

УДК 577.322.7

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ ЛИПИДОВ МЕМБРАНЫ ВЛИЯЕТ НА  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАМИЦИДИНА S С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА****Е.В.Хакл, В.П.Берест***Харьковский национальный университет им. В.Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4*

Поступила в редакцию 28 октября 2007 г.

Принята 20 ноября 2008 г.

Грамицидин S взаимодействует неспецифически с липидным бислоем мембран разных клеток и может нарушать структуру мембран не только эритроцитов, но и других клеток крови и вызвать изменение их функциональной активности при системном применении. Изучение взаимодействия мембранотропных противомикробных препаратов с мембранами клеток крови позволяет прояснить возможные пути повышения их терапевтического индекса. Изменение состояния липидного бислоя влияет на взаимодействие с ним молекулы GS. Исследование взаимодействия грамицидина S с мембранами клеток, модифицированными разными физическими и химическими факторами, даст возможность более детально установить механизм взаимодействия и определить направления модификации молекулы грамицидина S с целью снижения его гемолитической активности без потери противомикробной. В работе при помощи метода турбидиметрии изучен гемолиз эритроцитов человека под действием грамицидина S в присутствии разных модификаторов мембран. Показано, что характер связывания грамицидина с мембранами зависит от температуры - с увеличением температуры от 22 до 40°C уменьшается концентрация грамицидина, способная вызывать гемолиз эритроцитов. Установлено, что уменьшение упорядоченности липидов мембран эритроцитов при перекисном окислении *in vitro* ведет к облегчению встраивания грамицидина в мембрану, но, вместе с тем, приводит и к уменьшению прочности связывания грамицидина с мембранами. Доказано, что модификация состояния липидного бислоя мембраны при перекисном окислении липидов изменяет гемолитическую активность грамицидина S. Показано, что существует возможность направленной модификации структуры мембран для повышения их стойкости к литическому действию грамицидина S.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эритроциты, гемолиз, грамицидин S, температура, энергия активации,  $\alpha$ -токоферол, перекись водорода

Использование естественных антибиотиков рассматривается как возможное решение проблемы растущей устойчивости микроорганизмов к существующим противомикробным препаратам. Большие надежды в «пост-антибиотиковую эру» возлагаются в этой связи на природные антимикробные пептиды и их синтетические аналоги [1]. Такие пептиды вырабатываются, например, микроорганизмами для угнетения роста конкурентов и многие из них способны убивать бактерии и грибки, устойчивые к традиционным антибиотикам [2].

Мембраны являются мишенью для действия пептидных антибиотиков, однако при этом, дестабилизация мембран клеток организма хозяина может препятствовать пероральному или инъекционному применению этих антимикробных препаратов. Так, грамицидин S (GS) обладая широким спектром антимикробной активности, применяется лишь местно ввиду своей высокой гемолитической активности [3]. Предпринимаются попытки создания аналогов GS, имеющих более высокий терапевтический индекс, рассчитываемый по отношению гемолитической активности к антимикробной [4]. Выяснение факторов, определяющих специфичность взаимодействия противомикробных пептидов с мембранами разного состава, позволит расширить сферу применения антимикробных пептидов в борьбе с инфекциями.

Настоящая работа продолжает тему, начатую нами ранее – изучение взаимодействия полипептидного антибиотика грамицидина S с клетками крови

человека [5-7]. В нашей предыдущей работе мы детально изучили гемолиз эритроцитов под действием GS. Поскольку гемолиз эритроцитов под действием GS определяется взаимодействием GS с липидами мембран, представляет интерес изучить влияние факторов, изменяющих состояние липидного бислоя, на GS-индуцированный гемолиз эритроцитов. Среди факторов, изменяющих состояние липидного бислоя, прежде всего можно выделить температуру и процессы перекисного окисления липидов. Далее мы приводим результаты исследования влияния этих факторов на гемолиз эритроцитов под действием 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 35 доноров обоих полов. Из цельной донорской крови, стабилизированной «Глюгидином»<sup>®</sup>, эритроциты выделяли путем двукратного отмывания центрифугированием в физиологическом растворе («Фармахим», 0,15 М NaCl, рН 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 фотоэлектроколориметре 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. [8].

