БИОХИМИЯ
Т. 60, вып. 5 1995

УДК 577.152.3

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Zn НА ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ МЕЛИТТИНОМ

© 1995 г. *С.В. РУДЕНКО*[*], *Е.Е. НИПОТ, О.М. ПАВЛЮК*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 310015 Харьков, ул. Переяславская, 23; факс: (0572)72-00-84, электронная почта: cbi@ilt.kharkov.ua

Ключевые слова: мелиттин, эритроциты, гемолиз, дивалентные катионы.

Показано, что ионы Zn и Ca блокируют мелиттин-индуцированный гемолиз эритроцитов, находящихся в фазе гемолиза, причем степень блокирования увеличивается с ростом концентрации ионов. Кроме того, ионы Zn концентрационно-зависимым образом влияют на начальные стадии взаимодействия мелиттина (М) с мембраной, замедляя процесс его встраивания и соответственно скорость гемолиза. Сравнение концентрационных зависимостей скорости гемолиза от количества мелиттина и клеток в среде, а также закономерностей блокирования гемолиза ионами Zn в различных условиях с данными об индуцированном мелиттином лизисе липидных везикул показывает, что между М-индуцированным гемолизом и лизисом липидных везикул практически нет ничего общего, что указывает на незначительную роль пептид-липидных взаимодействий в механизме гемолиза клеток. Полученные результаты показывают, что мембрана эритроцитов обладает внутренним блокирующим механизмом, эффективность которого синергически усиливается в присутствии ионов Zn, что защищает клетки от литического действия мелиттина.

Мелиттин (М) – амфипатический пептид, состоящий из 26 аминокислот, является основным компонентом яда пчелы [1]. Он широко используется для изучения механизмов встраивания и транслокации пептидов (белков) в биологические мембраны. Показано, что М формирует в бислоях потенциалзависимые ионные каналы при концентрациях ниже микромолярных [2–4] и вызывает повышение проницаемости и утечку содержимого лизисных везикул [5–7]. В микромолярных концентрациях мелиттин вызывает лизис эритроцитов [5, 8–11], однако конкретный механизм этого явления до сих пор остается неясным. На основании способности М лизировать липидные везикулы предполагалось, что гемолиз эритроцитов является результатом его взаимодействия с липидным компонентом их мембраны. Авторы работы [8] обнаружили, что мелиттин связывается с мембраной эритроцита и формирует временные поры, через которые выходит гемоглобин (Hb). Временный характер образования этих пор объяснил бифазную кинетику гемолиза, наблюдаемую в эксперименте. Другие авторы [11] обнаружили ответ типа «все или ничего» в гемолизе эритроцитов и предположили коллоидно-осмотический механизм, в котором утечка гемоглобина является вторичной по отношению к формированию в мембране пор относительно небольшого размера. Было установлено, что размер пор, образованных мелиттином, зависит от его концентрации в среде [9]. А в работе [5], сравнив закономерности гемолиза эритроцитов и лизиса липидных везикул различного состава, включая везикулы с тем же составом, что и мембрана эритроцита, пришли к заключению, что механизм М-индуцированного гемолиза, по-видимому, включает пептид-белковые взаимодействия. В ряде дру-

[*] Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

©1995 Российская Академия Наук. Материал из электронного архива журнала "Биохимия". Статья оцифрована в Отделе Научной Информации НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Использование материала автоматически предполагает выполнение условий Пользовательского соглашения.

Постоянная ссылка на материал: http://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry/paper/1995/05/723.

