

УДК 577.322.7

**УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА К ГЕМОЛИЗУ ПОД
ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИПЕПТИДНОГО АНТИБИОТИКА ГРАМИЦИДИНА S****Е.В. ХАКЛ*, В.П. БЕРЕСТ, С.В. ГАТАШ****University of Manchester, Institute of Science and Technology, Manchester M60 1QD, UK;
Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61077 Харьков*

Поступила в редакцию 25 декабря 2003 г.

Литическая активность грамицидина S (GS) лежит в основе его антибактериального действия и одновременно с этим ограничивает системное клиническое применение данного полипептидного антибиотика. Синтетические аналоги GS призваны разделить антибактериальную и литическую активность и существенно снизить последнюю. Понимание структурно-функциональных связей жесткой планарной циклической молекулы декапептида позволяет целенаправленно вести поиск новых препаратов на основе GS. Другим важным аспектом удачного поиска является правильное понимание механизма взаимодействия GS с плазматическими мембранами. В работе при помощи метода турбидиметрии исследована концентрационная и температурная зависимости гемолиза эритроцитов человека под действием GS. Оценена энергия активации процесса гемолиза. Проведено сравнение кислотного и GS-индуцированного гемолиза эритроцитов человека. Показано, что анализ эритрограмм GS-индуцированного гемолиза позволяет получать дополнительную информацию о состоянии липидного бислоя мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, грамицидин S, гемолиз, температура, турбидиметрия.

В медицинской практике грамицидин S (GS) используется только местно [1]. GS вызывает коллоидно-осмотический гемолиз эритроцитов [2]. Взаимодействие пептида с мембраной вначале приводит к небольшому ее повреждению, приводящему к выходу гемоглобина из клетки. По мере роста концентрации антибиотика степень повреждения увеличивается, и при определенной концентрации GS теряется структурная целостность липидного бислоя [3]. Основное медицинское применение GS основано на его антибактериальной активности. Однако широкое использование GS в качестве антибактериального препарата затруднено в связи с высокой гемолитической активностью антибиотика. При разработке новых лекарственных препаратов, являющихся производными GS, тест на гемолитическую активность является необходимой составляющей наряду с проверкой их антибактериальной активности [4].

Несмотря на широкий интерес к использованию антибиотика GS и его аналогов в качестве антимикробных препаратов, непосредственно гемолиз эритроцитов под действием GS и его зависимость от различных факторов изучены недостаточно. Проводилось только качественное сравнение гемолитической активности GS и его производных [5]. Кроме того, в целом ряде работ, посвященных взаимодействию GS с модельными и биологическими мембранами, использовались достаточно высокие концентрации GS – гораздо выше, чем те концентрации, которые вызывают гемолиз эритроцитов [6]. Поэтому целью настоящей работы было, прежде всего, изучить гемолиз эритроцитов под действием GS и факторов, которые могут влиять на гемолитическую активность GS.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали медицинский препарат грамицидина S («Фармахим» или «Красфарма», Российская Федерация). Исходный 2% спиртовой раствор грамицидина S разбавлялся в 30-50 раз 0,15 М NaCl (рН 7,4). Для исключения влияния растворителя

были проведены контрольные измерения, показавшие, что раствор этанола в концентрации до 1 % объемного процента не влияет на светопропускание суспензии клеток.

Исследование выполнено на образцах крови 50 доноров обоих полов. Из цельной донорской крови, стабилизированной «Глюгидином»[®], эритроциты выделяли путем двукратного отмывания центрифугированием в физиологическом растворе («Фармахим», 0,15 М NaCl, pH 7,4) в течение 10 минут при 146 g и затем в течение 10 минут при 168 g. Суспензия эритроцитов для оптических измерений готовилась путем разведения 0,01-0,02 мл эритроцитарной массы в 3-4 мл физиологического раствора, при этом средняя концентрация эритроцитов составляла $\sim 10^6$ кл/мл. Концентрация клеток определялась при помощи световой микроскопии в камере Горяева. Все измерения проводились не позднее 48 часов с момента забора крови. Измерения проводили в интервале температур 10-50°C в специально разработанной термостабилизированной кювете. Температура исследуемого образца измерялась термопарой медь-константан, с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Гемолиз эритроцитов регистрировали на фотозлектроколориметре по изменению мутности суспензии клеток на длине волны $\lambda = 670$ нм. Кривые гемолиза записывали при непрерывном щадящем перемешивании суспензии эритроцитов для обеспечения равномерного доступа GS и предотвращения оседания эритроцитов. Для кислотного гемолиза эритроцитов использовался 0,004% раствор HCl [7].

