

УДК 576.324:612.111

С.В. Руденко^{1*}, М.К. Саид², Е.Л. Воловельская¹

Влияние некоторых β -блокаторов на гипотонический гемолиз эритроцитов

UDC 576.324:612.111

S.V. RUDENKO^{1*}, M.K. SAID², YE.L. VOLOVELSKAYA¹

Influence of Some β -Blockers on Erythrocyte Hypotonic Hemolysis

Исследовали влияние некоторых β -блокаторов на гипотонический гемолиз эритроцитов человека. Показано, что блокаторы при увеличении их концентрации в гипотонической среде в исследованном диапазоне концентраций уменьшали степень и скорость гемолиза. Эритроциты, предварительно обработанные блокаторами, наоборот становились более чувствительными к гипотонической среде и утрачивали способность блокироваться в тех же условиях. Анализ показывает, что данный эффект не может быть объяснен увеличением поверхностно-объемного отношения клеток, проницаемости мембраны для катионов и изменением ее текучести. Предполагается, что блокирование осуществляется за счет стимуляции репарации флуктуирующих мембранных пор, образующихся на ранней фазе гипотонического гемолиза.

Ключевые слова: эритроциты, гипотонический гемолиз, гемолитические поры, репарация, антиглаукомные препараты.

Досліджували вплив деяких β -блокаторів на гіпотонічний гемоліз еритроцитів людини. Показано, що блокатори при збільшенні їх концентрації в гіпотонічному середовищі в дослідженому діапазоні концентрацій зменшували ступінь і швидкість гемолізу. Еритроцити, попередньо оброблені блокаторами, навпаки ставали більш чутливими до гіпотонічного середовища і втрачали здатність блокуватися в тих же умовах. Аналіз показує, що даний ефект не можна пояснити збільшенням поверхнево-об'ємного відношення клітин, збільшенням проникності мембрани для катіонів та зміною її текучості. Передбачається, що блокування здійснюється за рахунок стимуляції репарації флуктуючих мембранних пор, що утворюються на ранній фазі гіпотонічного гемолізу.

Ключові слова: еритроцити, гіпотонічний гемоліз, гемолітичні пори, репарація, антиглаукомні препарати.

Influence of some β -blockers on human erythrocyte hypotonic hemolysis was investigated. Hemolysis extent and rate were shown to be inhibited as blockers concentrations increased in hypotonic medium within the concentration range studied. By contrast red blood cells pretreated with blockers became more sensitive to hypotonicity and less sensitive to blockers under the same conditions. The analysis shows that this effect cannot be explained by increased surface-volume ratio of cells, increased cation permeability of membranes or changes in membrane fluidity. It is assumed that blocking effect is attributed to stimulated repair of fluctuating membrane pores, which are formed at an earlier stage of hypotonic hemolysis.

Key words: erythrocytes, hypotonic hemolysis, hemolytic pores, repair, antiglaucoma medicines.

Явление гипотонического гемолиза эритроцитов использовано в криобиологических исследованиях в качестве модели повреждения клеточных мембран, приводящего к гибели клетки. Это явление, хотя и не в чистом виде, реализуется на этапе отогрева замороженных клеточных суспензий, особенно в присутствии проникающих криопротекторов. Расшифровка механизма гипотонического гемолиза может способствовать разработке новых, эффективных криопротекторных сред, которые, кроме криопротекторов содержат и другие компоненты, способствующие репарации мембранных дефектов, возникающих в цикле замораживание-отогрев. Известно, что многие амфифильные соединения различной химической

The phenomenon of erythrocyte hypotonic hemolysis is used in cryobiology as a model of cell membrane injuries leading to cell death. This phenomenon, though not *per se*, occurs when frozen cell suspensions are thawed, especially in the presence of penetrating cryoprotectants. Clarification of hypotonic hemolysis mechanism can promote elaboration of novel efficient cryoprotective media, which complementary to cryoprotectants contain other components contributing to repair of membrane defects, which emerge in a freeze-thawing cycle. Many amphiphilic substances of different chemical nature are known to interrupt hypotonic hemolysis, however mechanisms of this phenomenon are still unclear. Earlier we found [3] that some ophthalmological drugs being exogenous agents incor-

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
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

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

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

природы оказывают протектирующее влияние на гипотонический гемолиз, однако механизм этого явления во многом остается неясным. Ранее мы установили [3], что некоторые офтальмологические препараты, как экзогенные агенты, встраиваются в мембрану эритроцитов и изменяют их форму, поэтому можно полагать, что они также влияют на характеристики гипотонического гемолиза.

Цель работы – исследование влияния на гипотонический гемолиз ряда неспецифических β -блокаторов, аналогов простагландинов и катионного детергента, бензалконий хлорид, которые используются в медицине для лечения глаукомы и катаракты глаза.

Материалы и методы

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, которые отмывали сначала в физиологическом растворе без буфера (150 мМ NaCl), а затем в изотоническом растворе HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4). Полученный осадок разводили, до конечного объема 1 мл и использовали как сток-суспензию. Для изучения динамики гипотонического гемолиза клеток использовали двухканальный формометр-агрегометр ФА-01. Измерения, калибровку прибора и обработку информации проводили, как описано в [4].

В работе использовали следующие офтальмологические препараты: “Timolol” (активное вещество Timolol 5 мг/мл, “Фармак”, Украина), “Timohehal” (активное вещество Timolol 2,5 мг/мл, “Hexal AG”, Германия), “Xalacom” (активное вещество Timolol 5 мг/мл, латанопрост 50 мкг/мл, “Pfizer”, Бельгия), “Travatan” (активное вещество травопрост 40 мкг/мл, “Alcon-Couvreur”, Бельгия). Поскольку препараты содержат в качестве консерванта benzalkonium chloride (BzA) в концентрации 0,1–0,2 мг/мл, мы для сравнения также применяли раствор данного реагента (“Fluka”, Германия) с концентрацией 0,4 мг/мл; сывороточный альбумин человека и общие белки плазмы с концентрацией 50 г/л (ЗАО “Диакон-ДС”, Россия). При статистической обработке данных использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Известно, что в средах с пониженной осмолярностью эритроциты подвергаются осмотическому гемолизу, когда их объем достигает критического гемолитического объема [16, 19]. На рис. 1 показана зависимость оптической плотности (ОП) суспензии эритроцитов от концентрации NaCl в среде инкубации. Эта зависимость имеет сигмоидный вид и характеризуется монотонным уменьшением ОП в диапазоне 150–120 мМ и последующим

porated in erythrocyte membranes and changed their shape, that is why one can presume that they also influence hypotonic hemolysis characteristics.

The aim of the work is studying the influence of some non-specific β -blockers, analogues of prostaglandins and the cationic detergent benzalkonium chloride, which are applied in medicine for glaucoma and cataract treatment, on hypotonic hemolysis.

Materials and methods

The experiments were carried out in human erythrocytes, which firstly were washed with physiological solution without buffer (150 mM NaCl) and then with isotonic solution HBS (150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7.4). The obtained pellet was diluted to the final volume of 1 ml and used as stock suspension. A dual-channel shapemeter-aggregometer FA-01 was used for studying hypotonic hemolysis dynamics. Calibration of the device, measurements and processing the information were performed according to [4].

