

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-04>

УДК 577.352+ 577.182.26+576.52

## АНТИМІКРОБНИЙ ПЕПТИД ГРАМІЦИДИН S ВПЛИВАЄ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ТА ПРИГНІЧУЄ АДГЕЗІЮ ФІБРОБЛАСТІВ ЛІНІЇ L929

Н. М. Алабедалькарім<sup>1</sup>, В. П. Берест<sup>2</sup>, Н. М. Моїсєєва<sup>1</sup>, Г. А. Божок<sup>1,2</sup>,  
Т. П. Бондаренко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна;

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

e-mail: [berest@karazin.ua](mailto:berest@karazin.ua)

Надійшла до редакції 28 грудня 2022 р. Переглянута 20 червня 2023 р.

Прийнята до друку 26 червня 2023 р.

**Актуальність:** Антимікробні пептиди мають перспективи у боротьбі з резистентністю збудників інфекційних захворювань до наявних антибіотиків. Неспецифічний механізм цитостатичної дії антимікробних пептидів, зокрема граміцидину S, щодо бактерій виявляється ефективним і для ушкодження клітин новотворів.

**Мета роботи** полягає у з'ясуванні можливого протипухлинного ефекту антимікробного пептиду граміцидину S.

**Матеріали та методи.** Методами конфокальної лазерної та світлової мікроскопії вивчено морфо-функціональні особливості клітин сполучної тканини — фібробластів лінії L929 — під впливом граміцидину S в діапазоні концентрацій 0,5–50 мкг/мл.

**Результати:** Встановлено літичний вплив граміцидину S в концентрації 50 мкг/мл на клітини культури L929, у концентраціях 0,5 мкг/мл і 5,0 мкг/мл антибіотик підвищує синтетичну активність клітин та стимулює проліферацію фібробластів в моношарі. Анізоморфія клітин є більш вираженою в присутності 5,0 мкг/мл граміцидину S, доданого у поживне середовище під час формування моношару, при цьому третина клітин у зразку формує популяцію, що морфологічно відрізняється від інших клітин у культурі. Додавання 0,5 та 5,0 мкг/мл граміцидину S до неприкріплених фібробластів достовірно пригнічує формування моношару. Під впливом 5,0 мкг/мл граміцидину S швидкість формування моношару є низькою, навіть незважаючи на значний вміст клітин з високим показником ядерно-цитоплазматичного відношення. Кінетика заповнення дефекту клітинного моношару свідчить, що граміцидин S у концентраціях 0,5 та 5,0 мкг/мл здатен керувати мігрантно-проліферативними властивостями клітин лінії L929.

**Висновки:** Вплив граміцидину S на морфометричні параметри клітин залежить від концентрації пептиду та вихідного стану культури. Граміцидин S пригнічує адгезивні властивості фібробластів у моношаровій культурі клітин та швидкість формування моношару клітинами лінії L929. Найбільш чутливими до нелітичних концентрацій граміцидину S є клітини на стадії прикріплення та формування моношару. Пригнічення адгезивних властивостей клітин сполучної тканини граміцидином S є новим «неканонічним» ефектом відомого антимікробного препарату, який може свідчити про можливість застосування граміцидину S у якості антинеоплатичного засобу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** граміцидин S; фібробласти лінії L929; проліферація; адгезія; міграція.

**Як цитувати:** Алабедалькарім НМ, Берест ВП, Моїсєєва НМ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Антимікробний пептид граміцидин S впливає на проліферацію та пригнічує адгезію фібробластів лінії L929. Біофізичний вісник. 2023;49:43–60. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-04>

**In cites:** Alabedalkarim NM, Berest VP, Moiseieva NM, Bozhok GA, Bondarenko TP. The antimicrobial peptide gramicidin S alters proliferation and inhibits adhesion of L929 cell line fibroblasts. Biophysical Bulletin. 2023;49:43–60. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-04>

**Open Access.** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Антимікробні пептиди завдяки амфіфільності та наявності позитивного заряду молекул ефективно адсорбуються у поверхневому шарі та на плазматичній мембрані бактерій та клітин, обумовлюючи цитотоксичний ефект. Мішенню даних пептидів є переважно клітинні мембрани, резистентність до них розвивається рідко, проте недоліком є низька специфічність. Вивчення впливу протимікробних пептидів на клітини різних типів дозволяє розширити сферу їх застосування та з'ясувати нові терапевтичні можливості. Граміцидин S (GS) — циклічний катіонний антимікробний пептид з широким спектром антибактеріальної дії щодо грампозитивних бактерій, грибів та найпростіших [1]. Однак широке використання GS у клінічній практиці обмежено місцевим застосуванням антибіотика через його літичну дію на еритроцити [2, 3] та тромбоцити [4] людини. Спостережуване зростання резистентності мікрофлори до сучасних антибіотиків знов привернуло увагу до антимікробного пептиду GS завдяки відсутності в природі стійких до нього мікроорганізмів [5–7]. Було створено ряд його синтетичних аналогів, які зберігають високу антимікробну активність та мають більш низьку гемолітичну дію [8, 9]. Зміна електростатичних властивостей мембрани при зв'язуванні з антимікробним пептидом граміцидином S має впливати на спроможність клітин до адгезії, розпластування і проліферації. Дія GS як антибіотика полягає в порушенні структури та функції цитоплазматичної мембрани. У модельних мембранах GS краще зв'язується із негативно зарядженими ліпідами, ніж з цвіттеріонними або незарядженими фосфо- і гліколіпідами, взаємодія GS з якими зменшується у присутності холестеролу. Вбудовування в бішар супроводжується витонченням мембрани, GS переважно локалізується в бішарі поблизу залишків гліцерину, взаємодіючи з полярними головними групами та верхніми областями вуглеводневих ланцюгів ліпідів. GS розупорядковує рідкокристалічні бішари, підвищує неспецифічну проникність модельних і біологічних мембран [1, 16, 24, 32], при цьому пептид не утворює дискретних каналів у структурі фосфоліпідного бішару, а індукує перехідні дефекти різного розміру, які змінюють бар'єрні властивості мембрани.

Нещодавно встановлено, що деякі антибіотики з групи граміцидинів, у тому числі GS, здатні до пригнічення проліферації ліній канцерогенних клітин [10–12], що відкрило нові перспективи застосування GS в клінічній практиці. Припускають, що протиракова дія граміцидинів, так само як і їх антибактеріальний ефект, пов'язана з порушенням проникності мембрани клітин, а зрештою і з порушенням клітинного та іонного гомеостазу [13–17]. Але механізми обох ефектів та молекулярні деталі взаємодій залишаються не з'ясованими. У нашому дослідженні ми вивчили певні аспекти взаємодії GS з культурами клітин. У якості моделі обрано не канцерогенні клітини фібробластів лінії L929 — потенційно здатної трансформуватися у пухлиноподібні утворення. На додачу до цього фібробласти лінії L929 є клітинами сполучної тканини, яка може зазнавати впливу антибіотика граміцидину S за умов його рекомендованого місцевого застосування. L929 — це перещеплювана клітинна лінія фібробластів миші, які зазвичай використовуються для досліджень цитотоксичності *in vitro* завдяки відтворюваним біологічним реакціям і швидкості росту, відповідно до міжнародного стандарту ISO 10993-5.

Метою нашої роботи було з'ясувати перспективу застосування граміцидину S як протипухлинного терапевтичного агента, вивчивши його антиадгезивну, антиміграторну активність та здатність впливати на морфологічні та проліферативні властивості фібробластів лінії L929 в культурі клітин.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на перещеплюваній лінії клітин фібробластів L929, яку

отримували після 4 пасажів з культури, що зберігалася у парах рідкого азоту при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ . Культивування здійснювали при  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфері з 5%  $\text{CO}_2$  в живильному середовищі DMEM/F12 (“Biowest”, Франція) з додаванням 10% фетальної телячої сироватки та антибіотиків: бензилпеніциліну (200 Од/мл (“Arterium”, Україна) стрептоміцину (40 мкг/мл “Arterium”, Україна) та амфотерицину (5 мкг/мл “Arterium”, Україна).

