

УДК 612.111.118.221.3:547.42

К.В. МАРКОВА¹, В.В. РАМАЗАНОВ², В.А. БОНДАРЕНКО^{2*}

Влияние осмотического воздействия на детергентный лизис эритроцитов человека

UDC 612.111.118.221.3:547.42

K.V. MARKOVA¹, V.V. RAMAZANOV², V.A. BONDARENKO^{2*}

Osmotic Effect on Human Erythrocyte Detergent Lysis

Исследован гемолиз эритроцитов человека в средах, содержащих NaCl и сахарозу разной молярности, под воздействием неионных (Твин-20 – полиоксиэтиленсорбитан монолаурат; Тритон X-100 – октилфенол полиэтиленгликоль) и ионных (ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид; ДСН – додецил-сульфат натрия) детергентов различной концентрации. Изучено действие данных детергентов на лизис клеток в присутствии модификатора агрегатного состояния белка полосы 3 – ДИДС (4,4-диизотиоцианостилбен 2,2-дисульфат динатриевая соль). Процент гемолиза эритроцитов увеличивается при повышении концентрации детергентов в растворе. В исследуемых растворах характер развития гемолиза одинаков в присутствии всех детергентов. В растворе с 0,15М NaCl; 0,5М сахарозы; 20мМ Трис (рН 7,4) установлена наибольшая сохранность клеток в присутствии всех указанных детергентов. Модификатор ДИДС в среде усиливает гемолиз в клетках, хотя не изменяет тенденцию его развития в средах, содержащих NaCl и сахарозу, в присутствии неионных и ионных детергентов. Установлено, что среда, содержащая 0,15 М NaCl и 0,5М сахарозы, обеспечивает устойчивость эритроцитов к детергентам. Интенсивность такого защитного действия и усиливающего гемолиз действия ДИДС зависит от вида детергента.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, детергенты, осмотический фактор.

Досліджено гемоліз еритроцитів людини в розчинах, які містять NaCl та сахарозу (різної молярності), під впливом неіонних (Твін-20 – поліоксигетиленсорбітан монолаурат; Тритон X-100 – октилфенол поліетилєнґліколь) та іонних (ЦТАБ – цетилтриметиламмонійбромід; ДСН – додецил-сульфат натрію) детергентів з різною концентрацією. Вивчена дія цих детергентів на лизис клітин у присутності модифікатора агрегатного стану білка смуги 3 – ДІДС (4,4-діізотіоціаностилбен 2,2-дисульфат динатрієва сіль). Відсоток гемолізу еритроцитів збільшується при підвищенні концентрації детергентів у розчині. В досліджених розчинах характер розвитку гемолізу всіх детергентів однаковий. У розчині 0,15М NaCl; 0,5М сахарози; 20 мМ Трис (рН 7,4) виявлена найбільша збереженість клітин у присутності вказаних детергентів. Модифікатор ДІДС у середовищі підсилює гемоліз у клітинах, хоча не змінює тенденцію його розвитку в середовищах, що містять NaCl та сахарозу, в присутності неіонних та іонних детергентів. Встановлено, що розчин, який містить 0,15 М NaCl і 0,5М сахарози, забезпечує стійкість еритроцитів до детергентів. Інтенсивність захисної дії та підсилюючої гемоліз дії ДІДС залежить від виду детергенту.

Ключові слова: еритроцити, гемоліз, детергенти, осмотичний фактор.

There was studied the human erythrocyte hemolysis in the media, containing NaCl and sucrose of different molarity under the effect of non-ionic detergents (Tween 20: polyoxyethylene sorbitan monolaurate; Triton X-100: octylphenol polyethylene glycol) and ionic ones (CTAB: cetyl trimethyl ammonium bromide; SDS: sodium dodecyl sulphate) of various concentrations. Their effect on cell lysis in the presence of aggregate state modifier of band 3 protein: DIDS (4,4-diisothiocyanostilbene-2,2-disulfonic acid) was studied. The percentage of erythrocyte hemolysis increases when augmenting detergent concentration in solution. In the solution with 0.15 M NaCl; 0.5 M sucrose; 20 mM Tris (pH 7.4) we fixed the highest cell integrity in the presence of all mentioned detergents. DIDS modifier in the medium strengthens hemolysis in cells, although does not change the tendency of its development in NaCl and sucrose-containing media in the presence of ionic and non-ionic detergents. The medium, containing 0.15 M NaCl and 0.5 M sucrose was established to provide the erythrocyte resistance to detergents. The intensity of such a protective effect and hemolysis strengthening DIDS effect depends on a detergent type.

Key-words: erythrocytes, hemolysis, detergents, osmotic factor.

Известно, что при лизисе эритроцитов, вызванном детергентами, разрушается липидный бислой мембраны [4]. Детергенты способны связываться с мембранным белком гидрофобными связями, одновременно взаимодействуя полярными группами с водой [4].

There is known that under erythrocyte lysis, caused by detergents, the disorder in lipid bilayer of membrane occurs [4]. Detergents are capable to bind with a membrane protein via hydrophobic bonds, by polar group simultaneous interaction with water [4]. A

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* 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

¹V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 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

пами с водой [4]. Установлено существенное различие действия на мембрану ионных и неионных детергентов. В работе мы использовали детергенты: ионные (цетилтриметиламмонийбромид – ЦТАБ; додецилсульфат натрия – ДСН) и неионные (полиоксиэтиленсорбитан монолаурат – Твин-20; октилфенол полиэтиленгликоль – Тритон X-100;). Установлено, что Твин-20 и Тритон X-100 солюбилизируют меньшее количество белков из мембраны, чем ДСН [15], ЦТАБ в отличие от ДСН денатурирует белки, образуя с ними отрицательно заряженные комплексы [10].

В настоящее время существует большое количество теорий воздействия детергентов, однако механизм повреждения мембраны детергентами полностью не изучен. При осмотическом гемолизе изменяется структура белка полосы 3, который формирует канал анионного транспорта и является главным интегральным белком, так как в эритроцитарной мембране он составляет примерно половину от общего содержания интегральных белков [9]. Белок полосы 3 высокоструктурирован, многократно пронизывает эритроцитарную мембрану и существует в димерной и тетрамерной формах [9]. При связывании с ДИДС диссоциация тетрамеров на димеры приводит к увеличению площади гидрофобного контакта белка полосы 3 с липидами, что не влияет на деформацию и стабильность мембраны [18].

В связи с этим представляло интерес исследовать влияние осмотического воздействия и модификации гидрофобных взаимодействий белка полосы 3 в мембране на гемолитическое действие ионных и неионных детергентов в средах, содержащих NaCl и сахарозу.