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.

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). Гемолиз «основных» эритроцитов регистрировали на протяжении 7 мин, гемолиз добавленных эритроцитов регистрировали на протяжении 5 мин. Степень гемолиза добавочных эритроцитов мы обозначали как  $h_{0,5}$ . При 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 [7]. Величина  $h_{0,5}$  служит дополнительной характеристикой состояния липидного бислоя.

Для модификации вязкости липидного бислоя мембран эритроцитов использовали  $\alpha$ -токоферол (раствор в гексане (50 мкг/мл)), который добавлялся по 25 мкл к 1 мл суспензии отмытых эритроцитов. Для активации неферментативного перекисного окисления липидов перед исследованием гемолиза эритроцитов выдерживали при комнатной температуре 15 минут с 0,5 мм аскорбиновой кислотой и 12 мкМ солью Мора [9]. Содержание белка в суспензиях клеток определяли биуретовым методом [10]. Активность процессов перекисного окисления липидов в мембране эритроцитов определяли по уровню базального и индуцированного малонового диальдегида (МДА) спектрофотометрическим методом [11].

Энергии активации процесса гемолиза эритроцитов под действием GS рассчитывали из уравнения Аррениуса, изучая температурную зависимость скоростей соответствующих реакций [12].

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

На рис 1 (кривая 1) приведена зависимость изменения оптической плотности суспензии эритроцитов от температуры в присутствии GS. С ростом температуры степень гемолиза увеличивается, иными словами, по мере повышения температуры концентрация GS, необходимая для гемолиза эритроцитов, понижается, т.е. GS в концентрации, не вызывающей гемолиза эритроцитов при комнатной температуре, может индуцировать гемолиз при повышении температуры [7].

Известно, что повышение температуры приводит к переходу липидов мембран из гелеобразного в жидкое состояние и к разрыхлению липидного бислоя. При этом увеличивается площадь, приходящаяся на молекулу липида в бислое и увеличивается подвижность ацильных цепей жирнокислотных остатков липидов в гидрофобной области мембраны [13]. Поскольку встраивание GS в липидный бислой – кинетический процесс, сопровождающийся переориентацией липидных молекул и их кластеризацией, при повышении температуры и увеличении подвижности липидов взаимодействие GS с мембранами должно усиливаться. При этом необходимая для гемолиза эритроцитов концентрация GS будет понижаться, что и наблюдалось в эксперименте.

Из рис. 1 также следует, что преинкубация эритроцитов с прооксидантами ( $Fe^{2+}$  + аскорбат) увеличивает степень гемолиза эритроцитов под действием GS (кривая 3), в то время как преинкубация с антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферол) – уменьшает (кривая 2). Следует отметить, что сама по себе преинкубация эритроцитов не вызывала изменения оптической плотности суспензии эритроцитов в исследуемом интервале температур, т.е. не приводила к гемолизу эритроцитов. В случае преинкубации эритроцитов с  $\alpha$ -токоферолом (рис. 1, кривая 2) зависимость степени гемолиза от температуры имеет излом при температуре  $\sim 37^\circ C$ . До  $37^\circ C$  степень гемолиза эритроцитов, преинкубированных с  $\alpha$ -токоферолом, по мере увеличения температуры растет достаточно слабо по сравнению со степенью гемолиза интактных эритроцитов. После

37°C степень гемолиза преинкубированных с  $\alpha$ -токоферолом эритроцитов начинает резко возрастать. Было показано, что в области  $\sim 35$ -37°C происходят структурные перестройки мембранных белков [14]. Возможно, что структурные переходы, происходящие в белках, облегчают встраивание GS в мембрану. В области температур выше фазового перехода липидов в мембране  $\alpha$ -токоферол вызывает «замораживание» липидного бислоя, уменьшая латеральную подвижность липидов. Н. Watanabe и соавт. показали, что активация в эритроцитах свободнорадикальных процессов уменьшает текучесть и деформируемость эритроцитарных мембран и морфологию эритроцитов, тем самым изменяя агрегационную и деформационную способность этих клеток [19]. Полученные результаты полностью согласуются с данными по влиянию преинкубации тромбоцитов с про- и антиоксидантами на взаимодействие GS с мембранами тромбоцитов [15].

