

УДК 576.324:612.111

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТОВ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИГЛАУКОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕЖДУ ЭРИТРОЦИТАМИ И СРЕДОЙ****С.В. Руденко¹, Мохаммед Х. Саид²**¹*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина, e-mail: rsv@kharkov.ua*²*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина*

Поступила в редакцию 16 июня 2009 г.

Принята 26 июня 2009 г.

В работе исследовано влияние некоторых антиглаукомных препаратов на форму эритроцитов человека. Показано, что препараты при увеличении их концентрации изменяют форму клеток от дискоидной до сферической. Используя установленную зависимость индекса формы (ИФ) клеток от концентрации препарата в среде, разработан метод измерения свободной концентрации препаратов с использованием эритроцитов в качестве биологического сенсора. Данный метод был применен для определения коэффициентов распределения препаратов для эритроцитов и розовых теней, которые не сильно отличались для различных препаратов и имели величину порядка $1 \cdot 10^3$. Для Benzalkonium chloride, который входит в состав всех препаратов как консервант, сделаны оценки количества его молекул, связавшихся с мембраной эритроцита, и увеличения площади ее поверхности в зависимости от формы клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, антиглаукомные препараты, коэффициент распределения, теория бислоиной пары.

**DETERMINATION OF PARTITION COEFFICIENTS OF ANTIGLAUCOMA DRUGS BETWEEN
ERYTHROCYTES AND THE MEDIUM****S.V. Rudenko¹, Mohammed Kh. Saïd²**¹*Institute for Problem of Cryobiology and Cryomedicine of NASU, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov, 61015, Ukraine;*²*V.N.Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077, Ukraine*

In this work an effect of some antiglaucoma drugs on the shape of human erythrocytes was investigated. It has been shown that increasing drugs concentration leads to shape transformation of erythrocytes from discs toward spheres. Using the established dependence of shape index versus drug concentration in the medium the method to measure a free drug concentration based on implementation of erythrocytes as biological sensor was developed. This assay was further employed to determine partition coefficients for erythrocytes and pink ghosts which did not varied significantly among different drugs and had an order of $1 \cdot 10^3$. For Benzalkonium chloride, which is common agent for all drugs an estimate of the number of molecules bound to red blood cell membrane and an increase in its surface area depending on shape of the cell has been done.

KEY WORDS: erythrocyte, shape, antiglaucoma drugs, partition coefficient, bilayer couple theory

**ВИЗНАЧЕННЯ КОЕФІЦІЄНТІВ РОЗПОДІЛУ АНТИГЛАУКОМНИХ ПРЕПАРАТІВ МІЖ
ЕРИТРОЦИТАМИ І СЕРЕДОВИЩЕМ****С.В. Руденко¹, Мохаммед Х. Саїд²,**¹*Институт проблем криобіології і криомедицини НАН України, вул. Переяславська 23, Харків, 61015, Україна*²*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна*

У роботі досліджено вплив деяких антиглаукомних препаратів на форму еритроцитів людини. Показано, що препарати при збільшенні їхньої концентрації змінюють форму кліток від дискоїдної до сферичної. Використовуючи встановлену залежність індексу форми (ІФ) клітин від концентрації препарату в середовищі, розроблено метод виміру вільної концентрації препаратів з використанням еритроцитів як біологічних сенсорів. Даний метод був застосований для визначення коефіцієнтів розподілу препаратів для еритроцитів і рожевих тіней, що не значно відрізнялися для різних препаратів і мали величину порядку $1 \cdot 10^3$. Для Benzalkonium chloride, що входить до складу всіх препаратів як консервант, зроблені оцінки кількості його молекул, що зв'язалися з мембраною еритроцита, і збільшення площі її поверхні в залежності від форми клітин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцити, форма, антиглаукомні препарати, коефіцієнт розподілу, теорія біслоїної пари.