Цель работы – исследование влияния осмотического воздействия и модификатора белка полосы 3 ДИДС на чувствительность эритроцитов к действию ионных и неионных детергентов в средах, содержащих NaCl и сахарозу.

Материалы и методы

Эритроциты получали из свежесконсервированной донорской крови человека, которая была заготовлена на глюцицировом консерванте и доставлена из областной станции переливания крови г. Харькова. С целью унификации объекта использовали кровь мужчин II группы. После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl; 0,02 моль/л Трис-буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты в виде плотного осадка хранили при 4°C и использовали в течение 2 ч.

В работе применяли NaCl (х. ч.), сахарозу (ч. д.а.), ДИДС (Sigma), детергенты: ЦТАБ

considerable difference in the effect on a membrane of ionic and non-ionic detergents was established. In the research we used the following detergents: ionic (cetyltrimethyl ammonium bromide – CTAB; sodium dodecyl sulphate – SDS) and non-ionic ones (polyoxyethylene sorbitan monolaurate – Tween 20; octyl phenol polyethylene glycol – Triton X-100). Tween 20 and Triton X-100 were established to solubilise less number of proteins from a membrane than SDS [15], CTAB in contrast to SDS denatures proteins by forming with them negatively charged complexes [10].

Nowadays there is a huge number of theories about detergent effect, but the mechanisms of membrane damage by detergents is not completely studied. Under osmotic hemolysis there is a change in the structure of band 3 protein, forming anion transport channel and being the main integral protein, since in erythrocyte membrane it makes about a half of total content of integral proteins [9]. Being highly structured, the band 3 protein penetrates in a manifold way the erythrocyte membrane and exists in dimer and tetramer forms [9]. When binding with DIDS the tetramer dissociation into dimers results in an increase of hydrophobic contact area of band 3 protein with lipids, that does not affect membrane deformation and stability [18].

Due to this fact of interest was to study the influence of osmotic effect and modification of hydrophobic interactions of band 3 protein in membrane on hemolytic action of ionic and non-ionic detergents in the media, containing NaCl and sucrose.

The research aim is to study the effect of osmotic influence and modifier of band 3 protein, DIDS, on erythrocyte sensibility to the action of ionic and non-ionic detergents in the media, containing NaCl and sucrose.

Materials and methods

Erythrocytes were derived from freshly preserved human donor blood, prepared with Glugicir preservative and delivered from the Kharkov Regional Hemotransfusion Station. Male group A blood was used for unification of the experiments. After plasm removal the erythromass was thrice washed with centrifugation at 3,000 rpm during 3 min in 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/l NaCl; 0.02 mol/l Tris buffer, pH 7.4). Buffy coat layer and supernatant were removed by aspiration. Erythrocytes in the form of dense sediment were stored at 4°C and used within 2 hrs.

In the research we used NaCl (chemically pure), sucrose (pure for analysis), DIDS (Sigma), detergents: CTAB (Sigma); SDS (Sigma); Triton X-100 (Serva); Tween 20 (Ferak).

Detergent lysis was carried-out at 22±1°C within 10 min. Cell concentration in experimental media was 0.35% in 1 ml suspension volume. The rest cells were precipitated by centrifugation within 3 min at 3,000 rpm.

DIDS solution was prepared with distilled water in 2 mmol/l concentration and added into an experimental

(Sigma); ДСН (Sigma); Тритон X-100 (Serva); Твин-20 (Ferak).

Детергентный лизис проводили при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. Концентрация клеток в экспериментальных средах составляла 0,35% в объеме суспензии 1 мл. Оставшиеся клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 3000 об/мин.

Раствор ДИДС готовили на дистиллированной воде в концентрации 2 мМ/л и добавляли в экспериментальную среду за 2 мин до внесения детергентов с конечной концентрацией 20 мкМ/л.

В работе использовали комбинированные среды с 0,15 М NaCl и сахарозой разной концентрации (0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 М), приготовленные на 20 мМ Трис-буфера, pH 7,4. Перед добавлением ДИДС и детергентов эритроциты инкубировали в средах в течение 2 мин.

После проведения детергентного лизиса клетки осаждали центрифугированием. Процент гемолиза эритроцитов определяли по содержанию гемоглобина в надосадочной жидкости спектрофотометрическим методом ($\lambda = 543$ нм). Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии Тритон X-100 (0,1 %) по формуле: $[A_1/A_2] \times 100$, где A_1 – оптическая плотность надосадочной жидкости экспериментального образца; A_2 – оптическая плотность при полном гемолизе экспериментального образца.

Среднее значение рассчитывали с учетом результатов, полученных на эритроцитах от пяти доноров \pm стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали t-критерий Стьюдента при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследовано влияние осмотического фактора на детергентный лизис эритроцитов в средах, содержащих NaCl и сахарозу. На рис. 1 представлены кривые гемолиза эритроцитов человека под воздействием ионных и неионных детергентов. В результате исследования лизиса эритроцитов под воздействием детергентов установлено, что при повышении в растворе концентрации последних повреждаемость клеток возрастает, а характер развивающегося процесса сходен в средах с различным содержанием детергентов. Наибольшая сохранность клеток при воздействии всех использованных в работе детергентов наблюдается в растворе, содержащем 0,15 М NaCl; 0,5 М сахарозы, 20 мМ Трис pH 7,4. Данная среда является оптимальной для эритроцитов, поскольку оказывает на них протектирующее действие при детергентном лизисе.

Анализируя гемолиз эритроцитов под действием ЦТАБ (рис. 1, а), можно заметить, что при уве-

medium 2 min prior to detergent introduction with $20 \mu\text{mol/l}$ final concentration.

In the research we used the combined media with 0.15 M NaCl and sucrose with different concentrations (0; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9 M), prepared with 20 mM Tris-buffer, pH 7.4. Before adding DIDS and detergents the erythrocytes were incubated in media during 2 min.

After performing detergent lysis the cells were precipitated by centrifugation. Percentage of erythrocyte hemolysis was spectrophotometrically ($\lambda = 543$ nm) determined by hemoglobin content in supernatant. Hemoglobin release out of cells was calculated in percentage in respect to 100% erythrocyte hemolysis in Triton X-100 presence by the following formula: $[A_1/A_2] \times 100$, where A_1 is optical density of experimental sample's supernatant; A_2 is optical density under a complete hemolysis of experimental sample.

The mean value was calculated considering the results, obtained with erythrocytes from 5 donors \pm the standard error. To determine statistical significance of the results there was used the Student's t-criterion at $P < 0.05$.