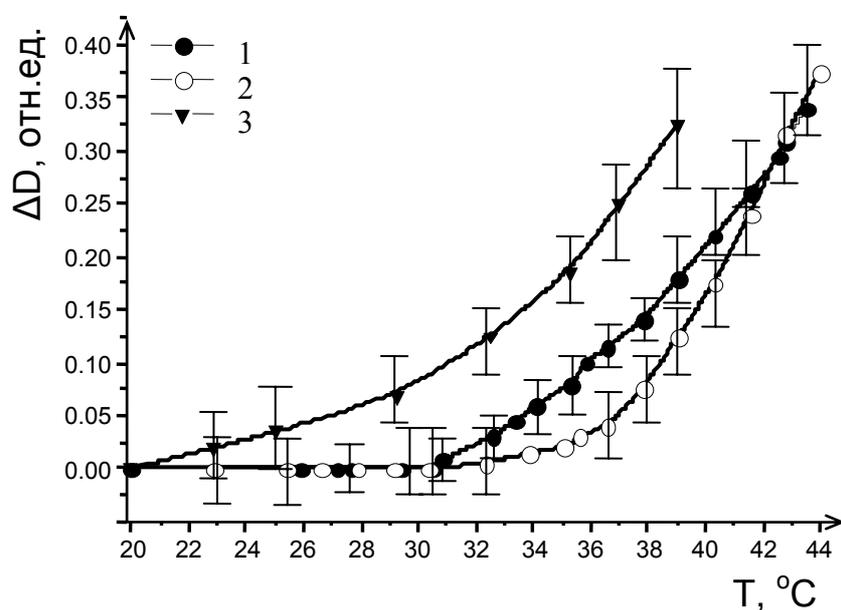


Рис. 1. Зависимости степени гемолиза от температуры для нативных эритроцитов (1) и эритроцитов, преинкубированных в течение 10 минут с  $\alpha$ -токоферолом (кривая 2) и ионами  $Fe^{2+}$  + аскорбат (кривая 3).

Концентрация МДА в контроле  $4,1 \pm 0,53$  нмоль/л, в клетках с повышенным уровнем ПОЛ  $7,25 \pm 0,74$  нмоль/л.

Преинкубация эритроцитов с про- и антиоксидантами не влияла на вид кривых кислотного гемолиза эритроцитов. Вероятно, это связано с разницей механизмов кислотного гемолиза эритроцитов и гемолиза под действием GS. Это еще раз показывает, что GS индуцированный гемолиз эритроцитов более чувствителен к состоянию липидного бислоя мембран, что позволяет использовать GS для выявления изменений в липидном компоненте мембран.

Энергии активации процесса гемолиза эритроцитов человека под действием грамицидина S составили  $178 \pm 23$  кДж/моль в контроле и  $109 \pm 17$  кДж/моль для эритроцитов, с повышенным уровнем перекисного окисления липидов. Очевидно, полученные значения энергии активации являются эффективными величинами, хотя и оказались ниже величин энергии активации термогемолиза эритроцитов – 298,3 или

290 кДж/моль, требующего более глубокого разрушения липидного бислоя эритроцитов [16, 17].

Мы также использовали преинкубацию суспензии эритроцитов с  $H_2O_2$  для инициации процессов ПОЛ. Преинкубация суспензии эритроцитов с  $H_2O_2$  ведет к уменьшению времени между добавлением GS к суспензии эритроцитов и началом гемолиза (в этих экспериментах мы использовали достаточно низкие концентрации GS, для того чтобы регистрировать достаточно детально начальную стадию гемолиза, при этом время полного гемолиза увеличивалось до 20-30 минут). Таким образом,  $H_2O_2$ , индуцируя ПОЛ в мембранах эритроцитов, вероятно, облегчает встраивание молекул GS в мембрану, поскольку взаимодействие молекулы GS с мембраной – кинетический процесс, зависящий от состояния и подвижности липидов в мембране.

