CELL BIOPHYSICS

Original article
https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-45-03

УДК 577.352

ЗМІНИ ЕЛЕКТРОФІЗИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЕРИТРОЦИТІВ, ІНДУКОВАНІ ГРАМІЦИДИНОМ С

Т. М. Овсяннікова, А. О. Коваленко, В. П. Берест, О. Ю. Боріков
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна;
e-mail: ovsyannikova@karazin.ua
Надійшла до редакції 2 березня 2021 р. Переглянута 12 травня 2021 р.
Прийнята до друку 20 травня 2021 р.

Актуальність. Використання антимікробних пептидів є одним з можливих шляхів подолання загрозливого стрімкого зростання стійкості мікроорганізмів до традиційних антибіотиків. Особливої уваги в цьому контексті заслуговує граміцидин С (GS), який вже понад 70 років є сертифікованим для місцевого медичного застосування. Гострий побічний гемолітичний ефект GS щодо клітин людини перешкоджає його системному використанню. Розуміння молекулярних механізмів взаємодії GS з біологічними мембранами дозволить з одного боку підсилити його бактерицидний ефект, а з іншого — зменшити негативні побічні ефекти щодо клітин людини й таким чином розширити спектр застосування антибактеріальних пептидів для боротьби з інфекційними захворюваннями, викликаними резистентними мікроорганізмами.
Мета роботи. Вивчення впливу різних доз антимікробного олігопептидного антибіотика GS на морфологічні та електрофізичні характеристики еритроцитів людини при інкубації *in vitro*.
Матеріали та методи. Методом проточної цитометрії з використанням спектроскопії імпульсів опору досліджено морфологічні зміни еритроцитів здорових донорів після попередньої інкубації з GS в концентраціях 5–40 мкг/мл. Вимірювали об'єм поодиноких клітин, розподіл еритроцитів за об'ємом в популяції та визначали величину потенціалу електричного пробою плазматичної мембрани еритроцитів людини.
Результати. Інкубація еритроцитів людини з сублітичними концентраціями GS супроводжується перерозподілом еритроцитів за об'ємом зі збільшенням частки еритроцитів меншого об'єму з меншим значенням стійкості мембрани до електричного пробою. Проте, збільшення концентрації GS до 40 мкг/мл, навпаки, призводить до збільшення частки клітин збільшеного об'єму з підвищеною стійкістю до електричного пробою мембрани. Обговорюються можливі механізми морфологічних змін еритроцитів під дією GS.
Висновки. Інкубація еритроцитів з GS у концентраціях 5–40 мкг/мл супроводжується перерозподілом клітин за об'ємом та зміною стійкості плазматичних мембран еритроцитів до електричного пробою, обумовленою дестабілізуючою мембранотропною дією пептиду, мікровезикуляцією еритроцитів за малих концентрації пептиду або порушенням цитоскелету клітин.
КЛЮЧОВІ СЛОВА: граміцидин С; еритроцити; електричний пробій мембрани; об'ємний розподіл.

CHANGES IN ELECTROPHYSICAL CHARACTERISTICS OF RED BLOOD CELLS INDUCED BY GRAMICIDIN S

T. M. Ovsyannikova, A. O. Kovalenko, V. P. Berest, O. Yu. Borikov
V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine
e-mail: ovsyannikova@karazin.ua

© Овсяннікова Т. М., Коваленко А. О., Берест В. П., Боріков О. Ю., 2021. **Open Access.** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/

Як цитувати: Овсяннікова Т. М., Ковленко А. О., Берест В. П., Боріков О. Ю. Зміни електрофізичних характеристик еритроцитів, індуковані граміцидином С. Біофізичний вісник. 2021;45:32-43. https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-45-03

Cite this article: Ovsyannikova T. M., Kovalenko A. O., Berest V. P., Borikov O. Yu. Changes in electrophysical characteristics of red blood cells induced by gramicidin S. Biophysical Bulletin. 2021;45:32-43. https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-45-03

Background. The use of antimicrobial peptides is one of the possible ways to overcome the threatening rapid growth of resistance of microorganisms to traditional antibiotics. Of particular role in this context is gramicidin S (GS), which is used for topical medical application for over 70 years. Acute hemolytic side effect of GS on human cells prevents its systemic use. Understanding the molecular mechanisms of interaction of GS with biological membranes will enhance its bactericidal effect on the one hand, and reduce the negative side effects on human cells and thus expand the range of antibacterial peptides to combat infectious diseases caused by resistant microorganisms.
Objectives. Study of the effect of different doses of the antimicrobial olygopeptide antibiotic GS on the morphological and electrophysical characteristics of human erythrocytes during *in vitro* incubation.
Materials and methods. Morphological changes of erythrocytes of healthy donors after preliminary incubation with GS at concentrations 5–40 μg/ml were studied by flow cytometry using resistance pulse spectroscopy. Single cell volume, erythrocyte volume distribution in the population was measured, and the electrical breakdown potential of the human erythrocyte plasma membrane was determined.
Results. Incubation of human erythrocytes with sub-lytic concentrations of GS is accompanied by redistribution of erythrocytes in this population by volume with increased number of smaller erythrocytes with less resistance of the membrane to electrical breakdown. However, increasing the concentration of GS to 40 μg/ml leads to an increase in the proportion of cells of increased volume with increased resistance to electrical breakdown of the membrane. Possible mechanisms of morphological changes of erythrocytes under the action of GS are discussed.
Conclusions. Incubation of erythrocytes with GS at concentrations 5–40 μg/ml is accompanied by redistribution of cells by volume and changes in the resistance of their plasma membrane to electrical breakdown due to destabilizing membrane-tropic action of the peptide, microvesiculation or cytoskeleton rearrangement.
KEY WORDS: gramicidin S; erythrocytes; electrical membrane breakdown; volume distribution.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ, ИНУЦИРОВАННЫЕ ГРАМИЦИДИНОМ С