Results and discussion

There was investigated the effect of osmotic factor on detergent lysis of erythrocytes in the media, containing NaCl and sucrose. Fig. 1 shows hemolysis curves of human erythrocytes under the effect of ionic and non-ionic detergents. As a result of studying the erythrocyte lysis under detergent effect there was established that with increasing concentration of the latter in solution, the cell damage augments, and a character of developing process is similar with that in the media with different content of detergents. The highest cell integrity under the effect of all detergents, used in the research, is observed in the solution with 0.15 M NaCl; 0.5 M sucrose; 20 mM Tris pH 7.4. This medium is the optimal for erythrocytes because of its protective effect on them during detergent lysis.

If analysing erythrocyte hemolysis under CTAB effect (Fig. 1, a) we may note, that under an increased CTAB concentration from 13 to $26 \mu\text{mol/l}$ in the solution the erythrocyte hemolysis does not significantly augment in all the media, meanwhile in the solution with 0.5 M sucrose, 0.15 M NaCl it remains at the same level. Under $39 \mu\text{mol/l}$ CTAB concentration the erythrocyte hemolysis is similar in all media (Fig. 1, a).

In the experiments with Tween-20 (Fig. 1, b), SDS (Fig. 1, c) and Triton X-100 (Fig. 1, d) there was established the same tendency of hemolysis development as for CTAB effect, but the curves have more flattened form, compared to the CTAB-induced lysis. Of note is the fact, that in the experiments with Tween 20 and Triton X-100 the hemolysis level in the medium with 0.5 M sucrose, 0.15 M NaCl is higher, than at erythrocyte treatment with CTAB and SDS. Moreover,

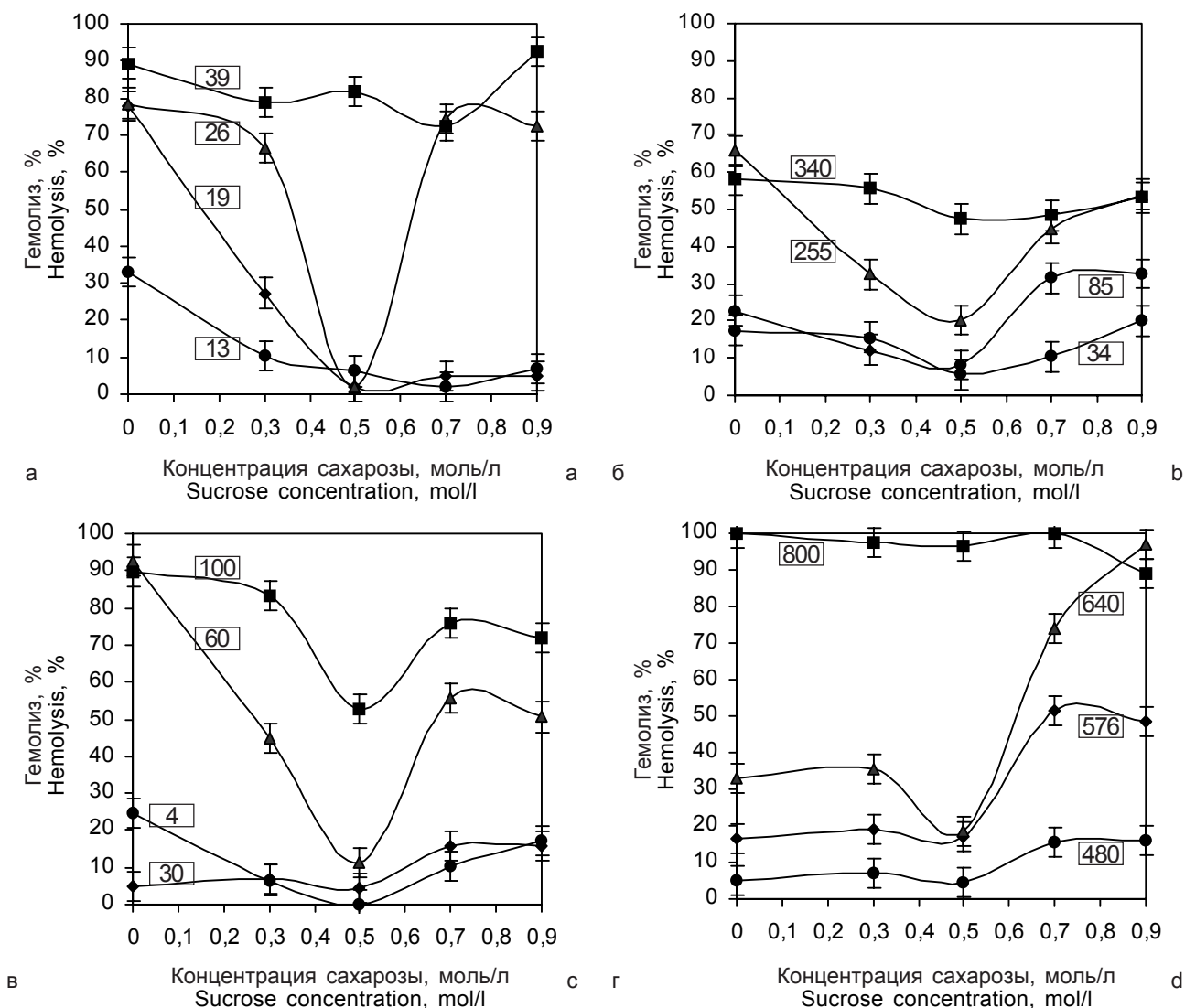


Рис. 1. Лизис эритроцитов человека в средах, содержащих 0,15M NaCl+ 20 мМ Трис (pH 7,4) и сахарозу разной молярности (0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 моль/л), под воздействием различных детергентов: а – ЦТАБ; б – Твин-20; в – ДСН; г – Тритон X-100; [255] – концентрация детергента, мкмоль/л.

Fig. 1. Lysis of human erythrocytes in media, containing 0.15 M NaCl+20 mM Tris (pH 7.4) and sucrose of different molarity (0; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9 mol/l) under detergent effect: а – CTAB; б – Tween 20; с – SDS; д – Triton X-100; [255] – detergent concentration, μ mol/l.

личении концентрации ЦТАБ в растворе от 13 до 26 мкмоль/л гемолиз эритроцитов существенно возрастает во всех средах, тогда как в растворе, содержащем 0,5 М сахарозы, 0,15 М NaCl, он остается на том же уровне. При концентрации ЦТАБ 39 мкмоль/л гемолиз эритроцитов сходен во всех средах (рис. 1, а).

В экспериментах с Твин-20 (рис. 1, б), ДСН (рис. 1, в) и Тритон X-100 (рис. 1, г) установлена аналогичная тенденция развития гемолиза, как и при воздействии ЦТАБ, однако кривые имеют более сглаженный вид по сравнению с лизисом, вызванным ЦТАБ. Отметим, что в экспериментах с Твин-20 и Тритон X-100 уровень гемолиза в среде с 0,5 М сахарозы, 0,15 М NaCl выше, чем при обработке эритроцитов ЦТАБ и ДСН. Причём в

in the experiments with CTAB the hemolysis level in this medium is lower than under SDS treatment of cells.

