

Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью алкил- β ,D-глюкопиранозидов

UDC 57.043:591.111.1

N.M. SHPAKOVA

Feasible Mechanism of Osmotic and Temperature Sensitivity Correction of Human Erythrocytes Using Alkyl- β ,D-Glucopyranosides

Изучали влияние неионных производных глюкопиранозида с длиной алкильной цепи 6, 8, 10 углеродных атомов на развитие гиперосмотического лизиса и холодового шока эритроцитов человека. Показана высокая антигемолитическая активность веществ (90–94%). Эффективные концентрации алкилглюкопиранозидов снижаются с увеличением длины алкильной цепи их молекул. В условиях протекции клеток при различных типах лизиса рассчитаны величины отношения количества молекул липида, приходящегося на 1 молекулу алкилглюкопиранозида в эритроцитарной мембране, и установлено, что мембранные концентрации этих веществ существенно не отличаются.

Ключевые слова: эритроциты человека, гиперосмотический стресс, холодовой шок, алкил- β ,D-глюкопиранозиды, антигемолитический эффект, эффективные концентрации.

Вивчали вплив неіонних похідних глюкопіранозиду з довжиною алкільного ланцюга 6, 8, 10 вуглецевих атомів на розвиток гіперосмотичного лізису та холодового шоку еритроцитів людини. Показана висока антигемолітична активність речовин (90–94%). Ефективні концентрації алкілглюкопіранозидів знижуються зі збільшенням довжини алкільного ланцюга їх молекул. В умовах протекції клітин при різних типах лізису розраховані величини відношення кількості молекул ліпиду, що припадає на 1 молекулу алкілглюкопіранозиду в еритроцитарній мембрані, і встановлено, що мембранні концентрації цих речовин суттєво не відрізняються.

Ключові слова: еритроцити людини, гіперосмотичний стрес, холодний шок, алкіл- β ,D-глюкопіранозиди, антигемолітичний ефект, ефективні концентрації.

There was studied the effect of glucopyranoside non-ionic derivatives with the alkyl chain length of 6, 8, 10 carbon atoms on hyperosmotic lysis and cold stress development in human erythrocytes. High antihemolytic activity of substances (90–94%) was demonstrated. Efficient concentrations of alkyl glucopyranosides reduce with an increase in alkyl chain length of their molecules. Under cell protection at different lysis types there were calculated the values of ratio of lipid molecule number per 1 molecule of alkyl glucopyranoside in erythrocyte membrane and the membrane concentrations of these substances were established as not significantly differed.

Key words: human erythrocytes, hyperosmotic stress, cold stress, alkyl- β ,D-glucopyranosides, antihemolytic effect, efficient concentrations.

Эритроциты характеризуются высокой чувствительностью к изменению осмотических условий среды. Как снижение концентрации соли, так и ее повышение в среде инкубации по сравнению с физиологической нормой сопровождается повреждением мембраны, приводящим к лизису клеток. Феномен гипотонического гемолиза эритроцитов, а также возможности его предотвращения изучены достаточно [12, 13, 16, 25]. В то же время гипертонический лизис практически не изучен, хотя представляет значительный интерес для криобиологии. В процессе замораживания клеточных суспензий клетки вытесняются растущими кристаллами льда в микрофазы, где достигаются высокие концентрации соли порядка 3–4 М [22], в то время как

Erythrocyte feature is a high sensitivity to a change in medium osmotic conditions. Both decrease in saline concentration and its increase in the incubation medium, compared to the physiological norm, are accompanied with membrane damage, resulting in cell lysis. The phenomenon of erythrocyte hypotonic hemolysis, as well as the possibilities for its prevention are well studied [12, 13, 16, 25]. At the same time a hypertonic lysis is practically unstudied, although being of great interest for cryobiology. During cell suspension freezing, the cells are pushed out by growing ice crystals into the microphases, where the high saline concentrations of about 3–4 M are achieved [22], meanwhile a spontaneous erythrocyte hemolysis is in progress when getting the 2.7 M threshold saline concentration in the

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

спонтанный гемолиз эритроцитов развивается при достижении пороговой концентрации соли в среде 2,7 М [3]. Полагают, что гипертонический стресс является одним из основных факторов криповреждения [22]. Это позволяет использовать перенос эритроцитов в высококонцентрированные солевые растворы при положительных температурах для моделирования ситуации, имеющей место при замораживании, и поиска способов предотвращения повреждения клеток. Давно обнаруженный феномен гипертонического холодового шока (охлаждение значительно обезвоженных эритроцитов от 37 до 0°C) по своим проявлениям также весьма близок к процессам, вызывающим повреждение клеток при замораживании [9].

Амфифильные соединения способны оказывать протектирующий эффект при различных видах стресса эритроцитов [3, 5, 10, 26]. Подробно исследована антигемолитическая активность большой группы амфифилов при гипотоническом лизисе эритроцитов человека [13, 16]. Защитный эффект неионных амфифильных соединений выявлен при лизисе, индуцированном ультразвуком [10]. В условиях гипертонического лизиса и гипертонического холодового шока эритроцитов не только человека, но и животных отмечена высокая эффективность ряда амфифильных соединений, относящихся к различным классам [3, 5].

Обычно растворимые амфифили при высоких концентрациях (на уровне критической концентрации мицеллообразования и выше) используют для солюбилизации мембран [24]. При низких концентрациях эти вещества могут оказывать влияние на мембранно-связанные функции различных клеток [14], а также защищать их от повреждения в условиях различных видов стресса [5, 10, 27].

Молекулы амфифильных соединений содержат отчетливо выраженные гидрофильные (полярные) и гидрофобные части. Использование гомологического ряда амфифильных веществ, у которых при неизменной гидрофильной части увеличивается длина алкильной цепи, позволяет оценить значение соотношения гидрофильности и гидрофобности в проявлении антигемолитического эффекта этих молекул.

Цель работы – изучение защитного эффекта представителей гомологического ряда алкил- β ,D-глюкопиранозидов, относящихся к неионным сурфактантам, в условиях гиперосмотического и холодового стресса эритроцитов человека.

Материалы и методы

Гексил- β ,D-глюкопиранозид, октил- β ,D-глюкопиранозид и децил- β ,D-глюкопиранозид были получены от фирмы Calbiochem (США). Все используемые амфифильные и другие реактивы

medium [3]. Hypertonic stress is believed to be one of the principal factors of cryodamage [22]. This enables using the erythrocyte transfer into high-concentrated salines under positive temperatures for modelling the situation, occurring under freezing, and searching for the ways of cell damage prevention. Long ago found-out phenomenon of hypertonic cold stress (cooling of highly dehydrated erythrocytes from 37 down to 0°C) by its manifestations is closely approximating to the processes, damaging cells under freezing [9].

Amphiphilic compounds are capable to cause a protective effect under different types of erythrocyte stress [3, 5, 10, 26]. Antihemolytic activity of a lot of amphiphiles under hypotonic lysis of human erythrocytes was studied in details [13, 16]. Protective effect of non-ionic amphiphilic compounds was revealed under ultrasound-induced lysis [10]. Under hypertonic lysis and hypertonic cold stress not only of human erythrocytes, but animal ones as well, there was noted a high efficiency of some amphiphilic compounds, referred to different classes [3, 5].

