective effect on red blood cells exposed to mechanical stress. *ASAIO J* 1997; 43: M571-575.
21. Kochevar, I.E. UV- induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochem Photobiol* 1990; 52: 795-800.
22. Kodicek, M. Enhanced glucose consumption in erythrocytes under mechanical stress. *Cell Biochem Funct* 1986; 4: 153-155.
23. Kodicek, M., Mircevova, L., Marik, T. Energy requirements of erythrocytes under mechanical stress. *Biomed Biochim Acta* 1987; 46: S103-107.
24. Kodicek, M., Suttner, J., Mircevova, L., Marik, T. Red blood cells under mechanical stress. *Gen Physiol Biophys* 1990; 9:291-299.
25. Lieber, M.R., Lange, Y., Weinstein, R.S., Steck, T.L. Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1984; 259: 9225-9234.
26. Mallinger, A.G., Mallinger, J., Hemmelhoch, J.M, Neil, J.F., Hanin, I. Transmembrane distribution of lithium and sodium in erythrocytes of depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)* 1980; 68: 249-255.
27. Lieber, M.R., Lange, Y., Weinstein, R.S., Steck, T.L. Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1984; 259: 9225-9234.
28. Mc Kenzie, S. (1988). *Hematología Clínica*. Santafé de Bogotá, Colombia: El Manual Moderno, S.A. de C.V. (pp. 27-28)
29. Mohandas, N., Chasis, J.A., Shohet, S.B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability membrane material properties, and shape. *Semin Hematol* 1983; 20: 225-242.
30. Mota de Freitas, D., Amari, L., Srinivasan, C., Rong, Q., Ramasamy, R., Abraha, A., Gerald, C.F., Boyd, M.K. Competition between Li^+ and Mg^{2+} for the phosphate groups in the human erythrocyte membrane and ATP: an NMR and fluorescence study. *Biochemistry* 1994; 33: 4101-4110.

31. Müller de S., A. (1995). Anemias hemolíticas por anormalidades de la membrana eritrocítica. En Perez Requejo, J.L. (Comp.), *Hematología*. 3^a ed. Venezuela. Disinlimed, C.A. (Tomo I, pp. 181-188).
32. Nikolaos, S., George, A., Telemachos, T., Maria, S., Yannis, M., Konstantinos, M. Effect of L-Carnitine in hemodialysis patients. *Ren Fail* 2000; 22: 73-80.
33. Ohta, Y., Okamoto, H., Kanno, M., Okuda, T. Atomic force microscopic observation of mechanically traumatized erythrocytes. *Artif Organs* 2002; 26:10-17.
34. Putvinskii, A.V. Decrease in the electrical stability of lipid membranes following UV- irradiation. *Biofizika* 1977; 22: 725-727.
35. Ratey, J.J., Mallinger, A.G. The relationship between extra and intracellular lithium concentration in human red blood cells: an in vitro study. *Br J Psychiatry* 1977; 131: 59-62.
36. Rong, Q., Espanol, M., Mota de Freitas, D., Geraldés, C.F. ⁷Li NMR relaxation study of Li⁺ binding in human erythrocytes. *Biochemistry* 1993; 32: 13490-13498.
37. Rosso, J., Zachowski, A., Devaux, P.F. Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Biochim Biophys Acta* 1988; 942 : 271-279.
38. Sadeghipour-Roudsari, H.R., Farahani, M., Shokrgozar, A.A., Farsam, H., Dehpour, A.R. Decrease in erythrocyte: plasma lithium ratio by concurrent administration of psychotropic drugs and lithium in mice. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 63-66.
39. Schreiner, H.C., Dunner, D.L., Meltzer, H., Fieve, R.R. The relationship of the lithium erythrocyte: plasma ratio to plasma lithium level. *Biol Psychiatry* 1979; 14: 207-213.
40. Spinedy, A., Pacini, L., Limatola, C., Luly, P., Farias, R.N. A study of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by chlorpromazine. *Biochem J* 1991; 278: 461-463.
41. Vargas, F. Singlet oxygen generation in the photolysis of drugs. *Modern topics in Photochemistry and Photobiology* 1997; 27-39.
42. Volotovskii, I.D., Sheiko, L.M., Konev, S.V. Influence of UV-light on erythrocyte membrane structure and catalytic behaviour of membrane acetylcholine esterase. *Mol Biol (Mosk)* 1976; 10: 1027-1034.
43. Yasuda, T., Shimokasa, K., Funakubo, A., Fukui, Y. Effect of wall hardness on hemolysis. *Artif Organs* 2000; 24: 614-618.
44. Zinchuk, V.V. Erythrocyte deformability: physiological aspects. *Usp Fiziol Nauk* 2001; 32: 66-78.