Для отримання моношарової культури суспензію клітин з концентрацією  $1,7 \times 10^5$  кл/мл висівали в пластикові флакони для культивування (“SPL Life Sciences”, Південна Корея). На 7 добу моношарову культуру обробляли 1:1 сумішшю 0,5% трипсину (“Sigma”, США) та розчину Версену (“PAA”, США) впродовж 5 хвилин, відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12, та висівали в лунки планшетів (24-лунковий планшет “SPL Lifesciences”, Південна Корея) в концентрації  $1,7 \times 10^4$  кл/мл. Життєздатність висівної суспензії клітин, яку оцінювали методом суправітального фарбування трипановим синім, складала  $92,33 \pm 5,3\%$ .

GS (“Renewal”), розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) вносили в лунки планшетів у фінальній концентрації 0,5, 5 та 50 мкг/мл. Середовище культивування контрольних груп клітин містило відповідну кількість живильного середовища (групи контролю – К), або 1% розчин ДМСО (група ДМСО – Д).

Дослідження проводили на стадії прикріплення та формування моношару (варіант 1) або на сформованому моношарі клітин (варіант 2, варіант 3).

У варіанті 1 суспензію клітини L929 з концентрацією  $1,7 \times 10^4$  кл/мл висівали в середовище, які містило відповідно 0,5, 5 і 50 мкг/мл GS, 1% розчин ДМСО, або виключно живильне середовище (контроль К1). На третю добу культивування проводили морфометричні дослідження, оцінювали швидкість формування моношару.

Згідно варіанту 2 суспензію клітини L929 з концентрацією  $1,7 \times 10^4$  кл/мл висівали в лунки планшетів, культивували три доби, після заміни середовища культивування додавали 0,5, 5 або 50 мкг/мл GS, або 1% розчин ДМСО та продовжували культивування ще 3 доби. Клітини контрольної група (контроль К2) культивували весь час у живильному середовищі без добавок.

Для варіанту 3 суспензію клітини L929 з концентрацією  $1,7 \times 10^4$  кл/мл висівали в лунки планшетів, культивували три доби. Після чого інкубували моношар з 0,5, 5 або 50 мкг/мл GS, або 1% розчином ДМСО годину в стандартних умовах культивування, відмивали GS та ДМСО і продовжували культивування ще три доби. Клітини контрольної група (контроль К3) культивували впродовж всього експерименту в живильному середовищі без добавок.

### *Морфометричні дослідження*

Морфологію клітин оцінювали в незабарвлених культурах та в препаратах, пофарбованих гематоксиліном-еозином за допомогою конфокального лазерного мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 META (Німеччина) і світлооптичного мікроскопа AmScore IN300T-FL (США) з цифровою камерою. Ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ) визначали за допомогою програми AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Німеччина) і розраховували за формулою:

$$\text{ЯЦВ} = \frac{S_{\text{я}}}{S_{\text{ц}}},$$

де ЯЦВ — ядерно-цитоплазматичне відношення,  $S_{\text{я}}$  — площа ядра,  $S_{\text{ц}}$  — площа цитоплазми.

### ***Фарбування гематоксиліном-еозином***

На відповідну добу культивування згідно плану експерименту (варіант 1, варіант 2, варіант 3) фібробласти фіксували 4% параформальдегідом протягом 30 хвилин, відмивали фосфатно-сольовим буфером (PBS, pH=7,4) і витримували послідовно по 1 хвилині в розчинах спирту зростаючих концентрацій (70%, 80%, 96%) та спадаючих концентрацій (96%, 80%, 70%). Після видалення спирту моношар клітин фарбували в гематоксиліні 5 хвилин, відмивали проточною водою і забарвлювали розчином еозину 1 хвилину, відмивали клітини дистильованою водою, покривали смужкою гліцерину та зберігали для подальших досліджень.

### ***Визначення конфлюентності моношару***

Конфлюентність моношару клітин, забарвлених гематоксиліном-еозином, оцінювали за допомогою сканування дна планшета на сканері Epson Perfection V10 (Японія). Підрахунки відносної площі моношару клітин проводили за допомогою програми AxioVision Rel 4.8, виражали у відсотках і розраховували за формулою

$$S = \frac{\sum S_M}{S_L \cdot 100\%},$$

де  $\sum S_M$  — сума площ ділянки із зафарбованими клітинами у межах лунки,  $S_L$  — площа лунки.

### ***Оцінка міграційної активності клітин в 2D культурі при пошкодженні моношару (тест загоєння «подряпини»)***

Для оцінки міграційної і проліферативної активності моношарової культури використовували модель ушкодження моношару у вигляді подряпини (scratch assay) [18]. Подряпину на моношарі робили пластиковим наконечником для піпет-дозатору об'ємом 200 мкл та діаметром 0,8 мм. Для оцінки площі загоєння робили серію фотознімків безпосередньо після нанесення подряпини та через 24, 48 та 72 години за допомогою світлооптичного мікроскопу AmScore IN300T-FL з цифровою камерою із використанням програмного забезпечення ImageJ. Площу «загоєння» подряпини виражали у відсотках і розраховували за формулою

$$S = \frac{100 \cdot (S_s - S_t)}{S_s},$$

де  $S_s$  — площа подряпини безпосередньо після нанесення дефекту;  $S_t$  — площа подряпини через певний час після нанесення дефекту.

Аплікацію GS проводили на сформований моношар 3 добової клітинної культури з нанесеною подряпиною в двох варіантах. У варіанті 2 термін культивування з GS в відповідних концентраціях та з димексидом складав 3 доби. У варіанті 3 після 1 години інкубації з GS або димексидом, їх видаляли шляхом 2-кратного змінення середовища, та додавали свіже поживне середовище для подальшого культивування впродовж 3дб.

### ***Статистичний аналіз***

Дані представлені у вигляді медіани з першим і третім кватрилем. Визначення значущості відмінностей отриманих даних в порівнюваних вибірках проведено за критеріями Манна-Уїтні (U). Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що мембранотропні властивості GS полягають зокрема в зміні щільності пакування ліпідів бішару мембрани в залежності від концентрації GS – від потоншення до повного порушення цілісності ліпідного бішару [16], і це може обумовлювати формування літичних пор в мембранах та гемолітичний ефект GS [4]. В субмікромолярних концентраціях (3–11 мкМ) GS здатен змінювати клітинний трансмембранний потенціал, що впливає на ріст і життєздатність ліній клітин [10, 19, 20].

Нами було зроблено припущення, що в нелітичних концентраціях GS може також впливати на здатність клітин до прикріплення, проліферації та міграції. На першому етапі роботи, ми вивчили дію GS на клітини лінії L929 у таких варіантах: на стадії прикріплення та формування моношару (варіант 1) або на сформований моношар (варіант 2).

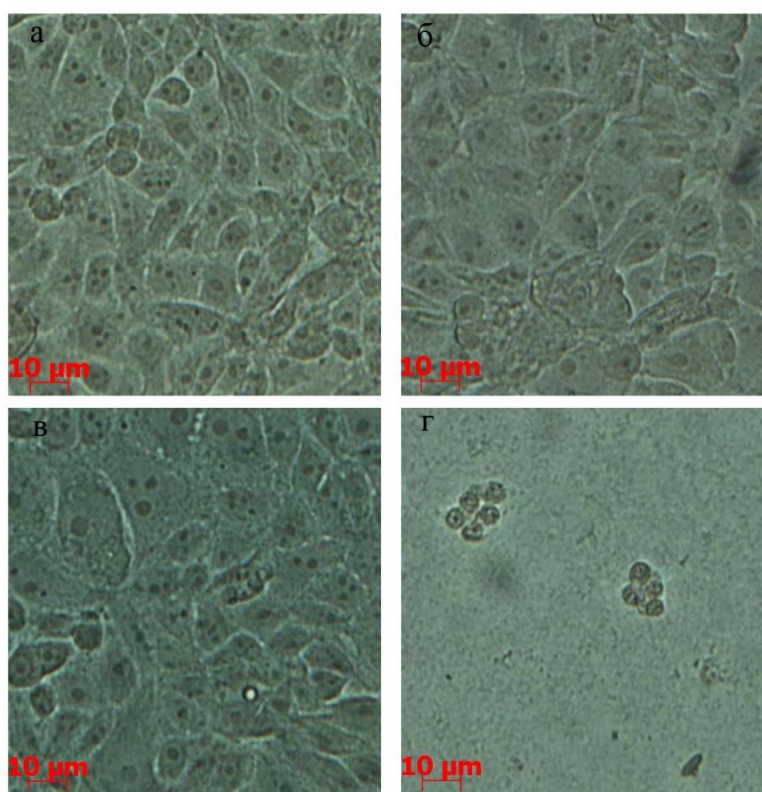


Рис. 1. Морфологія клітин лінії L929 (варіант 1) на 3-тю добу формування моношару в присутності відповідних концентрацій GS: а — контроль K1; б — GS 0,5 мкг/мл; в — GS 5 мкг/мл; г — GS 50мкг/мл. Мікрофото.