Зависимости степени гемолиза эритроцитов (гемолиз регистрировался в течение 7 минут после добавления гемолитика и был неполным) от концентрации  $H_2O_2$  для эритроцитов, выделенных из крови здоровых доноров и доноров с различными патологиями сердечно-сосудистой системы, представлены на рис 2 (А). Суспензия эритроцитов преинкубировалась с  $H_2O_2$  при постоянном перемешивании в течение 5 минут перед добавлением GS и началом гемолиза.

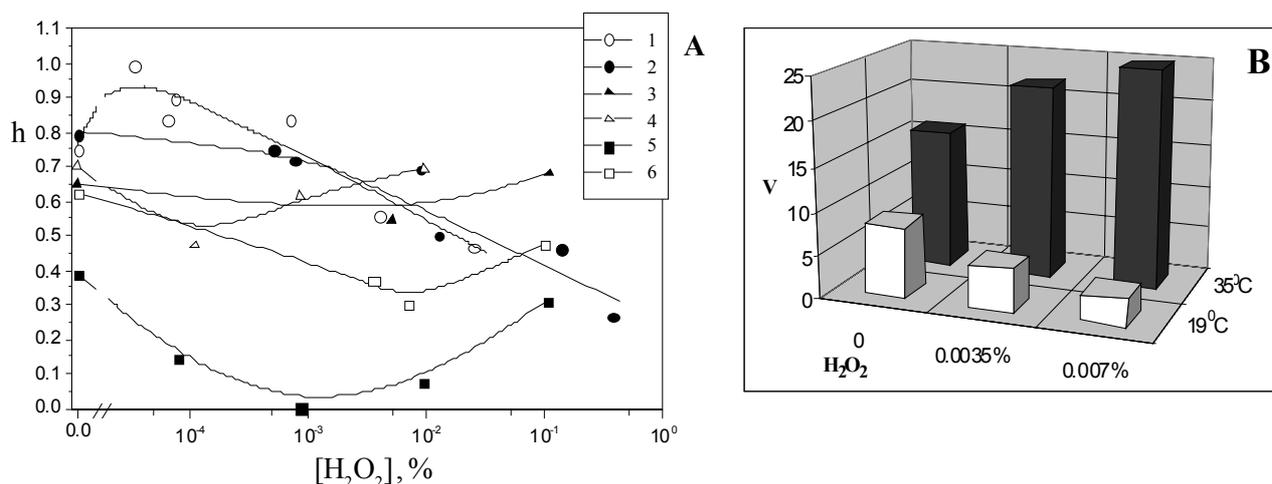
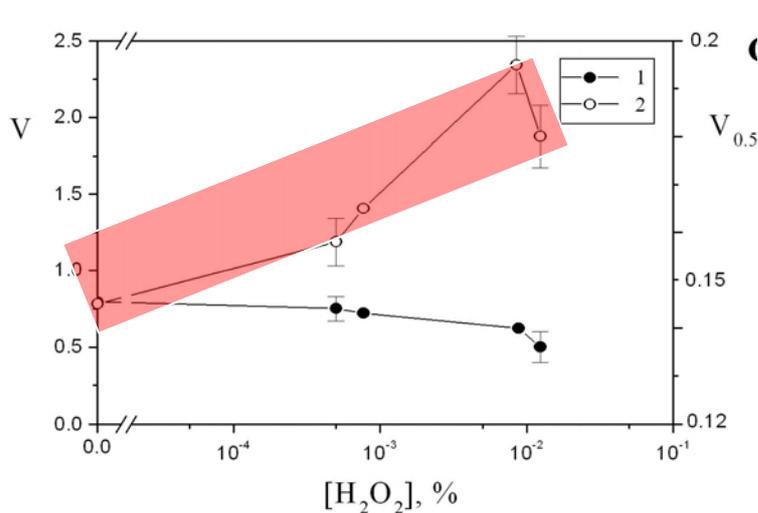