In the work the following ophthalmological drugs were used: Timolol (active substance Timolol, 5 mg/ml, Farmak, Ukraine), Timohehal (active substance Timolol, 2.5 mg/ml, Hexal AG, Germany), Xalacom (active substances Timolol, 5 mg/ml, Latanoprost 50mg/ml, Pfizer, Belgium), Travatan (active substance Travoprost, 40 mg/ml, Alcon-Couvreur, Belgium). Since the drugs contain benzalkonium chloride (BzA) as a preservative at the concentration of 0.1–0.2 mg/ml we used solutions of this agent (Fluka, Germany) at the concentration of 0.4 mg/ml, human serum albumin and plasma total proteins (CJSC Diakon-DS, Russia) at the concentration of 50 g/l for comparison.

The data were statistically processed by the Student t-test.

Results and discussion

It is known that in media with lowered osmolarity red blood cells undergo osmotic hemolysis, when their volume reaches maximal hemolytic volume [16, 19]. Dependence of erythrocyte suspension absorbance on NaCl concentration in incubation medium is presented in Fig. 1. The dependence is sigmoid and characterised by monotonous decrease in absorbance within the range of 150–120 mM and then up to zero. Since the absorbance is in proportion to erythrocyte concentration in suspension, its decrease in the sigmoid part reflects erythrocyte hemolysis. The right linear part is likely to be associated with cells swelling due to their transfer to medium with osmolarity less than intracellular one, but its value is still insufficient to cause hemolysis. One can assume that cells swelling reduces absorbance by 10%, consequently, if the initial absorbance is 0.3, the absorbance value, at which hemolysis starts, is 0.26–0.27. As one can see from the graph this corresponds to the start of the sigmoid part of the

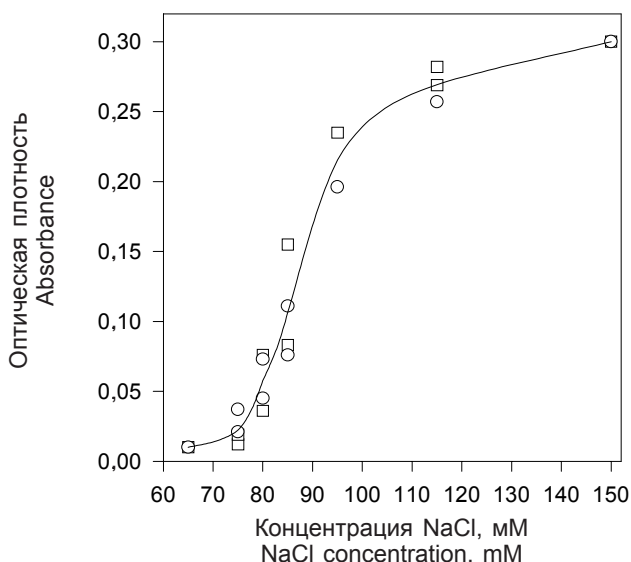


Рис. 1. Зависимость ОП суспензии эритроцитов от концентрации NaCl в среде инкубации. Экспериментальные величины, полученные на крови различных доноров: ○ – донор 1; □ – донор 2. Сплошная линия проведена через средние значения измеренных величин.

Fig. 1. Dependence of erythrocyte suspension absorbance on NaCl concentration in incubation medium. Experimental values determined for different donors' blood: ○ – donor 1; □ – donor 2. The solid line is drawn via the average values.

резким падением до нуля. Поскольку ОП пропорциональна концентрации эритроцитов в суспензии, ее уменьшение на сигмоидном участке отражает гемолиз эритроцитов. Правый линейный участок, по-видимому, связан с набуханием клеток, вследствие их переноса в среду с осмолярностью меньше внутриклеточной, но величина ее еще недостаточна, чтобы вызвать гемолиз. Можно полагать, что набухание клеток уменьшает ОП на 10%, следовательно, значение ОП, с которого начинается собственно гемолиз при ОП равной 0,3, составляет приблизительно 0,26–0,27. Как видно из графика это соответствует началу сигмоидного участка кривой. По усредненной кривой можно оценить, что 50%-й гемолиз соответствует концентрации 87 мМ NaCl, что близко к известным данным (0,4–0,55%) [5]. Для изучения влияния агентов на гипотонический гемолиз эритроциты помещали в выбранную нами стандартную гипотоническую среду (75 мМ NaCl, 2,5 мМ HEPES), которая в норме вызывает гемолиз около 90% клеток и дополнительно содержит разные концентрации исследуемых агентов. Оптическую плотность измеряли через 150 с после введения эритроцитов в соответствующую среду.

Динамические кривые гипотонического лизиса показаны на рис. 2. Необходимо обратить внимание на следующие особенности влияния препаратов на этот процесс. Увеличение их концентрации в среде

curve. From the average curve one can evaluate that 50% hemolysis corresponds to NaCl concentration of 87 mM, which is close to the published data (0.4–0.55%) [5]. To study the drugs' influence on hypotonic hemolysis we placed erythrocytes in the selected by us standard hypotonic medium (75 mM NaCl, 2.5 mM HEPES), which causes normally 90% hemolysis of cells and additionally contains different concentrations of the drugs investigated. Absorbance was registered 150 sec after incorporation of red blood cells into the appropriate medium.

The dynamic curves of hypotonic lysis are presented in Fig. 2. The following peculiarities of the drugs' influence on this process should be mentioned. Increasing in the drugs concentrations in medium results in a decline in the absolute value of absorbance changes, which attests to a reduction in hemolysis level. The curves of hypotonic hemolysis with the different drugs differ, and these can be divided into two groups: the first one includes the preparations BzA, Timolol and Xalacom, which decrease hemolysis rate, but do not prevent it within the experimental period; the second group includes Timoxenal and Travatan, which are able to inhibit hemolysis completely after a while. In both cases the hemolysis kinetics becomes biphasis one consisting of the first fast phase and the second slower one. This curve profile conforms with the mechanism, according to which the drugs affect hemolytic pore repair after a pore emerges in membrane, which determines dynamics of the second phase. The first phase is attributed to the development of initial hypotonic hemolysis, which proceeds in the control. It is confirmed by the fact that a similar curve profile may be achieved by adding the drug just after incorporation of cells to medium (data are not presented). Increase in NaCl concentration in hypotonic medium reduces hemolysis; in this case, however, kinetic curves are not of conspicuous biphasis pattern, which is typical for the drugs. This attests to the fact that salts do not block hemolysis, but enhance medium tonicity only and decrease swelling and injuries in the cell population, which hemolyzes in the control. In this case hemolysis kinetics maintains uniphase profile. Thus, the drugs are unlikely to affect the emergence of elementary hemolytic pores.