Soluble amphiphiles under high concentrations (at the level of critical micelle concentration and higher) are usually used for membrane solubilisation [24]. Under low concentrations these substances may affect the membrane-bound functions of different cells [14], as well as protect them against damages under various stresses [5, 10, 27].

Molecules of amphiphilic compounds comprise the distinctly manifested hydrophilic (polar) and hydrophobic parts. The usage of homologous series of amphiphilic substances, in which under unchanged hydrophilic part there is an increase in alkyl chain length, enables to estimate the value of hydrophilicity and hydrophobicity ratio in manifestation of antihemolytic effect of these molecules.

The research aim is to study a protective effect of representatives of alkyl- β ,D-glucopyranoside homologous series, referred to the non-ionic surfactants, under hyperosmotic and cold stresses of human erythrocytes.

Materials and methods

Hexyl- β ,D-glucopyranoside, octyl- β ,D-glucopyranoside and decyl- β ,D-glucopyranoside were obtained from Calbiochem Company (USA). All the used amphiphilic and other reagents were of “chemically pure” grade. Stock solutions of hexyl-, octyl- and decyl- β ,D-glucopyranoside contained 1.61, 0.268 and 0.022 M, correspondingly.

Erythrocytes were derived from donor blood of group A. After plasma removal the erythrocytes were twice washed-out with isotonic saline (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4) and preserved as a dense sediment not more than 2 hrs at 0°C. All the media were prepared with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4.

были квалификации “х. ч.”. Стоковые растворы гексил-, октил- и децил- β ,D-глюкопиранозида содержали 1,61, 0,268 и 0,022 М соответственно.

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали изотоническим солевым раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0°C. Все среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Гиперосмотический шок осуществляли следующим образом. Готовили стоковую суспензию эритроцитов (гематокрит 7%). Аликвоты клеточной суспензии переносили в пробирки, содержащие 1 мл 4,0 М NaCl и различные концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов. Инкубацию проводили при 37°C в течение 5 мин.

При холодовом шоке клетки инкубировали 10 мин в среде, содержащей 1,2 М NaCl, при температуре 37°C, а затем переносили на 10 мин в среды той же тоничности, содержащие различные концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов и имеющие температуру 0°C.

Конечная концентрация клеток во всех описанных экспериментах была $(3,0-3,2)\times 10^7$ клеток/мл (гематокрит 0,3%).

После описанных выше воздействий целые клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически при длине волны 543 нм определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток выражали как процент от 100 % гемолиза.

Антигемолитическая активность алкилглюкопиранозида (АГ) представлена величиной (в процентах), которая характеризует снижение гемолиза клеток в присутствии вещества по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил [5]. В качестве плато рассматривается область концентраций вещества, при которых наблюдается минимальный гемолиз эритроцитов. Значения эффективной концентрации ($КАГ_{max}$) – это концентрации вещества, соответствующие середине плато.

Экспериментальные результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего. Исследовали эритроциты крови не менее 6 доноров в 2 параллельных пробах. Анализ результатов проводили с помощью критерия Манна-Уитни (Statgraph for Windows).

Результаты и обсуждение

При перенесении эритроцитов человека в среду, содержащую 4,0 М NaCl, клетки повреждаются и гемолиз в зависимости от температуры достигает 70–90% [3]. Для исследования влияния представителей гомологического ряда производных глюкопиранозида на эритроциты человека в условиях гипертонического воздействия использовали

Hyperosmotic stress was realised as follows. There was prepared the erythrocyte stock suspension (7% hematocrit). Cell suspension aliquots were removed into the vials with 1 ml 4.0 M NaCl and differently concentrated alkyl- β ,D-glucopyranosides. Incubation was performed at 37°C within 5 min.

Under erythrocyte cold stress the cells were incubated for 10 min in the medium, containing 1.2 M NaCl at 37°C, then transferred for 10 min into the media with the same tonicity, comprising differently concentrated alkyl- β ,D-glucopyranosides with 0°C temperature.

Final cell concentration in the all described experiments was $(3.0-3.2)\times 10^7$ cells/ml (0.3% hematocrit).

After the described above effects the integral cells were precipitated by centrifugation and hemoglobin amount in a supernatant was spectrophotometrically determined at 543 nm wavelength. Hemoglobin release out of cells was expressed as the percentage of 100% hemolysis.

Antihemolytic activity of alkyl glucopyranoside (AG) is represented by the value (in percentage), characterizing a decreased cell hemolysis in the substance presence in respect to hemolysis in the amphiphile-free sample [5]. As a plateau there is considered the area of substance concentrations, when the minimum erythrocyte hemolysis is observed. The values of efficient concentration (CAG_{max}) are the substance concentrations, corresponding to the plateau midpoint.

The experimental results are presented as the arithmetic mean \pm the standard error of mean. Erythrocytes of at least 6 donors were studied in 2 parallel tests. The results were processed with the Mann-Whitney test (Statgraph for Windows).

Results and discussion

When transferring human erythrocytes into the medium with 4.0 M NaCl the cells are damaged and hemolysis achieves 70–90% depending on the temperature [3]. In order to investigate the effect of representatives of homologous series of glucopyranoside derivatives on human erythrocytes under hypertonic effect we used the alkyl glucopyranosides with alkyl chain length of 6, 8 and 10 carbon atoms: hexyl-, octyl- and decyl- β ,D-glucopyranosides (hereinafter referred as HGP, OGP and DGP, correspondingly). Concentration dependencies of nonionic amphiphilic effect on the level of erythrocyte hypertonic hemolysis at 37°C are represented by the curves 1 in Fig. 1. Adding the alkyl- β ,D-glucopyranosides into the medium with 4.0 M NaCl allows a significant reduction of cell lysis level. The dependencies are of turned-over bell shape: with an increase in amphiphilic concentration in the medium, there are first observed a decrease in hemolysis level, approaching the plateau, then the augmentation of cell damage level, moreover the latter is associated to amphiphilic detergent effect.

алкилглюкопиранозиды с длиной алкильной цепи 6, 8 и 10 углеродных атомов: гексил-, октил- и децил- β ,D-глюкопиранозидов (далее ГГП, ОГП и ДГП соответственно). Концентрационные зависимости влияния неионных амфифилов на уровень гипертонического гемолиза эритроцитов при температуре 37°C представлены кривыми 1 на рис. 1. Добавление алкил- β ,D-глюкопиранозидов в среду, содержащую 4,0 М NaCl, позволяет существенно снизить уровень лизиса клеток. Зависимости имеют перевернутую колоколообразную форму: по мере повышения концентрации амфифилов в среде наблюдаются сначала снижение уровня гемолиза, выход на плато, а затем увеличение уровня повреждения клеток, причем последнее связано с детергентным эффектом амфифилов.

Холодовой шок эритроцитов человека развивается при охлаждении клеток, находящихся в гипертонической среде [8]. Эффект холодого повреждения этих клеток максимально выражен в среде, содержащей 1,2 М NaCl [4]. Поэтому в наших экспериментах эритроциты помещали в 1,2 М NaCl при 37°C, а затем переносили их в среду той же тоничности, имеющую температуру 0°C. Такая постановка эксперимента позволяет максимально повысить скорость охлаждения клеточной суспензии, а также изучить действие амфифилов на этапе охлаждения клеток, когда эритроциты переносят в охлажденный раствор 1,2 М NaCl, в который уже добавлено исследуемое вещество.