Т. Н. Овсянникова, А. А. Коваленко, В. П. Берест, А. Ю. Бориков
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61022, Украина;
e-mail: ovsyannikova@karazin.ua

Актуальность. Использование антимикробных пептидов является одним из возможных путей преодоления стремительного роста устойчивости микроорганизмов к традиционным антибиотикам. Особого внимания в этом контексте заслуживает грамицидин С (GS), который уже более 70 лет является сертифицированным для местного медицинского применения. Острый побочный гемолитический эффект GS для клеток человека препятствует его системному использованию. Понимание молекулярных механизмов взаимодействия GS с биологическими мембранами позволит с одной стороны усилить его бактерицидный эффект, а с другой – уменьшить негативные побочные эффекты в отношении клеток человека и таким образом расширить спектр применения антибактериальных пептидов для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными резистентными микроорганизмами.
Цель работы. Изучение влияния различных доз антимикробного олигопептидного антибиотика GS на морфологические и электрофизические характеристики эритроцитов человека при инкубации *in vitro*.
Материалы и методы. Методом проточной цитометрии с использованием спектроскопии импульсов сопротивления исследовано морфологические изменения эритроцитов здоровых доноров после предварительной инкубации с GS в концентрациях 5–40 мкг/мл. Измеряли объем единичных клеток, распределение эритроцитов по объему в популяции и определяли величину потенциала электрического пробоя плазматической мембраны эритроцитов человека.
Результаты. Инкубация эритроцитов человека с сублитическими концентрациями GS сопровождается перераспределением эритроцитов по объему с увеличением доли эритроцитов меньшего объема с меньшим значением устойчивости мембраны к электрическому пробою. Однако, увеличение концентрации GS до 40 мкг/мл, наоборот, приводит к увеличению доли клеток увеличенного объема с повышенной устойчивостью к электрическому пробою мембраны. Обсуждаются возможные механизмы морфологических изменений эритроцитов под действием GS.
Выводы. Инкубация эритроцитов с GS в концентрациях 5–40 мкг/мл сопровождается перераспределением клеток по объему и изменением устойчивости плазматических мембран эритроцитов к электрическому пробою, обусловленной дестабилизирующим мембранотропным

действием пептида, микровезикуляцией эритроцитов при малых концентрации пептида или нарушением цитоскелета клеток.
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: грамицидин С; эритроциты; электрический пробой мембраны; распределение эритроцитов по объему в популяции клеток.

Зниження ефективності використання традиційних антибіотиків в лікуванні інфекційних захворювань людини, пов'язане з постійно зростаючим числом штамів мікроорганізмів резистентних до даної групи препаратів, є однією з найгостріших медичних проблем сучасності. У зв'язку з цим актуальним вбачається пошук нових антибіотиків, альтернативних методів і засобів антибактеріальної терапії.

Граміцидин С (GS) — циклічний декапептид групи тіротрицинових антибіотиків, який згубно впливає на грампозитивні бактерії і є менш ефективним проти грамнегативних штамів [1], також відомо, що GS може зв'язуватись з вірусним частинками [24]. На відміну від більшості сучасних антибіотиків GS реалізує свою антибактеріальну дію не шляхом пригнічення метаболічних процесів або перешкоджаючи реалізації генетичної інформації, а безпосередньо порушуючи цілісність бактеріальної мембрани. При цьому мікроорганізми практично не розвивають стійкість до цього препарату. Однією з ключових особливостей вторинної структури GS, яка визначає його мембранотропні властивості, є амфіфільність молекули. Амінокислотні залишки L-орнітину з позитивно зарядженими бічними ланцюгами, розташовані з одного боку пласкої молекули, залишками D-фенілаланіну з гідрофобними бічними ланцюгами – на протилежному боці [2]. Вважається, що позитивно заряджені бічні ланцюги забезпечують електростатичну взаємодію з негативно зарядженими ліпідами бактеріальної мембрани з наступним вбудовуванням в ліпідний бішар для максимізації гідрофобних взаємодій. Раніше було показано, що вбудовування катіонних антимікробних пептидів, таких як GS, в бактеріальну мембрану супроводжується її витонченням [3] з подальшим утворенням пор і внаслідок цього руйнуванням ліпідного бішару [4, 5, 6]. Результати досліджень взаємодії GS з мембраною показують, що антибіотик занурюється в рідкокристалічний ліпідний бішар як в модельних, так і в біологічних мембранах, імовірно локалізуючись в площині моношару нижче полярних головних груп фосфоліпідів і вище вуглеводневих ланцюгів залишків жирних кислот. Припускають, що GS порушує упаковку ліпідів в бішарі і може сприяти утворенню інвертованих кубічних фаз в ліпідах при більш низьких температурах, ніж це спостерігається за відсутності пептиду [6]. Можливим є проникнення декапептиду у внутрішній моношар клітинної мембрани і навіть його перехід у цитоплазму з ураженням внутрішньоклітинних мішеней.

Основним негативним побічним ефектом GS, який сильно обмежує його системне застосування в медичній практиці, є висока гемолітична активність, яка проявляється в дозах близьких до терапевтичних [7, 8]. При цьому, не дивлячись на тривалу історію застосування даного препарату, механізми взаємодії GS з плазматичними мембранами про- і еукаріотів залишаються недостатньо вивченими. Дослідження фізичних принципів і молекулярних механізмів взаємодії GS з біомембранами може сприяти як розширенню його терапевтичного потенціалу, так і стати теоретичною основою для розробки менш токсичних і більш ефективних аналогів.