The quantitative parameter, which can be used for evaluation of the drugs inhibiting activities, is inhibition coefficient K_{inh} . It is determined by the formula

$$K_{inh} = \frac{A - A_{contr}}{A_0 - A_{contr}} \quad (1)$$

where A is final absorbance in the presence of an inhibitor; A_{contr} is absorbance after termination of hypotonic hemolysis for control cells in medium without in-

приводит к уменьшению абсолютной величины изменения ОП, что свидетельствует о снижении степени гемолиза клеток. Характер кривых гипотонического гемолиза отличается для разных препаратов, их можно разделить на две группы: в первую входят препараты BzA, "Timolol" и "Xalacom", которые существенно уменьшают скорость гемолиза, но полностью его не предотвращают на временном отрезке эксперимента, во вторую – "Timohexal" и "Travatan", которые способны полностью тормозить гемолиз через определенное время. В том и другом случае кинетика гемолиза становится бифазной, состоящей из быстрой первой фазы и более медленной второй. Такой вид кривой отвечает механизму, согласно которому препараты оказывают влияние на репарацию гемолитических пор в мембране после их образования, что и определяет динамику второй фазы. Первая фаза обусловлена развитием начального гипотонического гемолиза, который развивается и в контроле. Это подтверждается тем, что сходный характер кривых можно получить при добавлении препарата сразу же после введения клеток в среду (данные не приведены). Увеличение концентрации NaCl в гипотонической среде уменьшает гемолиз, однако кинетические кривые в этом случае не имеют выраженного бифазного вида, характерного для препаратов. Это свидетельствует о том, что соли не блокируют гемолиз, а лишь увеличивают тоничность среды, и уменьшают степень набухания и повреждения той популяции клеток, которая гемолизует в контроле. Кинетика гемолиза при этом сохраняет однофазный вид. Таким образом, мало вероятно, что агенты оказывают влияние на процесс зарождения первичных гемолитических пор.

Количественным параметром, который можно использовать для оценки ингибирующего влияния препаратов, является коэффициент ингибирования K_{inh} , который определяется по формуле

$$K_{inh} = \frac{A - A_{contr}}{A_0 - A_{contr}} \quad (1)$$

где A – конечное значение ОП в присутствии ингибитора; A_{contr} – значение ОП после завершения гипотонического гемолиза для контрольных клеток в среде, не содержащей ингибитора; A_0 – начальное значение ОП, которое клетки имеют в начальный момент непосредственно перед гемолизом. Из формулы (1) следует, если $A = A_{contr}$, то ингибитор не оказывает влияния на процесс и K_{inh} равен нулю. Если же ингибитор полностью подавляет гемолиз и $A = A_0$, то K_{inh} равен 1 или 100%. На рис. 3 приведены зависимости K_{inh} от концентрации препаратов,

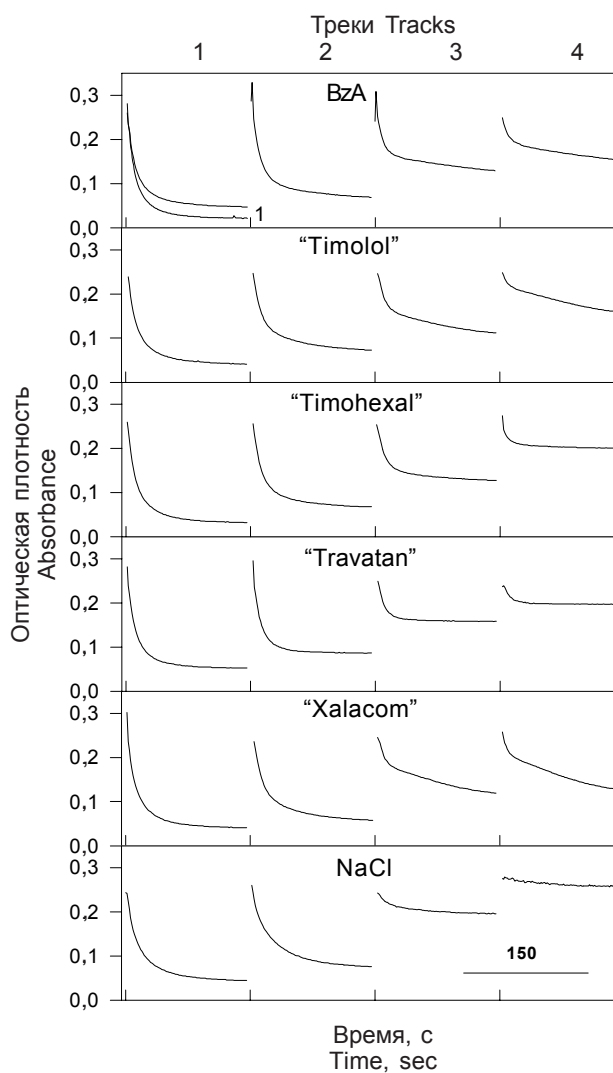


Рис. 2. Характерные кинетические кривые гипотонического гемолиза эритроцитов (зависимость ОП от времени) в зависимости от объема препаратов или 2 М раствора NaCl, добавленных в 2 мл гипотонической среды. Объемы препаратов, мкл: для BzA, "Travatan", "Xalacom", трек 1 – 1; трек 2 – 2; трек 3 – 5; трек 4 – 10. Для "Timolol", "Timohexal" трек 1 – 2, трек 2 – 5, трек 3 – 10, трек 4 – 20, для NaCl трек 1 – 5; трек 2 – 10; трек 3 – 20; трек 4 – 40. Каждый трек составляет 150 с. Кривая 1 на треке 1 сверху соответствует контрольному гемолизу в среде, не содержащей препараты.

Fig. 2. Typical kinetic curves of erythrocyte hypotonic hemolysis (time dependence of absorbance) depending on the volumes of drugs or 2 M NaCl solution added in 2 ml of hypotonic medium. The drugs volumes, μ l: BzA, Travatan, Xalacom, track 1 – 1, track 2 – 2, track 3 – 5, track 4 – 10; Timolol, Timohexal, track 1 – 2, track 2 – 5, track 3 – 10, track 4 – 20; NaCl, track 1 – 5, track 2 – 10, track 3 – 20, track 4 – 40. Each track is 150 sec. Curve 1 in track 1 for absorbance 1 corresponds to the control hemolysis in medium without drugs.

inhibitors; A_0 is initial absorbance, by which cells are characterized immediately before hemolysis. It results from the formula (1) that if $A = A_{contr}$ the inhibitor exerts no influence on the process and $K_{inh} = 0$. If the inhibitor arrests hemolysis completely and $A = A_0$, then $K_{inh} = 1$ or 100%. K_{inh} dependences on the drugs con-