Зависимости уровня холодого гемолиза эритроцитов от концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов представлены кривыми 2 на рис. 1. Как видно, все исследуемые вещества эффективно защищают клетки при холодом шоке, однако в более высоких по сравнению с гиперосмотическим шоком концентрациях. Следует отметить, что при использовании ДГП в высоких концентрациях, превышающих 0,13 мМ, наблюдается опалесценция растворов, содержащих 1,2 М NaCl при 0°C, поэтому не удалось получить типичную колоколообразную форму концентрационной зависимости (рис. 1, в, кривая 2).

Защитное действие алкил- β ,D-глюкопиранозидов при холодом шоке эритроцитов отмечается в более широком концентрационном диапазоне, который лежит правее концентрационного оптимума для гиперосмотического лизиса клеток (рис. 1).

Из полученных концентрационных зависимостей гипертонического гемолиза и холодого шока эритроцитов человека (рис. 1) были определены величины максимальной антигемолитической активности глюкопиранозидов (AG_{max}), концентрации веществ, при которых наблюдается максимальная и полумаксимальная (AG_{50}) антигемолитическая активность амфифилов (KAG_{max} и KAG_{50} соответственно) (табл. 1).

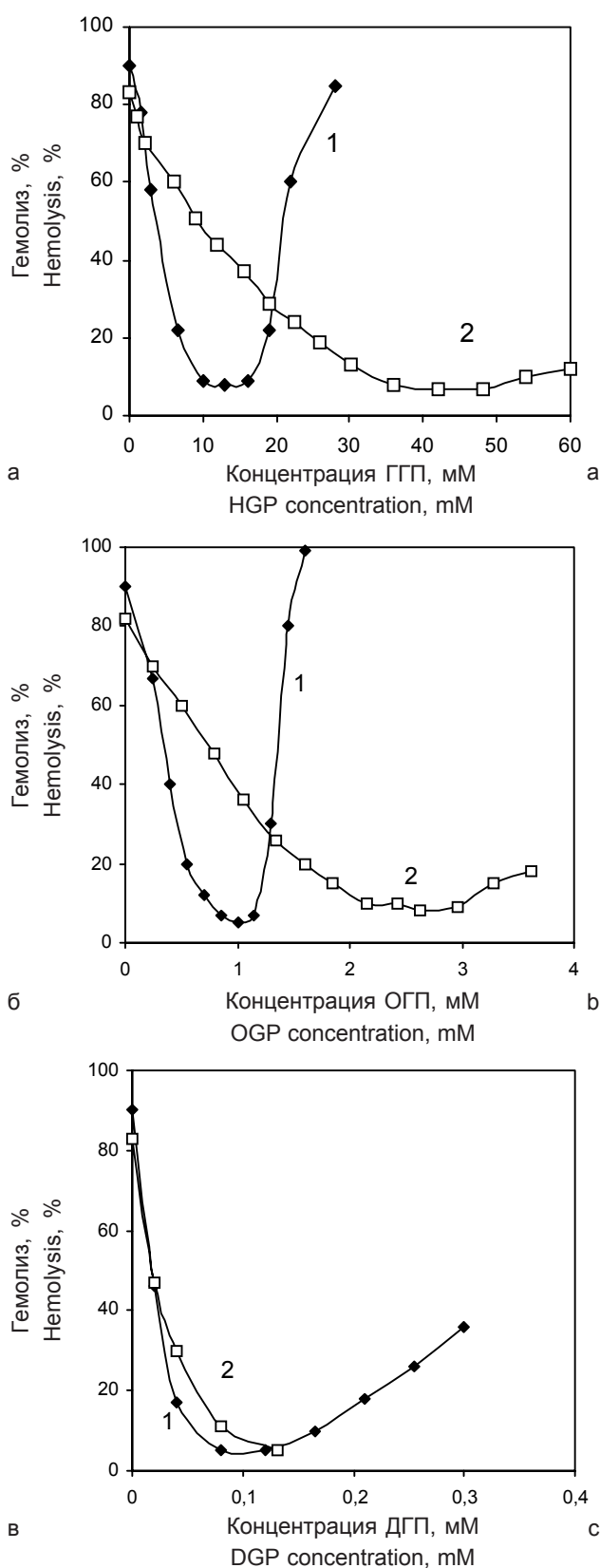


Рис. 1. Концентрационные зависимости влияния алкил- β ,D-глюкопиранозидов на гемолиз эритроцитов в условиях гиперосмотического (1) и холодого (2) шока: а – ГГП; б – ОГП; в – ДГП.

Fig. 1. Dose-response curves of alkyl- β ,D-glucopyranosides influence on erythrocyte hemolysis under hyperosmotic (1) and cold (2) stresses: a – HGP; b – OGP; c – DGP.

Таблица 1. Величины максимальной антигемолитической активности (%) и концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов (мМ), соответствующие максимальной и полумаксимальной протекции эритроцитов в условиях гиперосмотического и холодного шока

Table 1. Values of maximum antihemolytic activity (%) and alkyl- β ,D-glucopyranoside concentration (mM), corresponding to the maximum and half-maximum erythrocyte protection under hyperosmotic and cold stresses.

Вещества Substances	Гиперосмотический шок Hyperosmotic stress				Холодовой шок Cold stress			
	АГ _{макс} AG _{max}	КАГ _{макс} CAG _{max}	КАГ _{нач. плато} CAG _{plateau beg.}	КАГ ₅₀ CAG ₅₀	АГ _{макс} AG _{max}	КАГ _{макс} CAG _{max}	КАГ _{нач. плато} CAG _{plateau beg.}	КАГ ₅₀ CAG ₅₀
ГПП HGP	90 ± 7*	13	10	4	91 ± 7#	42	36	12,1
ОГП OGP	94 ± 5*	1	0,85	0,37	90 ± 8#	2,63	2,15	0,87
ДГП DGP	94 ± 5*	0,1	0,08	0,019	94 ± 5#	—	0,132	0,023

Примечание: различия между величинами недостоверны ($p < 0,01$): * – при гиперосмотическом лизисе; # – холодном шоке.
Notes: differences between values are not statistically significant ($p < 0.01$): * – under hyperosmotic lysis; # – under cold stress.

Концентрация, при которой наблюдается максимальная протекция клеток в условиях стресса, определяется как эффективная концентрация амфифила, соответствующая середине плато концентрационной зависимости. Так как при холодном шоке для ДГП из-за развития процесса мицеллообразования в среде, содержащей 1,2 М NaCl при 0°C, плато не было достигнуто, то в табл.1 представлены и значения концентраций гомологов, которые соответствуют началу плато (КАГ_{нач. плато}).

Следует отметить, что концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов в среде, при которой вещества защищают клетки от гиперосмотического повреждения и холодного шока, снижаются с ростом длины алкильной цепи в ряду ГПП > ОГП > ДГП. Концентрации гомологов глюкопиранозида, при которых наблюдается максимальная защита клеток от гиперосмотического лизиса и холодного шока, с удлинением алкильной цепи на каждые две CH_2 -группы снижаются более чем в 10 и 15 раз соответственно (табл. 1).