Fig. 1. Microscopy micrographs showing morphology of L929 cells (scenario 1) on the 3rd day of monolayer formation in the presence of corresponding concentrations of gramicidin S: а — control K1; б — in the presence of 0.5 µg/ml gramicidin S; в — in the presence of 5.0 µg/ml gramicidin S; г — in the presence of 50 µg/ml gramicidin S.

У варіанті 1 візуальний контроль через три доби показав, що у лунках з контролем (K1, Рис. 1а) та експериментальними концентраціями GS 0,5, 5 мкг/мл (Рис. 1б та Рис. 1в відповідно) спостерігається моношар полігональних клітин з добре помітними ядрами. Більшість клітин мали по 2–3 ядра, що свідчить про високу синтетичну активність клітин. Зразки, що культивували в присутності 0,5 та 5 мкг/мл GS, містили клітини різні за розміром: маленькі та великі. Причому анізоморфія клітин була більш вираженою в присутності 5 мкг/мл GS (Рис. 1б та Рис. 1в відповідно). При додаванні до

поживного середовища GS в концентрації 50 мкг/мл моношар фібробластів не розвивався: в лунках на третю добу спостерігався лише клітинний дебрис та поодинокі нерозпластані клітини (Рис. 1г). Клітини, що культивували з 1% розчином ДМСО, за морфологічними ознаками не відрізнялись від відповідного контролю (К1) (дані не представлено).

У варіанті 2 GS у відповідних концентраціях 0,5, 5 і 50 мкг/мл додавали до моношару клітин лінії L929 і культивували впродовж трьох діб. Ми встановили, що культивування в присутності 50 мкг/мл GS призводило до повного руйнування моношару (Рис. 2г). Тоді як GS в концентрації 0,5 та 5 мкг/мл (Рис. 2б) візуально не впливав на конфлюентність моношару культури клітин (Рис. 2б, 2в), але змінював морфологічні ознаки клітин. В присутності 0,5 мкг/мл GS культивовані клітини були значно більше за розміром та мали велике світле ядро з 1–2 ядерцями (Рис. 2б). При культивуванні з 5 мкг/мл GS культура клітин містила полігональні клітини різні за розміром з більш темним, щільним ядром з 1–3 ядерцями, та світлою цитоплазмою (Рис. 2в).

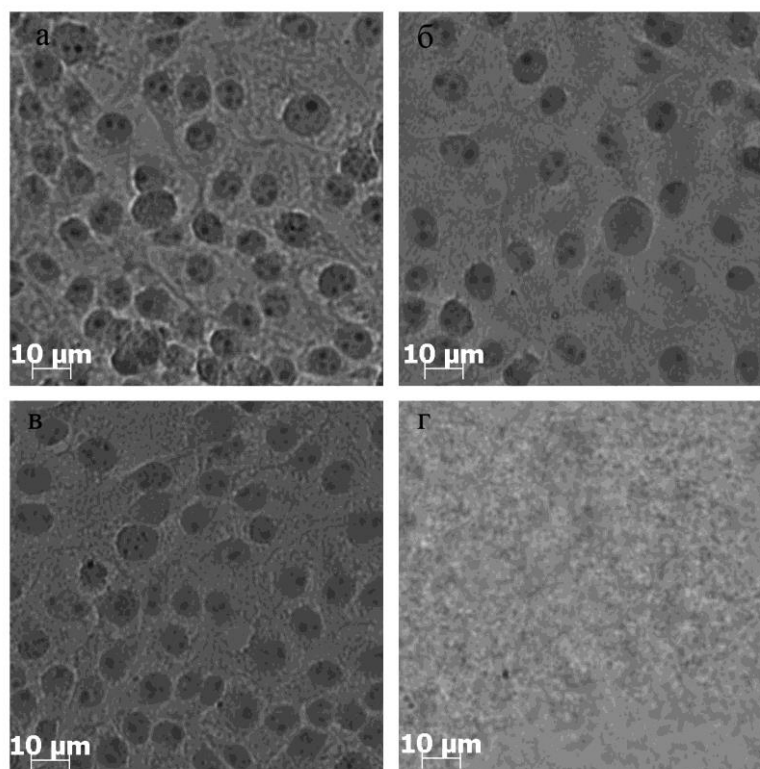


Рис. 2. Морфологія клітин лінії L929 (варіант 2) через 3 доби після додавання до моношару клітин GS в концентрації: а — контроль К1; б — GS 0,5 мкг/мл; в — GS 5 мкг/мл; г — GS 50 мкг/мл. Мікрофото  $\times 400$ .

Fig. 2. Microscopy micrographs showing morphology of L929 cells (scenario 2) 3 days after the addition of different concentrations of gramicidin S to the monolayer of cells: a — control K1; б — 0.5  $\mu\text{g/ml}$  gramicidin S; в — 5.0  $\mu\text{g/ml}$  gramicidin S; г — 50  $\mu\text{g/ml}$  gramicidin S. Magnification  $\times 400$ .

Для подальшої оцінки впливу GS на морфологічні характеристики клітин L929 після забарвлення гематоксилином та еозином визначали площу клітин (загальна площа), площу ядра та ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ) (Таблиця 1). В присутності GS в максимальній концентрації 50 мкг/мл ці показники не визначали,

тому що нечисленні клітини лінії L929, що збереглися при застосуванні такої концентрації пептиду, були не розпластані та мали пікнотичне ядро.

Таблиця 1. Морфометричні показники (площа ядра, площа клітини та ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ)) клітин лінії L929, які були культивовані з різними концентраціями GS згідно експериментальним умовам варіант 1, варіант 2.

Table 1. Morphometric indicators (nucleus area, cell area, nucleus-to-cytoplasm ratio) of L 929 cells cultured with different concentrations of gramicidin S according to the experimental conditions of scenario 1 and scenario 2.

Умови експерименту		Контроль К1 для варіанту 1; К2 для варіанту 2	ДМСО	Концентрація GS	
				0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
Варіант 1	Площа клітини (Загальна площа), мкм <sup>2</sup>	72,33 (58,55–92,80)	85,28 (75,71– 116,11)	83,94 (71,57–107,53)	<b>145,77*</b> <b>(101,27– 178,83)</b>
	Площа ядра, мкм <sup>2</sup>	26,19 (22,43–32,67)	28,99 (21,58–36,88)	24,92 (21,69–29,15)	<b>49,23*</b> <b>27,72–66,89)</b>
	ЯЦВ	0,35 (0,297–0,47)	0,33 (0,25–0,37)	<b>0,29*</b> <b>(0,24–0,36)</b>	0,36 (0,26–0,41)
Варіант 2	Площа клітини, (Загальна площа), мкм <sup>2</sup>	73,67 (69,69–90,69)	79,06 (65,38–109,55)	84,23 (67,76–106,73)	77,49 (65,14–91,21)
	Площа ядра мкм <sup>2</sup>	24,88 (21,69–29,63)	23,90 (20,19–26,89)	25,80 (22,20–33,05)	27,79 (23,02 – 32,41)
	ЯЦВ	0,32 (0,29–0,38)	0,29 (0,25–0,36)	0,335 (0,25–0,39)	<b>0,37*</b> <b>(0,31–0,43)</b>

Примітка: \* — відмінності достовірні відносно інтактного контролю К1 та К2 відповідно,  $p < 0,05$ ; дані наведено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3)

Note: \* — differences are significant compared to intact control K1 and K2, respectively;  $p < 0.05$ ; data are presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

З Таблиці 1 видно, що ДМСО, який був використаний як розчинник GS, значуще не впливав на морфометричні показники культури клітин лінії L929 як на стадії прикріплення та формування моношару (варіант 1), так і на сформований моношар (варіант 2). Проте вплив GS на морфометричні параметри клітин залежав від його концентрації та вихідного стану культури.

При додаванні 0,5 мкг/мл GS на етапі формування моношару (варіант 1) площа клітин дещо збільшувалась на тлі зменшення площі ядра, що призвело до достовірного зниження ЯЦВ клітин.