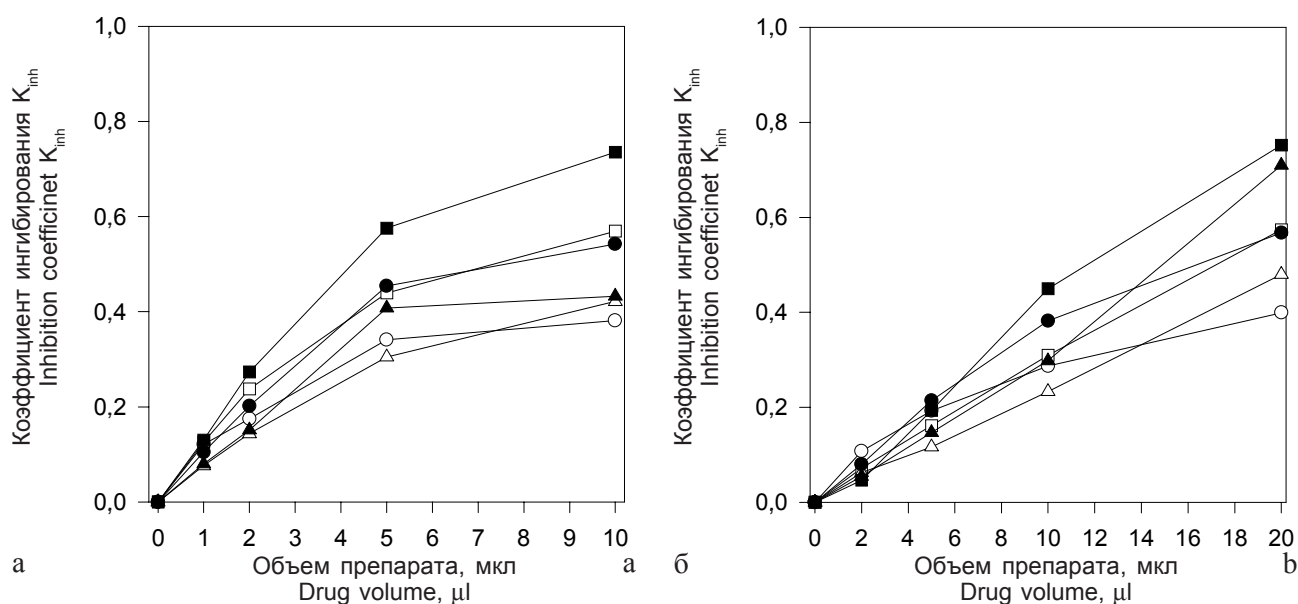


Рис. 3. Влияние препаратов на ингибирование гипотонического гемолиза эритроцитов двух доноров. Незаштрихованные символы соответствуют донору 1, заштрихованные – донору 2: а) \circ – BzA; \square – “Travatan”; \triangle – “Xalacom”; б) \circ – “Timolol”; \square – “Timohexal”; \triangle – “Oftan-Timolol”.

Fig. 3. The drugs effects on inhibition of hypotonic hemolysis of erythrocytes from two donors: open symbols to donor 1, close symbols to donor 2; а) \circ – BzA; \square – “Travatan”; \triangle – Xalacom; б) \circ – Timolol; \square – Timohexal; \triangle – Oftan-Timolol.

которые сгруппированы в соответствии с характером этой зависимости. Для препаратов BzA, “Travatan” и “Xalacom” (рис. 3, а) они имеют гиперболический вид с тенденцией к насыщению, а для “Timolol”, “Timohexal” и “Oftan-Timolol” – линейный (рис. 3, б). Из представленных данных видно, что степень блокирования для разных доноров может несколько отличаться по величине, но соотношение между эффектом различных препаратов на ингибирующую активность и характер ее зависимости от концентрации препаратов для разных доноров сохраняется. Следовательно, эритроциты разных доноров могут отличаться по чувствительности к ингибирующему влиянию исследуемых агентов.

Наиболее эффективными ингибиторами следует считать “Travatan” и “Timohexal”, которые при максимальных используемых концентрациях блокируют гипотонический гемолиз до 75%. Это подтверждается кинетическими данными, (см. рис. 2), показывающими полную остановку развития гемолитического процесса этими агентами, в отличие от других препаратов, которые значительно уменьшают скорость гемолиза, но полностью его не предотвращают. Для объяснения возможного механизма блокирования, мы построили график зависимости K_{inh} от увеличения концентрации NaCl в стандартной гипотонической среде. Это изменение можно рассматривать как ингибирование, по аналогии с добавлением препаратов, хотя понятно, что биофизические механизмы, лежащие в их основе могут отличаться по своей природе.

centrations, which are classified according to the pattern of a dependence, are presented in Fig. 3. They are hyperbolic with a tendency towards saturation (Fig. 3, a) for BzA and Xalacom and linear (Fig. 3, b) for Timolol, Timohexal and Oftan-Timolol. From the data presented one can see that though for different donors the extent of arrest can vary, the relation between effects of the different drugs on inhibiting activity and the character of inhibiting activity dependence on the drugs concentrations maintains. Consequently, different donors' erythrocytes can vary by their sensitivity to the inhibiting impacts of the agents studied.

The most efficient inhibitors are Travatan and Timohexal, which at the maximal concentrations arrest hypotonic hemolysis by 75%. This is also confirmed by the kinetic data (Fig. 2). Unlike other drugs, which decrease hemolysis rate, but do not prevent it, these preparations arrest the proceeding hemolytic process completely. To ascertain a possible arrest mechanism we plotted a graph of K_{inh} dependence on the rise in NaCl concentration in the standard hypotonic medium. These changes can be considered as inhibition by analogy with adding the drugs, though it is obvious that biophysical mechanisms lying in their basis can differ by their nature.

With reference to Fig. 4 it can be seen that 20 mM NaCl blocks hemolysis by 70–80%, that corresponds to the arrest caused by the maximal concentrations of some agents, *i. e.* perhaps there is an osmotic equivalent of arrest, when the same hemolysis level in the presence of a blocker is achieved just by increasing

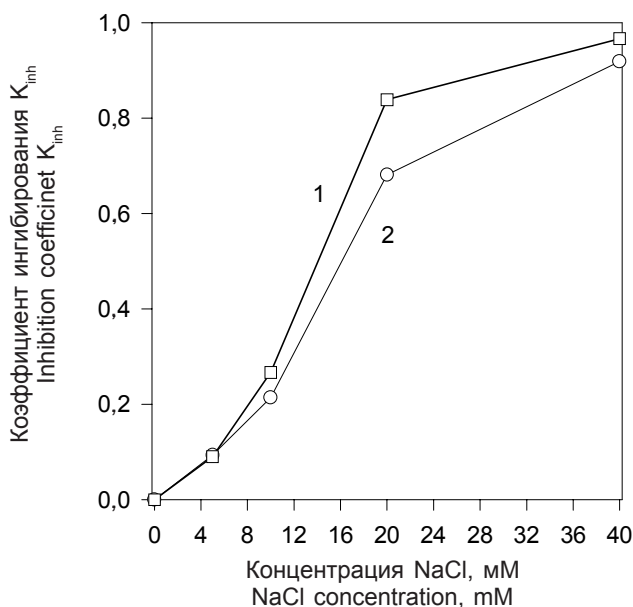


Рис. 4. Влияние NaCl на ингибирование гипотонического гемолиза эритроцитов доноров: 1 – донор 1; 2 – донор 2.

Fig. 4. Influence of NaCl on inhibition of hypotonic hemolysis of erythrocytes from the donors: 1 – donor 1; 2 – donor 2.

Как видно (рис. 4), добавление 20 мМ NaCl на 70–80% блокирует гемолиз, что соответствует блокировке, вызываемой максимальными концентрациями некоторых агентов, т. е. по-видимому существует осмотический эквивалент блокирования, когда тот же уровень гемолиза в присутствии блокатора достигается простым повышением осмолярности гипотонической среды. Однако зависимость K_{inh} от концентрации NaCl имеет сигмоидный вид, напоминающий аналогичную зависимость ОП (см. рис. 1), которая отличается от зависимости K_{inh} концентрацией агентов-ингибиторов с линейной либо гиперболической формой (рис. 3). Это значит, что механизм их действия не совпадает с осмотическим механизмом действия NaCl.