Fig. 2 shows a detergent hemolysis of DIDS-treated human erythrocytes. In all the experiments with DIDS the number of damaged cells was established to increase, moreover in the experiment with CTAB it was the highest. Hemolysis of DIDS treated erythrocytes and untreated ones differs by 35–80%. Under detergent lysis with SDS and Tween 20 the differences achieve 20–30% and 20–40%, correspondingly. Under DIDS effect on erythrocytes, placed in media with Triton X-100 the DIDS effect, strengthening hemolysis, is the lowest. The data on hemolysis of DIDS treated erythrocytes are not statistically and significantly different from untreated ones (Fig. 2, d). Thus, the binding of Triton X-100 with DIDS, modifying band 3

экспериментах с ЦТАБ уровень гемолиза в данной среде ниже, чем при обработке клеток ДСН.

На рис. 2 показан детергентный гемолиз эритроцитов человека, обработанных ДИДС. Установлено, что во всех экспериментах с ДИДС увеличивается количество повреждённых клеток, причём в эксперименте с ЦТАБ оно наибольшее. Гемолиз эритроцитов, обработанных и необработанных ДИДС, отличается на 35–80%. При детергентном лизисе с ДСН отличия достигают 20–30%, с Твин-20 – 20–40%. При воздействии ДИДС на эритроциты, помещённые в среды с Тритон X-100, влияние ДИДС, который усиливает гемолиз, наименьшее (рис. 2, г). Данные гемолиза эритроцитов, обработанных ДИДС, статистически не отлича-

protein, does not significantly affect hemolysis curves. There was also established, that under DIDS effect on detergent lysis the most optimal medium for erythrocytes is that, containing 0.5 M sucrose, 0.15 M NaCl (Fig. 2).

Hypertonic hemolysis is used as the method, enabling to model damages during bioobject cryopreservation. A universal approach to achieve cell cryoresistance is assumed to be in providing the conditions, when a cell is maximally stable under osmotic dehydration. At the same time the dehydration of cells is the factor, controlling cytoskeletal state [3].

Due to dehydration there is a change in surface-volume cell ratio. Modification of cell volume at preliminary stages is the simplest way to increase cell resis-

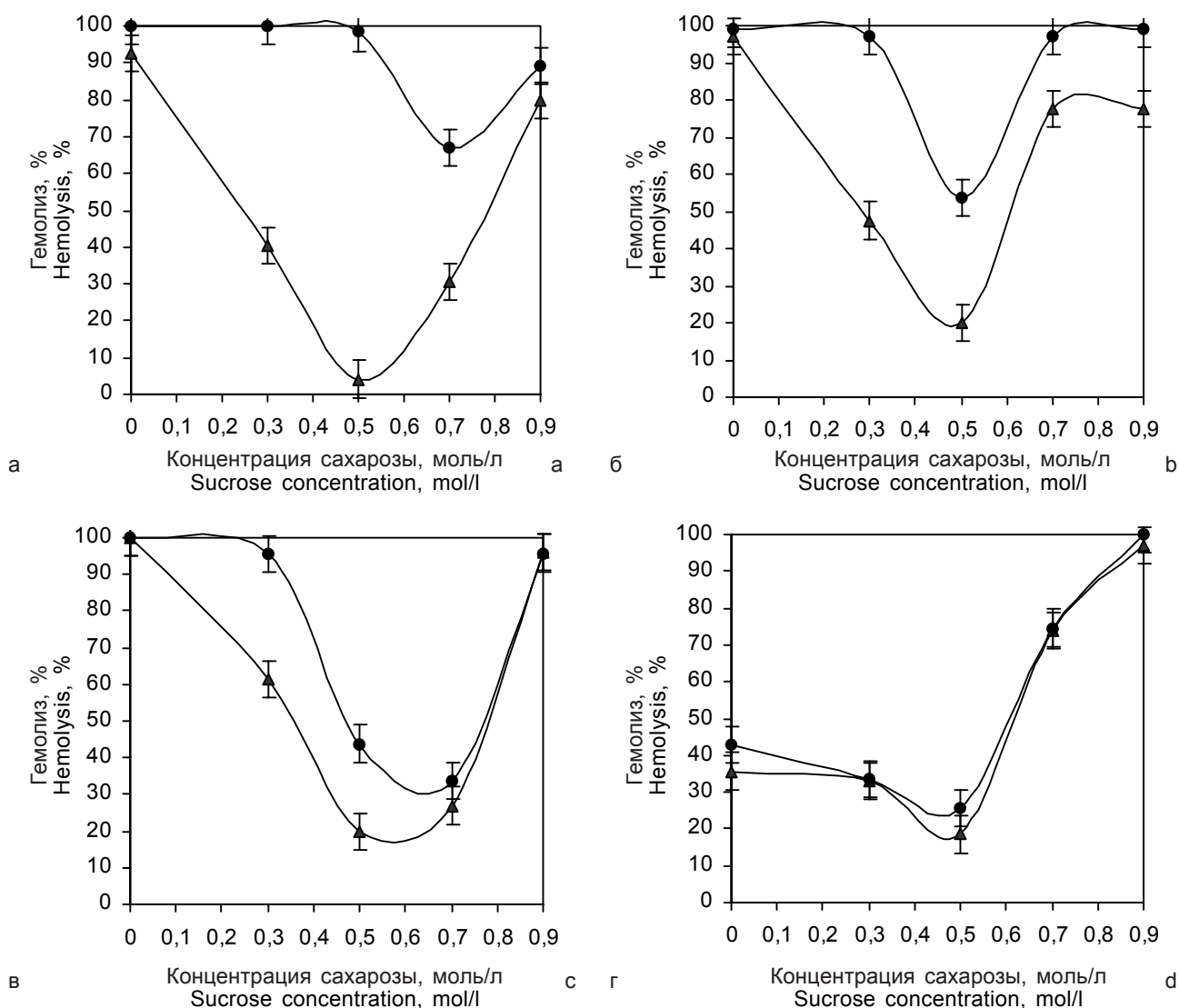


Рис. 2. Влияние ДИДС (20 мкмоль/л; ● – среда с ДИДС; ▲ – среда без ДИДС) на детергентный лизис эритроцитов человека в средах, содержащих 0,15 М NaCl + 20 мМ Трис (рН 7,4) и сахарозу разной молярности (0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 моль/л) под воздействием: а – 26 мкмоль/л ЦТАБ; б – 30 мкМ/л Твин-20; в – 85 мкмоль/л ДСН; г – 640 мкмоль/л Тритон X-100.