гих работ показано, что мелиттин эффективно взаимодействует с такими белками, как кальмодулин [12, 13], Ca- [14], Na,K- и H,K-АТРаза [15, 16], и белком полосы 3 [17, 18]. Дивалентные катионы, такие как Ca и Zn, обладают способностью защищать клетки от гемолитического действия многих агентов типа вирусов или токсинов различного происхождения [2, 5, 19, 20]. Это же справедливо и в отношении мелиттина [2, 5, 19]. В связи с этим дивалентные катионы могут быть применены как средство для расшифровки конкретных механизмов гемолиза, индуцированного различными агентами [5]. В данной работе были исследованы закономерности блокирования М-индуцированного гемолиза ионами Zn. Сравнение полученных результатов с данными о М-индуцированном лизисе липидных везикул показывает, что между двумя типами лизиса нет практически ничего общего, что свидетельствует против предположения о существенной роли пептид-липидных взаимодействий в механизме М-индуцированного гемолиза эритроцитов, тем самым подтверждая идею о решающей роли в нем белок-пептидных взаимодействий. Кроме того, полученные данные позволяют сделать вывод о существовании в мембране эритроцитов внутреннего блокирующего механизма, который в синергизме с ионами Zn эффективно защищает клетки от литического действия мелиттина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В описанных ниже экспериментах использовалась только свежая донорская кровь. Несколько капель крови из пальца донора добавлялись к 10 мл физиологического раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4), перемешивались и дважды отмывались путем центрифугирования (2000 g, 3 мин). 30 мкл полученного осадка эритроцитов разводили в 0,5 мл физиологического раствора и использовали в течение нескольких часов как сток-суспензию. Динамику гемолиза эритроцитов изучали спектрофотометрическим методом на длине волны 720 нм [21, 22]. 6–7 мкл суспензии эритроцитов помещали в спектрофотометрическую кювету объемом 2 мл, снабженную магнитной мешалкой, таким образом, чтобы начальная величина оптического пропускания (ОП) соответствовала значению 0,12–0,13. Измерение концентрации эритроцитов в кювете с помощью Coulter-Counter показало, что такая исходная величина оптического пропускания соответствует концентрации клеток $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл. Изменение оптического пропускания суспензии после введения в кювету мелиттина и ионов Zn из концентрированных сток-растворов непрерывно регистрировалось с помощью самописца. Скорость гемолиза вычисляли как тангенс угла наклона (α) зависимости оптического пропускания от времени. В тех случаях, когда измерялась зависимость скорости М-индуцированного гемолиза от концентрации клеток, измеряемая скорость гемолиза нормировалась на исходную величину оптического пропускания суспензии. Поскольку оптическое пропускание в выбранном диапазоне прямо пропорционально концентрации клеток, измеряемая скорость уменьшения оптического пропускания пропорциональна скорости гемолиза эритроцитов [22]. Величина оптического пропускания суспензии полностью гемолизированных эритроцитов при данной длине волны равна нулю. Мелиттин, свободный от примесей фосфолипазы А2, был любезно предоставлен К. Демпси (Бристольский университет, Англия). Остальные реактивы были квалификации х.ч.. Эксперименты проводились при комнатной температуре – 22–24°.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены типичные зависимости изменения оптического пропускания суспензии эритроцитов после добавления мелиттина, отражающие процесс гемолиза клеток. Введение ионов Zn в различных концентрациях в инкубационную среду после начала гемолиза приводит к его ингибированию (т.е. к уменьшению скорости гемолиза), степень которого была рассчитана, исходя из определения, представленного на рис. 1,*б*. 100%-ное ингибирование соответствует случаю, когда гемолиз полностью прекращается после введения в среду катионов. На рис. 2 приведена зависимость коэффициента ингибирования М-индуцированного гемолиза k от концентрации вводимых катионов– Zn и Ca. Как видно из приведенных зависимостей, оба дивалентных катиона обладают способностью блокировать гемолиз, причем эффективность ионов Zn в этом отношении значительно превосходит эффективность ионов Ca. 50%-ное ингибирование в случае ионов Zn достигается при концентрации 0,1 мМ, в то время как соответствующая величина для Ca в 100 раз больше (10 мМ).