Додавання 5 мкг/мл GS на етапі формування моношару (варіант 1) призводило до значущого збільшення площі ядра та клітин в цілому, причому ЯЦВ не відрізнялося від відповідного контролю.

Аплікація 0,5 мкг/мл GS до сформованого моношару клітин (варіант 2) достовірно не змінювала морфометричні показники клітин. Проте в присутності 5 мкг/мл GS відмічено тенденцію до зростання площі ядра та загальної площі клітини, що призводило до достовірного зростання ЯЦВ.

Таким чином, статистично значущий ефект GS на морфометричні показники фібробластів (площу ядра та клітин) було встановлено лише при дії пептиду в концентрації 5 мкг/мл на неприкріплені клітини (варіант 1).

В зв'язку з цим ми дослідили розподіл клітин за загальною площею та площею ядра після обробки GS за схемами варіанту 1 та варіанту 2.



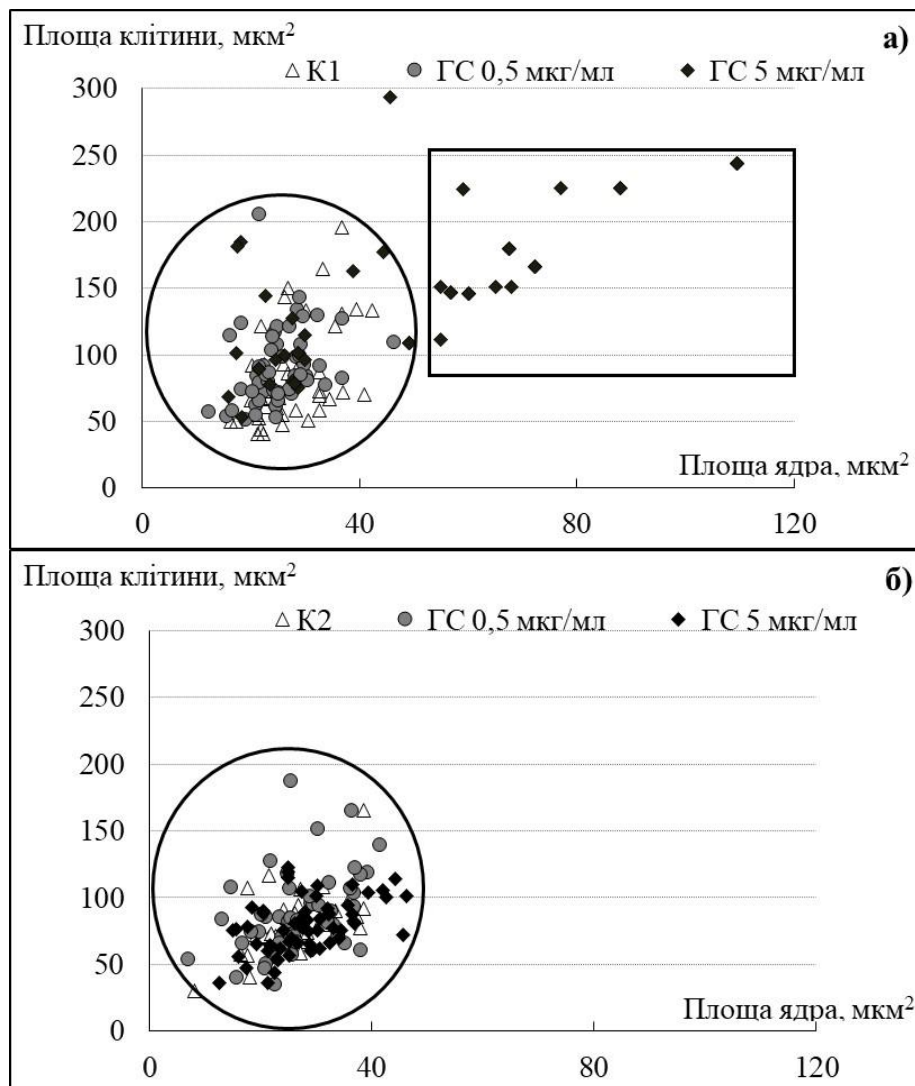


Рис. 3. Розподіл за загальною площею та площею ядра клітин фібробластів L929, що були оброблені GS згідно умовам експерименту: а — варіант 1; б — варіант 2.

Колом виділено популяцію клітин, характерну для усіх досліджених зразків культур — т.зв. популяція 1, та прямокутником — популяцію 2.

Fig. 3. Distribution of L929 fibroblast cells by total area and nucleus area. Cells were treated with gramicidin S according to experimental conditions: a — scenario 1; б — scenario 2.

Oval encircles the population of cells presented in all samples studied — the so-called population 1; rectangle encompass cells of population 2.

З Рис. 3 видно, що контрольні клітини та зразки, які культивували з 0,5 мкг/мл та 5 мкг/мл GS (варіант 2, Рис. 3б) та з GS 0,5 мкг/мл (варіант 1, Рис. 3а) розподіляються у межах однієї досить щільної популяції клітин (популяція 1, Рис. 3).

Проте 5 мкг/мл GS, доданий у поживне середовище під час формування моношару (варіант 1, Рис. 3а), індукує в культурі клітин формування двох популяцій клітин: популяції 1, яка характерна для усіх досліджених зразків, та популяції 2, яка включає  $34,7 \pm 0,3\%$  клітин, що морфологічно відрізняються від клітин популяції 1 завдяки великому ядру та збільшеній площі клітини. Це співпадає з нашими візуальними спостереженнями анізоморфії культури клітин, що формувалася в присутності 5 мкг/мл GS.



Таблиця 2. Морфометричні показники (площа ядра, площа клітини та ядро-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ)) різних популяцій клітин лінії L929, що культивували з 5 мкг/мл GS згідно експериментальним умовам варіант 1.

Table 2. Morphometric indicators (nucleus area, cell area, nucleus-to-cytoplasm ratio) of different populations of L 929 cells cultured with 5.0 µg/ml of gramicidin S according to the experimental conditions of scenario 1.

	Площа клітини (загальна площа), мкм <sup>2</sup>	Площа ядра, мкм <sup>2</sup>	ЯЦВ
Популяція 1	<b>109,05*</b> (89,55–146,67)	28,68 (22,73–49,23)	<b>0,28*</b> (0,24–0,38)
Популяція 2	<b>179,34*</b> (151,38–225,20)	<b>68,00*</b> (65,00–77,00)	<b>0,41*</b> (0,38–0,43)

Примітка: \* — відмінності достовірні відносно відповідного інтактного контролю K1, p<0,05. Дані наведено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3).

Note: \* — differences are significant compared to intact control K1; p<0.05; data are presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

Подальший порівняльний аналіз клітин у складі обох популяцій (Таблиця 2) показав, що популяція 1 та популяція 2 відрізняються за морфометричними параметрами: популяція 1 має знижений показник ЯЦВ, аналогічно зразкам, культивованим з 0,5 мкг/мл GS (варіант 1, Таблиця 1). Проте клітини популяції 2 мають достовірно високий показник ЯЦВ на тлі збільшення розміру клітин та зростання площі ядра у більш ніж 2,5 рази.

Як відомо, ЯЦВ є непрямим показником проліферації та функціональної активності клітин: зниження ЯЦВ може свідчити про пригнічення відповідних функцій, а зростання ЯЦВ — про підвищення функціональної активності клітин, або бути ознакою проліферації [22]. Згідно нашим даним (Таблиця 1), ЯЦВ інтактного контролю дорівнює 0,349 для K1 та 0,32 для K2. Відмінності між ЯЦВ контрольних культур є статистично незначущими. Найнижчий показник ЯЦВ є притаманним культурі клітин з 0,5 мкг/мл GS в поживному середовищі (варіант 1, Таблиця 1) та клітинній популяції 1, що була культивована з 5 мкг/мл GS (варіант 1, Таблиця 2). Найвищі значення ЯЦВ встановлено для культури з 5 мкг/мл GS в поживному середовищі (варіант 2) та популяції 2 культури з 5 мкг/мл GS в поживному середовищі (варіант 1). Високе ЯЦВ характерне для мало диференційованих клітин, які швидко діляться, та їх попередників. Великі зрілі клітини зазвичай мають низьке ядро-цитоплазматичне відношення. Ймовірно зменшення ЯЦВ при невеликих концентраціях GS є наслідком стимулюючого впливу антибіотика на клітинну проліферацію. Відомо, що фактори, які змінюють проникність плазматичної мембрани, впливають на регуляцію об'єму клітин під час ділення, послідовність клітинного циклу та допомагають підтримувати баланс між проліферацією, апоптозом, перехресними перешкодами з іншими білками клітинної мембрани або факторами транскрипції, які, в свою чергу, модулюють прогресію клітинного циклу або регулюють шляхи біосинтезу структурних компонентів клітини.