Для уточнения возможного механизма блокирования гемолиза концентрированную суспензию эритроцитов обрабатывали BzA в изотонической среде с таким расчетом, чтобы они связали приблизительно такое же количество агента, как и в разбавленной суспензии. Возможно обработанные клетки будут обладать повышенной устойчивостью к гипотоническому лизису из-за увеличенной площади поверхности в результате внедрения исследуемого препарата. Данные таких экспериментов показаны на рис. 5, из которого видно, что клетки, обработанные BzA в меньшей концентрации, не будут устойчивее, а наоборот имеют тенденцию к сдвигу по оси тоничности вправо. Клетки, обработанные BzA большей концентрации, становятся намного чувствительнее к гипотонии по сравнению с контролем. Кроме того, мы устано-

osmolarity of hypotonic medium. Nevertheless K_{inh} dependence on NaCl concentration is sigmoid like the analogous absorbance dependence (see Fig. 1), which differs from linear or hyperbolic K_{inh} dependences by the inhibitors concentrations (Fig. 3). This means that mechanisms of their action are not the same as osmotic mechanism of NaCl action.

To clarify a possible mechanism of hemolysis arrest we treated concentrated erythrocyte suspension with BzA in isotonic medium in order to allow red blood cells to bind approximately the same quantity of the agent as that in diluted suspension. Maybe the treated cells will be more tolerant to isotonic lysis because of increased surface area as a result of incorporating the drug. The data of these experiments are presented in Fig. 5, in which one can see that the cells treated with lower concentrations of BzA are not more tolerant, *vice versa*, they tend to shift to the right on the tonicity axis. The cells treated with higher concentrations of BzA become much more sensitive to hypotonicity than the control ones. Besides, we established that all the drugs lose capacity for inhibiting hemolysis of the treated cells even when the drugs are present in hypotonic medium and block conspicuously hemolysis of untreated cells (see Fig. 2, 3). The data obtained contradict the model, according to which reduced hemolysis

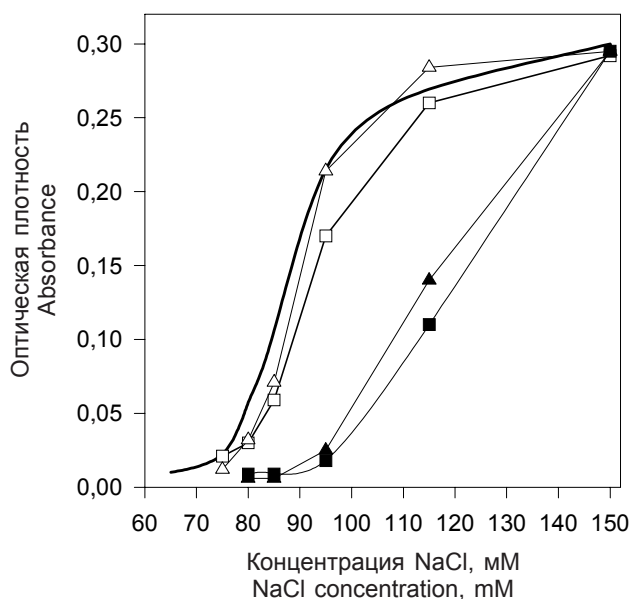


Рис. 5. Зависимость ОП суспензии эритроцитов ($1,6 \times 10^9$ кл/мл), обработанных BzA (157 мкМ – □, △; 314 мкМ – ■, ▲) в течение 15 мин, от концентрации NaCl в среде инкубации: □, ■, – донор 1; ▲, △ – донор 2. Сплошная кривая для контрольных эритроцитов приведена для сравнения.

Fig. 5. Dependence of erythrocyte suspension (1.6×10^9 cells/ml) absorbance after 15-minute BzA treatment (157 μM – □, △; 314 μM – ■, ▲) on NaCl concentration in incubation medium: □, ■, – donor 1; ▲, △ – donor 2. Solid line for control erythrocytes data is given for comparison.

вили, что все препараты утрачивают способность ингибировать гемолиз обработанных клеток даже тогда, когда препараты присутствуют в гипотонической среде и вызывают выраженное блокирование гемолиза необработанных клеток (рис. 2, 3). Полученные данные противоречат модели, согласно которой уменьшение гемолиза обусловлено увеличением поверхности мембраны. По-видимому, механизм имеет другую природу, которая пока не исследована.

Дополнительным подтверждением того, что взаимодействие препаратов с мембраной (на примере BzA) приводит к существенному нарушению их свойств, могут служить и следующие наблюдения.

1. Клетки, обработанные BzA в концентрированной суспензии, не гемолизуют в этой среде в течение продолжительного времени (часы) при комнатной температуре, однако они начинают спонтанно гемолизировать при их переносе в кювету. Степень и скорость гемолиза возрастают по мере увеличения времени инкубации эритроцитов с BzA и концентрации BzA. При этом гемолиз развивается с лагом и имеет двухфазный характер (рис. 6, А и В). Возможно, этот процесс потенцируется сдвиговыми деформациями, которые клетки претерпевают при их перемешивании в кювете.

2. Указанный спонтанный гемолиз активируется альбумином и общими белками плазмы, причем активация значительно сильнее, если эти реагенты добавлять через некоторое время после клеток (рис. 6, В, С). Как видно из рис. 6, WP активируют гемолиз сильнее, чем А1.

3. Если клетки после обработки низкими концентрациями BzA при переносе в кювету. близки к дискоидным, то А1 и WP уменьшают его, что указывает на сферуляцию клеток (данные не приведены).

4. Эритроциты, обработанные BzA в концентрированной суспензии и дважды отмытые в физиологическом растворе, в значительной мере утрачивают способность ингибироваться против гипотонического гемолиза в среде, содержащей исследуемые препараты. Таким же свойством обладают и эритроциты, не отмытые от BzA (рис. 6, А, трек 2).

Одним из механизмов обеспечения протекции против гипотонического гемолиза может быть индуцированное блокаторами повышение проницаемости мембраны для ионов калия. Установлено, что протектирующий эффект различных соединений коррелирует с увеличением калиевой проницаемости [9, 12, 18], а аналогичный эффект лизолецитина, сопровождается уменьшением проницаемости мембран для калия в гипотонических условиях [10]. Иными словами, протектирующий эффект не всегда связан с повышением

is attributed to an increase in membrane surface. Perhaps the mechanisms are of different nature, which has not revealed yet.

The following observations can serve as an additional confirmation of the fact that the interaction between the drugs (as exemplified by BzA) and membrane results in significant distortions of their properties:

1. The cells treated with BzA in concentrated suspension do not hemolyze in this medium for a long period of time (hours) at room temperature, however they start hemolyzing spontaneously after their transfer to a cuvette. Hemolysis level and rate rise as the duration of erythrocyte incubation with BzA and BzA concentration grow. In this case hemolysis proceeds with lag and is of biphasis pattern (Fig. 6, A and B). Perhaps this process is attributed to shear deformation, which cells undergo while being stirred in a cuvette.

2. The spontaneous hemolysis above-mentioned is activated by albumin and plasma total proteins, notably the activation is much stronger if these reagents are added after cells after a while. In Fig. 6 one can see that WP activate hemolysis more that А1 (Fig. 6, B, C).

3. If cells are discoid-like after treatment with low concentrations of BzA and transfer to a cuvette, А1 and WP reduce it, that indicates to cell spherulation (data are not presented).