При физиологических условиях нормальные эритроциты человека принимают форму двояковогнутого диска. Хорошо известно, что многие агенты могут обратимо модифицировать эту форму при постоянной площади поверхности и объеме [1-4]. Одна серия агентов, включающая анионные амфипаты, высокие значения концентрации солей и рН, истощение по АТФ, обогащение холестерином и близость к стеклянной поверхности индуцирует серию кренированных форм, называемых эхиноцитами и характеризующиеся наличием спикул. Другая серия агентов, включающая катионные амфипаты, низкие величины солей и рН, истощение по холестерину, индуцирует вогнутые формы, называемые стоматоцитами. Эти трансформации клеточной формы являются универсальными в том смысле, что вид формы и порядок ее появления не зависит от того такой именно эхиноцитарный или стоматоцитарный ее вызывает. Объяснение этим изменениям формы было предложено Хофманом [5] и Шитсом и Сингером [6], которые предположили, что механизм включает мембранный дисбаланс и небольшие изменения в площади поверхности ΔA_0 между двумя бислоями клеточной мембраны. Таким образом, любой эффект, который приводит к расширению внешнего монослоя по отношению к внутреннему (увеличение ΔA_0) приводит к тенденции формирования выпуклых структур на клеточной поверхности (эхиноцитарные спикулы), и наоборот, расширение внутреннего монослоя (уменьшение ΔA_0) способствует формированию вогнутостей, т.е. стоматоцитарных форм. Недавно предложенная модель постулирует, что форма эритроцита определяется эластичностью изгиба липидного бислоя и сдвиговой эластичностью мембранного скелета [7,8]. Эта, так называемая теория бислоевой пары (ТБП), объясняет универсальность основного перехода стоматоцит-дискоцит-эхиноцит или обратного перехода, постулируя, что все формомодулирующие агенты (физические или химические) действуют полностью или главным образом через их влияние на ΔA_0 . Эта модель способна также воспроизвести различные стадии эхиноцитоза или стоматоцитоза за счет простого варьирования относительных площадей липидного бислоя, а также предсказать существование других форм за пределами этой основной последовательности, которые наблюдаются при определенных условиях [7]. ТБП была успешно применена для качественного и количественного объяснения изменения формы эритроцитов при действии различных экзогенных стимулов [9-15]. Поскольку офтальмологические препараты, используемые для лечения глаукомы, также являются экзогенными агентами, целью данной работы было определить влияют ли они на форму эритроцитов, определить их коэффициент распределения и установить в какой мере их эффект находится в соответствии с положениями теории бислоевой пары.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, которые отмывали один раз в незабуференном физиологическом растворе (150 мМ NaCl) и второй раз в изотоническом растворе HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, рН 7,4). Полученный осадок разводили в 10 раз, доводя до конечного объема в 1 мл, и использовали как сток-суспензию. Для изучения изменений формы клеток во времени использовали двухканальный формометр-агрегометр ФА-01. Проведение измерений, калибровку прибора и обработку информации проводили аналогичным образом как описано в [16]. Розовые тени эритроцитов получали ступенчатым гипотоническим гемолизом. Для этого к 1 мл сток-суспензии отмытых эритроцитов добавляли 1 мл дистиллированной воды, инкубировали 5 минут при комнатной температуре, после чего добавляли еще 1 мл воды и через 5 минут инкубации центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин на центрифуге ОПН-3. Супернатант удаляли, а осадок отмывали 1 раз в HBS и доводили

до исходного объема в 1 мл. При таком методе концентрация теней в полученной сток-суспензии, практически, равна концентрации исходных эритроцитов.