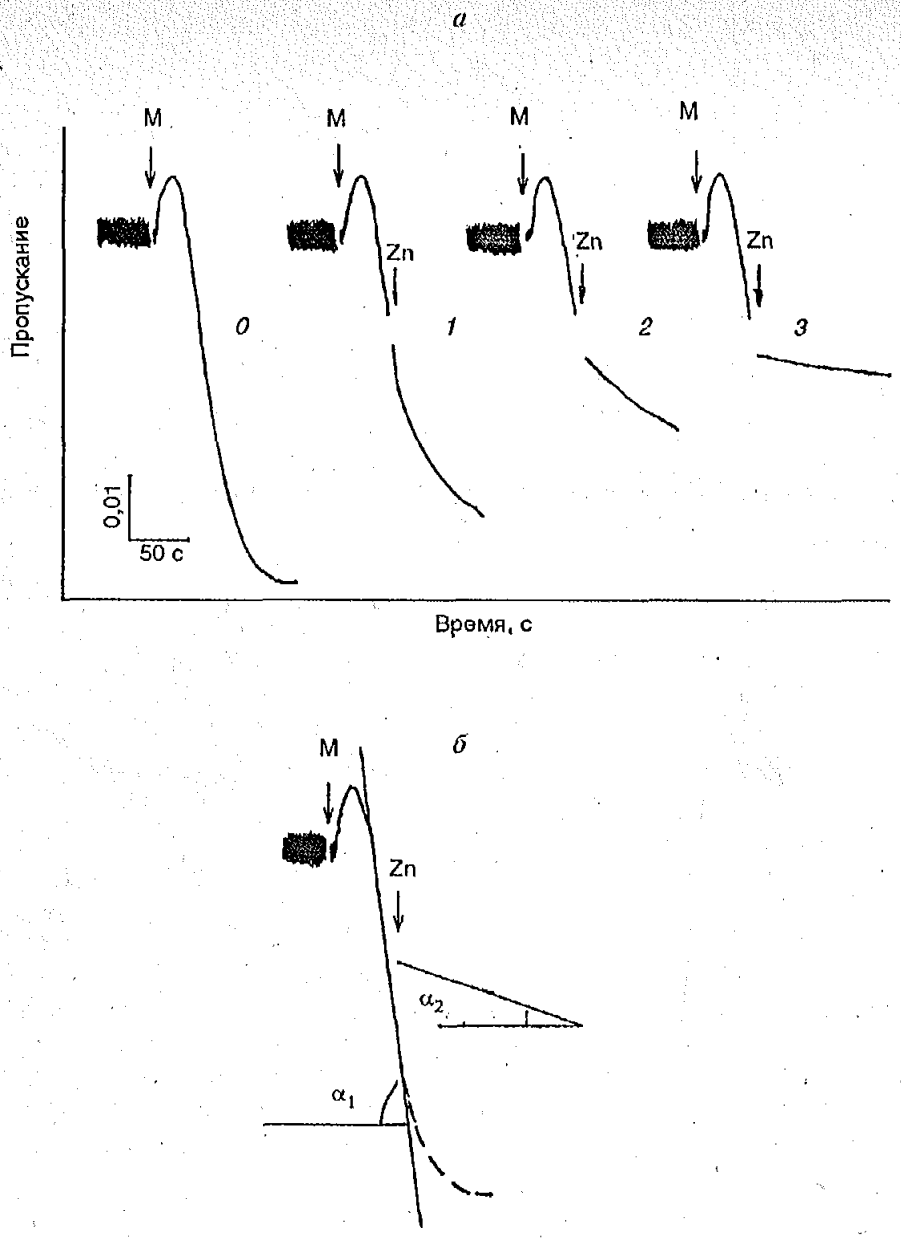

Рис. 1. *а* – Влияние ионов Zn на блокирование мелиттин-индуцированного гемолиза эритроцитов, находящихся в фазе гемолиза. Стрелками обозначено введение мелиттина (М) в конечных концентрациях 0,25 мкг/мл (*0*, без Zn) и ионов Zn в конечных концентрациях: 0,25 (*1*), 0,5 (*2*), 1 мМ (*3*). *б* – Способ, посредством которого вычисляется коэффициент ингибирования $k = \left(1 - \frac{\operatorname{tg}\alpha_2}{\operatorname{tg}\alpha_1}\right) \cdot 100\%$, используемый для количественной оценки блокирующей способности катионов

Эффект блокирования М-индуцированного гемолиза является обратимым и снимается при последующем введении эквимольного количества ЭДТА (данные не представлены), что свидетельствует в пользу того, что катионы блокируют предсуществующую М-индуцированную пору в мембранах эритроцитов, которая снова открывается при удалении катионов, причем аффинность связи катионов с лигандами, ответственными за процесс блокирования, меньше, чем аффинность их связи с ЭДТА. Этот результат согласуется с результатами других работ, полученных при использовании других литических агентов, других типов клеток и иных экспериментальных условий [2, 5, 19, 20, 23]. Можно предполагать, что ионы Zn могут оказывать влияние не только на предсуществующую М-индуцируемую пору, но и влиять как на сам процесс ее формирования, так и на процесс встраивания М в мембрану.