Метою представленої роботи було вивчення впливу сублітичних доз GS на морфологічні та електрофізичні характеристики еритроцитів при інкубації *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Вимірювання проводили на електроцитоаналізаторі ЕЦА-02, модель К (МВ НПП «ТИМЕЛ», Харків, Україна).

Метод спектроскопії імпульсів опору заснований на вимірюванні зміни величини електричного струму, що протікає між двома платиновими електродами, який виникає при проходженні клітини через отвір датчика, що розділяє електроди.

Співвідношення між об'ємом клітини і зміною електричного струму при проходженні клітини крізь отвір датчика має вигляд:

$$\frac{\Delta I}{I} = -\gamma \frac{V_{кл}}{kV_{Д} - V_{кл}}, \quad (1)$$

де $V_{кл}$ — об'єм клітини; $V_{Д}$ – ефективний об'єм датчика; I — сила струму, що проходить крізь датчик; ΔI — амплітуда зміни струму при проходженні клітини через датчик; γ — фактор форми (γ=1,5 для сфери, γ=1,2 для дискоцитів), параметр k є функцією від ω — відношення питомого електричного опору суспендованих частинок до питомого електричного опору середовища, яке розраховується за формулою:

$$k = 1 + \frac{\gamma}{\varpi - 1} \quad (2)$$

для не провідних частинок ($\omega >> 1$), k наближається до 1 [18].

Реєструючи силу струму, що проходить крізь датчик, можливо вимірювати об'єм клітин, а також їх кількість, яка буде дорівнювати сумі імпульсів струму за фіксований проміжок часу.

У роботі використано медичний препарат граміцидину С («Renewal»). 2% водно-етанольний розчин GS розводили у 30-50 разів 0,15 М NaCl (pH 7,4). Для виключення впливу розчинника було здійснено контрольні вимірювання, які показали, що розчин етанолу в концентрації до 1 об'ємного відсотка не впливає на об'ємний розподіл суспензії клітин.

Еритроцити одержували з крові 7 здорових донорів-добровольців різної статі віком від 20 до 35 років. Донорську кров відбирали в пробірку з цитратним буфером, pH 7,4, після чого центрифугували при 3000 об/хв для осадження еритромаси. Осад еритроцитів тричі відмивали фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1,5 з наступним центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 3 хв.

Аліквоти еритромаси кожного донора інкубували з розчинами GS різної концентрації (5, 10, 20, 40 мкг/мл) протягом 15 хв при постійному обережному перемішуванні. 5 мкл зразка додавали в кювету приладу з 5 мл фізіологічного розчину, опустивши датчик в кювету, проводили забір рідини, при постійному тиску 280 атм, покроково змінюючи силу струму на 50 мкА для накопичення гістограм. Для вимірювання електричної точки пробою мембрани еритроцитів силу струму змінювали в діапазоні від 100 мкА до 950 мкА. Для накопичення даних при кожному із встановлених значень сили струму реєстрували спектри імпульсів опору 8 192 клітин.

Опис і аналіз досліджуваних показників еритроцитів проводились для кожного донора індивідуально. Зміни всіх розглянутих параметрів різних донорів мали однакові тенденції, в зв'язку з чим в статті для ілюстрації наведено типові результати окремого донора.

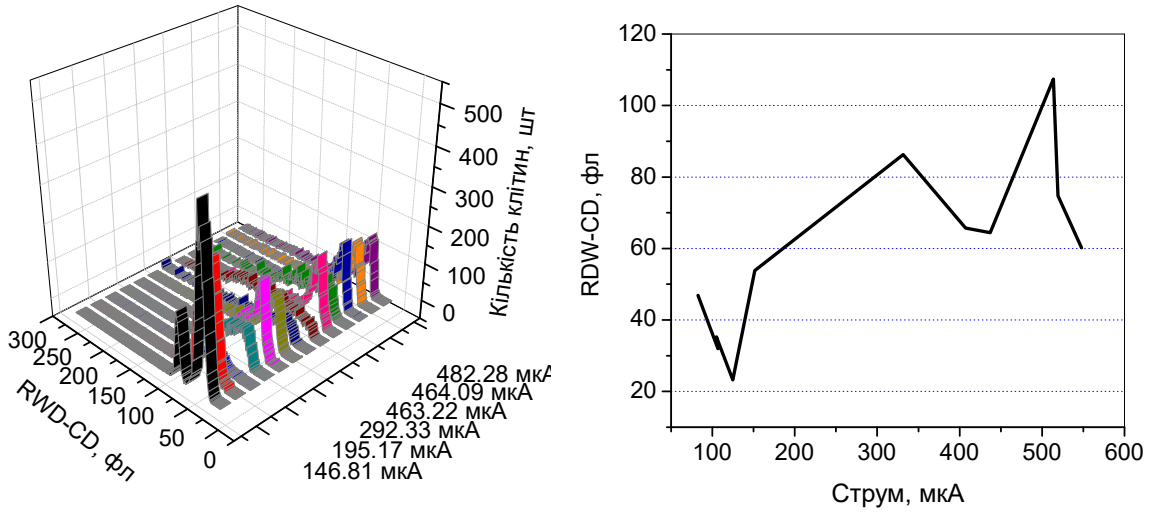
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Еритроцитарний пул в досліджуваних контрольних зразках крові був неоднорідний: поряд з клітинами нормальної референтної величини [9] в аналізованій аліквоті еритромаси визначалися малі та великі еритроцити, в приблизній пропорції 2,2:1,5:1,0 в порядку зростання розмірів клітини (рис. 1 а)

Клітини субпопуляції малих еритроцити пошкоджуються при значеннях сили струму — близько 82 мкА, середні отримують пробій при струмі трохи більше 330 мкА,

великі — понад 513 мкА (рис. 1 b).