4. The erythrocytes treated with BzA in concentrated suspension and washed twice with physiological solution mostly lose the capacity for being inhibited against hypotonic hemolysis in medium containing the drugs studied. The red blood cells, which were not washed from BzA, have the same feature (Fig. 6, A, track 2).

One of the mechanisms providing protection against hypotonic hemolysis may be a blocker-induced enhancement in membrane potassium permeability. Protective effects of different compounds were discovered to correlate with potassium permeability [9, 12, 18], and an analogous effect of lysolethitin is accompanied by a decline in membrane potassium permeability under hypotonic conditions [10]. In other words protective effect is not always associated with enhanced permeability of membranes. Additionally it was shown that in order to become more tolerant under hypotonic conditions the erythrocytes had to lose a considerable quantity of potassium, that is why the protective activities of the substances studied by us are unlikely to be due to their influence on membrane permeability [2, 7]. There is another explanation of protective activity: blockers boost membrane rigidity (lessen its fluidity), that allows it to sustain larger osmotic stress. There is a correlation between membrane fluidity and hypotonic hemolysis curve at pH 6.0, but not at pH 7.4 [2, 10]. Membrane fluidity depends on osmotic fragility of ATP-depleted erythrocytes [27]. The data that the detergent C9E20 boosts fluidity, but has no protec-

проницаемости мембраны. Кроме того, установлено, что для повышения устойчивости эритроцитов в гипотонических условиях клетки должны потерять значительное количество калия, поэтому мало вероятно, что протектирующий эффект исследованных нами веществ обусловлен их влиянием на проницаемость мембраны [2, 7]. Существует другое объяснение протектирующего эффекта вещества: блокаторы усиливают ригидность мембраны (уменьшают ее текучесть), что позволяет ей выдерживать большие осмотические нагрузки. Связь между текучестью мембраны и кривой гипотонического гемолиза установлена при pH 6,0, но не при pH 7,4 [2, 10]. Текучесть мембраны зависит от осмотической хрупкости эритроцитов, истощенных по АТФ [27]. Подтверждением косвенной связи между текучестью мембраны и гипотоническим гемолизом служат данные, что детергент С9Е20 увеличивает текучесть, но не является протектором, тогда как С9Е9 аналогично влияет на текучесть и блокирует гемолиз [14]. Блокирующий эффект исследуемых препаратов также не может быть объяснен их влиянием на текучесть мембраны, поскольку клетки, обработанные BzA, становятся более чувствительными к гипотонии, что предполагает увеличение текучести мембраны по аналогии с действием додецилсульфата натрия [25]. Аналогичный блокирующий эффект характерен для множества химических соединений: ингибиторов кальмодулина [6, 7, 20], жирных кислот [7, 8, 24], различных детергентов [8, 12, 14, 18, 24, 28, 29], лизолипидов [9–11, 21], аминокислот [21, 22], блокаторов кальциевых каналов, фосфолипаз [22], флюнитразепамов [15] и флюоресцентных красителей [13]. Авторы работы [17] пришли к заключению, что не существует причинной связи между блокирующим эффектом амфифилов и их способностью изменять форму эритроцитов или вызывать везикуляцию мембран, а также между молекулярной структурой этих веществ и их зарядом. Гипотонический гемолиз эритроцитов обусловлен формированием в их мембранах гемолитических пор со сложной молекулярной структурой, в состав которых, предположительно, входит анионный канал AE1 [25, 26], поэтому неспецифическое влияние многих блокаторов может объясняться их взаимодействием с белковыми или липидными компонентами поры. Установлено, что вязкоэластичность мембраны существенно влияет на процесс формирования пор [1, 23]. С этой точки зрения, наши данные можно интерпретировать таким образом, что офтальмологические препараты блокируют процесс формирования и рост этих пор на начальной стадии гипотонического гемолиза нативных клеток. Однако предварительная обработка клеток препаратами приводит к изменению

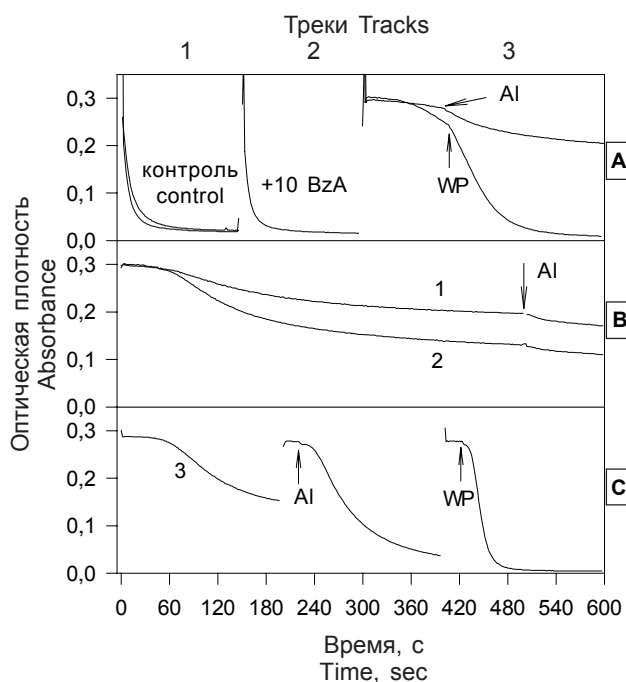


Рис. 6. Влияние обработки эритроцитов BzA на характерные кинетические кривые гипотонического гемолиза и спонтанного гемолиза в HBS. Сток -раствор эритроцитов обрабатывали BzA в концентрации 314 мкМ, после чего через разное время перенесли в гипотоническую среду (А, треки 1, 2) или HBS (А, трек 3; В, С). Стрелками указаны моменты добавления альбумина (Al) или белков плазмы (WP). Для кривых 1, 2, 3 эксперименты проводили последовательно через 15 мин для одного и того же образца обработанной крови. Конечная концентрация AL и WP составила 1,25 мг/мл.

Fig. 6. Influence of BzA-treatment of erythrocytes on typical kinetic curves of hypotonic hemolysis and spontaneous hemolysis in HBS. Erythrocyte stock solution treated with BzA at the concentration of 314 mM and then transferred to hypotonic medium after various periods of time (A, tracks 1, 2) or to HBS (A, track 3; B, C). The arrows mean moments of adding albumin (Al) or plasma proteins (WP). Curves 1, 2, 3 – experiments were carried out successively every 15 min for the same sample of treated blood. The final Al and WP concentrations were 1.25 mg/ml.

tive activity, while C9E9 influences fluidity in the same way and inhibits hemolysis, confirm an indirect connection between membrane fluidity and hypotonic hemolysis [14]. The inhibiting effects of the drugs studied cannot be explained by their impact on membrane fluidity either, since the cells treated with BzA become more sensitive to hypotonicity, which implies an increase in membrane fluidity by analogy with sodium dodecyl sulphate action [25]. An analogous inhibiting effect is intrinsic to many chemical compounds: calmodulin inhibitors [6, 7, 20], fat acids [7, 8, 24], different detergents [8, 12, 14, 18, 24, 28, 29], lysolipids [9–11, 21], amino acids [21, 22], calcium channel blockers, phospholipases [22], flounitrazepams [15] and fluorescent dyes [13]. The authors [17] concluded that there was no casual relation between amphiphils' inhibiting effects and their ability to change erythrocyte shape or