Характерная особенность строения молекул амфифильных веществ – наличие в их составе полярной (гидрофильной) и неполярной (гидрофобной) частей. При определенной концентрации амфифильных веществ их молекулы собираются в мицеллы. Термодинамической движущей силой мицеллообразования являются гидрофобные взаимодействия: углеводородная часть амфифильной молекулы выталкивается из водной среды, в результате чего образуются мицеллы, внутренняя часть которых состоит из углеводорода, а внешняя, обращенная к водному раствору, – из полярных групп. Концентрации амфифильных веществ в растворе, при которых образуются в заметных количествах устойчивые мицеллы, называют

Cold stress of human erythrocytes is in progress under cooling of cells, being in hypertonic medium [8]. The effect of cold damage of these cells is maximally manifested in the medium with 1.2 M NaCl [4]. Therefore in our experiments the erythrocytes were placed into 1.2 M NaCl at 37°C, then transferred into 0°C medium with the same tonicity. Such experiment performance enables the maximum augmentation of cooling rate of cell suspension, as well as the study of amphiphile effect at the stage of cell cooling, when erythrocytes are transferred into the 1.2 M NaCl cooled solution, where the studied substance has been already added.

Dependencies of erythrocyte cold hemolysis level on alkyl- β ,D-glucopyranoside concentration are presented by curves 2 in Fig. 1. As it is seen, all the studied substances protect efficiently the cells under cold stress, but under higher concentrations, compared to a hyperosmotic stress. Of note is the fact, that when using highly-concentrated DGP, exceeding 0.13 mM, there is observed the opalescence of solutions, containing 1.2 M NaCl at 0°C, therefore we did not manage to obtain a typical bell shape of concentration dependency (Fig. 1, c, curve 2).

Protective effect of alkyl- β ,D-glucopyranosides under erythrocyte cold stress is noted in a wider concentration range, being situated to the right of the concentration optimum for cell hyperosmotic lysis (Fig. 1).

Proceeding from the concentration dependencies of hypertonic hemolysis and cold stress of human erythrocytes (Fig. 1) we determined the values of maximum antihemolytic activity of glucopyranosides (AG_{max}), concentrations of substances, when the maximum and half-maximum (AG_{50}) antihemolytic amphiphil activities were observed (CAG_{max} and CAG_{50} , correspondingly) (Table 1).

критической концентрации мицеллообразования (*ККМ*). Величины *ККМ* амфифилов зависят от длины алкильной цепи и существенно снижаются с ее ростом [1,6].

Известно, что зависимость $lg(KKM)$ в гомологичных рядах разных детергентов от числа атомов углерода в их алкильной цепи имеет линейный характер [1, 6]:

$$lg(KKM) = A - Bn, \quad (1)$$

где n – число атомов углерода в алкильной цепи амфифильных веществ; A и B – константы. В соответствии с физическим смыслом величина B – это свободная энергия мицеллообразования, приходящаяся на 1 атом углерода (на 1 метиленовую группу), связанная с переносом молекулы сурфактанта из истинного раствора в мицеллы.

Зависимость *ККМ* алкил- β ,D-глюкопиранозидов от длины алкильной цепи n представлена прямой 1 на рис. 2 в полулогарифмических координатах (величины *ККМ* взяты из работы [6]). В тех же координатах представлены для гиперосмотического и холодового шока эритроцитов зависимости концентраций алкилглюкопиранозидов, соответствующих началу плато, и для гиперосмотического лизиса эритроцитов – зависимость эффективных концентраций от числа углеродных атомов в алкильной цепи гомологов алкилглюкопиранозидов.

Все представленные зависимости характеризуются линейностью с высоким значением достоверности аппроксимации, $R \geq 0,999$ (рис. 2).

При гиперосмотическом лизисе эритроцитов зависимости $lg KAG_{\text{макс}}$ и $lg KAG_{\text{нач. плато}}$ глюкопиранозидов от длины их алкильной цепи параллельны. Это позволяет допустить, что при холодовом шоке представленная зависимость $lg KAG_{\text{нач. плато}}$ может в определенной степени отражать характер зависимости эффективных концентраций ($KAG_{\text{макс}}$) алкилглюкопиранозидов от числа углеродных атомов в гидрофобной части молекулы.

Углы наклона прямых зависимостей $lg KAG_{\text{макс}}$ и $lg KAG_{\text{нач. плато}}$ при гиперосмотическом лизисе в точности совпадают с коэффициентом B в уравнении (1), а зависимость $lg KAG_{\text{нач. плато}}$ для холодового шока также имеет наклон, близкий к величине B (рис. 2). Это значит, что доминирующую роль в эффективности алкил- β ,D-глюкопиранозидов при гиперосмотическом лизисе и холодовом шоке эритроцитов, как и при мицеллообразовании, играет гидрофобный эффект.

Следует отметить, что на самом деле с увеличением осмолярности среды наблюдается снижение величин *ККМ* неионных детергентов [30]. Исходя из того, что зависимости $lg KKM$ децил- и

The concentration, when the maximum cell protection under stress conditions is observed, is determined as an efficient amphiphilic concentration, corresponding to the plateau midpoint of concentration dependency. Since under cold stress for DGP due to the micelle-formation process development in the medium, containing 1.2 M NaCl at 0°C, the plateau was not achieved, the Table 1 showed the values of homologue concentrations, corresponding to the plateau beginning ($CAG_{\text{plateau beg.}}$).

Of note is the fact, that the concentrations of alkyl- β ,D-glucopyranosides in the medium, where substances protect cells against hyperosmotic damage and cold stress, reduce with growth of alkyl chain length in HGP > OGP > DGP series. The concentrations of glucopyranoside homologues, when the maximum cell protection against hyperosmotic lysis and cold stress are observed, with alkyl chain extension by each two CH_2 -groups reduce more, than in 10 and 15 times, correspondingly (Table 1).

The feature in molecular structure of amphiphilic substances is the presence in their composition of polar (hydrophilic) and non-polar (hydrophobic) parts. Under the certain concentration of amphiphilic substances their molecules come together in micelles. Hydrophobic interactions are a thermodynamic active force in micelle-formation: hydrocarbon part of amphiphilic molecule is expelled out of aqueous medium, resulting in micelle formation, an internal part of which consists of hydrocarbon, but an external one, turned to an aqueous solution, does of polar groups. The concentrations of amphiphilic substances in the solution, when the resistant micelles are formed in detectable amounts, are named as the critical micelle concentration (*CMC*). The values of amphiphilic *CMC* depend on the alkyl chain length and significantly decrease with its growth [1, 6].

The dependency of $lg(CMC)$ in homologous series of different detergents on carbon atom number in their alkyl chain is known to be of linear character [1, 6]:

$$lg(CMC) = A - Bn, \quad (1)$$

where n is the number of carbon atoms in alkyl chain of amphiphilic substances, A and B are the constants. According to the physical meaning the value B is a free energy of micelle-formation per 1 carbon atom (per 1 methylene group), related to the surfactant molecule transfer from a true solution into micelles.