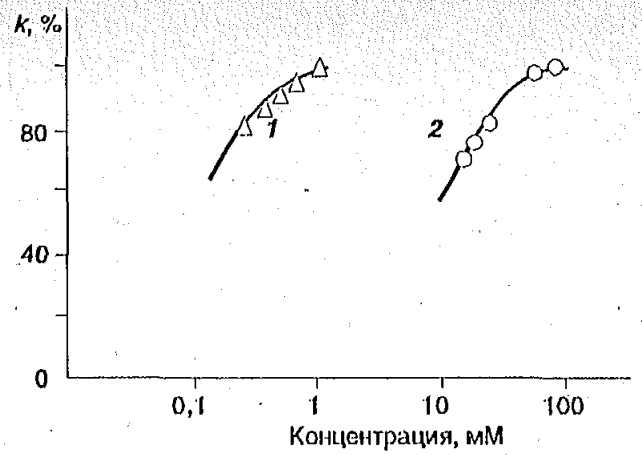

Рис. 2. Влияние катионов Zn (*1*) и Ca (*2*) на коэффициент ингибирования М-индуцированного гемолиза эритроцитов $k = \left(1 - \frac{\mathrm{tg}\alpha_2}{\mathrm{tg}\alpha_1}\right) \cdot 100\%$