Інкубація еритромаси з розчином GS різних концентрацій призводить до появи клітин різного об'єму (рис. 2 a–c). Співвідношення субпопуляцій еритроцитів в пулі клітин одного і того ж донора при різних концентраціях GS розрізнялися як між собою, так і з контролем.



(a) (b)

Рис. 1. Розподіл еритроцитів за об'ємом (RWD-CD) (a) та стійкістю мембрани до електричного пробою (b) в контрольних зразках.

Fig. 1. Distribution of native red blood cells by volume (RWD-CD) (a) and by membrane ability to withstand electrical breakdown (b).

У всіх випадках показано наявність переважної групи клітин з об'ємом, який є близьким до референтних показників (еритроцити середнього розміру). Друга субпопуляція еритроцитів, яка значною мірою представлена в контрольному зразку, — еритроцити більших розмірів у порівнянні з основною масою клітин в загальному пулі. Ця субпопуляція зберігається і після інкубації з антибіотиком, але в кількість клітин її дещо знижується щодо контролю. Разом з тим, спостерігається як зменшення, так і збільшення об'єму ряду клітин, тобто в загальній масі формуються групи еритроцитів, які за розмірами відрізняються від клітин переважаючого пулу. Так, чітко виділяється група невеликих за розмірами еритроцитів, яка з'являється при інкубації з GS в концентрації 5 мкг/мл, стає значимо представленою при 10 мкг/мл, зменшується при 20 мкг/мл і практично зникає при інкубації еритромаси з GS у концентрації 40 мкг/мл. Поряд з цим частина клітин збільшується в розмірах, причому це збільшення неоднорідне і при різних дозах доходить до величин від 80 фл до 200 фл.

Загальна картина розподілу клітин за об'ємом при дії різних концентрацій антибіотика виглядає наступним чином (див. Рис. 2, a, b, c, d). У пулі еритроцитів є стійка до дії GS субпопуляція клітин, яка складає найбільшу групу клітини, що мають об'єм, близький до референтних величин. Збільшення дози GS послідовно від 5 до 40 мкг/мл викликає різноспрямовані зміни загального пулу клітин за об'ємом. При низьких і середніх дозах в загальній масі з'являються клітини, схильні до зменшення свого об'єму, такі клітини переважають, особливо при концентрації 10 мкг/мл. Зі збільшенням концентрації GS вище 10 мкг/мл збільшується частка еритроцитів великого об'єму. Зміни у розподілі клітин за об'ємом відбуваються за рахунок еритроцитів основної групи

клітин середнього розміру.

Певним чином пояснити механізм взаємодії спостережуваного впливу GS на розподіл популяції еритроцитів за об'ємом допомагають результати вимірювання струму пробою мембрани клітин, інкубованих із різними концентраціями антибіотика.