Для количественной характеристики гемолиза использовали такие величины: h – степень гемолиза ($h = D_{\text{нач}} - D_{\text{кон}}$, где $D_{\text{нач}}$ и $D_{\text{кон}}$ – оптическая плотность суспензии эритроцитов до и после гемолиза, соответственно), V – скорость гемолиза, t – время полного гемолиза.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартных пакетов прикладных программ Microsoft Excel, Microcal Origin. Рассчитывали средние значения вариант в группе из 4-7 доноров и среднеквадратические отклонения. Для представления результатов использовали M – среднее значение признака, s – среднеквадратическое отклонение, характеристику выборки представляли в формате $M \pm s$. Для анализа закона распределения данных использовали критерий Шапиро-Уилкса. Проверку статистических гипотез в группах проводили в зависимости от вида распределения с использованием параметрических (t-критерий Стьюдента, F - критерий Фишера) и непараметрических (U – критерий Манна-Уитни) критериев. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление раствора GS к суспензии эритроцитов вызывает повреждения мембран клеток, приводящее к гемолизу эритроцитов. Типичные кривые гемолиза эритроцитов под действием GS, как и для случая кислотного гемолиза, имеют S-образную форму. По мере увеличения концентрации GS увеличивается скорость гемолиза эритроцитов и уменьшается время полного гемолиза (рис. 1). В исследованном интервале концентраций GS зависимости скорости и времени гемолиза эритроцитов от концентрации гемолитика (GS) имеют практически линейный характер как при комнатной (20°C), так и при высокой (45°C) температуре. При наблюдении GS-индуцированного гемолиза необходимо подбирать концентрации антибиотика, позволяющие количественно исследовать кинетику процесса.

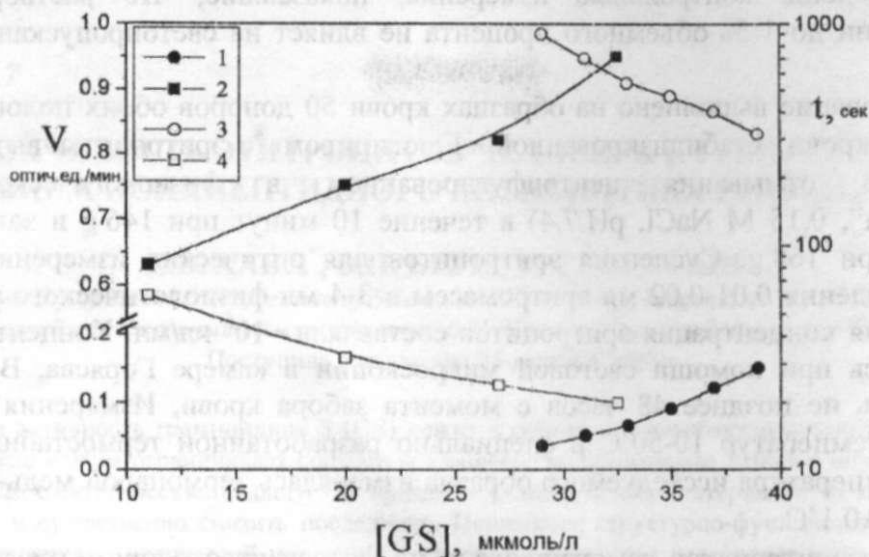


Рис. 1. Зависимости скорости V (1, 2) и времени t (3, 4) гемолиза эритроцитов под действием GS от концентрации GS в растворе. Температура 20°C (1, 3) и 45°C (2, 4).

На рисунке 2 приведены интегральные и дифференциальные кривые гемолиза эритроцитов под действием GS, полученные при различных температурах. Как видно из рис. 2, при низкой температуре в суспензии присутствуют две основные фракции эритроцитов, различающиеся по устойчивости к гемолитику - грамицидину S и гемолизирующие в разное время (через ~40 и ~70 сек после начала гемолиза). По мере роста температуры изменяется дифференциальная кривая гемолиза, что свидетельствует об изменении распределения эритроцитов по устойчивости к гемолизу. При этом популяция эритроцитов становится более однородной и значительно увеличивается доля эритроцитов, гемолизировавших в течение первых 20-25 секунд.