Показник конфлюентності моношару також є показником клітинної проліферації. В зв'язку з цим ми дослідили вплив GS на формування конфлюентного моношару (варіант 1) та його збереженість (варіант 2).

З Таблиці 3 видно, що площі моношарів контрольних зразків K1 та K2 достовірно не відрізняються. Враховуючи, що тривалість культивування контролів K1 та K2 складає 3 та 6 діб відповідно, можна припустити, що активне формування моношару відбувається в перші три доби культивування. Ймовірно, що подовження

культивування збільшує щільність клітинних культур, що призводить до контактного інгібування проліферації [22]. Таке «контактне» пригнічення могло проявлятися також у зменшенні ЯЦВ відповідного інтактного контролю (К2, варіант2). Димексид, доданий у поживне середовище, достовірно не впливає на формування моношару. Додавання GS в обох нелітичних концентраціях 0,5 та 5 мкг/мл до неприкріплених фібробластів достовірно пригнічує формування моношару (варіант 1). Аплікація GS у таких концентраціях до прикріплених клітин (варіант 2) призводить до незначного збільшення площі моношару для зразків з 5 мкг/мл GS (варіант 2), що корелює з підвищенням значення ЯЦВ.

Таблиця 3. Відносна площа моношару на різних термінах культивування клітин лінії L929 у присутності GS згідно схем експерименту варіант 1 та варіант 2.

Table 3. The relative area of the monolayer at different times of cultivation of L929 cells in the presence of gramicidin S according to the scenario 1 and scenario 2 experimental schemes.

Умови експерименту	Контроль (К)	Димексид (Д)	Концентрація GS	
			0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
Варіант 1	79,24 (77,31–81,17)	75,87 (67,00–74,74)	<b>73,15*</b> <b>(72,37–5,120)</b>	<b>70,99*</b> <b>(66,93–71,71)</b>
Варіант 2	83,28 (83,27–87,63)	85,44 (82,10–90,72)	86,24 (82,10–90,73)	91,90 (87,24–97,14)

Примітка: \* — відмінності достовірні відносно відповідного інтактного контролю,  $p < 0,05$ . Дані представлено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3).

Note: \* — differences are significant compared to corresponding intact control;  $p < 0.05$ . Data given as: median (quartile 1 – quartile 3)

Таким чином, найбільш чутливими до нелітичних концентрації GS виявилися клітини на стадії прикріплення та формування моношару. Пригнічення швидкості формування моношару у варіанті 1 співпадало зі зниженням ЯЦВ культур клітин в присутності 0,5 мкг/мл GS. Під впливом 5 мкг/мл GS активність формування моношару була також низькою, хоча культура містила значний відсоток клітин з високим показником ЯЦВ. Ймовірно, що інгібуючий ефект GS обумовлений пригніченням адгезивних властивостей клітин.

Для подальшого з'ясування впливу GS на міграційно-проліферативні властивості клітин ми використали тест «подряпина», який є загально прийнятним простим й інформативним методом вивчення активності клітин *in vitro*. Він заснований на тому явищі, що клітини у культурі здатні до міграції в зону з меншою клітинною щільністю [18, 23]. Цей процес триває поки клітинна щільність культури не досягне фази зливного росту (контактне інгібування) [22].

Візуальне спостереження за площею подряпини дозволило встановити, що клітини у інтактних контролях (К2 та К3) практично повністю закривають дефект моношару через 72 години (Рис. 4).

Короткотривала (1 год) аплікація димексиду (Д3), 0,5 та 5 мкг/мл GS до культури клітин (варіант 3) не впливає достовірно на динаміку «загоєння» подряпини в порівнянні з контролями К3 (Таблиця 4). Повне закриття дефекту спостерігається через 72 години. При додаванні літичної концентрації GS (50 мкг/мл) спостерігається уповільнене заповнення дефекту поверхні клітинами, приблизно 50% від контролю через 24 години. При подальшому культивуванні клітини втрачають міграційно-проліферативні та адгезивні здібності, оскільки відносна площа подряпини збільшується до вихідного розміру. Таким чином, короткотривала інкубація (1 година) з 50 мкг/мл GS призводить до розвитку незворотних пошкоджень клітин.

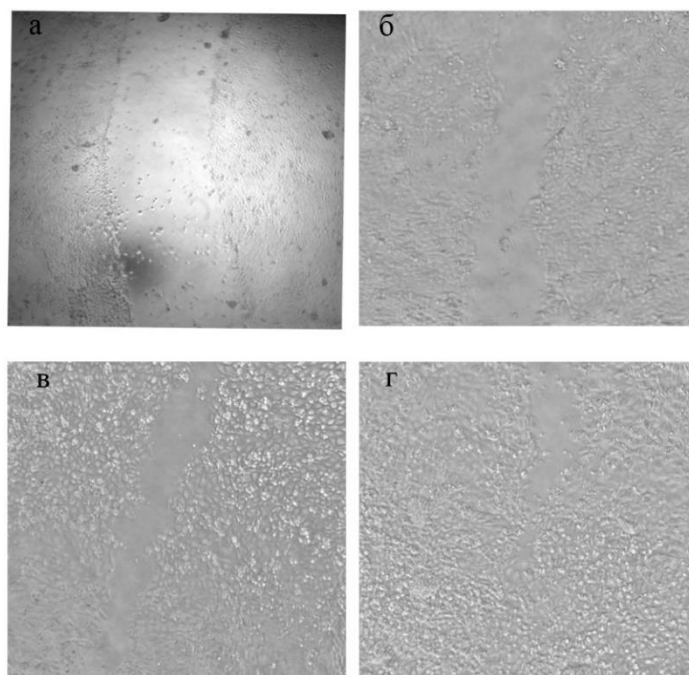


Рис. 4. Загоєння подряпини в моношарі інтактних клітин лінії L929 з часом культивування: а — дефект моношару, б — через 24 години, в — через 48 год, г — через 96 годин.

Fig. 4. Scratch recovery in a monolayer of intact L929 cells after different duration of cultivation: а — monolayer defect, б — after 24 hours, в — after 48 hours, г — after 96 hours.

Таблиця 4. Відносна площа подряпини (%) на різних термінах культивування клітин лінії L929, які було оброблено різними концентраціями GS протягом 1 години (варіант 3) Дані представлено як медіана (квартиль 1 – квартиль 3)

Table 4. Relative scratch area (%) after different durations of culturing of L929 cells treated with various concentrations of gramicidin S for 1 hour (scenario 3). Data presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

Умови експерименту	Термін культивування, години			
	12 год	24 год	48 год	72 год
Інтактний контроль (К3)	40,37 (37,08–46,74)	12,04 (11,08–12,99)	13,32 (6,85–19,78)	0
Контроль з обробкою ДМСО (Д3)	48,63 (44,47–62,82)	29,48 (28,48–44,89)	4,30 (4,03–4,58)	0
GS 0,5 мкг/мл	30,90 (29,90–36,84)	15,58 (14,78–31,77)	5,86 (5,51–6,22)	5,55 (2,78–10,24)
GS 5 мкг/мл	41,30 (39,37–51,24)	29,22 (22,19–41,06)	17,30 (11,61–17,30)	8,73 (7,99–10,08)
GS 50 мкг/мл	<b>87,21*</b> <b>(83,45–93,95)</b>	<b>64,43*</b> <b>(64,24–72,74)</b>	<b>85,67*</b> <b>(85,29–90,77)</b>	<b>98,00*</b> <b>(97,5–98,50)</b>

Примітка: \* — відмінності достовірні відносно К3,  $p < 0,05$

Note: \* — significant differences compared to K3,  $p < 0,05$

При довгостроковому культивуванні клітин (варіант 2) димексид та обидва розчини GS 0,5 та 5мкг/мл гальмують репарацію подряпини перші 24 години (Таблиця 5) [41–43]. Проте гальмівний ефект 5 мкг/мл GS був більш пролонгований і значуще блокував закриття подряпини протягом 48 годин. Культивування з літичною концентрацією GS

50 мкг/мл призводить до деструкції клітинного моношару не тільки в зоні подряпини, але й на інших ділянках.