Dependency of alkyl- β ,D-glucopyranoside *CMC* on the alkyl chain length n is represented by the line 1 in Fig. 2 in semilogarithmic coordinates (*CMC* values are taken from the paper [6]). Within the same coordinates for erythrocyte hyperosmotic and cold stresses there are shown the dependencies of alkyl- β ,D-glucopyranoside concentrations, corresponding to the plateau

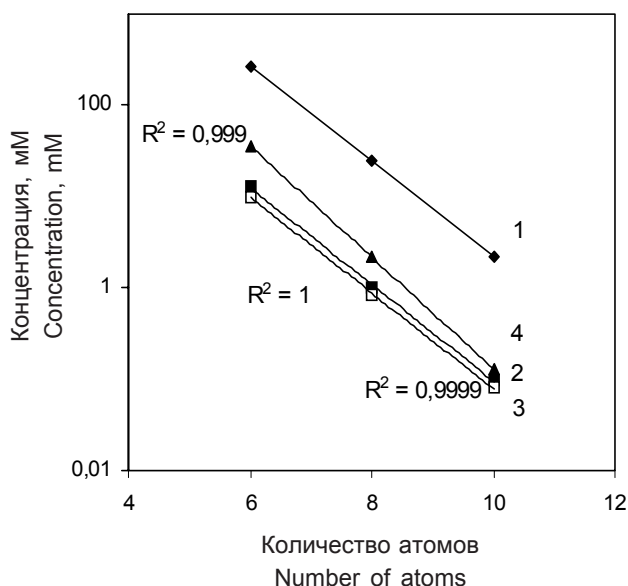


Рис. 2. Полулогарифмическая зависимость KKM (1), концентраций при гиперосмотическом шоке KAG_{max} и $KAG_{нач.плато}$ (2 и 3 соответственно) и холодном шоке $KAG_{нач.плато}$ (4) от числа углеродных атомов в алкильной цепи алкил- β ,D-глюкопиранозидов.

Fig. 2. Semilogarithmic dependency of CMC (1), concentrations under hyperosmotic stress of CAG_{max} and $CAG_{plateau beg.}$ (2 and 3, correspondingly) and cold stress of $CAG_{plateau beg.}$ (4) on a number of carbon atoms in alkyl chain of alkyl- β ,D-glucopyranosides.

додецилмальтозида, а также октилглюкопиранозидов от концентрации NaCl в среде (на основании результатов работы [30]) параллельны, можно допустить, что подобный характер зависимостей $lg KKM$ от осмолярности раствора свойственен и представителям гомологического ряда алкилглюкопиранозидов. Поэтому можно полагать, что величины KKM гексил-, октил- и децилглюкопиранозидов будут достаточно синхронно изменяться с увеличением осмолярности среды.

Алкилглюкопиранозиды характеризуются высокой антигемолитической активностью, которая при гипертоническом лизисе и холодном шоке эритроцитов превышает 90%. Предполагалось, что, несмотря на отличающиеся в десятки раз протектирующие концентрации амфифильных соединений в водных растворах, их концентрации в мембране примерно одинаковы для равного по величине эффекта [25].

Для проверки этого предположения была предпринята попытка оценить величину R , равную количеству молекул липида, приходящемуся на 1 молекулу детергента, при максимальной (AG_{max}) и полумаксимальной (AG_{50}) защите клеток при различных типах лизиса. Для этого необходимы значения коэффициентов распределения (K_p) алкилглюкопиранозидов в системе мембрана-вода. К сожалению, доступна была лишь величина коэффи-

beginning, and for erythrocyte hyperosmotic lysis there is the dependency of efficient concentrations on a number of carbon atoms in alkyl chain of alkyl glucopyranoside homologues.

All the presented dependencies are characterised by the linearity with a high value of statistical significance of approximation, $R \geq 0.999$ (Fig. 2).

Under erythrocyte hyperosmotic lysis the dependencies of $lg CAG_{max}$ and $lg CAG_{plateau beg.}$ of glucopyranosides on the length of their alkyl chain are parallel. This enables admitting the fact, that under cold stress the presented dependency of $lg CAG_{plateau beg.}$ may in a certain extent reflect the dependency character of efficient concentrations (CAG_{max}) of alkyl glucopyranosides on a number of carbon atoms in hydrophobic part of molecule.

The slope angles of lines of $lg CAG_{max}$ and $lg CAG_{plateau beg.}$ dependencies under hyperosmotic lysis coincide precisely with the coefficient B in the equation (1), but the $lg CAG_{plateau beg.}$ dependency for cold stress has also the slope, being close to the value B (Fig. 2). This means, that a hydrophobic effect plays a dominating role in the efficiency of alkyl- β ,D-glucopyranosides under hyperosmotic lysis and cold stress of erythrocytes and micelle-formation as well.

Of note is the fact, that indeed with an increase in medium osmolarity there is observed a decrease in CMC values of non-ionic detergents [30]. Proceeding from the fact, that the dependencies of $lg CMC$ of decyl- and dodecyl maltoside, as well as octyl glucopyranoside on NaCl concentration in the medium (basing on the research results [30]) are parallel, we may admit the similar character of $lg CMC$ dependencies on solution osmolarity to be inherent to representatives of alkyl glucopyranoside homologous series as well. Therefore we may suggest, that the CMC values of hexyl-, octyl- and decyl glucopyranosides will change quite synchronously with medium osmolarity rise.

Alkyl glucopyranosides are characterized with a high antihemolytic activity, exceeding 90% under hypertonic lysis and cold stress of erythrocytes. One assumed, that in spite of differing in tens times protecting concentrations of amphiphilic compounds in aqueous solutions, their concentrations in membrane were approximately the same for the equal in value effect [25].

In order to verify this assumption there was attempted to estimate the value R , equal to the number of lipid molecules per detergent molecule, under the maximum (AG_{max}) and half-maximum (AG_{50}) cell protections under various lysis types. For this purpose the values of partition coefficients (C_p) of alkyl glucopyranosides in the membrane-water system are needed. Unfortunately, only the value of OGP distribution coefficient in this system for vesicles from egg phosphatidyl choline ($C_p = 63$ [20]) was available.

циента распределения ОГП в этой системе для ве-
зикул из яичного фосфатидилхолина ($K_p = 63$ [20]).
Однако как для сложных эфиров, так и для других
производных алифатического ряда зависимости
 $lg K_p$ от числа углеродных атомов в алкильной цепи
гомологов n характеризуются линейностью [1]:

$$lg K_p = A' + B'n. \quad (2)$$

Кроме того, для достаточно большого числа
гомологических рядов детергентов существует
обратная зависимость между $lg K_p$ и $lg KKM$ (с
коэффициентом -1), откуда следует, что $B' = B$.
Вышеизложенное позволяет экстраполировать
зависимость $lg K_p$ от n прямой линией для того,
чтобы приблизительно оценить коэффициенты
распределения DGP и HGP: 730 и 5,5 соответст-
венно.

Поскольку в работе использовали неионные де-
тергенты, то во внимание не принимали возможное
влияние ионной силы на коэффициенты распределе-
ния и полагали, что детергенты распределяются
только в липидные области мембраны [24, 31].

Для оценки отношения количества липида, при-
ходящегося на молекулу амфифильного вещества
в эритроцитарной мембране (R) были использованы
следующие величины: $5,2 \times 10^{-13}$ г липида/гель
[11], 0,658 л/моль – парциальный молярный объем
липидной фазы эритроцитарной мембраны [18]. При
расчете объема неполярной фазы исходили из того,
что плотность липида 1 г/мл [15].