Fig. 2. DIDS effect (20 μ mol/l; ● – medium with DIDS; ▲ – medium without DIDS) on detergent lysis of human erythrocytes in media, containing 0.15 M NaCl + 20 mM Tris (pH 7.4) and sucrose of different molarity (0; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9 mol/l) under detergent effect: а – 26 μ mol/l CTAB; б – 30 μ mol/l Tween 20; в – 85 μ mol/l SDS; г – 640 μ mol/l Triton X-100.

ются от необработанных (рис. 2, г). Таким образом, связывание Тритон X-100 с ДИДС, модифицирующего белок полосы 3, существенно не влияет на кривые гемолиза. Также установлено, что и при действии ДИДС на детергентный лизис наиболее оптимальная для эритроцитов среда, содержащая 0,5М сахарозы, 0,15М NaCl (рис. 2).

Гипертонический гемолиз используют как метод, позволяющий моделировать повреждения при криоконсервировании биообъектов. Предполагают, что универсальный подход к достижению криоустойчивости клеток заключается в обеспечении условий, при которых клетка обладает максимальной стабильностью при осмотической дегидратации. При этом дегидратация клеток является фактором, управляющим состоянием цитоскелета [3].

Вследствие дегидратации изменяется поверхностно-объемное отношение клетки. Модификация объема клеток на предварительных этапах – наиболее простой способ повышения устойчивости клеток к гипертоническому шоку и замораживанию [3]. Следовательно, можно направленно контролировать и управлять осмотической чувствительностью клеток [3]. В работе [1] показано, что пора, образующаяся в эритроцитарной мембране при осмотическом гемолизе, способна увеличиваться или уменьшаться в зависимости от экспериментальных условий, т.е. она представляет собой динамическую структуру.

В работе [1] рассматривается возможная деформация плазматической мембраны при частичном обезвоживании клетки. При определенных значениях тоничности среды и времени инкубации клеток изгибание плазматической мембраны может быть причиной латерального перераспределения мембранных компонентов и не приводит к лизису клетки.

Полученные результаты позволяют предположить, что плазматическая мембрана эритроцитов, помещенных в среду, содержащую 0,15М NaCl и 0,5М сахарозы, претерпевает модификации в результате латерального перераспределения компонентов. Это приводит к уменьшению объема клеток на предварительных этапах обработки и обуславливает высокую устойчивость к дальнейшему гипертоническому воздействию [6]. В результате этого наблюдается осмотически-индуцированная устойчивость клеток к стрессу. Возможно, повышение уровня сохранности эритроцитов при обработке растворами, содержащими 0,5М сахарозы или 0,45М NaCl, связано с включением осмотического механизма нарастания устойчивости. Данный процесс заключается в модификации взаимодействий цитоскелета с липидным бислоем мембраны в области связей белок полосы 3 –

tance to hypertonic stress and freezing [3]. Consequently, a directed control for cell osmotic sensitivity is possible [3]. As demonstrated in the paper [1], the pore, forming in erythrocyte membrane under osmotic hemolysis is capable of increasing or reducing depending on experimental conditions, *i. e.* it represents a dynamic structure.

A possible deformation of plasmatic membrane under partial cell dehydration is envisaged in the paper [1]. Under the certain values of medium tonicity and cell incubation time, the flexure of plasmatic membrane may be the cause of lateral redistribution of membrane components without leading to cell lysis.

The results obtained allow to assume plasmatic membrane of erythrocytes, placed into the medium, containing 0.15 M NaCl and 0.5 M sucrose, as undergoing modifications as a result of lateral redistribution of components. This results in cell volume decrease at preliminary stages of treatment and stipulates a high resistance to further hypertonic effect [6]. As a result there is observed an osmotically-induced cell resistance to stress. The augmentation of erythrocyte preservation level during cell treatment with solutions, containing 0.5 M sucrose and 0.45 M NaCl, is possibly associated to the triggering of osmotic mechanism of resistance increase. This process consists in the modification of cytoskeletal interaction with membrane lipid bilayer in the area of band 3 protein-ankyrin-cytoskeleton bonds [8]. As a result, the maximum cell stability under hypertonic stress is achieved. One believes, that sucrose is capable to manifest cryoprotective properties by affecting protein components of membrane and to stabilise the protein-lipid interaction [7]. The sucrose presence in the medium is known to reduce the solubility of non-ionic and zwitterionic detergents and correspondingly to decrease the critical concentrations of micelle-formation (CCM) [19].

One of the approaches in membrane studying is the effect on it by different modifiers, in particular detergents: the group of amphiphilic compounds, capable for hydrophilic and hydrophobic interactions [4]. There are known two models of solubilisation and fragmentation of membranes by detergents: the first one is a cooperative binding of detergent molecule with membrane during following transfer inside a cell and binding with internal monolayer; the second one is the lipid extraction from external membrane monolayer by direct transfer in detergent micelles. In both cases the membranes are fragmented with formation of mixed vesicles, containing molecules of detergents and lipids or detergents and proteins. According to the hypothesis [11] the membrane solubilisation comprises three stages. At the first stage the detergents are bound without solubilisation with membrane fractions, meanwhile at the third one the membrane components are completely solubilized, by aggregating in mixed mi-

анкирин-цитоскелет [8]. В результате достигается максимальная стабильность клеток при гипертоническом шоке. Существует мнение, что сахароза способна проявлять криопротекторные свойства, действуя на белковые компоненты мембраны, и стабилизировать белково-липидные взаимодействия [7]. Известно, что присутствие в среде сахарозы снижает растворимость неионных и цвиттерионных детергентов и соответственно уменьшает критические концентрации мицеллообразования (ККМ) [19].

Одним из подходов к исследованию мембраны является воздействие на неё различными модификаторами, в частности детергентами – группой амфифильных соединений, которые способны к гидрофильным и гидрофобным взаимодействиям [4]. Известны две модели солюбилизации и фрагментации мембран детергентами: первая – кооперативное связывание молекул детергента с мембраной при последующем переносе внутрь клетки и связывании с внутренним монослоем; вторая – экстракция липидов из внешнего монослоя мембраны прямым переносом в детергентные мицеллы. В обоих случаях мембраны фрагментируются с образованием смешанных везикул, содержащих молекулы детергентов и липидов или детергентов и белков. Согласно гипотезе [11] солюбилизация мембраны включает три стадии. На стадии I детергенты связываются без солюбилизации с мембранными фракциями, тогда как на стадии III мембранные компоненты полностью солюбилизируются, объединяясь в смешанные мицеллы. Полагают, что на стадии II насыщение мембран детергентом осуществляется со смешанными мицеллами при термодинамическом взаимодействии, близком к ККМ [11].

Скорость и тип солюбилизации биологических мембран зависит от состояния и природы детергента, мембраны [10].