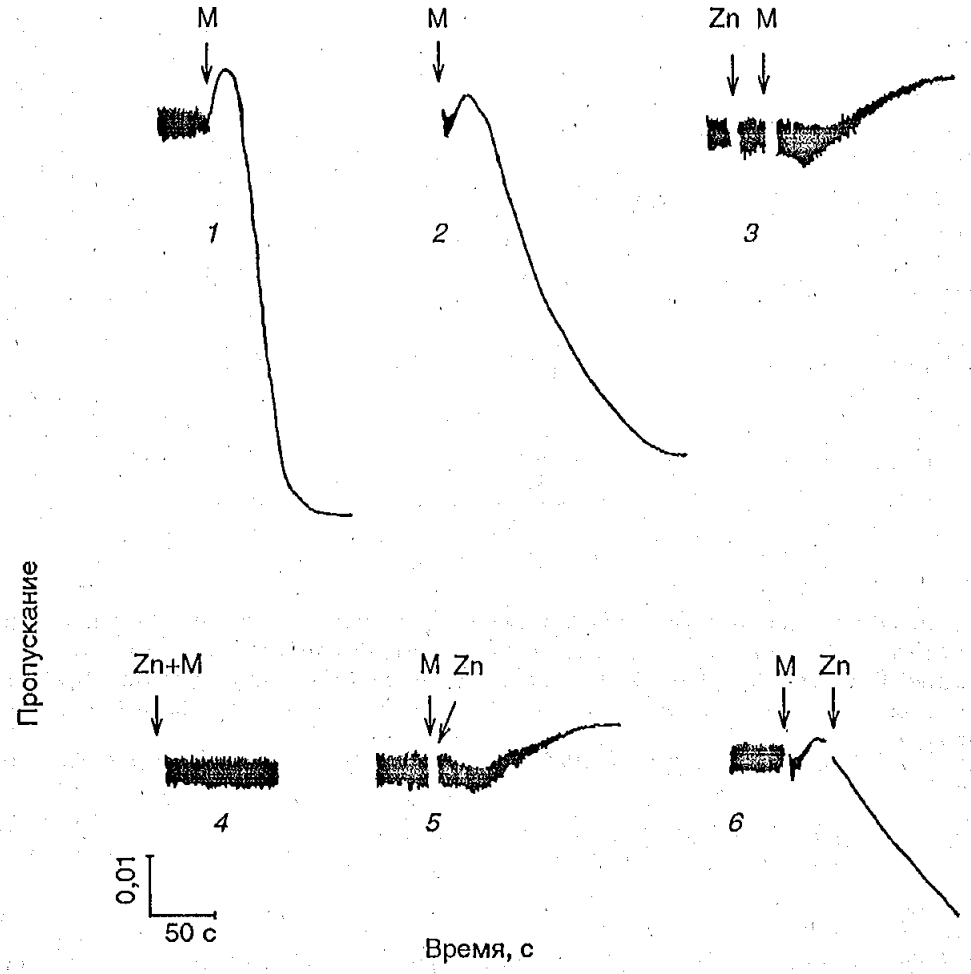

Рис. 3. Влияние ионов Zn на динамику М-индуцированного гемолиза в зависимости от последовательности добавления Zn, М или эритроцитов в среду инкубации. Концентрации Zn – 75 мкМ, М – 1 мкг/мл, эритроцитов – $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл

В связи с этим в ряде экспериментов мы варьировали порядок добавления клеток, мелиттина и Zn в среду.

Типичные зависимости изменения оптического пропускания в этих случаях приведены на рис. 3. Было обнаружено, что порядок приведения реагентов в контакт существенным образом влияет на динамику М-индуцированного гемолиза. Например, введение клеток непосредственно в раствор,

содержащий мелиттин (кривая *2*), приводит к двукратному уменьшению скорости гемолиза по сравнению с используемым в большинстве экспериментов контрольным вариантом, когда мелиттин добавлялся к клеточной суспензии через 50 с после введения клеток в среду из более концентрированной суспензии клеток (кривая *1*). Порядок добавления существенно видоизменял и характер влияния Zn. Последовательное введение Zn, а затем М характеризовалось уменьшением скорости гемолиза и увеличением лаг-периода перед началом спада кривой (кривая *3*). Аналогичный результат был получен при добавлении Zn сразу же (экспериментальное время задержки 5 с) после введения М (кривая *5*). Если же Zn был добавлен немного позже, когда кривая ОП достигает максимума, то, хотя скорость гемолиза и уменьшилась, эффект иона был значительно меньше, чем в предыдущих случаях (кривая *6*). Наиболее сильное влияние Zn на М-индуцируемый гемолиз было обнаружено, когда клетки вводились в среду, исходно содержавшую Zn и М. В этом случае во временном интервале, характерном для других вариантов этого эксперимента, не было зарегистрировано никаких изменений в сигнале ОП, свидетельствующих, что эритроциты не только не гемолизируют, но и не меняют свои объем и форму (кривая *4*). Учитывая также, что используемая концентрация Zn является достаточно малой, для блокирования гемолиза (рис. 2), что видно из кривой *6*, можно заключить, что ионы Zn определенным образом влияют на начальные стадии М-индуцированного порообразования и, возможно, на сам процесс встраивания М в мембрану. Для адекватного сравнения данных этих экспериментов