Таким чином, на 72 годину культивування відбувалося закриття подряпини у всіх зразках, крім тих, що культивували з GS 50 мкг/мл. Це ще раз підтверджує спостереження про те, що ця концентрація є літичною для клітин при її довготривалій аплікації.

В останні роки з'явилися нові дані, що пептиди граміцидини мають не тільки антибактеріальний ефект, але й здатні пригнічувати проліферацію і міграцію ракових клітин [10, 11, 20]. Ці дані, з одного боку, стимулювали розробку похідних граміцидинів, які на фоні більш низької токсичності для клітин зберігали значну антибактеріальну і протипухлинну активність [8, 9, 24], а з іншого боку, загостило інтерес до розуміння механізмів взаємодії граміцидину з клітинами, які на сьогоднішній день залишаються не повністю з'ясованими. Цитолітичний ефект граміцидину переважно пов'язують зі збуренням ліпідних шарів бактеріальної мембрани [25] і, в наслідок цього, порушенням клітинного та іонного гомеостазу [13, 20]. Інші автори наполягають, що насамперед, GS порушує синтез АТФ, блокуючи деякі ферменти респіраторного шляху [26], або впливає на локалізацію периферичних мембранних білків, що беруть участь у клітинному поділі та синтезі клітинної оболонки [27]. Нові данні також свідчать, що пригнічування міграції клітин під впливом антибіотиків з групи граміцидинів супроводжується зниженням експресії та перерозподілом на поверхні клітин трансмембранних протеїнів, які відповідають за адгезію та міграцію клітин [11]. Але загальної картини взаємодії граміцидину S з клітинами не має, завдяки тому що його вплив на різні типи клітин не є однаковим [3, 11, 28]. З огляду на вивчення можливості системного застосування аналогів або інкапсульованих наноносіями форм антимікробних пептидів [29] цікавим було вивчення впливу GS на клітин сполучної тканини на додачу до робіт з вивчення впливу цього циклічного пептиду на клітини крові [3, 4, 28, 30].

Таблиця 5. Відносна площа подряпини на різних термінах культивування клітин лінії L929 з різними концентраціями GS протягом 3 діб (варіант 2). Дані представлено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3)

Table 5. Relative scratch area (%) after different durations of culturing of L929 cells treated with various concentrations of gramicidin S for 3 days (scenario 2). Data presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

Умови експерименту	Термін культивування, години			
	12 год	24 год	48 год	72 год
Інтактний контроль (K2)	42,62 (37,61–57,25)	12,04 (11,08–12,99)	13,32 (6,85–19,78)	0
Контроль з обробкою ДМСО протягом 3 діб (Д2)	48,63 (44,47–62,82)	23,99 21,50–35,97	4,31 (4,03–4,58)	0
GS 0,5 мкг/мл	32,16 (29,01–33,35)	31,58* (28,29–44,87)	0,86 (0,54–2,37)	0
GS 5 мкг/мл	42,93 (38,59–46,69)	<b>46,86*</b> <b>(35,92–48,76)</b>	<b>30,87*</b> <b>(28,06–34,40)</b>	4,24 (2,61–11,30)
GS 50 мкг/мл	<b>77,78*</b> <b>(60,92–94,64)</b>	<b>97,75*</b> <b>(96,45–99,06)</b>	<b>82,46*</b> <b>(79,75–85,16)</b>	100

Примітка: \* — відмінності достовірні відносно інтактного контролю,  $p < 0,05$

Note: \* — significant differences compared to intact control,  $p < 0,05$

Наше дослідження присвячене вивченню впливу GS на ряд функціональних характеристик фібробластів лінії L929, що проявляються на різних етапах культивування: адгезія, міграційно-проліферативний потенціал, формування моношару.

Граміцидин S у концентраціях 0,5, 5,0 та 50 мкг/мл додавали до клітин лінії L929 на різних етапах культивування: до суспензії клітин — для дослідження впливу на прикріплення та швидкість формування моношару (варіант 1), до моношару клітин — для виявлення можливого токсичного ефекту (варіант 2 та варіант 3) та у тесті «подряпина» (варіант 2, варіант 3) — для оцінки міграційно-проліферативного потенціалу клітин в присутності GS.

Відомо, що антибактеріальний ефект GS проявляється в діапазоні концентрацій 3–12,5 мкг/мл [31], в той час як 50% цитотоксична дія на культурі клітин — при концентрації 18,7 мкг/мл, а 50% гемоліз еритроцитів спостерігається при концентрації 35,2 мкг/мл [32, 33].

За нашими даними GS в концентрації 50 мкг/мл проявляв виражений цитотоксичний ефект. Навіть короткотривала, протягом 1 години, аплікація GS у концентрації 50 мкг/мл на моношар клітин в тесті «подряпина» призводила до незворотного гальмування міграційної активності фібробластів при «репарації» моношару. Довготривала інкубація (протягом трьох діб) неприкріплених клітин до сформованого моношару з GS в концентрації 50 мкг/мл призводила до руйнування цілісного моношару та цитолітичного ефекту на усі клітини.

У нелітичних концентраціях 0,5 та 5 мкг/мл вплив GS на досліджені клітини залежав від терміну аплікації та вихідного стану клітин. Додавання GS до клітин під час інокуляції призводило до зменшення площі сформованого моношару та погіршення показників ЯЦВ на третю добу, особливо для зразків, культивованих з 0,5 мкг/мл GS, в порівнянні з відповідним контролем. Для клітин, культивованих з 5 мкг/мл GS, показник ЯЦВ не зазнав значних змін, завдяки формуванню популяції клітин, що мали збільшену загальну площу клітини та ядра. Ця популяція не була залучена до активної проліферації, тому що клітини, інкубовані з GS (варіант 1), не сформували конфлюентний моношар незалежно від наявності або відсутності популяції великих клітин.

В той же час при аплікації нелітичних концентрацій GS на прикріплені клітини (варіант 2) конфлюентний моношар зберігався, а кількісні значення ЯЦВ значуще не відрізнялись від відповідного контролю, або перевищували їх (аплікація 5 мкг/мл GS). Таким чином, неприкріплені фібробласти були більш чутливими до впливу GS у нелітичних концентраціях.

Відомо, що адгезія фібробластів до позаклітинного матриксу здійснюється завдяки фокальній адгезії — специфічному контакту, що формується за участю актинових волокон цитоскелету, мембранних периферичних та інтегральних білків з волокнами позаклітинного матриксу. Показано, що інтегрин-опосередкована адгезія залежить від стану ліпідного бішару мембрани. Так, зміна товщини бішару та поділу ліпідної фази мембран клітин під впливом амфифільної сполуки бензилового спирту знижує швидкість міграції ендотеліоцитів внаслідок погіршення зв'язку інтегральних білків з субстратом [34, 40]. GS, як відомо, також може призводити до кластеризації мембранних білків, що відповідають за поділ клітин [6, 16] та їх здатність до міграції [11], а також циклопептид здатен викликати формування неламелярних ліпідних фаз у модельних мембранах та стоншувати бішар [1, 24].

Для більшості клітин прикріплення їх до субстрату в сукупності зі стимуляцією ростовими факторами регулюють клітинний цикл, стимулюють клітини до входу в мітоз [35]. Стійка клітинна адгезія необхідна для ініціювання синтезу ДНК і

придушення апоптозу [36]. Натяг клітин при адгезії до позаклітинного субстрату є ключовою точкою, що ініціює перехід клітин до G<sub>1</sub>/S фази [37]. Вважають, що фокальна адгезія має вирішальне значення для нормальної роботи клітини, а також здатності клітини реагувати на навколишнє середовище [38].

Це пояснює значно вищу чутливість неприкріплених клітин лінії L929 до GS, який впливав на кількісні значення ЯЦВ, на формування моношару, в порівнянні з їх впливом на прикріплені клітини.

Використовуючи тест «подряпина», ми дослідили вплив терміну аплікації GS на здатність культури клітин до репарації пошкодженого моношару. Найвища, літична, концентрація GS (50 мкг/мл) навіть під час короткотривалої аплікації незворотно пригнічувала закриття дефекту моношару. GS з нелітичними концентраціями 0,5 та 5 мкг/мл зворотно гальмував репарацію дефекту моношару при триденній аплікації. Проте гальмівний ефект залежав від концентрації GS: 0,5 мкг/мл затримував закриття дефекту протягом 24 години, а 5 мкг/мл GS протягом 48 годин.