Динамику морфологических изменений изучали при введении аликвоты клеток в 2 мл HBS (стандартная концентрация клеток $6 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл), содержащий исследуемые препараты или необходимый объем раствора препарата добавляли в суспензию клеток в кювете. В работе использовали следующие офтальмологические препараты: Timolol (активное вещество Timolol 5 мг/мл) (Фармак, Украина), Timohexal (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 в концентрации от 0,1 до 0,2 мг/мл, мы также использовали для сравнения раствор данного реагента (Fluka, Германия) с концентрацией 0,4 мг/мл. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Эксперименты проводили при комнатной температуре 22–24 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие исследуемых препаратов с эритроцитами приводит к изменению их исходной дискоидной формы, что регистрируется по уменьшению индекса формы (ИФ) суспензии клеток. На рис. 1 показаны зависимости ИФ от объема некоторых добавленных препаратов к 2 мл клеточной суспензии. Видно, что зависимости имеют гиперболический вид и с увеличением концентрации препаратов ИФ уменьшается, что говорит о все более прогрессирующей сферуляции эритроцитов. Такой тип зависимости характерен для всех препаратов. Можно отметить, что влияние препаратов на ИФ зависит от порядка добавления клеток и препаратов в среду. ИФ больше, т.е. степень сферуляции меньше, если клетки добавляли в среду с препаратом и меньше, если то же количество препарата добавляли к клеткам через 50 с. Этот эффект больше проявляется при малых концентрациях агентов и зависит от их типа. Например, для Timolol он больше чем для VzA и Xalacom. Можно предположить, что эритроциты могут изменять свою чувствительность к действию агента в зависимости от времени эквilibрации в кювете, как это было продемонстрировано ранее в отношении литического действия мелиттина [17]. Проверочные эксперименты показали, однако, что чувствительность клеток к агентам слабо зависит от времени и добавление агента через 450 с вызывает такое же изменение ИФ как и через 50 с (данные не приведены).

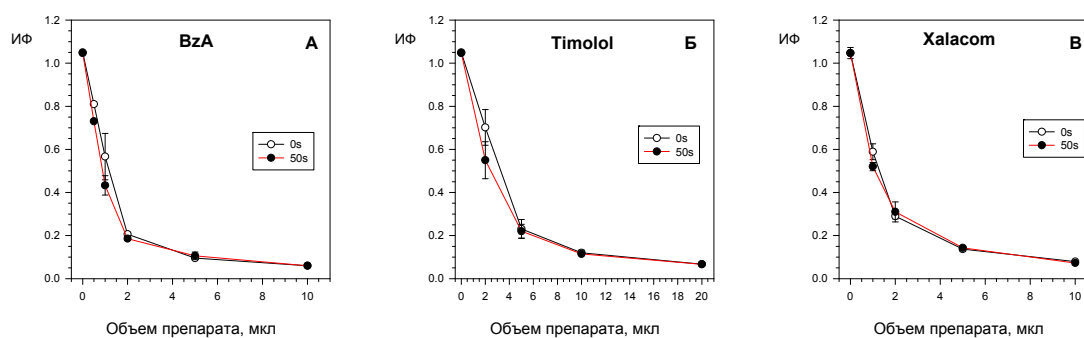


Рис. 1. Зависимость стационарного ИФ эритроцитов от объема добавленного в кювету препарата для Benzalkonium chloride VzA (А), Timolol (Б) и Xalacom (В). Открытые символы обозначают, что эритроциты добавляли непосредственно в среду, содержащую заданное количество препарата. Закрытые символы соответствуют случаю когда препарат добавляли в суспензию эритроцитов, которые инкубировали в кювете с HBS в течение 50 с.

Следовательно, различная реакция клеток обусловлена какими-то другими причинами, а не изменением их состояния и чувствительности к агенту.

Изменение формы эритроцитов при взаимодействии с агентами можно объяснить тем, что агенты встраиваются в наружный монослой мембраны, увеличивают его площадь поверхности и приводят к изгибу мембраны в соответствии с теорией бислошной пары [6,7]. Количественной мерой встраивания агента в мембрану может быть коэффициент распределения K_p , который определяется как отношение концентрации агента в эритроцитах к концентрации агента в среде после его перераспределения и достижения равновесия. Коэффициент распределения можно рассчитать по формуле:

$$K_p = \frac{(C_0 - C_{free})}{C_{rbc} \cdot V_{rbc} \cdot C_{free}} \quad (1)$$

где C_0 и C_{free} - начальная и свободная концентрация агента после достижения равновесия, соответственно; C_{rbc} - концентрация эритроцитов в 1 мл; V_{rbc} - объем эритроцита в мл ($90 \cdot 10^{-12}$ мл).