нужно также учитывать конкретные условия их проведения, в частности эффект замедления гемолиза при введении клеток в среду с мелиттином (кривая *2*). Для того чтобы более полно охарактеризовать этот эффект, скорость М-индуцированного гемолиза была измерена при различных концентрациях М. Как видно из рис. 4, максимальная скорость гемолиза эритроцитов в 2 раза больше, если М добавлять к суспензии клеток, при любой используемой концентрации М.

Зависимость скорости гемолиза от концентрации М описывается степенной функцией с показателем степени не более 2. Скорость гемолиза является также функцией концентрации клеток. Она уменьшается пропорционально степени $(-1/2)$ от концентрации клеток. Данные, приведенные на рис. 5, показывают, что скорость гемолиза зависит от времени, прошедшем от момента введения эритроцитов в кювету до момента добавления к ним М. Иными словами, после разбавления в кювете эритроциты становятся все более чувствительными к литическому действию одного и того же количества М. Последний результат позволяет объяснить полученные выше данные в рамках единого предположения. Мы полагаем, что временная зависимость эффекта М на скорость гемолиза и соответственно зависимость от концентрации М (рис. 4) объясняются существованием внутреннего блокирующего механизма (ВБМ), действующего по типу ионов Zn и исходно протектирующего мембрану эритроцитов от литического действия М. Разбавление клеток и их перемешивание в кювете, вероятно, приводят к отмыванию некоторых мембранных компонентов, входящих в его состав, и соответственно к уменьшению его эффективности, в результате чего чувствительность клеток к М увеличивается. Ионы Zn, являясь сами по себе блокаторами М-индуцируемого гемолиза, могут действовать в синергизме с ВБМ, неаддитивно увеличивая его эффективность. Если это так, то естественной проверкой этого предположения могут быть эксперименты, в которых Zn добавляется к клеткам, помещенным в среду мелиттина непосредственно вслед за ним, моделируя ситуацию, изображенную на рис. 3 (кривая *4*). Другая проверка состоит в том, что эритроциты сначала инкубируются фиксированное время (50 с) в присутствии Zn для предполагаемого сохранения эффективности ВБМ, после чего к ним добавляется М. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 6.