Рис. 2. Влияние преинкубации эритроцитов с  $H_2O_2$  на GS-индуцированный гемолиз. **А.** Зависимости степени гемолиза эритроцитов (за 7 минут гемолиза) от концентрации  $H_2O_2$  в растворе для GS-индуцированного гемолиза эритроцитов, преинкубированных в течение 5 минут с  $H_2O_2$ . Эритроциты были выделены из крови здоровых доноров (1, 2- образцы крови различных доноров) и доноров с заболеваниями: 3 – посттромбофлибический синдром, 4 – синдром Лериша, 5, 6 – атеросклероз (образцы крови различных доноров). **В.** Зависимости скорости (V) полного GS-индуцированного гемолиза нативных эритроцитов и эритроцитов, преинкубированных в течение 5 минут с  $H_2O_2$ , от концентрации  $H_2O_2$  в растворе, полученные при 19 и 35°C.

Как видно из рис. 2, зависимости различаются для образцов крови различных доноров, однако можно указать общие закономерности влияния преинкубации эритроцитов с  $H_2O_2$  на GS индуцированный гемолиз эритроцитов. Средние концентрации  $H_2O_2$ , использовавшиеся в работе ( $10^{-3} \div 10^{-2}$  %), вызывают понижение скорости гемолиза. Для некоторых образцов это понижение гемолитической активности было незначительным, тогда как для других, при определенных

концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  GS полностью терял свою гемолитическую активность. В частности, в случае гемолиза эритроцитов с повышенным содержанием холестерина, выделенных из крови больных атеросклерозом, их преинкубация с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрации  $\sim 10^{-3}\%$  приводила к полному отсутствию гемолиза при добавлении GS к суспензии эритроцитов. При дальнейшем повышении концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  степень гемолиза возрастала, однако достаточно высокие концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (выше 1%) нами не изучались. Действие низких концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  %) было более неоднозначным: для одних образцов преинкубация эритроцитов с  $\text{H}_2\text{O}_2$  усиливала гемолиз, для других – не влияла или незначительно ослабляла (не более чем на 10% от гемолиза интактных эритроцитов, что ненамного превышало погрешность измерения).

В области концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10^{-3}$ – $10^{-2}$  % скорость гемолиза понижается с повышением концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 2). Однако при более высокой температуре эта зависимость будет иметь иной характер. Как видно из рис. 2 (В), на котором приведены скорости гемолиза эритроцитов, преинкубированных с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при двух температурах (19 и 35°C), при 19°C с ростом концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  скорость гемолиза эритроцитов понижается, тогда как при 35°C скорость существенно возрастает в случае преинкубации эритроцитов с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Мы, таким образом, наблюдаем синергизм влияния ПОЛ и температуры, отмеченный и авторами [18].



Зависимости скорости гемолиза «основных» (1, левая шкала) и «добавочных» (2, правая шкала) эритроцитов от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворе для GS-индуцированного гемолиза нативных эритроцитов и преинкубированных в течение 5 минут с  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Рис. 3. Подвижность липидов влияет на прочность связывания GS с мембраной эритроцитов

Особо хотелось бы остановиться на зависимостях, приведенных на рис. 3. Кривая (1) относится к гемолизу основных эритроцитов под действием GS, кривая (2) – к гемолизу добавочных эритроцитов. В этом эксперименте мы выбирали концентрацию GS так, чтобы в случае интактных эритроцитов полностью отсутствовал гемолиз «добавочных» эритроцитов. Как видно из сравнения зависимостей 1 и 2, по мере увеличения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при которой преинкубировались эритроциты, скорость гемолиза основных эритроцитов немного уменьшается, что обсуждалось выше. В то же время скорость гемолиза добавочных эритроцитов увеличивается (рис. 3). Таким образом, преинкубация эритроцитов с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрации  $\sim 10^{-3}$  –  $10^{-2}$  % оказывала противоположный эффект на гемолиз основных и добавочных эритроцитов. Мы

предполагаем, что  $H_2O_2$ , индуцируя ПОЛ в мембранах эритроцитов, облегчает встраивание молекул GS в мембрану и в то же время облегчает отсоединение уже связавшихся с мембраной молекул GS, то есть делает связывание GS с мембранами менее прочным.