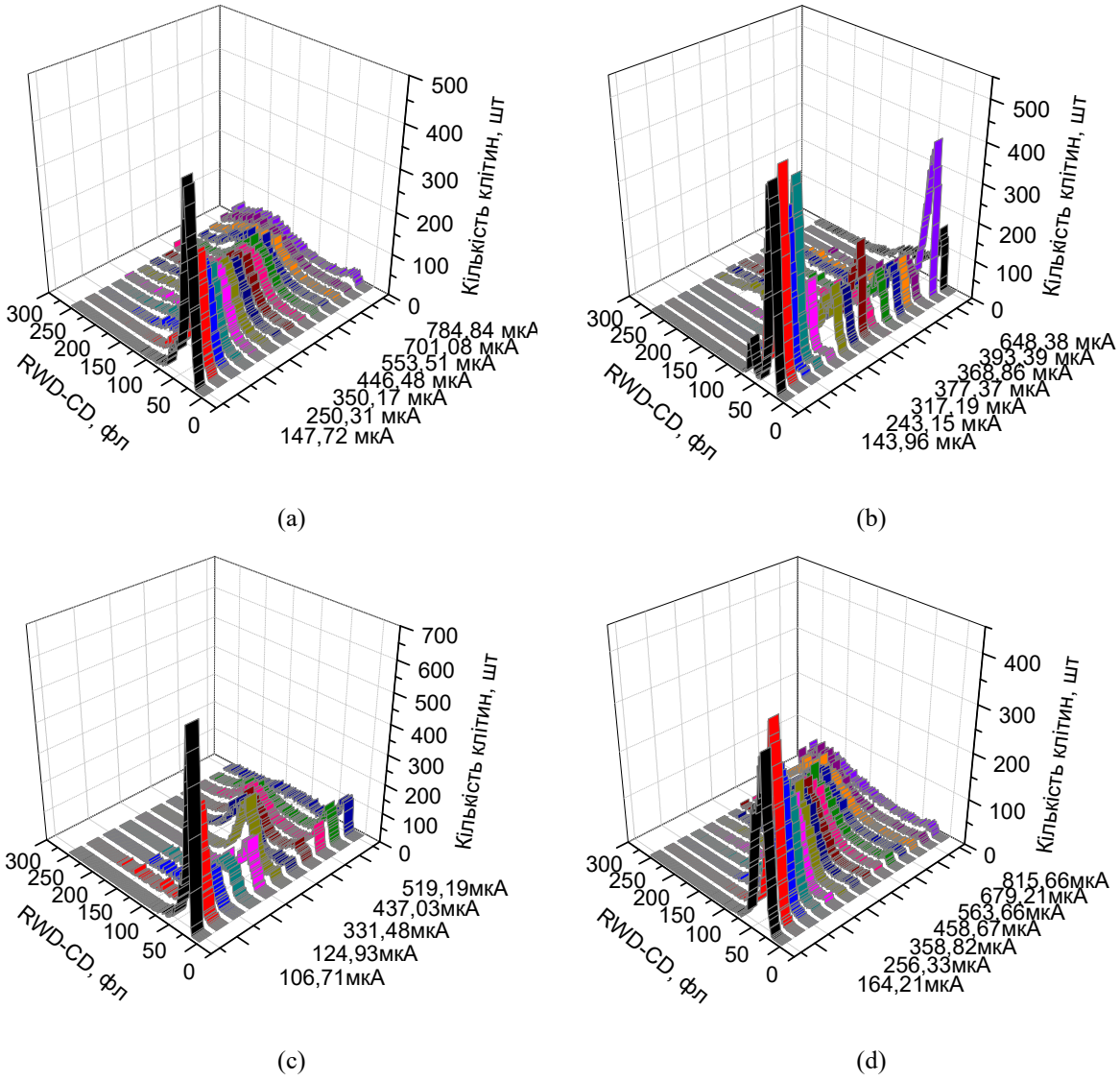


Рис. 2. Розподіл еритроцитів за об'ємом (RWD-CD) в зразку еритромаси після інкубації клітин з GS в концентраціях 5, 10, 20, 40 мкг на 1 мл суспензії еритроцитів (відповідно — a, b, c, d).

Fig. 2. Volume distribution (RWD-CD) of RBCs incubated with GS at concentrations 5, 10, 20, 40 μg/ml (respectively — a, b, c, d).

Формування неоднорідності пулу еритроцитів під дією антибіотика впливає на загальну картину пошкодження еритроцитів при дії струму різної величини (рис. 3 a–c). Після інкубації з GS формуються підгрупи еритроцитів з різною стійкістю мембрани до дії електричних імпульсів. Якщо в контрольних зразках електричний пробій явно вказував на наявність двох популяцій еритроцитів у донора, то після інкубації з антибіотиком їх число зростало при малих концентраціях GS (5 і 10 мкг/мл), а при концентрації 20 мкг/мл знову спостерігалася наявність двох субпопуляцій, пробій

мембран однієї відбувається при струмі близькому до 125 мкА, другої — при струмі близькому до 550 мкА.

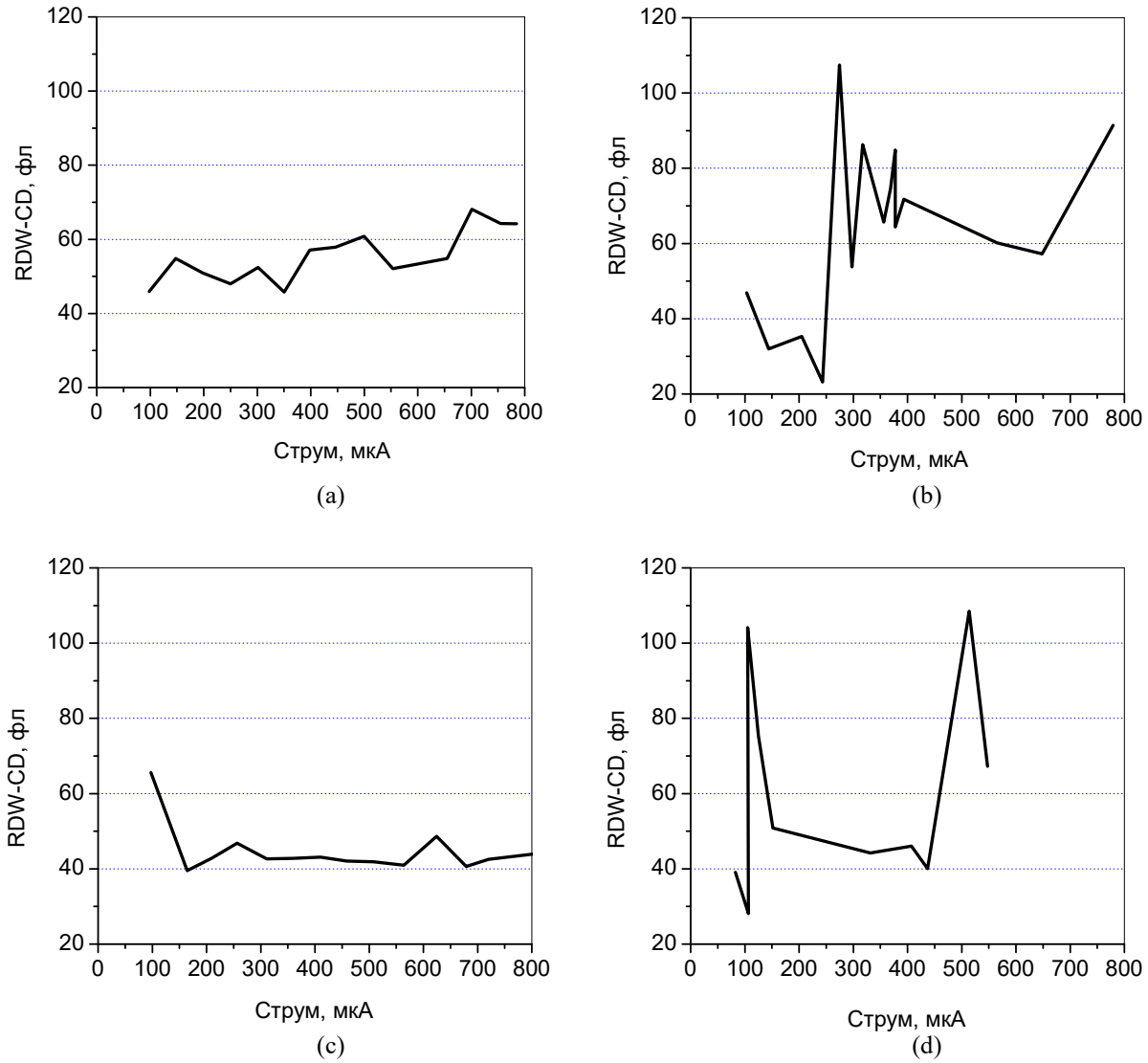


Рис. 3. Показники стійкості мембрани еритроцитів до електричного пробою після інкубації клітин з GS в концентраціях 5, 10, 20, 40 мкг на 1 мл еритромаси (відповідно — a, b, c, d).