физико-химической структуры мембраны и, вероятно, изменяет и саму структуру гемолитических пор. В пользу этого свидетельствует факт, что обработка эритроцитов трипсином или нейраминидазой не изменяет кривую осмотической хрупкости, но уменьшает способность хлорпромазина блокировать гемолиз таких клеток [7]. Согласно теоретическим оценкам [1] и некоторым экспериментальным данным [26] гемолитическая пора представляет собой флуктуирующую пору, которая постоянно расширяется и "залечивается." Этот процесс также сопровождается флуктуациями объема клетки [16]. Возможно, протектирующий эффект блокаторов реализуется тогда, когда пора находится именно в этом флуктуационном режиме. Изменение структуры поры за счет нарушения белковых и липидных взаимодействий после обработки эритроцитов разными препаратами, включающими и BzA, могут нарушить этот режим функционирования поры и снизить эффективность действия блокаторов практически до нуля, что установлено и нашими наблюдениями. Следует отметить, поскольку эффект блокирования гемолиза реализуется, в основном, при кинетическом режиме, когда изменяется осмолярность среды, применение блокаторов при замораживании клеточных суспензий, на наш взгляд, малопродуктивно, так как введение препарата на определенном этапе разогрева суспензии технически сложно.

Выводы

Установлено, что офтальмологические препараты в небольших концентрациях обладают способностью блокировать гипотонический гемолиз эритроцитов. Однако предварительная обработка клеток препаратами (на примере BzA) приводит к повышению их чувствительности к гипотонии и утрате ими способности блокироваться препаратами в тех же экспериментальных условиях.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико-химическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека // *Біофізичний вісник*. – 1998. – Т. 422, №2. – С. 54–58.
2. Нипот Е.Е. Влияние температуры и некоторых литических пептидов на эритроциты человека при дегидратации-регидратации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1997. – 24 с.
3. Руденко С.В., Саид М.К. Определение коэффициентов распределения антиглаукомных препаратов между эритроцитами и средой // *Биофиз. вестник*. – 2009. – Вып. 23. – С. 69–76.
4. Руденко С.В., Важди Кхалаф Жамиль Маданат, Бондаренко В.А. Влияние модификаторов на катион-индуцируемую агрегацию эритроцитов // *Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия: Биология*. – 2006. – Т. 729, Вып. 3. – С. 265–270.

to cause membrane vesiculation as well as between molecular structure of these substances and their charges. Erythrocyte hypotonic hemolysis is attributed to hemolytic pores with complicated molecular structure in erythrocyte membranes. The pores, presumably, comprise anionic channel AE1 [25, 26], that is why non-specific influence of many blockers can be explained by their interactions with protein or lipid components of the pores. Membrane viscoelasticity was found to affect greatly the process of pore formation [1, 23]. From this point of view our data can be interpreted in the following way: the ophthalmological drugs arrest formation and growth of the pores at the initial stage of native cell hypotonic hemolysis. Nevertheless pre-treatment of cells with the drugs results in changes of physico-chemical structure of membranes and, possibly, changes the hemolytic pore structure itself. In favour of this the following fact attests: trypsin- or neuraminidase-treatment does not change the osmotic fragility curve, but lessens the ability of chlorpromazine to inhibit hemolysis of such cells [7]. According to the theoretical assessment [1] and some experimental data [26] a hemolytic pore is a fluctuating pore, which widens continuously and "is healed". This process is also accompanied by cell volume fluctuations [16]. Probably the blockers' inhibiting effects are implemented when the pore is in this fluctuating mode. The pore structure changes owing to abnormalities of protein and lipid interactions after treatment of erythrocytes with the different drugs including BzA can impair this mode of the pore functioning and lessen the blockers efficiency up to zero, which was also established in our research. It should be noted that since hemolysis-inhibiting effect is implemented mainly under the kinetic mode, when medium osmolarity changes, application of blockers for cell suspension freezing, in our opinion, is inefficient, as the drug administration is technically intricate.

Conclusions

The ophthalmological drugs at low concentrations are able to inhibit hypotonic hemolysis of red blood cells. Nevertheless the pre-treatment of cells with the drugs (as exemplified by BzA) makes them more sensitive to hypotonicity and lose their capacity for being inhibited by the drugs under the same experimental conditions.

References

1. Gordiyenko Ye.A., Panina Yu.Ye. A physico-chemical model of human erythrocyte hypotonic hemolysis // *Biofizychnyy Visnyk*. – 1998. – Vol. 422, N2. – P. 54–58.
2. Nipot Ye.Ye. Temperature and some lytic peptides influence on human erythrocytes during dehydration-rehydration: Author's abstract of the thesis of Candidate of Biological Sciences. – Kharkov, 1997. – 24 p.