Для того, чтобы измерить свободную концентрацию агентов C_{free} , которая установилась после смешивания с ними эритроцитов, мы применили метод биологического сенсора, т.е. использовали эритроциты для измерения концентрации агентов в среде, используя известную зависимость ИФ от концентрации агента (рис. 1).

Эксперимент проводили следующим образом. Агенты в концентрации, которая вызывала изменение ИФ до 0,2 и ниже добавляли в кювету с эритроцитами, после чего содержимое переносили в пробирки, центрифугировали и 1 мл супернатанта снова переносили в кювету, добавляли 1 мл HBS, добавляли новую порцию эритроцитов и измеряли полученный ИФ, который теперь отражал концентрацию свободного агента в растворе с учетом двукратного разведения. Такие эксперименты проводили для стандартной концентрации эритроцитов, а также для концентраций в два раза меньшей и большей стандартной. Измеренные таким образом значения C_{free} использовали для расчета коэффициента распределения по формуле (1).

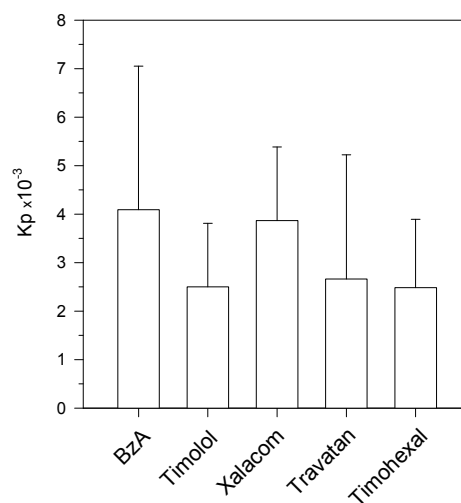


Рис. 2. Значения коэффициентов распределения K_p различных препаратов между эритроцитами и средой. Данные представлены как среднее \pm ст.откл.

На рис. 2 представлены значения K_p для исследованных препаратов, которые имеют величину от $2,5$ до $4 \cdot 10^3$, но статистически достоверно не отличаются из-за большого коэффициента вариации, который наблюдается в данных экспериментах.

При анализе этой плохой воспроизводимости мы обратили внимание, что возможной причиной может быть неспецифическая сорбция препаратов на стеклянных и пластиковых поверхностях используемых пробирок. Даже в стеклянной кювете, используемой для определения ИФ, иногда можно наблюдать вариации значений в зависимости от времени выдерживания препарата и его концентрации. По-видимому, слабой неспецифической сорбцией можно объяснить и тот факт, что при малых концентрациях препаратов его действие слабее если он находится в кювете изначально, а не добавляется к клеткам позже. Если определенная часть препарата сорбируется неспецифически, то полученные значения K_p будут завышены и представляют собой верхнюю оценку этих величин. Для минимизации возможного влияния неспецифической сорбции мы измеряли K_p для розовых теней, которые позволяют проводить эти эксперименты непосредственно в кювете, таким образом минимизируя дополнительный контакт агентов с различного рода поверхностями. Преимущество теней состоит в том, что их присутствие в кювете не мешает измерению ИФ эритроцитов, поскольку они даже в значительных концентрациях дают небольшой вклад в оптический сигнал. Если предполагать, что тени связывают агенты также как и эритроциты, то они будут уменьшать свободную концентрацию агентов, что можно зарегистрировать с помощью “измерительных” эритроцитов. Вторым преимуществом теней является то, что эти измерения можно проводить в одних и тех же условиях при различных концентрациях теней. Из формулы (1) можно получить, что свободная концентрация агента связана с концентрацией клеток (теней) следующим образом:

$$C_{free} = \frac{C_0}{1 + K_p \cdot C_{rbc} \cdot V_{rbc}} \quad (2)$$

На рис. 3 показаны экспериментальные величины и соответствующие им теоретические кривые со значениями K_p , которые наилучшим образом описывают данные эксперимента. Для VzA и Travatan K_p равен $(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^3$, для Xalacom $(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^3$ для Timohexal $(0.64 \pm 0.17) \cdot 10^3$ и для Timolol $(0.62 \pm 0.11) \cdot 10^3$. Интересно, что соотношение этих величин практически совпадает с таковым, показанным на рис. 2, где K_p для Timohexal и Timolol на 40% меньше чем для VzA и Xalacom, но сами эти значения в четыре раза меньше.

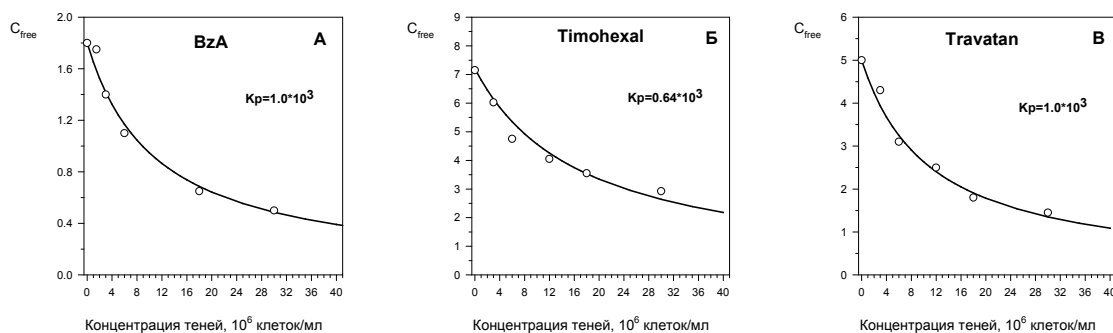


Рис. 3. Зависимость свободной концентрации препаратов VzA (А), Timohexal (Б) и Travatan (В) от концентрации теней. Символы обозначают экспериментальные величины, сплошная линия – теоретическая зависимость, рассчитанная по формуле (2), соответствующая значениям K_p , приведенным на графиках.

Это может быть связано как с тем, что тени связывают агенты в меньшей степени по сравнению с нативными клетками, так и с тем, что данные, приведенные на рис. 2, представляют собой завышенные значения, как обсуждалось выше. Таким образом, можно заключить, что значения K_r исследованных препаратов не сильно различаются между собой и равны примерно $(1.0 \pm 0.4) \cdot 10^3$. Такой результат наводит на мысль, что изменения формы эритроцитов могут вызываться каким-то одним веществом, например VzA, который входит в состав всех препаратов, но в различных концентрациях.