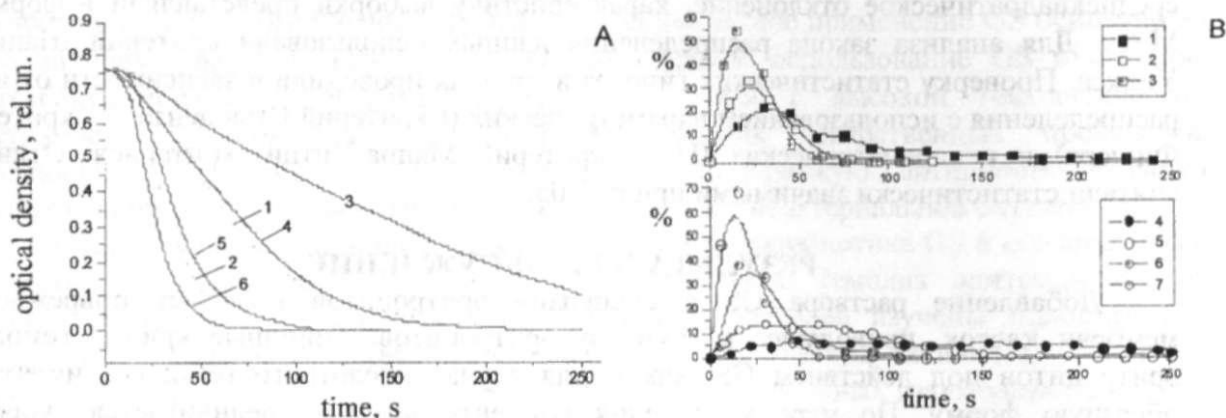


Рис. 2. Интегральные (А) и дифференциальные (В) кривые гемолиза эритроцитов под действием GS, полученные при различных температурах: 1 - 10°C, 2 - 18°C, 3 - 22,5°C, 4 - 22,5°C, 5 - 31,5°C, 6 - 43,5°C, 7 - 50°C. Концентрация GS в растворе - 10 мкг/мл (кривые 1,2,3) и 30 мкг/мл (кривые 4,5,6,7).

По мере увеличения температуры скорость гемолиза эритроцитов увеличивается, а время - уменьшается. Обе зависимости имеют монотонный характер. Вероятно, увеличение скорости гемолиза с температурой объясняется разжижением липидного

компонента мембран при увеличении температуры, что облегчает встраивание молекул GS в мембрану.

Анализ температурной зависимости скорости гемолиза эритроцитов позволил рассчитать из уравнения Аррениуса величину энергий активации процесса, которая составила 178 ± 23 кДж/моль. Полученные энергии активации оказались ниже величин энергии активации термогемолиза эритроцитов – 298,3 или 290 кДж/моль, требующего более глубокого разрушения липидного бислоя эритроцитов [8, 9].

Следует отметить, что добавление GS в концентрации, достаточной для гемолиза эритроцитов, не приводило к существенному изменению pH суспензии эритроцитов: pH $7,4 \pm 0,1$. Это может быть одним из преимуществ GS-индуцированного гемолиза эритроцитов по сравнению с кислотным гемолизом при изучении состояния и стабильности мембран эритроцитов.

Чтобы охарактеризовать прочность связывания GS с мембраной, после окончания гемолиза основных эритроцитов мы добавляли еще 0,5 мл суспензии эритроцитов (добавочных). В этом случае концентрация GS бралась достаточно низкой, чтобы в конце гемолиза оставалось как можно меньше молекул GS, не связавшихся с мембранами (т.е. чтобы мембраны были в избытке по отношению к количеству молекул GS). Степень гемолиза добавочных эритроцитов мы обозначали как $h_{0.5}$. Зависимость $h_{0.5}$ от концентрации GS приведена на рисунке 3. Как видно из рисунка 3, при достаточно низкой концентрации GS повторное добавление эритроцитов к гемолизированным клеткам не приводит к гемолизу свежих “добавочных” эритроцитов. При повышении концентрации гемолитика наблюдается гемолиз добавочных эритроцитов, вероятно, за счет избытка GS (рис. 3).