Полученные величины R для максимального и
полу максимального защитного эффекта алкил-
глюкопиранозидов для исследуемых типов гемо-
лиза эритроцитов представлены в табл. 2. Видно,
что при использовании алкил- β ,D-глюкопирано-
зидов в концентрациях, при которых проявляется
их максимальная защита (AG_{max} 90–94%), величи-
на R действительно мало зависит от длины алкиль-
ной цепи n . Величины R при максимальной протек-
ции (AG_{max}) и при использовании эффективных
концентраций составляют 21,0–24,1 и 6,6–9,2 для
гиперосмотического и холододового гемолиза эритро-
цитов соответственно. Величины R при макси-
мальной протекции (AG_{max}), но при использовании
концентраций амфифилов, соответствующих нача-
лу плато, составляют для гиперосмотического ли-
зиса и холододового шока 26,3–28,4 и 7,7–15,8 соот-
ветственно.

Защитный эффект амфифилов в условиях гипо-
тонического шока эритроцитов известен и описан
для многих структурно-разнородных соединений
[12, 13, 16, 25]. Механизм, лежащий в основе анти-
гемолитического эффекта амфифилов при гипото-
ническом стрессе эритроцитов, полностью не
выяснен. Чаще всего антигемолитическое дейст-

However for both compound ethers and other deriva-
tives of aliphatic series the $lg C_p$ dependencies on a
number of carbon atoms in alkyl chain of homologues
 n are characterized by the linearity [1]:

$$lg K_p = A' + B'n. \quad (2)$$

In addition, for quite a big number of detergent ho-
mologous series there is an inverse dependency be-
tween $lg C_p$ and $lg CMC$ (with coefficient -1), whence
it follows, that $B' = B$. The mentioned above enables
to extrapolate the dependency $lg C_p$ vs. n by straight
line for an approximate assessment of distribution
coefficients DGP and HGP: 730 and 5.5, correspon-
dingly.

Since we used the non-ionic detergents in the work,
we did not take into account a possible effect of ionic
strength on partition coefficients and we believed, that
the detergents were distributed only into the membrane
lipid areas [24, 31].

In order to estimate the ratio of lipid number per a mole-
cule of amphiphile substance in erythrocyte membrane
(R) we used the following values: 5.2×10^{-13} g of lipid
per ghost [11], 0.658 l/mol is partial molar volume of
lipid phase of erythrocyte membrane [18]. When
calculating the non-polar phase volume we proceeded
from 1 g/ml lipid density [15].

The obtained values R for the maximum and half-
maximum protective effects of alkyl glucopyranosides
for studied types of erythrocyte hemolysis are shown
in the Table 2. It appears, that when using alkyl- β ,D-
glucopyranosides in concentrations, when their maxi-
mum protection (AG_{max} 90–94%) is manifested, the
value R really slightly depends on the alkyl chain length
 n . The values R under the maximum protection (AG_{max})
and when using the efficient concentrations are 21.0–

Таблица 2. Отношение липид/амфифил в
эритроцитарной мембране при максимальной (AG_{max})
протекции эритроцитов в условиях
гиперосмотического и холододового шока

Table 2. Lipid/amphiphil ratio in erythrocyte membrane at
the maximum (AG_{max}) erythrocyte protection under
hyperosmotic and cold stresses

Вещества Substances	Гиперосмотический шок Hyperosmotic stress		Холододовый шок Cold stress	
	КАГ _{max} CAG _{max}	КАГ _{нач. плато} CAG _{plateau beg.}	КАГ _{max} CAG _{max}	КАГ _{нач. плато} CAG _{plateau beg.}
ГГП HGP	21,2	27,6	6,6	7,7
ОГП OGP	24,1	28,4	9,2	9,7
ДГП DGP	21,0	26,3	–	15,8

вие веществ в данном случае объясняют расширением площади мембраны при встраивании молекул этих соединений в липидный бислой и увеличением значения отношения площадь поверхности/объем клетки, что позволяет эритроциту достигать большего объема в гипотонической среде прежде, чем будет превышено критическое мембранное натяжение [25]. Однако тот факт, что антигемолитическая активность амфифильных соединений наблюдается также при гиперосмотическом и холодном стрессе эритроцитов непосредственно в момент действия стрессового фактора, т. е. перед тем, как клетки начинают набухать [8], ставит под сомнение правомерность такого объяснения в качестве универсального. Кроме того, такая точка зрения противоречит данным работ [9, 13], в которых было показано, что различные амфифилы, оказывающие существенный антигемолитический эффект, уменьшают величину критического гемолитического объема или не оказывают на нее никакого влияния.

Известно, что встраивание различных инородных амфифильных молекул в мембрану способно изменить подвижность жирнокислотных цепей липидов [31], нарушить липидную упаковку в мембранном бислое и систему водородных связей между полярными головками фосфолипидов [17], изменить взаимодействия на границах мембранных доменов [29] и вызвать трансмембранное перераспределение фосфолипидов [21, 23]. Перераспределение амфифильных молекул в мембранах также может сопровождаться образованием транзитных небислойных структур, которые, как предполагают, представляют собой гексагональные фазы (H_{11} -фазы) или инвертированные мицеллы [7, 16].

Данные о взаимодействии алкил- β ,D-глюкопиранозидов с биологическими мембранами и липидными везикулами главным образом доступны для ОГП. Этот детергент широко используется при реконструировании функциональных мембран и, следовательно, интенсивно изучается [19, 30, 31]. ОГП и его гомологи уменьшают температуру фазового перехода липидов [28]. С помощью метода ^2H -ЯМР спектроскопии было показано [31], что добавление ОГП существенно увеличивает флуктуацию сегментов жирнокислотных цепей фосфолипидов, находящихся во внутренней части липидного бислоя, но почти не оказывает влияния на область их полярных голов. Пертурбирующий эффект ОГП отличается от структурно-родственного, но имеющего большую гидрофильную голову монододецилового эфира октаэтилена, который вызывает общее разупорядочивание на всех его уровнях [31].

24.1 and 6.6–9.2 for hyperosmotic and cold hemolysis of erythrocytes, correspondingly. The values R under the maximum protection (AG_{max}), but when using the amphiphilic concentrations, corresponding to the plateau beginning, make for hyperosmotic lysis and cold stress 26.3–28.4 and 7.7–15.8, correspondingly.

Amphiphilic protective effect under erythrocyte hypotonic stress is known and described for many structurally heterogeneous compounds [12, 13, 16, 25]. The mechanism, being the base for amphiphilic antihemolytic effect under erythrocyte hypotonic stress has not been completely studied. An antihemolytic effect of substances in this case is mostly explained by the membrane area extension during these compounds' molecules building into a lipid bilayer and an increased value of ratio of surface area/cell volume, that enables an erythrocyte to achieve a larger volume in hypotonic medium before a critical membrane tension will be exceeded [25]. However the fact, that an antihemolytic activity of amphiphilic compounds is also observed under hyperosmotic and cold stresses of erythrocytes directly in the moment of stress factor effect, *i. e.* before cells begin swelling [8], puts in question the validity of this explanation as a universal one. In addition, this point of view contradicts the research data [9, 13], where different amphiphiles, causing a significant antihemolytic effect, were shown to reduce the value of critical hemolytic volume or cause no effect on it.