В настоящей работе основное внимание мы уделили изучению тех концентраций  $H_2O_2$ , которые приводят к понижению степени и скорости гемолиза эритроцитов под действием GS. Это понятно, поскольку основной интерес с точки зрения разработки antimicrobial препаратов на основе GS представляют именно те условия, в которых гемолитическая активность GS, препятствующая его широкому применению, понижается. Таким образом, показанные в настоящей работе экспериментальные условия, при которых GS-индуцированный гемолиз эритроцитов значительно ослабляется, могут представлять особый интерес для дальнейшего более подробного изучения.

### ВЫВОДЫ

GS индуцированный гемолиз эритроцитов чувствителен к фазовому состоянию липидов мембран. Расчитаны величины энергий активации процессов гемолиза эритроцитов. Установлено, что интенсификация процессов ПОЛ в мембране эритроцита способствует понижению гемолитической активности грамицидина S.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. Peptide antimicrobial agents // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2006. – Vol. 19, No. 3. – P. 491–511.
2. Hancock R.E., Sahl H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – V. 24, N 12. – P. 1551-1557
3. Yamada K., Shinoda S.S., Oku H., Komagoe K., Katsu T., Katakai R. Synthesis of low-hemolytic antimicrobial dehydropeptides based on gramicidin S // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49, N 26. – P. 7592-7595.
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. Хакл Е.В., Берест В.П., Гаташ С.В. Влияние гамма-облучения на агрегацию тромбоцитов // *Вісн. Харк. ун-ту.* - 1998. - № 450. - Біофізичний вісн. - Вип.4. - С. 96-99
6. Адиб Халаф Фадел Аль Амуш, Берест В.П., Хакл Е.В. Активация и дезагрегация тромбоцитов *in vitro* при действии грамицидина S // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2007. – Вип. 1. – С. 167-172.
7. Хакл Е.В., Берест В.П., Гаташ С.В. Устойчивость эритроцитов человека к гемолизу под действием полипептидного антибиотика грамицидина S // *Біофізичний вісник.* - 2008. - № 20(1).- 114-120.
8. Биофизика клеточных популяций и надорганизменных систем: Сб.науч.тр. / Отв.ред. И.И. Гительзон. - Новосибирск: Наука, СО, 1992. - 159 с.
9. Берест В.П., Гаташ С.В. Залежність агрегації тромбоцитів від температури // *Фізіологічний журнал.* - 1998. - Т.44, №5-6. - С.89-94.
10. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. - М.: Мир, 1991. – 544 с.
11. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252 с.

12. Atkins P.W. Physical Chemistry. Fifth edition, Oxford, Melbourne, Tokyo. Oxford University Press, 1994. - 1031 p.
13. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. - М.: Наука, 1981. - 293 с.
14. Hackl EV, Gatash SV, Nikolov OT. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2005. – V.63, N 2. – P. 137-148.
15. Hackl E., Berest V., Alamoush A., Gatash S. Gramicidin S effect on human blood platelets depends on the mobility of membrane lipids // Journal of Peptide Science. – 2006. - Volume 12, Issue S1. – P. 227.
16. 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.
17. 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.
18. Leyko W., Bartosz G. Membrane Effects of ionizing radiation and hyperthermia // International Journal of Radiation Biology. – 1985. – Vol. 49, Issue 5. – P. 743–770.
19. Watanabe H., Kobayashi A., Yamamoto T., et. al. Alterations of human erythrocytes membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium // Free Radic. Biol. Med. – 1990. - 8 (6). – P. 507-514.