При немиецеллярном связывании детергента с мембраной насыщение мембраны происходит кооперативным способом в концентрации, которая ниже ККМ. Этот процесс сопровождается медленным связыванием и солюбилизацией мембраны [11]. При действии детергента в концентрации выше его ККМ наблюдаются полная солюбилизация мембранных структур и включение компонентов мембраны в собственные мицеллы детергента. Если используемая концентрация не достигает ККМ, происходит модификация мембраны без полного разрушения структур бислоя [4].

Катионный детергент ЦТАБ лизирует клетки и ядра, денатурирует белки и образует с ними положительно заряженные комплексы [2]. Указанный детергент в водных растворах образует мицеллы, размер которых увеличивается при повышении его

концентрации. One believes, that at the second stage the membrane saturation with detergent is realised with mixed micelles under thermodynamic interaction, close to CCM [11].

The rate and type of biological membrane solubilisation depend on the state and nature of detergent, membrane [10].

During non-micelle binding of detergent with membrane its saturation occurs by a cooperative way in the concentration lower than CCM. This process is accompanied by a slow binding and solubilisation of membrane [11]. Under detergent effect in the concentration higher than its CCM, there are observed a complete solubilisation of membrane structures and the inclusion of membrane components into the own micelles of detergent. If the used concentration does not achieve CCM, there is occurred the membrane modification without complete destruction of bilayer structures [4].

Cationic detergent CTAB lyses cells and nuclei, denatures proteins and forms with them the positively-charged complexes [2]. The mentioned detergent in aqueous solutions forms the micelles, which size augments with its concentration increase [5]. Non-ionic detergents Tween 20 and Triton X-100 are polyoxyethylene derivatives. Tween 20 is applied to treat membranes for peripheral protein removal. The anionic detergent SDS lyses cells and nuclei, denatures proteins and forms with them negatively charged complexes, destroys nucleoproteids [2]. It is usually used when preparing proteins for electrophoresis [5]. This detergent denatures proteins, by destroying non-covalent bonds. The SDS is known to bind with the main chain of peptide in the ratio of one SDS molecule for two residues of aminoacid, thereby changing protein charge for negative, proportional to this protein mass (appr. 1.4 g SDS/g of protein). The obtained charge is significantly bigger than the initial one. Electrostatic tension, forming during binding with SDS, contributes to protein repulsion from each other and a change in membrane protein structures [11].

During lipid solubilisation by detergent with concentration lower than CCM, the isolated membrane proteins are known as capable to preserve their enzymatic or transport functions [20]. Triton X-100 is applied to obtain band 3 protein, preserving its transport functions after inclusion into liposomes [13].

SDS and Tween 20 were established to solubilise lipid membranes in concentrations equal or exceeding CCM [11]. Under Triton X-100 effect, which concentration corresponds to CCM, there are occurred the protein extraction and liquefaction of membrane lipid bilayer with no change in polarity of membrane hydrophobic areas [21]. Lipid bilayer destruction with lipid and protein separation begins after Triton X-100 monomer inclusion into membranes [15]. At the same

концентрации [5]. Неионные детергенты Твин-20 и Тритон X-100 являются производными полиоксиэтилена [11]. Твин-20 используют для обработки мембран с целью удаления периферических белков. Анионный детергент ДСН лизирует клетки и ядра, денатурирует белки и образует с ними отрицательно заряженные комплексы, разрушает нуклеопротеиды [2]. Он обычно используется при подготовке белков для электрофореза [5]. Этот детергент денатурирует белки, разрушая нековалентные связи. Известно, что ДСН связывается с основной цепью пептида в соотношении одна молекула ДСН на два остатка аминокислоты, что изменяет заряд белка на отрицательный, который пропорционален массе этого белка (приблизительно 1,4 г ДСН/г белка). Полученный заряд значительно больше, чем первоначальный. Электростатическое напряжение, которое создается при связывании с ДСН, способствует отталкиванию белков друг от друга и изменению белковых структур мембраны [11].

Известно, что при солюбилизации липидов детергентом с концентрацией, ниже его ККМ, выделяемые мембранные белки могут сохранять свои энзиматические или транспортные функции [20]. Тритон X-100 используют для получения белка полосы 3, который сохраняет свои транспортные функции после включения в липосомы [13].

Установлено, что ДСН и Твин-20 солюбилизируют липиды мембран в концентрациях, равных или превышающих ККМ [11]. При действии Тритон X-100, концентрация которого соответствует ККМ, происходят экстракция белков и разжижение липидного бислоя мембраны без изменения полярности гидрофобных областей мембраны [21]. Разрушение липидного бислоя с разделением липидов и белков начинается после включения в мембраны мономеров Тритон X-100 [14]. При этом наблюдается немицеллярный механизм взаимодействия детергента с белками [12]. Показано, что Тритон X-100 и Твин-20 солюбилизируют меньшее количество белков из мембран эритроцитов, чем ДСН [14]. В работе [10] показано, что неионные детергенты (Твин-20, Тритон X-100) взаимодействуют преимущественно с липидными компонентами мембран, содержащими Са-АТФазу, в концентрациях ниже их ККМ, тогда как ионные детергенты (в частности ДСН) экстрагируют Са-АТФазу перед солюбилизацией липидов [10]. Солюбилизация мембран неионными детергентами, в отличие от ДСН, происходит в результате кооперативного связывания преимущественно с липидными компонентами белоксодержащих мембран [10].

Вышеизложенные данные согласуются с результатами, полученными нами. Показано, что высокая устойчивость эритроцитов к гипертоническому шоку и замораживанию контролируется

time a non-micelle mechanism of detergent interaction with proteins is observed [12]. Triton X-100 and Tween 20 were shown to solubilise less proteins from erythrocyte membranes, than SDS [14]. As shown in the paper [10], the non-ionic detergents (Tween 20, Triton X-100) mostly interact with lipid components of membranes, containing Ca-ATPase in concentrations lower than their CCM, meanwhile the ionic detergents (particularly SDS) extract Ca-ATPase before lipid solubilisation [10]. Membrane solubilisation by non-ionic detergents in contrast to SDS occurs as a result of cooperative binding mostly with lipid components of protein-containing membranes [10].

The mentioned above data conform to our results. Erythrocyte high resistance to hypertonic stress and freezing was shown as controlled by their volume [6]. Detergent action was established as stipulated by the capability to bind by hydrophobic bonds with protein membrane components [4]. Due to such building of detergent the bond between membrane components destroys, and finally the biomembrane solubilisation occurs. Osmotic effect as the factor, capable to sharply increase the erythrocyte resistance to cooling and transfer into hypertonic solutions, is associated to strengthening hydrophobic bonds in membrane [6]. Therefore an osmotic pressure prevents the occurrence of detergent-caused damages in the medium, containing 0.5 M sucrose and 0.15 M NaCl (Fig. 2) [6].