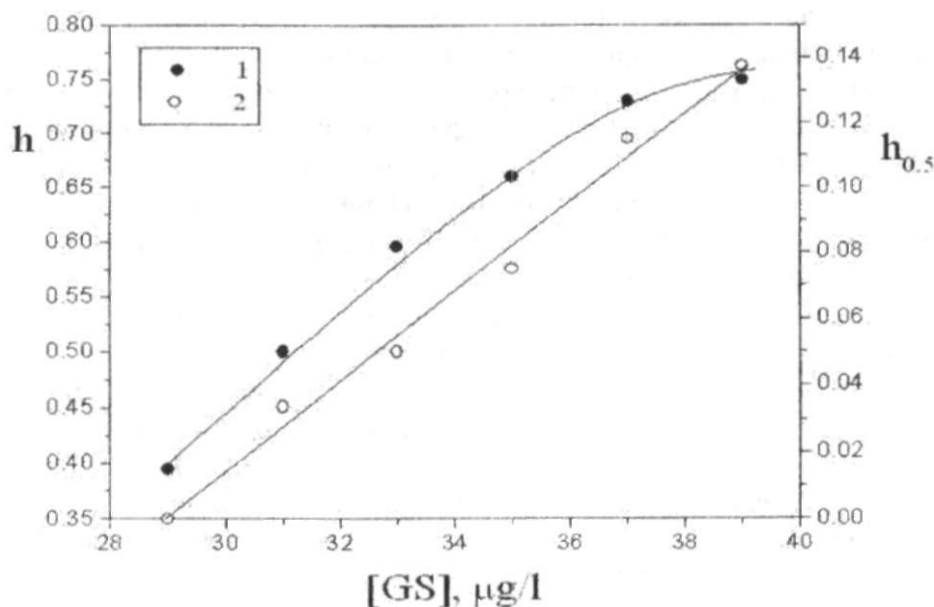


Рис. 3. Зависимости степени гемолиза основных (h , 1) и добавочных эритроцитов ($h_{0.5}$, 2) от концентрации грамицидина в растворе.

Температура 20°C . Гемолиз “основных” эритроцитов регистрировался в течение 10 мин, гемолиз “добавочных” эритроцитов – в течение 5 мин.

В случае мембран протопластов авторы [10] также показали, что добавление избытка фосфолипидных везикул приводит к снятию GS с мембран.

Полученные результаты (рис. 3) могут объясняться тем, что связывание GS с мембранами достаточно прочное, либо в результате связывания с мембраной молекула GS меняет конформацию и теряет литическую активность. Чтобы выяснить, какое объяснение является более вероятным, был проведен следующий эксперимент: после гемолиза «основных» эритроцитов (при этом концентрация GS выбиралась достаточно низкой, чтобы мембраны эритроцитов были в избытке) в кювету добавляли еще 0,5 мл «добавочных» эритроцитов. Это приводило к немедленному резкому повышению оптической плотности за счет увеличения количества клеток (рассеивающих центров), однако потом оптическая плотность оставалась постоянной. Начальная концентрация GS подбиралась таким образом, чтобы скорость гемолиза «основных» эритроцитов была низкой, и полностью отсутствовал гемолиз «добавочных» эритроцитов. Через 5-10 минут мы начинали постепенно увеличивать температуру в кювете, при этом оптическая плотность суспензии эритроцитов начала понижаться, что происходит в результате гемолиза эритроцитов. Результаты, приведенные на рис. 3, свидетельствуют о том, что по мере увеличения температуры степень и скорость гемолиза увеличиваются. Таким образом, концентрации GS, недостаточные для индуцирования гемолиза «добавочных» эритроцитов при комнатной температуре, становятся достаточными для индуцирования гемолиза при повышении температуры. Если бы молекула GS в результате взаимодействия с мембранами «основных» эритроцитов меняла конформацию и теряла свою гемолитическую активность, гемолиз «добавочных» эритроцитов при повышенной температуре не наблюдался бы. Поэтому, результаты, приведенные на рис. 3, объясняются, вероятно, тем, что молекулы GS достаточно прочно связаны с мембранами клеток.