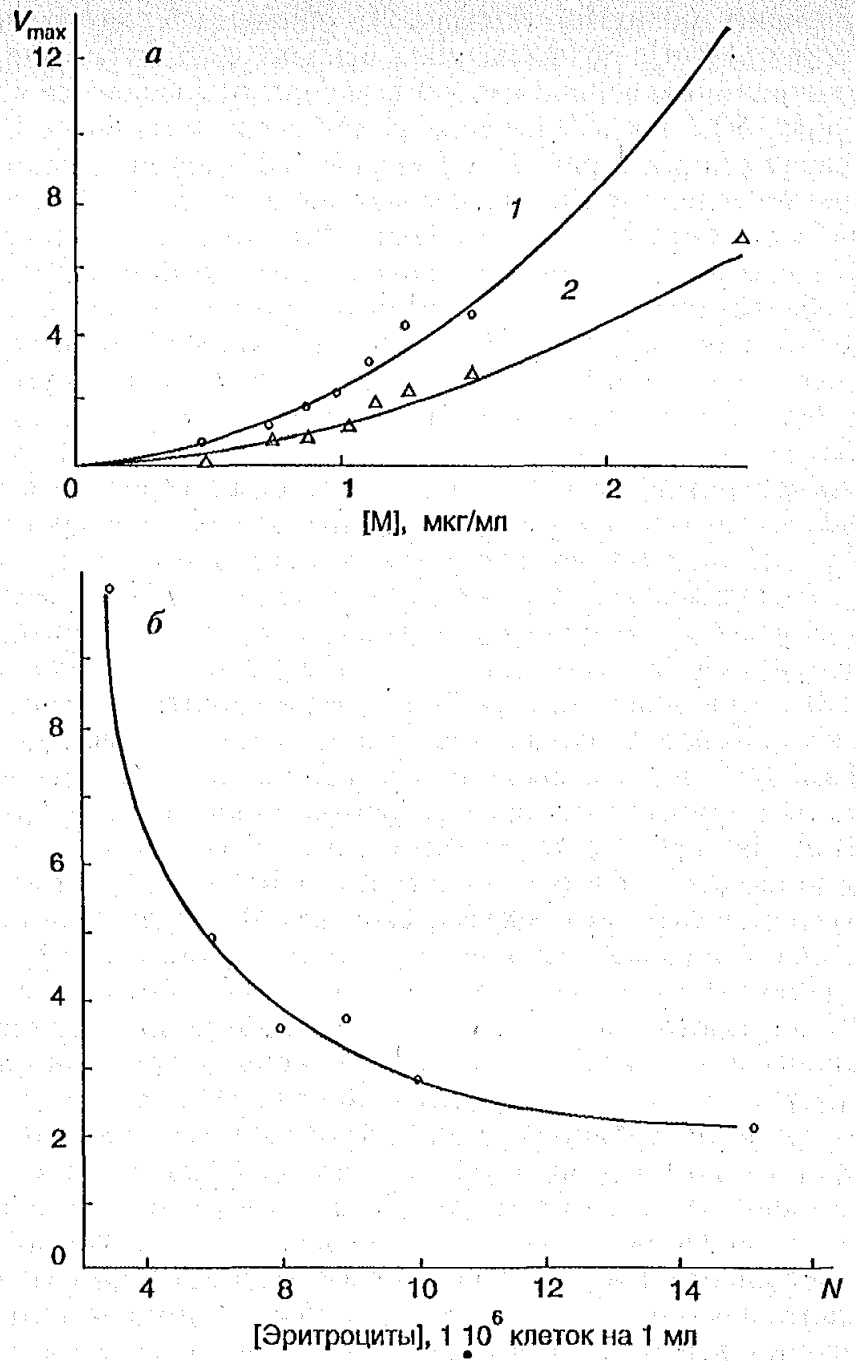

Рис. 4. Зависимость максимальной скорости М-индуцированного гемолиза от концентрации М в среде инкубации (*а*) и от концентрации эритроцитов (*б*): *а* – *1* – М добавлялся в суспензию эритроцитов через 50 с после внесения клеток в среду, *2* – клетки в конечной концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл добавлялись в среду, исходно содержащую указанное количество М (сплошные линии – теоретические кривые, полученные путем подгонки по методу наименьших квадратов согласно формуле $V = Ac^n$, где c – концентрация М, n – показатель степени, равный 1,96 (*1*) и 1,8 (*2*), A – постоянный коэффициент, равный 2,2 (*1*) и 1,2 (*2*)); *б* – М в концентрации 2 мкг/мл вводился в среду через 50 с после добавления клеток (сплошная кривая – зависимость, имеющая вид $V = A/\sqrt{c}$)

Действительно, добавление Zn непосредственно после клеток идентично случаю, когда клетки вводятся в среду, содержащую Zn и М, и приводит к полному ингибированию М-индуцируемых изменений в состоянии эритроцитов (кривые *1* и *2*). Предварительная инкубация в среде с Zn, однако, не предотвращает в полной мере М-индуцируемых изменений, хотя и замедляет их (кривая *3*). Это свидетельствует в пользу того, что ионы Zn сами по себе не способны предотвратить десорбцию компонентов, ответственных за ВБМ. Таким образом, мы приходим к заключению, что ионы Zn синергически

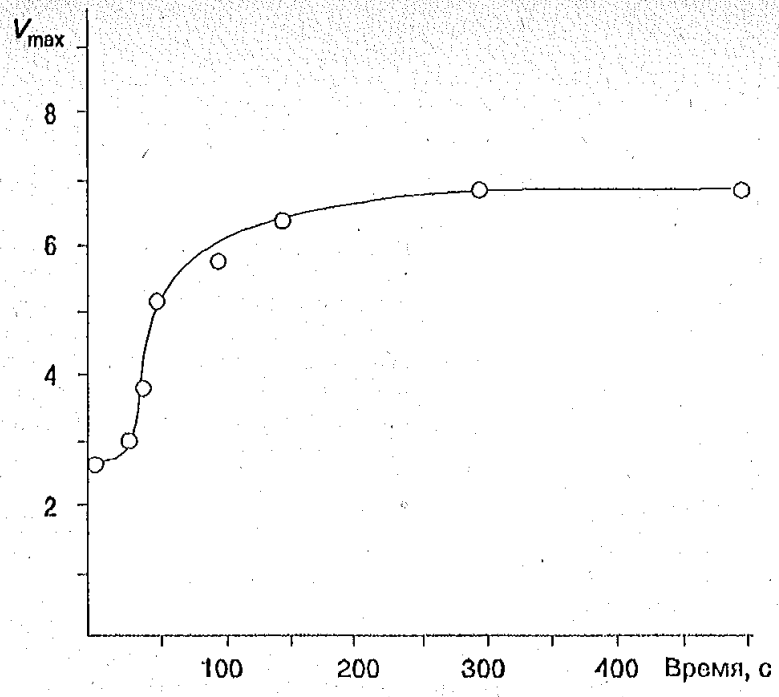

Рис. 5. Зависимость максимальной скорости гемолиза, индуцированного мелиттином (1,25 мкг/мл), от времени инкубации клеток в кювете до момента введения М