Building of different alien amphiphilic molecules into a membrane is known as capable to change the motility of fatty acid lipid chains [31], disorder a lipid package in a membrane bilayer and hydrogen bond system between phospholipid polar heads [17], change the interactions at the boundaries of membrane domains [29] and cause a transmembrane redistribution of phospholipids [21, 23]. The redistribution of amphiphilic molecules in membranes may be also accompanied with forming the transitory non-bilayer structures, which are assumed to represent the hexagonal phases (H_{11} phases) or inverted micelles [7, 16].

The data about interaction of alkyl- β ,D-glucopyranosides with biological membranes and lipid vesicles are mostly available for OGP. This detergent is widely applied when reconstructing functional membranes and, consequently, is intensively studied [19, 30, 31]. OGP and its homologues decrease the temperature of lipid phase transition [28]. Using the ^2H -NMR spectroscopy method there was demonstrated [31], that the OGP adding significantly increased the fluctuation of segments of phospholipid fatty acid chains, being in internal part of lipid bilayer, but hardly affected the area of their polar heads. The OGP perturbing effect differs from a structurally related, but having bigger hydrophilic head octaethylene monododecyl ether, causing a total disordering at all its levels [31].

Можно полагать, что механизм антигемолитического действия амфифилов при различных типах стрессов является универсальным. Протектирующее действие амфифилов, вероятно, связано с большим или меньшим неспецифическим нарушением мембранной структуры эритроцитов при быстром распределении амфифильных молекул в липидном бислое [7]. В результате такой пертурбации мембранная структура становится более лабильной, что позволяет ей лучше адаптироваться к действию стресса. Между тем конкретное проявление антигемолитической активности зависит как от типа стресса, так и от особенностей влияния амфифильного вещества на эритроцитарную мембрану.

Выводы

Неионные производные глюкопиранозида проявляют высокую антигемолитическую активность при гиперосмотическом гемолизе и холодовом шоке эритроцитов. Показано, что доминирующую роль в эффективности алкил- β ,D-глюкопиранозидов, как и при мицеллообразовании, играет гидрофобный эффект. Определено, что алкил- β ,D-глюкопиранозиды при одинаковых величинах антигемолитической активности и значительно различающихся водных концентрациях имеют примерно равные концентрации в мембране эритроцита.

Литература

1. *Абрамзон А.А.* Поверхностно-активные вещества: Свойства и применение.— Л.: Химия, 1981.— 304 с.
2. *Дюпортал Г., Козлов А.С.* Вплив алкілглюкопіранозидів на термотропні властивості ліпосом різного складу і мембран еритроцитів // Тез. доп. II з'їзду Укр. біофізичного товариства.— Харків, 1998.— С. 99.
3. *Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. криобиологии.— 2004.— №3.— С. 51–57.
4. *Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Порівняльний аналіз гіпертонічного криогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища // Біологія тварин.— 2006.— Т. 8, №1-2.— С. 123–129.
5. *Ершов С.С., Писаренко Н.А., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Вплив катіонних та аніонних амфифільних сполук на гіпертонічний криогемоліз еритроцитів ссавців // Фізіологічний журнал.— 2007.— Т. 53, №4.— С. 78–84.
6. *Холмберг К., Йёнссон Б., Кронберг Б., Линдман Б.* Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах.— М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007.— 527 с.
7. *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.
8. *Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.— 1995.— Т. 60, №10.— С. 1624–1631.
9. *Beresford R.A., Fastier F.N.* Effects of some S-alkylthiourea and related compounds on the osmotic fragility and the

One may believe, that the mechanism of antihemolytic effect of amphiphiles under different stress types is a universal one. Protecting effect of amphiphiles is probably associated to a greater or lesser non-specific disorder in erythrocyte membrane structure under rapid distribution of amphiphilic molecules in a lipid bilayer [7]. As a result of this perturbation a membrane structure becomes more labile, allowing its better adaptation to stress effect. However a specific manifestation of antihemolytic activity depends on both stress type and peculiarities of amphiphilic substance effect on erythrocyte membrane.

Conclusions

Non-ionic derivatives of glucopyranoside manifest a high antihemolytic activity under hyperosmotic hemolysis and cold stress of erythrocytes. Hydrophobic effect was shown to play a dominating role in alkyl- β ,D-glucopyranoside efficiency and during micelle formation as well. Alkyl- β ,D-glucopyranosides at equal values of antihemolytic activity and significantly differing aqueous concentrations were determined to have approximately equal concentrations in erythrocyte membrane.

References

1. *Abramzon A.A.* Surface-active substances: properties and application.— Leningrad: Khimiya, 1981.— 304 p.
2. *Duportail G., Kozlov A.S.* Effect of alkyl glucopyranosides on thermotropic peculiarities of liposomes of different composition and erythrocyte membranes // Proceed. of 2nd Meeting of Ukr. Biophysical Society.— Kharkov, 1998.— P. 99.
3. *Ershov S.S., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Sensitivity of mammalian erythrocytes to the change in temperature and osmotic conditions of medium // Problems of Cryobiology.— 2004.— N3.— P. 51–57.
4. *Ershov S.S., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Comparative analysis of erythrocyte hypertonic cryohemolysis of different animal species when changing osmotic and temperature medium conditions // Biologiya Tvaryn.— 2006.— Vol. 8, N1-2.— P. 123–129.
5. *Ershov S.S., Pisarenko N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Effect of cation and anion amphiphilic compounds on hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes // Fiziologichnyy Zhurnal.— 2007.— Vol. 53, N4.— P. 78–84.
6. *Kholmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.* Surface-active substances and polymers in aqueous solutions.— Moscow, 2007.— 527 p.
7. *Tsybal L.V., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Modification with chlorpromazine of structural and functional state of erythrocyte membranes // Biol. Membrany.— 2005.— Vol. 22, N4.— P. 327–335.
8. *Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A.* Antihemolytic effect of chlorpromazine under hyperosmotic and cold stresses of erythrocytes // Biokhimiya.— 1995.— Vol. 60, N10.— P. 1624–1631.
9. *Beresford R.A., Fastier F.N.* Effects of some S-alkylthiourea and related compounds on the osmotic fragility and the membrane expansion of human erythrocytes // Br. J. Pharmacol.— 1980.— Vol. 71, N1.— P. 253–258.
10. *Cheng J.Y., Riesz P.* Mechanism of the protective effects of long chain n-alkyl glucopyranosides against ultrasound-