Зная значение K_r для агента, концентрацию клеток и их объем, можно рассчитать свободную концентрацию агента в суспензии клеток при равновесии и, соответственно, количество агента, связавшегося с одним эритроцитом. Для такого расчета необходимо также знать молекулярную массу агента. Поскольку исследованные препараты представляют собой смеси как минимум двух активных субстанций (например VzA и Timolol) такой расчет сделать затруднительно, поскольку неясно молекулярную массу какого вещества нужно брать за основу, особенно если они существенно различаются. Поэтому мы ограничимся рассмотрением этого вопроса для индивидуального агента VzA, молекулярная масса которого известна и равна 254. Из данных, представленных на рис.4, следует, что зависимость ИФ от количества агента, связавшегося с мембраной эритроцита, имеет такой же гиперболический вид, как и зависимость от концентрации агента во внешней среде. Можно также определить, что для достижения ИФ равного $\sim 0,2$, что соответствует примерно третьей стадии эхиноцитоза [18] необходимо, чтобы в мембрану встроилось $50 \cdot 10^6$ молекул VzA. Чтобы оценить площадь, которую они занимают необходимо знать поверхностную площадь одной молекулы VzA, которая неизвестна. Из литературных данных известно, что площадь молекулы монопальмитоифосфатидилхолина составляет $0,48 \text{ нм}^2$ [9], холестерина – $0,39 \text{ нм}^2$ [14], лизолецитина от $0,21$ до $0,46 \text{ нм}^2$ [14], а основных фосфолипидов мембраны порядка $0,5 \text{ нм}^2$ [19]. Учитывая этот диапазон значений, можно получить, что суммарная площадь молекул VzA составляет от $10,5$ до 23 мкм^2 , что составляет от $7,7$ до $16,8\%$ общей поверхности мембраны, если принимать, что она равняется 137 мкм^2 . Рассуждая подобным образом далее, можно прийти к заключению, что при больших концентрациях агента увеличение площади внешнего монослоя мембраны будет составлять от 38 до 84% ее исходной площади.

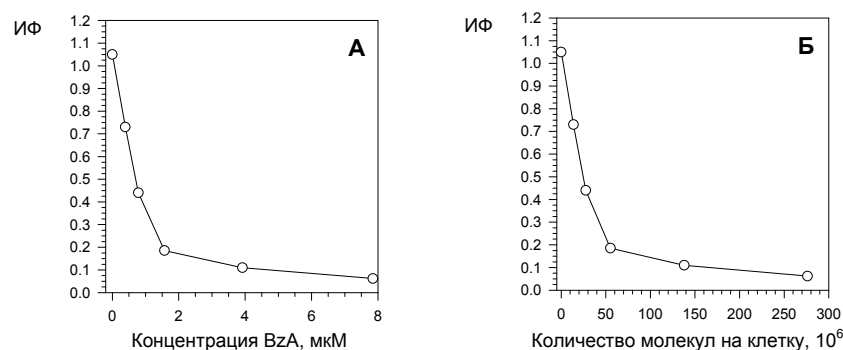


Рис. 4. Зависимость стационарного ИФ эритроцитов от концентрации добавленного в кювету препарата Benzalkonium chloride VzA (А) и от количества молекул VzA, связавшегося с мембраной одного эритроцита (Б). Стандартная концентрация эритроцитов, $K_r = 1 \cdot 10^3$.

Полученные нами оценки значительно превосходят ранее полученные результаты, в которых показано, что стадия 3 эхиноцитоза достигается при встраивании $3\text{-}8\cdot 10^6$ молекул монопальмитоифосфатидилхолина, которые приводят к увеличению площади поверхности на 3,2% [9]. Подобные результаты были получены и в других работах для иных веществ [10,14], что рассматривается как экспериментальное подтверждение теории бислошной пары. В то же время имеются данные, что Кр для хлорпромазина равен 3000 и для индуцированного им стоматоцитоза необходимо связывание $1\cdot 10^8$ молекул [20], что имеет тот же порядок величины, что и полученные нами для VzA.

В целом, полученные данные, а также данные авторов работы [20] относительно хлорпромазина, вызывают затруднения в их интерпретации с точки зрения ТБП из-за слишком большого увеличения поверхностной площади, которую они, предположительно, вызывают. Если допустить, что это, тем не менее, именно так, то можно ожидать, что клетки, обработанные данными препаратами, имеющие большое поверхностно-объемное отношение, будут обладать повышенной устойчивостью к гипотоническому гемолизу. Наши предварительные эксперименты показали, что этот эффект действительно имеет место, и он зависит от концентрации и вида препарата. Последнее имеет большое значение, поскольку показывает, что изменения формы клеток при воздействии различных препаратов данной серии обусловлены не только действием VzA, но и другими их активными компонентами. В противном случае эффект препаратов на блокирование гипотонического гемолиза, если он обусловлен только VzA, не должен был бы отличаться. Хотя нельзя полностью исключить и такой возможности, что некоторые компоненты не влияют на форму, но влияют на гипотонический гемолиз. Одним из возможных объяснений всех этих эффектов может быть то, что VzA, подобно холестерину [14], быстро и, практически, одновременно встраивается не только во внешний, но и во внутренний монослой мембраны с небольшим избытком во внешнем монослое. Такая модель, в принципе, позволяет объяснить увеличение суммарной площади поверхности мембраны, но делает неопределенным величину избытка площади в наружном монослое и ее связь с формой эритроцитов. Она требует проверки с использованием других методов исследования структуры биологических мембран.