Fig. 3. Resistance of RBC membrane to electrical breakdown upon preliminary incubation of cells with GS at concentrations 5, 10, 20, 40 μg/ml (respectively — a, b, c, d).

Звертає на себе увагу і той факт, що при використанні антибіотика в дозах 10 і 20 мкг/мл пошкодження мембран еритроцитів проявлялося в клітинах однакового об’єму, але при різних силах струму. У таких випадках, ймовірно, крихкість клітини залежала від різних причин, тобто пробій був обумовлений різними молекулярними механізмами.

У присутності GS в концентрації 40 мкг/мл вже при мінімальних струмових навантаженнях близько 100 мкА спостерігалося явище, схоже на мембранний пробій, після якого об’єм клітин зменшувався з референтних значень до більш низьких показників. При подальшому збільшенні сили струму не спостерігалося будь-яких подій, що вказують на електричний пробій мембран і критичну зміну об’єму клітин.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було показано, що при низьких концентраціях GS частина еритроцитів із загального пулу аналізованих клітин зменшується в розмірах. Зниження об'єму еритроцитів в цих умовах може бути пов'язано з утворенням локальних дефектів мембрани і посиленням процесів утворення мікровезикул. Біогенез і секреція мікровезикул є невід'ємною частиною фізіології еритроцитів, яка пов'язана з дозріванням і старінням клітин і сприяє своєчасному позбавленню від пошкоджених компонентів, які в іншому випадку можуть викликати небажані гемостатичні та імунологічні реакції [10]. Вивільнення мікровезикул супроводжується зміною співвідношення об'єму і площі поверхні клітин в результаті ремоделювання мембрани [11]. Відділення мікровезикул від еритроцитів сприяє втраті гемоглобіну (до 20%) і частини клітинної мембрани з одночасним зменшенням об'єму клітин і збільшенням їх щільності [12].

Отримані дані частково підтверджуються дослідженнями уніламелярних ліпідних везикул із димірістоілфосфатидилхоліну (ДМФХ), що містять різні концентрації GS, проведені авторами [13] за допомогою денситометрії та звукової вело симетрії, в яких було встановлено, що включення GS поступово знижує температуру фазового переходу ДМФХ везикул, а також знижує ступінь кооперативності основного фазового переходу і збільшує об'ємну стисливість везикул. GS, ймовірно, посилює теплові флуктуації в області основного фазового переходу і забезпечує більшу свободу обертального руху для вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів. Здатність GS збільшувати стисливість мембрани і знижувати температуру фазового переходу свідчить про наявність ділянок спотвореної структури мембрани навколо вбудованих молекул антибіотика.

В нашому дослідженні встановлено підвищення питомого об'єму еритроцитів при відносно високій концентрації GS. Це так само може вказувати на порушення цілісності ліпідного бішару при взаємодії з високими концентраціями GS.

Певну послідовність морфологічних змін еритроцитів при інкубації з різними концентраціями GS визначено в роботі [7] з використанням моделі двошарового зчеплення (bilayer-couple hypothesis) [14]. Автори [7] відзначають, що напочатку GS адсорбується на мембрані еритроцита, що знаходиться в формі дискоцита, це розширює його зовнішній ліпідний шар і призводить до трансформації клітини в ехіноцит. Наступна форма яка спостерігається авторами [7] — дискоцит — формується, коли вміст пептиду тимчасово вирівнюється між двома моношарами, в результаті його переміщення у внутрішній моношар за допомогою критичного механізму або утворення перехідних пір. Оскільки внутрішній ліпідний моношар еритроцитів містить більше негативно заряджених ліпідів, ніж зовнішній моношар [15], GS накопичується у внутрішньому моношарі плазмалеми завдяки своєму подвійному позитивному заряду. Через результуючу більш високу концентрацію антибіотика у внутрішньому ліпідному моношарі площа його збільшується, що і веде до формування стоматоцитів. Коли внутрішній ліпідний моношар насичується GS, зовнішній моношар також дифузно заповнюється пептидом, що знову призводить до формування еритроцитів – дискоцитів, але, мабуть, з більшим об'ємом, ніж у інтактних клітин. Важливу роль в спостережуваних трансформаціях форми клітин автори резервують за компонентами цитоскелету еритроцитів, які залишаються за межами розгляду в рамках даної моделі. У той же час було показано, що модель двошарового зчеплення вимагає існування еластичного мембранного каркаса, пов'язаного з мембраною, щоб різниця в площах моношарів мембрани викликала характерні перетворення форми [16] Таким чином, починаючи з природною форми дискоцитів, морфологія еритроцитів зазнає послідовність трансформацій: ехіноцит — дискоцит — стоматоцит — дискоцит — сфероцит — тінь. Подальше перетворення еритроцитів в сфероцити виходить за рамки моделі двошарового зчеплення, але може бути пояснено

збільшенням мембранного натягу: відомо, що деякі амфіфільні пептиди збільшують натяг мембрани, яка зі свого боку прагне мінімізувати площу поверхні. Спостережувана зміна морфології дискоцитів в сфероцит може бути пов'язана з цим ефектом, тобто сферична форма мінімізує площу поверхні для даного фіксованого об'єму. Підвищений натяг мембрани також може пояснити останній етап в послідовності трансформації форми еритроцитів. Пори мембрани, що виникли внаслідок дефектів, швидко розширюються під дією високої напруги [17], що викликає розрив еритроцитів, перетворюючи їх в тіні, позбавлені гемоглобіну.