Нещодавно було показано, що GS здатний до арешту клітинного циклу на стадії G<sub>2</sub>/M, завдяки чому подавляє міграцію та індукує апоптоз в клітинах рака шлунку людини [10]. Для клітин лінії L929 індукований арешт на стадії G<sub>2</sub>/M призводить до зростання середнього фазового об'єму [39]. Ми показали, що додавання 5 мкг/мл GS до фібробластів під час інокуляції призводить до виділення групи великих клітин, що мають збільшений розмір ядра і клітини в цілому, і можуть, ймовірно, бути результатом арешту клітинного циклу у стадії G<sub>2</sub>/M. При вивченні репарації подряпини нами отримано підтвердження, що GS з концентрацією 5 мкг/мл дійсно зворотно блокує проліферацію та міграцію фібробластів на 24, або 48 годин в залежності від тривалості аплікації.

Таким чином, грамїцидин S в концентрації 5 мкг/мл не має значущого цитотоксичного ефекту на культуру фібробластів, але призводить до пригнічення міграційної активності клітин. Причому ступінь пригнічення і можливість відновлення цього параметру залежить від терміну аплікації GS та вихідного рівня адгезії клітин.

Перспективою нашого дослідження може стати вивчення впливу GS на формування об'ємних клітинних агрегатів. Базовою проблемою розвитку пухлин, фіброзу та раку є здатність трансформованих клітин «відчувати» жорсткість тканин і визначати напрямок міграції. Дуротаксис — міграція клітин в бік збільшення жорсткості субстрату, спостерігається частіше, проте описано і спрямовану міграцію клітин гліоми U-251MG до менш жорстких областей [44]. Негативний та позитивний дуротаксиси опосередковані механочутливою сигналізацією, скоротливістю актоміозину, рівнем таліну. Як показано в нашій роботі, грамїцидин S впливає на міграційну активність фібробластів при 2-D культивуванні, а з'ясування скорочувальних і адгезивних механізмів, чутливих до дії пептиду при формуванні 3-D клітинних кластерів, сприятиме розумінню молекулярних механізмів міграції та створенню нових засобів терапії.

Іще одним можливим застосуванням знайденої нами здатності грамїцидину S зворотно блокувати проліферацію та міграцію фібробластів є використання пептидного антибіотика для загоєння ран при пошкодженні тканин або в косметології. Фібробласти разом із мезенхімальними стовбуровими клітинами та кератиноцитами керують молекулярними процесами, залученими до закриття та відновлення пошкодженої тканини, запобігаючи інфекціям і вразливості до подальших пошкоджень. Дослідники зацікавлені в потенційному терапевтичному застосуванні фібробластів для загоєння ран завдяки їх регенеративним можливостям і секреції сигнальних молекул, які регулюють інші клітини, що відновлюють тканини [45].

## ВИСНОВКИ

Антимікробний пептид граміцидин S у нелітичних концентраціях виявляє властивість слабого мутагена, впливає на проліферативну активність клітин сполучної тканини, зокрема, в концентраціях 0,5 мкг/мл і 5 мкг/мл граміцидин S підвищує синтетичну активність та стимулює проліферацію фібробластів в моношарі та швидкість формування моношару клітинами культури L929. Найбільш чутливими до нелітичних концентрацій граміцидину S є клітини на стадії прикріплення та формування моношару. Підвищення концентрації граміцидину S до 50 мкг/мл веде до лізису фібробластів лінії L929 у культурі.

У нелітичних концентраціях граміцидин S пригнічує адгезивні властивості фібробластів, викликаючи різноспрямовані зміни показників проліферації та функціональної активності клітин при сталому гальмуванні пептидом формування моношару.

Граміцидин S в концентрації 5 мкг/мл не має значущого цитотоксичного ефекту на культуру фібробластів, але призводить до пригнічення міграційної активності клітин. Причому ступінь пригнічення і можливість відновлення цього параметру залежить від терміну аплікації GS та вихідного рівня адгезії клітин.

Зворотне блокування граміцидином S у концентрації 5 мкг/мл проліферації та міграції фібробластів узгоджується зі спостереженим нами раніше антиагрегаційним ефектом GS щодо тромбоцитів, тобто може бути універсальною анти-адгезивною властивістю даного декапептиду, яка в перспективі може бути використана в терапії новоутворень; у косметології; а також може сприяти загоєнню ран.

## КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ


Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

### Authors' ORCID ID

Н. М. Алабедацькарім  <https://orcid.org/0000-0002-4445-9230>

В. П. Берест  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>

Н. М. Моїсєєва.  <https://orcid.org/0000-0002-9845-2317>

Г. А. Божок  <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

## REFERENCES

1. Prenner EJ, Lewis RN, McElhane 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](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00207-2)
2. Malik A, Bissinger R, Liu G, Liu G, Lang F. Enhanced eryptosis following gramicidin exposure. *Toxins* 2015;7(5):1396–410. <https://doi.org/10.3390/toxins7051396>
3. Ovsyannikova T M, Kovalenko AO, Berest VP, Borikov OY. Changes in electrophysical characteristics of red blood cells induced by gramicidin S. *Biophys Bull*. 2021;(45):32–43. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-45-03>
4. 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>
5. Hazam PK, Phukan C, Akhil R, Singh A, Ramakrishnan V. Antimicrobial effects of syndiotactic polypeptides. *Sci Rep*. 2021;11(1):1823. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81394-2>
6. Berditsch M, Afonin S, Reuster J, Lux H, Schkolin K, Babii O, et al. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci *Sci Rep*. 2019;9(1):17938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54212-z>
7. 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>
8. Pal S, Singh G, Singh S, Tripathi JK, Ghosh JK, Sinha S, et al. Tetrahydrofuran amino acid-containing gramicidin S analogues with improved biological profiles. *Org Biomol Chem*. 2015;13(24):6789–802. <https://doi.org/10.1039/c5ob00622h>



9. Tamaki M, Harada T, Fujinuma K, Takanashi K, Shindo M, Kimura M, et al. Polycationic gramicidin S analogues with both high antibiotic activity and very low hemolytic activity *Chem Pharm Bull*. 2012;60(9):1134–8. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00290>
10. Chen T, Wang Y, Yang Y, Yu K, Cao X, Su F, et al. Gramicidin inhibits human gastric cancer cell proliferation, cell cycle and induced apoptosis. *Biol Res*. 2019;52(1):57. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0264-1>
11. Wang RQ, Geng J, Sheng WJ, Liu XJ, Jiang M, Zhen YS. The ionophore antibiotic gramicidin A inhibits pancreatic cancer stem cells associated with CD47 down-regulation. *Cancer Cell Int*. 2019;19:145. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0862-6>
12. Raileanu M, Popescu A, Bacalum M. Antimicrobial peptides as new combination agents in cancer therapeutics: A promising protocol against HT-29 tumoral spheroids. *Int J Mol Sci*. 2020;21:6964. <https://doi.org/10.3390/ijms21186964>
13. Wijesinghe D, Arachchige MCM, Lu A, Reshetnyak YK, Andreev OA. pH dependent transfer of nano-pores into membrane of cancer cells to induce apoptosis. *Sci Rep*. 2013;3:3560. <https://doi.org/10.1038/srep03560>
14. Jafari A, Babajani A, Sarrami Forooshani R, Yazdani M, Rezaei-Tavirani M. Clinical applications and anticancer effects of antimicrobial peptides: From bench to bedside. *Front Oncol*. 2022;12:819563. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.819563>
15. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*. 2020;25(12):2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>
16. Ashrafuzzaman MD. The antimicrobial peptide gramicidin S enhances membrane adsorption and ion pore formation potency of chemotherapy drugs in lipid bilayers. *Membranes*. 2021;11(4):247. <https://doi.org/10.3390/membranes11040247>
17. Li H, Anuwongcharoen N, Malik A, Prachayasittikul V, Wikberg J, Nantasenamat C. Roles of d-Amino Acids on the Bioactivity of Host Defense Peptides. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1023. <https://doi.org/10.3390/ijms17071023>
18. Liang CC, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329–33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
19. Hendrix DV, Ward DA, Barnhill MA. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. *Am J Vet Res*. 2001;62(10):1664–9. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1664>
20. Haoyang W-W, Xiao Q, Ye Z, Fu Y, Zhang D-W, Li J, et al. Gramicidin A-based unimolecular channel: cancer cell-targeting behavior and ion transport-induced apoptosis. *ChemComm*. 2021;57(9):1097–1100. <https://doi.org/10.1039/D0CC08073J>
21. Ali SS, Hajrah NH, Ayuob NN, Moshref SS, Abuzinadah OA. Morphological and morphometric study of cultured fibroblast from treated and untreated abnormal scar. *Saudi Med J*. 2010;31(8):874–81. PMID: 20714684
22. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453–65. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x)
23. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol*. 2011;769:25–30. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_2)
24. Abraham T, Prenner EJ, Lewis RNAH, Mant CT, Keller S, Hodges RS, et al. Structure–activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: Aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(5):1420–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.12.019>
25. Mogi T, Ui H, Shiomi K, Ōmura S, Kita K. Gramicidin S identified as a potent inhibitor for cytochrome bd - type quinol oxidase. *FEBS Lett*. 2008;582(15):2299–302. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.031>
26. Mogi T, Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(23):3821–6. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0129-9>
27. Wenzel M, Rautenbach M, Vosloo JA, Siersma T, Aisenbrey CHM, Zaitseva E, et al. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00802-18>
28. Hackl EV, Berest VP, Gatash SV. Human erythrocytes resistance to haemolysis caused by polypeptide antibiotic gramicidin S. *Biophys Bull*. 2008;20(1):114–20. Available from: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/1577>
29. Berest V, Sotnikov A, Sichevska L. Lipid nanocarriers impede side effects of delivered antimicrobial peptide. 2021 IEEE 3rd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering (UKRCON), Lviv, Ukraine, 2021, pp. 513–8. <https://doi.org/10.1109/UKRCON53503.2021.9575721>