- membrane expansion of human erythrocytes // *Br. J. Pharmacol.*– 1980.– Vol. 71, N1.– P. 253–258.
10. *Cheng J.Y., Riesz P.* Mechanism of the protective effects of long chain n-alkyl glucopyranosides against ultrasound-induced cytolysis of HL-60 cells // *Ultrason. Sonochem.*– 2007.– Vol. 14, N5.– P. 667–671.
 11. *Chi L.-M., Wu W.-G.* Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. Quantitative light microscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements // *Biophys. J.*– 1990.– Vol. 57, N6.– P. 1225–1232.
 12. *Dubnickova M., Bobrowska-Hagerstrand M., Soderstrom T. et al.* Gemini (dimeric) surfactant perturbation of the human erythrocyte // *Acta Biochim. Pol.*– 2000.– Vol. 47, N3.– P. 651–660.
 13. *Eskelinen S., Saukko P.* The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // *Biorheology.*– 1984.– Vol. 21, N3.– P. 363–377.
 14. *Eytan G.D., Broza R., Shalitin Y.* Gramicidin S and dodecylamine induce leakage and fusion of membranes at micromolar concentrations // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1988.– Vol. 937, N2.– P. 387–397.
 15. *Franks N.P., Lieb W.R.* Is membrane expansion relevant to anaesthesia? // *Nature.*– 1981.– Vol. 292, N5820.– P. 248–251.
 16. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem.-Biol. Interactions.*– 1991.– Vol. 79, N3.– P. 335–347.
 17. *Hanpft R., Mohr K.* Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1985.– Vol. 814, N1.– P. 156–162.
 18. *Malheiros S.V.P., de Paula E., Merelles N.C.* Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis // *Biochem. Biophys. Acta.*– 1998.– Vol. 1373, N2.– P. 332–340.
 19. *Ménager C., Guemghar D., Perzynski R. et al.* Lipid bilayer elasticity measurements in giant liposomes in contact with a solubilizing surfactant // *Langmuir.*– 2008.– Vol. 24, N9.– P. 4968–4974.
 20. *Ollivon M., Eidelman O.* Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside // *Biochemistry.*– 1988.– Vol. 27, N5.– P. 2839–2846.
 21. *Pantaler E., Kamp D., Haest C.W.* Acceleration of phospholipid flip-flop in erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1509, N1–2.– P. 397–408.
 22. *Pegg D.E., Diaper M.P.* The effect of initial tonicity on freeze/thaw injury to human red cells suspended in solutions of sodium chloride // *Cryobiology.*– 1991.– Vol. 28, N1.– P. 18–35.
 23. *Schwichtehövel K., Deuticke B., Haest C.W.M.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1992.– Vol. 1111, N1.– P. 35–44.
 24. *Seddon A.M., Curnow P., Booth P.J.* Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2004.– Vol. 1666, N 1–2.– P. 105–117.
 25. *Seeman P.* The membrane actions of anesthetics and tranquilizers // *Pharmacol. Rev.*– 1972.– Vol. 24, N4.– P. 586–655.
 26. *Shpakova N.M., Koba L.V., Bondarenko V.A. et al.* Amphiphilic substances increase the stability of erythrocytes to the action of cold and hyperosmotic stress // *Proceedings of the 34th Annual Meeting of Society for Cryobiology.*– Barcelona, 1997.– P. 160.
 27. *Synchykova O.P., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Effect of alkyl-beta,d-glucopyranosides on hypertonic haemolysis of erythrocytes // *Bioelectrochemistry.*– 2004.– Vol. 62, N2.– P. 163–167.
 28. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time, and osmotic stress // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N5.– P. 507–521.
 - induced cytolysis of HL-60 cells // *Ultrason. Sonochem.*– 2007.– Vol. 14, N5.– P. 667–671.
 11. *Chi L.-M., Wu W.-G.* Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. Quantitative light microscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements // *Biophys. J.*– 1990.– Vol. 57, N6.– P. 1225–1232.
 12. *Dubnickova M., Bobrowska-Hagerstrand M., Soderstrom T. et al.* Gemini (dimeric) surfactant perturbation of the human erythrocyte // *Acta Biochim. Pol.*– 2000.– Vol. 47, N3.– P. 651–660.
 13. *Eskelinen S., Saukko P.* The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // *Biorheology.*– 1984.– Vol. 21, N3.– P. 363–377.
 14. *Eytan G.D., Broza R., Shalitin Y.* Gramicidin S and dodecylamine induce leakage and fusion of membranes at micromolar concentrations // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1988.– Vol. 937, N2.– P. 387–397.
 15. *Franks N.P., Lieb W.R.* Is membrane expansion relevant to anaesthesia? // *Nature.*– 1981.– Vol. 292, N5820.– P. 248–251.
 16. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem.-Biol. Interactions.*– 1991.– Vol. 79, N3.– P. 335–347.
 17. *Hanpft R., Mohr K.* Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1985.– Vol. 814, N1.– P. 156–162.
 18. *Malheiros S.V.P., de Paula E., Merelles N.C.* Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis // *Biochem. Biophys. Acta.*– 1998.– Vol. 1373, N2.– P. 332–340.
 19. *Ménager C., Guemghar D., Perzynski R. et al.* Lipid bilayer elasticity measurements in giant liposomes in contact with a solubilizing surfactant // *Langmuir.*– 2008.– Vol. 24, N9.– P. 4968–4974.
 20. *Ollivon M., Eidelman O.* Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside // *Biochemistry.*– 1988.– Vol. 27, N5.– P. 2839–2846.
 21. *Pantaler E., Kamp D., Haest C.W.* Acceleration of phospholipid flip-flop in erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1509, N1–2.– P. 397–408.
 22. *Pegg D.E., Diaper M.P.* The effect of initial tonicity on freeze/thaw injury to human red cells suspended in solutions of sodium chloride // *Cryobiology.*– 1991.– Vol. 28, N1.– P. 18–35.
 23. *Schwichtehövel K., Deuticke B., Haest C.W.M.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1992.– Vol. 1111, N1.– P. 35–44.
 24. *Seddon A.M., Curnow P., Booth P.J.* Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2004.– Vol. 1666, N 1–2.– P. 105–117.
 25. *Seeman P.* The membrane actions of anesthetics and tranquilizers // *Pharmacol. Rev.*– 1972.– Vol. 24, N4.– P. 586–655.
 26. *Shpakova N.M., Koba L.V., Bondarenko V.A. et al.* Amphiphilic substances increase the stability of erythrocytes to the action of cold and hyperosmotic stress // *Proceedings of the 34th Annual Meeting of Society for Cryobiology.*– Barcelona, 1997.– P. 160.
 27. *Synchykova O.P., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Effect of alkyl-beta,d-glucopyranosides on hypertonic haemolysis of erythrocytes // *Bioelectrochemistry.*– 2004.– Vol. 62, N2.– P. 163–167.
 28. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time, and osmotic stress // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N5.– P. 507–521.
 29. *Van Osdol W.W., Ye Q., Johnson M.L., Biltonen R.L.* Effects of the anesthetic dibucaine on the kinetics of the gel-liquid crystalline transition of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles // *Biophys. J.*– 1992.– Vol. 63, N4.– P. 1011–1117.

29. *Van Osdol W.W., Ye Q., Tohnson M.L., Biltonen R.L.* Effects of the anesthetic dibucaine on the kinetics of the gel-liquid crystalline transition of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles // *Biophys. J.*– 1992.– Vol. 63, N4.– P. 1011–1117.
30. *Walter A., Kuehl G., Barnes K., Van der Waerdt G.* The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1508, N1-2.– P. 20–33.
31. *Wenk M.R., Alt T., Seelig A., Seelig J.* Octyl-beta-D-glucopyranoside partitioning into lipid bilayers: thermodynamics of binding and structural changes of the bilayer // *Biophys. J.*– 1997.– Vol. 72, N47.– P. 1719–1731.
30. *Walter A., Kuehl G., Barnes K., Van der Waerdt G.* The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1508, N1-2.– P. 20–33.
31. *Wenk M.R., Alt T., Seelig A., Seelig J.* Octyl-beta-D-glucopyranoside partitioning into lipid bilayers: thermodynamics of binding and structural changes of the bilayer // *Biophys. J.*– 1997.– Vol. 72, N47.– P. 1719–1731.

Accepted 06.10.2009

*Поступила 06.10.2009
Рецензент Н.Г. Землянских*