ВЫВОДЫ

В данной работе установлено, что офтальмологические препараты в небольших концентрациях обладают способностью изменять форму эритроцитов от дискоидной до сферической. Используя метод биологического сенсора, в котором эритроциты использовали для измерения концентрации агентов в растворе, были измерены коэффициенты распределения препаратов для эритроцитов и розовых теней и сделаны оценки количества молекул VzA, связавшихся с мембраной эритроцита, и увеличения площади ее поверхности в зависимости от формы клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoffman J.F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells, *Blood Cells*. 1987, 12, 565-588.
2. Hoffman J.F. Some red blood cell phenomena for the curious, *Blood Cells Mol.Dis.* 2004, 32, 335-340.
3. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte, *J.Theor.Biol.* 1999, 196, 343-61.
4. Wong P A hypothesis of the disc-sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observations, *J.Theor.Biol.* 2005, 233, 127-135.
5. Hoffman J.F. Quantitative study of factors which control shape transformations of human red blood cells of constant volume, *Nouv.Rev.Fr.Hematol.* 1972, 12, 771-774.

6. Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1974, 71, 4457-4461.
7. Lim H.W.G., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002, 99, 16766-16769.
8. Mukhopadhyay R, Lim H.W.G., Wortis M. , Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing, *Biophys.J.* 2002, 82, 1756-1772.
9. Chi L.M., Wu W.G., Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. Quantitative light microscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements, *Biophys.J.* 1990, 57, 1225-1232.
10. Ferrell J.E.J., Lee K.J, Huestis W.H. Membrane bilayer balance and erythrocyte shape: a quantitative assessment, *Biochemistry* 1985, 24, 2849-2857.
11. Sheetz M.P., Painter R.G., Singer S.J., Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes, *J.Cell Biol.* 1976, 70, 193-203.
12. Sheetz M.P., Singer S.J. Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shapes of human erythrocytes, *J.Cell Biol.* 1976, 70, 247-251.
13. Iglie A, Kralj-Iglie V, Hagerstrand H, Amphiphile induced echinocyte-spheroechinocyte transformation of red blood cell shape, *Eur.Biophys.J.* 1998, 27, 335-339.
14. Lange Y, Slayton J.M. Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape, *J.Lipid Res.* 1982, 23, 1121-1127.
15. Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1974, 71, 4457-61.
16. Руденко С.В., Мухамед Хани Румиех, Бондаренко В.А. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. II. Влияние ингибиторов анионного транспорта, *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Біофізичний вісник.* 2007, Вип. 1(18),. 53-60.
17. Rudenko S.V., Nipot E.E. Protection by chlorpromazine, albumin and divalent cations of hemolysis induced by melittin, [ala-14]melittin and whole bee venom, *Biochem. J.* 1996, 317, 747-754.
18. Rudenko S.V., Crowe J.H., Tablin F. Determination of time-dependent shape changes in red blood cells, *Biochemistry (Mosc.)* 1998, 63, 1385-1394.
19. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя, М.: Наука, 1981, 296 с.
20. Hartmann J, Glaser R. The influence of chlorpromazine on the potential-induced shape change of human erythrocyte, *Biosci.Rep.* 1991, 11, 213-221.