Hemolysis curves with Triton X-100 and Tween 20 (see Fig. 1, b, d) look like more flattened compared to the data about lysis at SDS and CTAB presence (see Fig. 1, a, b). This testifies to the fact, that SDS and CTAB cause more significant effect on erythrocyte membranes, than Triton X-100 and Tween 20. Different intensity of damaging effect is stipulated by the effect character on membrane of ionic and non-ionic detergents. Non-ionic detergents (Tween-20, Triton X-100) result in the rupture of protein-lipid bonds, without damaging protein membrane components [14]. Ionic detergents act not only on the protein-lipid boundary, but cause protein denaturation as well [14].

Osmotic lysis is accompanied by modifications in membrane, associated to the changes in band 3 protein structure [16]. In our research we used DIDS: band 3 protein modifier [17].

DIDS binding with a membrane results in a disorder of bonds between cytoskeletal and band 3 protein [16], reducing a protective effect of osmotic action at preliminary stages of cell incubation. Of knowledge is the fact that during DIDS binding with band 3 protein there is an increase in contact area of this protein with lipid membrane components. This is the reason of an increase in the number of damaged cells during DIDS modifier effect on detergent lysis [17].

When binding with erythrocyte membrane, DIDS causes the dissociation of band 3 protein tetramers

их объёмом [6]. Установлено, что действие детергентов обусловлено способностью связываться гидрофобными связями с белковыми компонентами мембраны [4]. За счет такого встраивания детергентов разрушается связь между компонентами мембраны и, в конечном итоге – биомембраны солюбилизируются. Осмотическое действие как фактор, способный резко повышать устойчивость эритроцитов к охлаждению и переносу в гипертонические растворы, связан с усилением гидрофобных связей в мембране [6]. Поэтому осмотическое действие препятствует возникновению повреждений, вызванных детергентами, в среде, содержащей 0,5 М сахарозы, 0,15 М NaCl (рис. 2) [6].

Кривые гемолиза с Тритон X-100 и Твин-20 (см. рис. 1, б, г) имеют более сглаженный вид по сравнению с данными лизиса в присутствии ДСН и ЦТАБ (см. рис. 1, а, в). Это свидетельствует о том, что ДСН и ЦТАБ оказывают более значительное действие на мембраны эритроцитов, чем Тритон X-100 и Твин-20. Различная интенсивность повреждающего действия обусловлена характером действия на мембрану ионных и неионных детергентов. Неионные детергенты (Твин-20, Тритон X-100) приводят к разрыву белково-липидных связей, не повреждая белковые компоненты мембраны [15]. Ионные детергенты действуют не только на границе белок-липид, но и вызывают денатурацию самих белков [15].

Осмотический лизис сопровождается модификациями в мембране, связанными с изменениями структуры белка полосы 3 [16]. В нашей работе был использован ДИДС – модификатор белка полосы 3 [17].

Связывание ДИДС с мембраной приводит к разрушению связей цитоскелета с белком полосы 3 [16], что снижает защитный эффект осмотического действия на предварительных этапах инкубации клеток. Известно, что при связывании ДИДС с белком полосы 3 увеличивается площадь контактов данного белка с липидными компонентами мембраны. Это является причиной увеличения количества поврежденных клеток при воздействии на детергентный лизис модификатора ДИДС [17].

При связывании с мембранами эритроцитов ДИДС вызывает диссоциацию тетрамеров белка полосы 3 на димеры [17], что способствует ослаблению взаимодействия цитоскелета с мембраной. Такое влияние приводит к усилению действия ионных детергентов (как в случае с ЦТАБ и ДСН), которые солюбилизируют мембранные белки [14]. Однако при увеличении площади контактов белок-липид [14] действие неионных детергентов (Твин-20, Тритон X-100) на мембрану ослабляется. Поэтому влияние ДИДС на лизис с ЦТАБ и ДСН (рис. 2, а, в) проявляется в большей степени, чем

into dimers [17], contributing to the weakening of cytoskeletal interaction with membrane. Such an effect results in strengthening of ion detergent effect (as in case with CTAB and SDS), which solubilise membrane proteins [14]. However when increasing the area of protein-lipid contacts [14] the effect of non-ionic detergents (Tween 20, Triton X-100) on membrane is weakened. Therefore the DIDS effect on lysis with CTAB and SDS (Fig. 2, a, c) is manifested in a greater extent, than on a detergent one, caused by Tween 20 and Triton X-100 (Fig. 2, b, d).

The results obtained enable suggesting an osmotic factor at preliminary stages before different detergents effect as contributing to an increase in erythrocyte resistance, by strengthening the interaction of cytoskeleton with band 3 protein. This proves the correctness of the approach to search the way for cell resistance increase by modifying their states at preliminary incubation stages.

Conclusions

The medium, containing 0.15 M NaCl; 0.5 M sucrose protectively affects erythrocytes under detergent lysis, caused by both ionic and non-ionic detergents.

DIDS presence in the medium results in a rise of cell sensitivity to detergent effect and reduces the erythrocyte integrity under osmotic effect.

Modifier DIDS is capable in a different extent to strengthen the erythrocyte sensitivity to ionic and non-ionic detergents.

References

1. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 331 p.
2. *Bogatov V.V.* DNA and RNA isolation for pharmacy. Methods for DNA and RNA isolations, envisaged in terms of industrial pharmacy // Bull. Eksp. Biol. Med.– 1983.– Vol. 50, N4.– P. 41–47.
3. *Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V.* Dehydration effects in controlling the cold and osmotic sensitivity of cells // Problems of Cryobiology.– 1992.– N4.– P. 14–25.
4. *Introduction into biomembranology: Manual / Ed. by A.A. Boldyrev.*– Moscow: Publishing House of Moscow State University, 1990.– P. 87–98.
5. *Idiyatullin Z.Sh., Arkhipov V.P., Babkina Ya.A., Ryzhkina I.S.* Study of aggregation behaviour of aminomethylated phenols and calix(4)resorcinarenes in DMFA-CTAB medium by NMR FT PMFG method // Chemistry and Computational Stimulation. Butlerov Communications.– 2002.– N6, suppl.– [web site] http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol2/cd-a3/data/jchem&cs/russian/n6/appl6/yal2001/1sdms97/1sdms97.htm (15.09.2008).
6. *Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A.* Volume shift as the factor, controlling erythrocyte osmotic resistance in solutions of low molecular cryoprotectants // Physico-chemical and biological effect of cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1990.– P. 115–123.
7. *Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.* Cryoprotectant effect on erythrocyte resistance to detergents under band 3 protein aggregate state modification stress // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 335–345.