Авторами [7] було показано, що еритроцити демонструють послідовність перетворень форми при впливі GS в діапазоні концентрацій 10–20 мкМ. Використаний нами метод спектроскопії імпульсів опору не дозволяє безпосередньо визначати форму клітин. Ми припускаємо, що подібна зміна форми еритроцитів могла відбуватися і за наших експериментальних умов, проте присутність еритроцитів різної форми в аналізованих суспензіях мала б викликати утворення полімодальних гістограм, чого не спостерігалося в наших експериментах з проточної цитометрії. Ми пояснюємо отриману надзвичайно гетерогенну картину розподілу еритроцитів як за об'ємом, так і за силою струму електричного пробою (рис. 1–3) зменшенням об'єму клітин внаслідок мікровезикуляції. Цей процес може бути опосередкований вбудовуванням GS у екстрацелюлярний моношар мембрани еритроцита, формуванням обернених або кубічних ліпідний фаз та провокуванням «відшнуровування» фрагментів мембран [22]. Цей ефект імовірно не залежить від роботи ліпід-траслокуючих ферментів та цитоскелету. Вищі концентрації GS, використані в нашій роботі, викликають збільшення об'єму клітин також не через осмотичні ефекти. Часова залежність цих змін дає нам можливість припустити, що зміна об'єму в цьому випадку відбувається за рахунок перерозподілу GS у внутрішній моношар плазмалеми та може бути опосередкована викликаною GS зміною проникності мембран еритроцитів до іонів Ca^{2+}, активацією моторних нанодоменів цитоскелету, транслоказ та скрамблаз. Подібну кальцій-залежну активацію тромбоцитів було вивчено у наших попередніх роботах [23].

За допомогою екстраполяції отриманих результатів дослідів впливу різного часу інкубації GS з еритроцитами *in vitro* на рівень цілого організму можна припустити, що, по-перше, навіть сублітичні концентрації GS викликають приховані зміни у червоних кров'яних клітинах — зменшується стійкість мембран до електричного пробою. Це відбувається через перерозподіл заряджених та незаряджених ліпідів в мембрані з утворенням кластерів з різною електричною ємністю та відзначене раніше зменшення поверхневого потенціалу плазматичної мембрани при інкубації з GS [19]. Такі зміни структури мембран можуть призводити до утворення агрегатів клітин, а в наслідок цього — зниженню ефективності газо- та масообмінних процесів в капілярах й до гіпоксії; крім того можуть відбуватися зміни в'язкості цільної крові, що позначатиметься на показниках гемодинаміки, вести до гіпертензії, надлишкового навантаження на серце. По-друге, сублітичні концентрації GS при тривалому інкубуванні та літичні при коротких експозиціях ведуть до зміни об'єму еритроцитів та зменшення електромеханічної стійкості їх мембран. Крім щойно описаних ефектів викликаних змінами біофізичних характеристик плазматичної мембрани, на рівні системи циркуляції крові та цілого організму зменшення чи збільшення об'єму еритроцитів веде до зменшення концентрації гемоглобіну, зниження ефективності транспорту кисню та CO_2 і врешті до гіпоксії та ішемії. Це додаткові до гемолізу еритроцитів несприятливі фактори впливу «прямого» застосування GS через системний кровообіг. Можливість корегування гемолітичної дії GS шляхом застосування комплексів антибіотику із наноносіями та модифікації структури пептиду показано в роботах [20, 21, 2]. Перевагою першого підходу є використання нової

лікарської форми зареєстрованого фармпрепарату, позаяк переваги хімічно модифікованих аналогів, які спостерігалися *in vitro*, мають бути підтверджені та пройти тривалу процедуру погодження та реєстрації нового лікарського засобу. Виявлені нами нові побічні ефекти від віртуального системного застосування GS мають бути враховані при пошуку можливості внутрішнього використання GS чи створенні препаратів-аналогів. З іншого боку, віднайдені особливості взаємодії GS з мембранами клітин ссавців можуть бути універсальними й проявлятися для бактеріальних клітин, простіших, грибів та вірусів. В такому випадку наведені у нашій статті нові механізми пошкоджуючої дії GS можуть бути враховані при оптимізації захисту від хвороботворних мікроорганізмів та створенню нових підходів до боротьби з антибіотиковою резистентністю.

Крім того застосований нами підхід щодо аналізу змін розподілу еритроцитів за об'ємом під впливом фармпрепарату дозволив визначити зміни у різних за віком фракціях еритроцитів. Це може бути корисним з огляду на більш персоналізований підхід до визначення впливу лікарського засобу на окремого пацієнта. Більше того, відома зміна морфо-функціональних характеристик різних фракцій еритроцитів під час тривалого зберігання донорської крові чи еритромаси може бути використана для оптимізації кріозахисних середовищ із вмістом GS.

ВИСНОВКИ

Зміни об'єму та величини електричного пробою мембрани після інкубації еритромаси з GS у всіх обстежених донорів були односпрямованими у гетерогенній популяції еритроцитів здорових донорів.

Сублітичні концентрації GS (5 і 10 мкг антибіотика на 1 мл еритромаси) при інкубації протягом 15 хв викликають зменшення об'єму частини еритроцитів у всіх донорів.

Інкубація еритроцитів протягом 15 хв з GS в концентрації 20 мкг/мл веде до посилення гетерогенності їх пулу, що, ймовірно, пов'язано з граничним заповненням сайтів зв'язування антибіотика на мембрані клітин при даній концентрації.