30. Berest VP, Hackl EV, Gatash SV. Effect of the erythrocyte membrane state on the gramicidin S - induced haemolysis of erythrocytes. *J Pept Sci.* 2004;10(S2):237. <https://doi.org/10.1002/psc.618>
31. Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Hancock REW, Hodges RS. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Pept Protein Res.* 2009;47(6):460–6. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1996.tb01096.x>
32. Swierstra J, Kapoerchan V, Knijnenburg A, van Belkum A, Overhand M. 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>
33. Hackl E.V., Berest V.P., Gatash S.V. Effect of cholesterol content on gramicidin S-induced hemolysis of erythrocytes. *Int J Pept Res Ther.* 2012;18(2):163–70. <https://doi.org/10.1007/s10989-012-9289-9>
34. Son S, Moroney GJ, Butler PJ.  $\beta_1$ -integrin-mediated adhesion is lipid-bilayer dependent. *Biophys J.* 2017;113(5):1080–92. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.010>
35. Li Y, Burrige K. Cell-cycle-dependent regulation of cell adhesions: adhering to the schedule. *BioEssays.* 2018;41(1):1800165. <https://doi.org/10.1002/bies.201800165>
36. Jones MC, Zha J, Humphries MJ. Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci.* 2019;374(1779):20180227. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0227>
37. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, et al. A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell.* 2013;154(5):1047–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
38. Advani AS, Chen AY, Babbitt CC. Human fibroblasts display a differential focal adhesion phenotype relative to chimpanzee. *Evol Med Public Health.* 2016;1:110–6. <https://doi.org/10.1093/emph/eow010>
39. Falck Minitis M, Mukwaya A, Gjørloff Wingren A. Digital holographic microscopy for non-invasive monitoring of cell cycle arrest in L929 cells. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e106546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106546>
40. Mikami K, Haseba T, Ohno Y. Ethanol induces transient arrest of cell division ( $G_2 + M$  block) followed by  $G_0/G_1$  block: dose effects of short- and longer-term ethanol exposure on cell cycle and cell functions. *Alcohol Alcohol.* 1997;32(2):145–52. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008248>
41. Guo W, Qiu W, Ao X, Li W, He X, Ao L, et al. Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt/mTOR-mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *Brit J Pharmacol.* 2020;177(14):3327–41. <https://doi.org/10.1111/bph.15052>
42. Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Kloska A, Piotrowska E, Narajczyk M, Gabig-Cimińska M. The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in gene expression modulation and glycosaminoglycan metabolism in lysosomal storage disorders on an example of mucopolysaccharidosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):304. <https://doi.org/10.3390/ijms20020304>
43. Rodríguez-Burford C, Oelschläger DK, Talley LI, Barnes MN, Partridge EE, Grizzle WE. The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines. *Biotechnic & Histochemistry.* 2003;78(1):17–21. <https://doi.org/10.1080/10520290312120004>
44. Isomursu A, Park K-Y, Hou J, Cheng B, Mathieu M, Shamsan GA, et al. Directed cell migration towards softer environments. *Nat Mat.* 2022;21(9):1081–90. <https://doi.org/10.1038/s41563-022-01294-2>
45. Cialdai F, Risaliti C, Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:958381. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.958381>

#### THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE GRAMICIDIN S ALTERS PROLIFERATION AND INHIBITS ADHESION OF L929 CELL LINE FIBROBLASTS

N. M. Alabedalkarim<sup>1</sup>, V. P. Berest<sup>2</sup>, N. M. Moiseieva<sup>1</sup>, G. A. Bozhok<sup>1,2</sup>, T. P. Bondarenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NASU, 23 Pereyaslavska St., Kharkiv, 61016, Ukraine

<sup>2</sup>V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

e-mail: [berest@karazin.ua](mailto:berest@karazin.ua)

Submitted December 28, 2022; Revised June 20, 2023;

Accepted June 26, 2023

**Background:** Natural antimicrobial peptides are used in the fight against pathogens resistant to existing synthetic antibiotics. The non-specific mechanism of cytostatic action of antimicrobial peptides, in particular gramicidin S, against bacteria is also effective for damaging the cells of neoplasms. The existence of such a property in a registered antibiotic will indicate its antineoplastic potential and can be used to expand the spectrum of its therapeutic application.

**Aim of work** is to clarify the possible antitumor effect of the antimicrobial peptide gramicidin S.

**Materials and Methods:** Using the methods of confocal laser microscopy and light microscopy, the morphological and functional features of connective tissue cells under the influence of gramicidin S in the concentration range 0.5–50  $\mu\text{g/ml}$  were studied using L929 fibroblasts cell culture. The cell area, nucleus

area, and nucleus-to-cytoplasm ratio were determined. To study the migratory and proliferative activity of cells in vitro, the “scratch assay” was used, the confluency of the monolayer of cells was evaluated, morphometric studies were performed, and the relative area of the scratch was measured after 24, 48, and 72 hours.

**Results:** The lytic effect of gramicidin S in a concentration of 50 µg/ml on L929 cells was established, in concentrations of 0.5 µg/ml and 5.0 µg/ml, the antibiotic increases the synthetic activity of cells and stimulates the proliferation of fibroblasts in a monolayer. Cell anisomorphism is more pronounced in the presence of 5.0 µg/ml gramicidin S added to the culturing medium during monolayer formation, while a one-third of the cells in the sample form a population that is morphologically different from other cells in the culture. The addition of gramicidin S at non-lytic concentrations of 0.5 and 5.0 µg/ml to unattached fibroblasts reliably inhibits monolayer formation. Under the influence of 5.0 µg/ml gramicidin S, the rate of monolayer formation is low, even despite the significant content of cells with a high nuclear-cytoplasmic ratio. The kinetics of filling the cell monolayer defect using the “scratch assay” shows that GS in concentrations of 0.5 and 5.0 µg/ml can control the migratory and proliferative properties of L929 cells.

**Conclusions:** The effect of gramicidin S on the morphometric parameters of cells depends on the concentration of the peptide and the cell status in the culture. GS corrupts the adhesive properties of L929 fibroblasts in monolayer cell culture and the rate of cell monolayer formation. Cells at the stage of attachment and monolayer formation were most sensitive to non-lytic concentrations of GS. Inhibition of the adhesive properties of connective tissue cells by gramicidin S is a new non-canonical effect of a known antimicrobial drug, which may indicate the possibility of using gramicidin S as an anti-neoplasm agent.

**KEY WORDS:** gramicidin S; fibroblasts L929; proliferation; cell adhesion; cell migration.