5. *Bennekou P., Barksman T.L., Christophersen P., Kristensen B.I.* The human red cell voltage-dependent cation channel. Part III: Distribution homogeneity and pH dependence // *Blood Cells Mol. Dis.*— 2006.— Vol. 3, N1.— P. 10–14.
6. *Beresewicz A.* Anti-ischemic and membrane stabilizing activity of calmodulin inhibitors // *Basic Res. Cardiol.*— 1989.— Vol. 8, N6.— P. 631–645.
7. *Born G.V., Housley G.M.* Effects of modification of the membranes of intact erythrocytes on the anti-haemolytic action of chlorpromazine // *Br. J. Pharmacol.*— 1983.— Vol. 79, N2.— P. 481–487.
8. *Csordas A., Schauenstein K.* Structure- and configuration-dependent effects of C18 unsaturated fatty acids on the chicken and sheep erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 769, N3.— P. 571–577.
9. *Eskelinen S., Mela M.* Cation permeability and mechanical properties of the erythrocyte membrane under the influence of lysophosphatidylcholine (LPC) in isotonic and hypotonic media // *Acta Physiol. Scand.*—1984.— Vol. 122, N4.— P. 527–534.
10. *Eskelinen S.* Effect of lysophosphatidylcholine on salt permeability through the erythrocyte membrane under haemolytic conditions // *Gen. Physiol. Biophys.*— 1986.— Vol. 5, N6.— P. 637–647.
11. *Eskelinen S., Saukko P.* The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // *Biorheology.*— 1984.— Vol. 21, N3.— P. 363–377.
12. *Fogt A., Hagerstrand H., Isomaa B.* Effects of N,N'-bisdimethyl-1,2-ethanediamine dichloride, a double-chain surfactant, on membrane-related functions in human erythrocytes // *Chem. Biol. Interact.*— 1995.— Vol. 94, N2.— P. 147–155.
13. *Fortes P.A., Ellory J.C.* Asymmetric membrane expansion and modification of active and passive cation permeability of human red cells by the fluorescent probe 1-anilino-8-naphthalene sulfonate // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1975.— Vol. 413, N3.— P. 65–78.
14. *Galembeck E., Alonso A., Meirelles N.C.* Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants // *Chem. Biol. Interact.*—1998.—Vol. 113, N3.—P. 91–103.
15. *Garcia D.A., Quiroga S., Perillo M.A.* Flunitrazepam partitioning into natural membranes increases surface curvature and alters cellular morphology // *Chem. Biol. Interact.*— 2000.— Vol. 129, N3.— P. 263–277.
16. *Gordienko E.A., Gordienko Yu.A., Gordiyenko O.I.* The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *CryoLetters.*— 2003.— Vol. 24, N2.— P. 229–244.
17. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem. Biol. Interact.*— 1991.— Vol. 79, N3.— P. 335–347.
18. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— Vol. 860, N3.— P. 510–524.
19. *Jay A.W., Rowlands S.* The stages of osmotic haemolysis // *J. Physiol.*— 1975.— Vol. 252, N3.— P. 817–832.
20. *Malheiros S.V., de Paula E., Meirelles N.C.* Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1998.— Vol. 1373, N2.— P. 332–340.
21. *Morimoto Y., Tanaka K., Iwakiri Y. et al.* Protective effects of some neutral amino acids against hypotonic hemolysis // *Biol. Pharm. Bull.*— 1995.— Vol.18, N10.— P. 1417–1422.
22. *Peters S.M., de Jong M.D., Bindels R.J. et al.* Effects of renal cytoprotective agents on erythrocyte membrane stability // *Life Sci.*— 1998.— Vol. 63, N11.— P. 975–983.
23. *Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N.* Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2002.— Vol. 1558, N2.— P. 119–132.
3. *Rudenko S.V., Said M.K.* Determination of coefficients of distribution of anti-glaucoma drugs between erythrocytes and medium // *Biofizicheskiy Vestnik.*— 2009.— Issue 23.— P. 69–76.
4. *Rudenko S.V., Vazhdi Khalaf Zhamil Madanat, Bondarenko V.A.* Modifiers influence on cation-induced erythrocyte aggregation // *Vestnik V.N. Karazin KNU. Series: Biologiya.*— 2006.— Vol. 729, Issue 2.— P. 265–270.
5. *Bennekou P., Barksman T.L., Christophersen P., Kristensen B.I.* The human red cell voltage-dependent cation channel. Part III: Distribution homogeneity and pH dependence // *Blood Cells Mol. Dis.*— 2006.— Vol. 3, N1.— P. 10–14.
6. *Beresewicz A.* Anti-ischemic and membrane stabilizing activity of calmodulin inhibitors // *Basic Res. Cardiol.*— 1989.— Vol. 8, N6.— P. 631–645.
7. *Born G.V., Housley G.M.* Effects of modification of the membranes of intact erythrocytes on the anti-haemolytic action of chlorpromazine // *Br. J. Pharmacol.*— 1983.— Vol. 79, N2.— P. 481–487.
8. *Csordas A., Schauenstein K.* Structure- and configuration-dependent effects of C18 unsaturated fatty acids on the chicken and sheep erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 769, N3.— P. 571–577.
9. *Eskelinen S., Mela M.* Cation permeability and mechanical properties of the erythrocyte membrane under the influence of lysophosphatidylcholine (LPC) in isotonic and hypotonic media // *Acta Physiol. Scand.*—1984.— Vol. 122, N4.— P. 527–534.
10. *Eskelinen S.* Effect of lysophosphatidylcholine on salt permeability through the erythrocyte membrane under haemolytic conditions // *Gen. Physiol. Biophys.*— 1986.— Vol. 5, N6.— P. 637–647.
11. *Eskelinen S., Saukko P.* The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // *Biorheology.*— 1984.— Vol. 21, N3.— P. 363–377.
12. *Fogt A., Hagerstrand H., Isomaa B.* Effects of N,N'-bisdimethyl-1,2-ethanediamine dichloride, a double-chain surfactant, on membrane-related functions in human erythrocytes // *Chem. Biol. Interact.*— 1995.— Vol. 94, N2.— P. 147–155.
13. *Fortes P.A., Ellory J.C.* Asymmetric membrane expansion and modification of active and passive cation permeability of human red cells by the fluorescent probe 1-anilino-8-naphthalene sulfonate // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1975.— Vol. 413, N3.— P. 65–78.
14. *Galembeck E., Alonso A., Meirelles N.C.* Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants // *Chem. Biol. Interact.*—1998.—Vol. 113, N3.—P. 91–103.
15. *Garcia D.A., Quiroga S., Perillo M.A.* Flunitrazepam partitioning into natural membranes increases surface curvature and alters cellular morphology // *Chem. Biol. Interact.*— 2000.— Vol. 129, N3.— P. 263–277.
16. *Gordienko E.A., Gordienko Yu.A., Gordiyenko O.I.* The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *CryoLetters.*— 2003.— Vol. 24, N2.— P. 229–244.
17. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem. Biol. Interact.*— 1991.— Vol. 79, N3.— P. 335–347.
18. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— Vol. 860, N3.— P. 510–524.
19. *Jay A.W., Rowlands S.* The stages of osmotic haemolysis // *J. Physiol.*— 1975.— Vol. 252, N3.— P. 817–832.
20. *Malheiros S.V., de Paula E., Meirelles N.C.* Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1998.— Vol. 1373, N2.— P. 332–340.
21. *Morimoto Y., Tanaka K., Iwakiri Y. et al.* Protective effects of some neutral amino acids against hypotonic hemolysis // *Biol. Pharm. Bull.*— 1995.— Vol.18, N10.— P. 1417–1422.

24. Rybczynska M., Csordas A. Chain length-dependent interaction of free fatty acids with the erythrocyte membrane // *Life Sci.*– 1989.– Vol. 44, N9.– P. 625–632.
25. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol. 16, N2.– P. 188–194.
26. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol. 16, N5.– P. 506–512.
27. Tozzi-Ciancarelli M.G., Di Massimo C., Mascioli A. Aging of human erythrocytes: the role of membrane perturbations induced by *in vitro* ATP-depletion // *Cell Mol. Biol.*– 1992.– Vol. 38, N3.– P. 303–310.
28. Vives M.A., Infante M.R., Garcia E. et al. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants // *Chem. Biol. Interact.*– 1999.– Vol. 118, N1.– P. 1–18.
29. Vives M.A., Macian M., Seguer J. et al. Hemolytic action of anionic surfactants of the diacyl lysine type // *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*– 1997.– Vol. 118, N1.– P. 71–74.
22. Peters S.M., de Jong M.D., Bindels R.J. et al. Effects of renal cytoprotective agents on erythrocyte membrane stability // *Life Sci.*– 1998.– Vol. 63, N11.– P. 975–983.
23. Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2002.– Vol. 1558, N2.– P. 119–132.
24. Rybczynska M., Csordas A. Chain length-dependent interaction of free fatty acids with the erythrocyte membrane // *Life Sci.*– 1989.– Vol. 44, N9.– P. 625–632.
25. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol. 16, N2.– P. 188–194.
26. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol. 16, N5.– P. 506–512.
27. Tozzi-Ciancarelli M.G., Di Massimo C., Mascioli A. Aging of human erythrocytes: the role of membrane perturbations induced by *in vitro* ATP-depletion // *Cell Mol. Biol.*– 1992.– Vol. 38, N3.– P. 303–310.
28. Vives M.A., Infante M.R., Garcia E. et al. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants // *Chem. Biol. Interact.*– 1999.– Vol. 118, N1.– P. 1–18.
29. Vives M.A., Macian M., Seguer J. et al. Hemolytic action of anionic surfactants of the diacyl lysine type // *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*– 1997.– Vol. 118, N1.– P. 71–74.

Поступила 01.12.2009
Рецензент Н.Г. Землянских

Accepted in 01.12.2009