GS у концентрації 40 мкг/мл викликає збільшення об'єму клітин, хоча після 15 хвилинної інкубації не призводить до їх гемолізу.

Отримані дані можуть бути використані для розширення спектру застосування антибактеріальних пептидів в медичній практиці, а також розробки більш ефективних і менш токсичних аналогів.

ПОДЯКА

Роботу виконано в рамках проекту фундаментального дослідження Міністерства освіти і науки України, номер держреєстрації 0118U002041.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Овсяннікова Т. М. https://orcid.org/0000-0002-0344-0189
Коваленко А. О. https://orcid.org/0000-0002-6332-8922
Берест В. П. https://orcid.org/0000-0001-7779-154X
Боріков О. Ю. https://orcid.org/0000-0001-5776-566X

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Gause GF, Brazhnikova MG. Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds. Nature. 1944; 154(3918):703. https://doi.org/10.1038/154703a0

2. Guan Q, Huang S, Jin Y, Campagne R, Alezra V, Wan Y. Recent Advances in the Exploration of Therapeutic Analogues of Gramicidin S, an Old but Still Potent Antimicrobial Peptide. J Med Chem. 2019;62(17):7603-17. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00156
3. Wenzel M, Rautenbach M, Vosloo JA, Siersma T, Aisenbrey CHM, Zaitseva E, Laubscher WE, van Rensburg W, Behrends JC, Bechinger B, Hamoen LW. The Multifaceted Antibacterial Mechanisms of the Pioneering Peptide Antibiotics Tyrocidine and Gramicidin S. mBio. 2018;9(5):e00802-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00802-18
4. Katsu T, Kuroko M, Morikawa T, et al. Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. Biochim Biophys Acta. 1989;983(2):135-41. https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90226-5
5. Prenner EJ, Lewis RNAH, McElhaney RN. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes Biochim Biophys Acta. 1999;1462(1-2):201-21. https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00207-2
6. Wu M, Maier E, Benz R, Hancock REW. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Biochemistry. 1999;38(22):7235-42. https://doi.org/10.1021/bi9826299
7. Semrau S, Monster MWL, van der KnaapM, et al. Membrane lysis by gramicidin S visualized in red blood cells and giant vesicles. Biochim Biophys Acta. Biomembranes. 2010;1798(11):2033-39. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.001
8. Swierstra J, Kapoerchan V, Knijnenburg A, et al. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35(5):763-9. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2595-y
9. Hoffmann JJML, Nabbe KCAM, van den Broek NMA. Effect of age and gender on reference intervals of red blood cell distribution width (RDW) and mean red cell volume (MCV). Clin Chem Lab Med. 2015;53(12):2015-9. https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0155
10. Leal JKF, Adjobo-Hermans MJW, Bosman GJCGM. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. Front Physiol. 2018;9:703. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00703
11. Blanc L, De Gassart A, Géminard C, Bette-Bobillo P, Vidal M. Exosome release by reticulocytes—An integral part of the red blood cell differentiation system. Blood Cells Mol Dis. 2005;35(1):21–6. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.04.008
12. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy. Int J Mol Sci. 2021;22(1):153. https://doi.org/10.3390/ijms22010153
13. Krivanek R, Rybar P, Prenner EJ, et al. Interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with dimyristoyl-phosphatidylcholine bilayer membranes: a densitometry and sound velocimetry study. Biochim Biophys Acta. Biomembranes. 2001;1510(1-2):452-63. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00376-X
14. Lim GHW, 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 USA. 2002;99 (26):16766-69. https://doi.org/10.1073/pnas.202617299
15. Murate M, Abe M, Kasahara K, Iwabuchi K, Umeda M, Kobayashi T. Transbilayer distribution of lipids at nano scale. J Cell Sci. 2015;128(8):1627-38. https://doi.org/10.1242/jcs.163105
16. Huang HW, Chen F-Yu, Lee M-T. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. Phys Rev Lett. 2004;92(19):198304. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.92.198304
17. Karatekin E, Sandre O, Brochard-Wyart F. Transient pores in vesicles. Polym Int. 2003;52(4):486-93. https://doi.org/10.1002/pi.1007
18. Grover NB, Naaman J, Ben-Sasson S, Doljanski F, Nadav E. Electrical Sizing of Particles in Suspensions: II. Experiments with Rigid Spheres. Biophys J. 1969;9(11):1415-25. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(69)86462-3
19. Borikov OY, Morozova OM, Berest VP. Sub-Microfluidic Setup to Quantify Cell Surface & Charge Density. 2019 IEEE 2nd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering. 2019:256–9 https://doi.org/10.1109/UKRCON.2019.8879988
20. Hackl EV, Berest VP. Зміна рухливості ліпідів мембрани впливає на взаємодію грамицидина S з еритроцитами людини. Біофізичний вісник. 2008;2(21):56-63. Available from: https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/16742
21. Berest VP, Sotnikov A, Sichevska LV. Lipid nanocarriers impede side effects of delivered antimicrobial peptide (*in press*)
22. Penič S, Mesarec L, Fošnarič M, Mrówczyńska L, Hägerstrand H, Kralj-Iglič V, Iglič A. Budding and Fission of Membrane Vesicles: A Mini Review. Front Phys. 2020;8:342. https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00342

23. Hackl EV, Berest VP, Gatash SV. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S with platelets. J Pept Sci. 2012;18(12):748–54. https://doi.org/10.1002/psc.2461
24. Abdalla MA, McGaw LJ. Natural Cyclic Peptides as an Attractive Modality for Therapeutics: A Mini Review. Molecules (Basel, Switzerland). 2018;23(8):2080. https://doi.org/10.3390/molecules23082080