Величина $h_{0,5}$ также может служить дополнительной характеристикой состояния липидного бислоя. Иллюстрацией этого может служить сравнение гемолиза «основных» и «добавочных» эритроцитов под действием GS и HCl (рис. 4). Как видно из рис. 4, преинкубация эритроцитов с рядом лекарственных препаратов (папаверином, адреналином и новокаином) и альфа-токоферолом практически не влияла на скорость гемолиза, вызванного GS (следует отметить, что добавление этих веществ к суспензии эритроцитов также не вызывало изменения оптической плотности образца). В то же время величина $h_{0,5}$ значительно уменьшалась в случае преинкубации эритроцитов с папаверином, адреналином и новокаином и значительно возрастала в случае преинкубации с альфа-токоферолом. Т.о. можно предположить, что преинкубация эритроцитов с исследованными веществами приводит к тому, что молекулы GS более прочно связаны с мембраной, что свидетельствует об изменениях в мембранах эритроцитов (прежде всего в липидном бислое либо заряде мембраны). В то же время степень и скорость кислотного гемолиза эритроцитов не зависели от преинкубации эритроцитов с исследованными веществами (рис. 4). Данные рисунка позволяют нам сравнить чувствительность кислотного гемолиза и GS-индуцированного гемолиза к модификации мембран эритроцитов, видно, что GS-индуцированный гемолиз эритроцитов может быть более чувствителен к состоянию мембран эритроцитов. Следует отметить, что в настоящей работе мы не ставили целью исследовать влияние лекарственных препаратов на мембраны эритроцитов, этот вопрос достаточно подробно освещен в литературе.

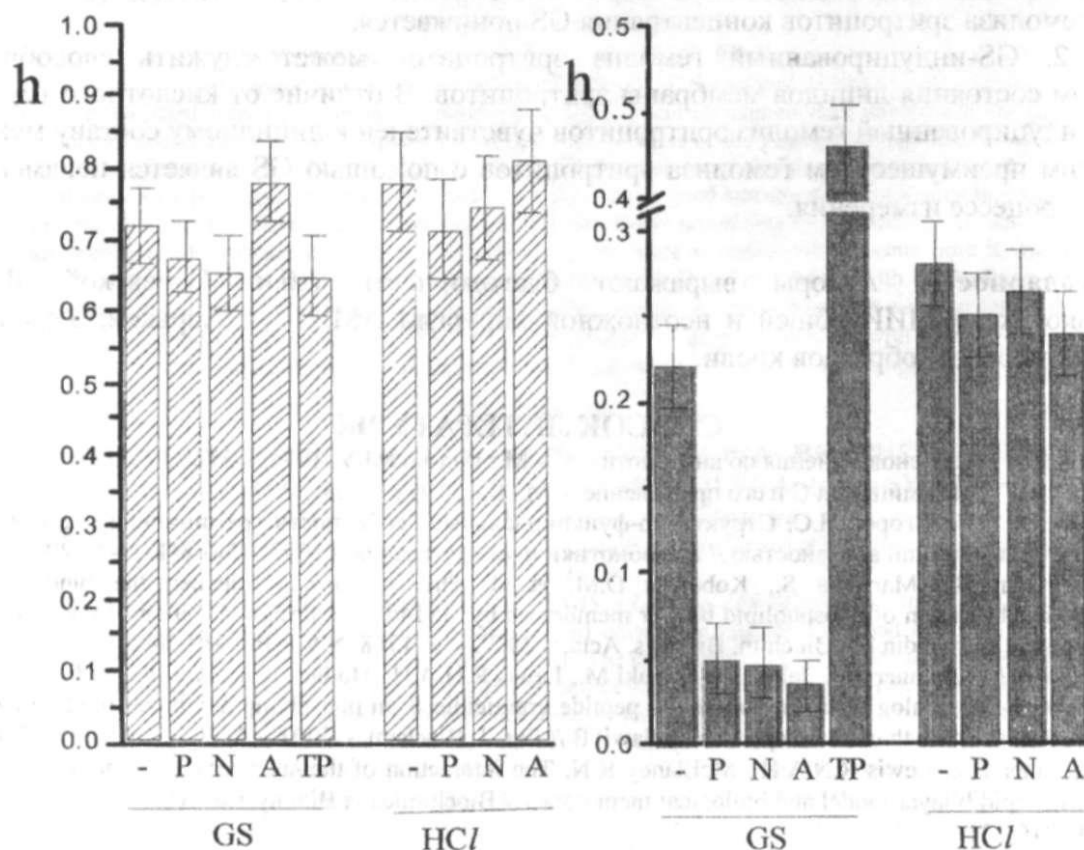


Рис. 4. Влияние биологически активных веществ на гемолиз эритроцитов.