на детергентный лизис, вызванный Твин-20 и Тритон X-100 (рис. 2, б, г).

Полученные результаты позволяют предположить, что осмотический фактор на предварительных этапах перед действием различных видов детергентов способствует повышению устойчивости эритроцитов, усиливая взаимодействия цитоскелета с белком полосы 3. Это доказывает правильность подхода к поиску пути повышения устойчивости клеток посредством модификации их состояний на предварительных этапах инкубации.

Выводы

Среда, содержащая 0,15M NaCl; 0,5M сахарозы, оказывает защитное действие на эритроциты при детергентном лизисе, вызванном как ионными, так и неионными детергентами.

Присутствие в среде ДИДС приводит к повышению чувствительности клеток к действию детергентов и уменьшает сохранность эритроцитов при осмотическом воздействии.

Модификатор ДИДС в разной мере способен усиливать чувствительность эритроцитов к ионным и неионным детергентам.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 431 с.
2. Богатов В.В. Выделение ДНК та РНК для фармации // Труды Одес. политехн. ун-та.– 1998.– №1(5).– С. 41-47.
3. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Пробл. кробиологии.– 1992.– №4.– С. 14–25.
4. Введение в биомембранологию: Учеб. пособие / Под ред. А.А. Болдырева.– М.: Изд-во МГУ, 1990. – С.87–98.
5. Идиятуллин З.Ш., Архипов В.П., Бабкина Я.А., Рыжкина И.С. Исследование агрегационного поведения аминотетраметил-ированных фенолов и каликс(4)резорциноренов в среде вода-ДМФА-ЦТАБ методом ЯМР ФП ИГМП [Электронный ресурс] // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения.– 2002.– №6, приложение.– [web-сайт] http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol2/cd-a3/data/jchem&cs/russian/n6/appl6/ya12001/1sdms97/1sdms97.htm (15.09.2008).
6. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Объёмный сдвиг как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. трудов.– Киев: Наук. думка, 1990.– С. 115–123.
7. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Влияние криопротекторов на устойчивость эритроцитов к детергентам при модификации агрегатного состояния белка полосы 3 // Пробл. кробиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 335–345.
8. Рамазанов В.В. Влияние осмотического стресса и модификаторов цитоскелета на развитие холодового и гипертонического шока эритроцитов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1993.– 138 с.

8. Ramazanov V.V. Effect of osmotic stress and cytoskeletal modifiers on development of cold and hypertonic stress of erythrocytes: Thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 1993.– P. 100.
9. Chernitsky E.A., Vorobey A.B. Structure and function of erythrocyte membranes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.– 216 p.
10. Kragh-Hansen U., le Maire M., Moller J.V. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes // Biophys. J.– 1998.– Vol. 75, N6.– P. 2932–2946.
11. le Maire M., Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1508, N1–2.– P. 86–111.
12. le Maire M., Kwee S., Andersen J.P., Moller J.V. Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins // Eur. J. Biochem.– 1983.– Vol. 129, N3.– P. 525–532.
13. Lukacovic M.F., Feinstein M.B., Shaafi R.I., Perrie S. Purification of stabilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane and its reconstitution into liposomes // Biochemistry.–1981.– Vol. 20, N11.– P. 3145–3151.
14. Macarulla J.M., Alonso A., Arrondo J.L. et al. Membrane solubilization by the non-ionic detergent triton X-100. A comparative study including model and cell membranes // Rev. Esp. Fisiol.– 1989.– Vol. 45.– P. 1–8.
15. Matson R.S., Goheen S.C. Use of high-performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilization of human erythrocyte ghosts // J. Chromatogr.– 1986.– Vol. 359.– P. 285–295.
16. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Pharm. Bull.– 1993.– Vol. 16, N2.– P. 188–194.
17. Van Dort H.M., Knowless D.W., Chasis J.A. et al. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem. Chem.– 2001.– Vol. 276, N50.– P. 46968–46974.
18. Van Dort H.M., Moriyama R., Low P.S. Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles // J. Biol. Chem.– 1998.–Vol. 273, N24.– P. 14819–14826.
19. Walter A., Kuehl G., Barnes K., Van der Waardt G. The vesicle to micelle transition of phosphatidylcholine vesicle induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1508, N1–2.– P. 20–33.
20. Womack M.D., Kendal D.A., Macdonald R.C. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes // Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol. 733, N2.– P. 210–215.
21. Yegutkin G.G. Effects of increasing concentration of nonionic detergent triton X-100 on solubilization and structure of rat liver and adipose plasma membranes // Membr. Cell. Biol.– 1997.– Vol. 10, N5.– P. 515–520.

Accepted in 18.11.2008

9. Черницкий Е.А., Воробей А.Б. Структура и функция эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 216 с.
10. Kragh-Hansen U., le Maire M., Moller J.V. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes // *Biophys. J.*– 1998. –Vol. 75, N6.– P. 2932–2946.
11. le Maire M., Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1508, N1–2.– P. 86–111.
12. le Maire M., Kwee S., Andersen J.P., Moller J.V. Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins // *Eur. J. Biochem.*– 1983.– Vol. 129, N3.– P. 525–532.
13. Lukacovic M.F., Feinstein M.B., Shaafi R.I., Perrie S. Purification of stabilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane and its reconstitution into liposomes // *Biochemistry.*–1981.– Vol. 20, N11.– P. 3145–3151.
14. Macarulla J.M., Alonso A., Arrondo J.L. et al. Membrane solubilization by the non-ionic detergent triton X-100. A comparative study including model and cell membranes // *Rev. Esp. Fisiol.*– 1989.– Vol. 45.– P. 1–8.
15. Matson R.S., Goheen S.C. Use of high-performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilization of human erythrocyte ghosts // *J. Chromatogr.*– 1986.– Vol. 359.– P. 285–295.
16. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol. 16, N2.– P. 188–194.
17. Van Dort H.M., Knowless D.W., Chasis J.A. et al. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // *J. Biol. Chem.*– 2001.– Vol. 276, N50.– P. 46968–46974.
18. Van Dort H.M., Moriyama R., Low P.S. Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles // *J. Biol. Chem.*– 1998.–Vol. 273, N24.– P. 14819–14826.
19. Walter A., Kuehl G., Barnes K., Van der Waerd G. The vesicle to micelle transition of phosphatidylcholine vesicle induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1508, N1–2.– P. 20–33.
20. Womack M.D., Kendal D.A., Macdonald R.C. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1983.– Vol. 733, N2.– P. 210–215.
21. Yegutkin G.G. Effects of increasing concentration of nonionic detergent triton X-100 on solubilization and structure of rat liver and adipose plasma membranes // *Membr. Cell. Biol.*– 1997.– Vol. 10, N5.– P. 515–520.

Поступила 18.11.2008