Слева: Степени гемолиза интактных эритроцитов (обозначены “-”) и эритроцитов, преинкубированных в течение 5 мин при комнатной температуре с папаверином (обозначены P), новокаином (обозначены N), адреналином (обозначены A) и альфа-токоферолом (обозначены TP) при постоянном перемешивании. В качестве гемолитика использовались GS или 0.004% раствор HCl. Гемолиз «основных» эритроцитов регистрировали в течение 7 мин, его степень обозначена как h (слева). Через 7 минут после начала гемолиза в кювету добавляли еще 0.5 мл суспензии эритроцитов. Гемолиз добавленных эритроцитов регистрировали в течение 5 мин, его степень обозначена как $h_{0.5}$ (справа). В случае преинкубации эритроцитов с TP использовалась кровь пациентов с кардиозаболеваниями.

Чтобы исключить возможность того, что в эксперименте на рис. 4 исследованные вещества влияли на структуру молекулы GS, вызывая потерю ее гемолитической активности, мы провели серию контрольных экспериментов, в которых преинкубировали GS с папаверином, адреналином или новокаином в течение 5-10 мин перед добавлением GS к суспензии эритроцитов (сами эритроциты не преинкубировались с исследуемыми веществами). При этом степень и скорость гемолиза «основных» и «добавочных» эритроцитов под действием GS, преинкубированного с исследованными веществами, практически не отличались от аналогичных величин для гемолиза эритроцитов под действием стандартно приготовленного раствора GS.

ВЫВОДЫ

1. При увеличении температуры скорость гемолиза эритроцитов монотонно

увеличивается, а время – уменьшается. По мере повышения температуры необходимая для гемолиза эритроцитов концентрация GS понижается.

2. GS-индуцированный гемолиз эритроцитов может служить своеобразным тестом состояния липидов мембраны эритроцитов. В отличие от кислотного гемолиза, GS индуцированный гемолиз эритроцитов чувствителен к липидному составу мембран. Другим преимуществом гемолиза эритроцитов с помощью GS является неизменность pH в процессе измерения.

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.б.н. Сичевской Л.В. и Харьковскому НИИ общей и неотложной хирургии АМНУ (г. Харьков, Украина) за предоставление образцов крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 512 с.
2. Гаузе Г.Ф. Грамицидин С и его применение. – М.: Б.и., 1952. – 153 с.
3. Полин А.Н., Егоров Н.С. Структурно-функциональные особенности грамицидина С в связи с его антибиотической активностью // Антибиотики и химиотерапия. - 2003. - № 48(12). - С. 29-32.
4. Abraham T., Marwaha S., Kobewka D.M. et al. The relationship between the binding to and permeabilization of phospholipid bilayer membranes by GS14dK4, a designed analog of the antimicrobial peptide gramicidin S // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1768, N 9. – P. 2089-2098.
5. Kiricsi M., Prenner E.J., Jelokhani-Niaraki M., Lewis R.N.A.H., Hodges R.S., McElhaneу R.N. The effect of ring-size analog of the antimicrobial peptide gramicidin S on phospholipids bilayer model membranes and on the growth of *Acholeplasma laidlawii* B // Eur. J. Biochem. – 2002. – V. 269. – P. 5911-5920.
6. Prenner E.J., Lewis R.N.A.H., McElaney R.N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes // Biochimica et Biophysica Acta. – 1999. – V. 1462. – P. 210-221.
7. Биофизика клеточных популяций и надорганизменных систем: Сб. науч. тр. / Отв. ред. И.И. Гительзон. - Новосибирск: Наука, СО, 1992. - 159 с.
8. Przybylska M., Bryszewska M., Chapman I.V. Thermal properties and fluidity of human erythrocyte membranes in diabetes mellitus // Int. J. Radiat. Biol. – 1993. – V. 63, N 3. – P. 419-424.
9. Przybylska M., Bryszewska M., Kedziora J. Thermosensitivity of red blood cells from Down's syndrome individuals // Bioelectrochemistry. – 2000. – V. 52, N 2. - P. 239-249.
10. Булгакова В.Г., Королев П.Н., Петрыкина З.М. и др. Изменения оптической плотности суспензии протопластов бактерий подвергнутых действию мембрано-активных антибиотиков // Антибиотики. – 1984. – Т. 29, N 10. – С. 756-760.