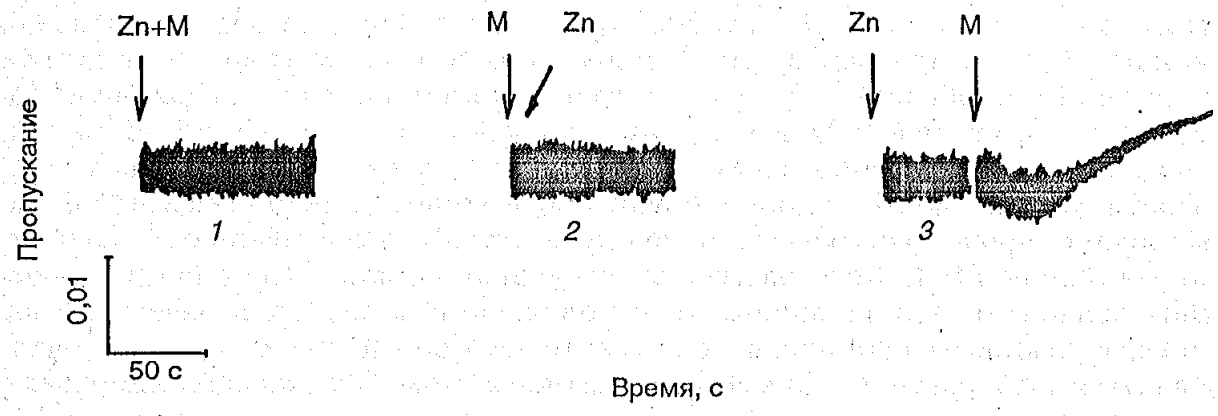

Рис. 6. Влияние последовательности добавления Zn (75 мкМ) на пропускание суспензии эритроцитов ($1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл) в присутствии мелиттина (1 мкг/мл): *1* – клетки вводятся в среду, содержащую Zn и М, *2* – ионы Zn вводятся в среду, содержащую М, непосредственно после введения туда клеток (экспериментальное время задержки для введения Zn 4–5 с), *3* – М добавляется в суспензию клеток, инкубировавшуюся 50 с в присутствии Zn

действуют с ВБМ на ранних стадиях взаимодействия М с мембраной. Актуальный механизм этого взаимодействия может заключаться в препятствии сорбции М на мембране и соответственно в уменьшении его результирующей способности формировать гемолитические поры. Косвенным доказательством в пользу этого является характер кинетических кривых, изображенных на рис. 3 и 6, полученных в присутствии ионов Zn. Как показано в работе [24], изменение формы эритроцитов от диска к сфере сопровождается возрастанием ОП и одновременным уменьшением ее флуктуаций, обусловленных перемешиванием клеточной суспензии. Как видно из рис. 1 и 3, уменьшение ОП сопровождается первоначальным исчезновением флуктуаций ОП, что свидетельствует о переходе клеток из дисков в сферы, а затем к гемолизу. Указанная формотрансформация подтверждается прямым микроскопическим анализом. Сферулирование эритроцитов является результатом встраивания молекул М в наружный монослой мембраны. Аналогичный

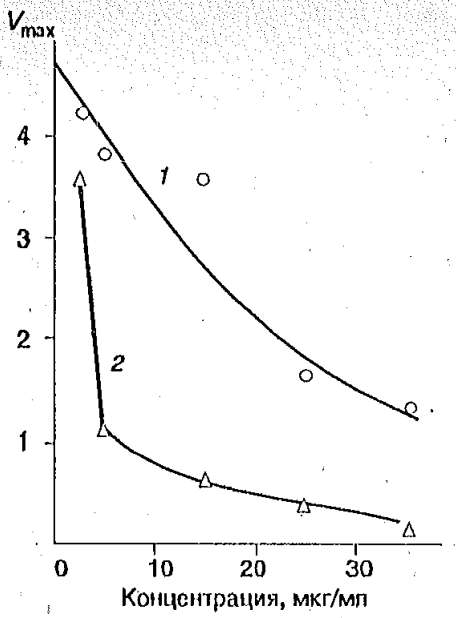

Рис. 7. Влияние ионов Zn на максимальную скорость М-индуцированного гемолиза при добавлении М (0,9 мкг/мл) к суспензии эритроцитов ($1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл) через 50 с после введения в среду клеток, к которым через 25 с после их введения был добавлен Zn (*1*); *2* – клетки были введены в среду, исходно содержащую М и Zn

процесс наблюдается в случае встраивания других мембраноактивных соединений, как обладающих, так и не обладающих литическими свойствами [10, 24–26]. В связи с этим степень формотрансформации, регистрируемая по изменению сигнала ОП, может служить качественным показателем, отражающим процесс встраивания М в мембрану в присутствии ионов Zn, поскольку сами ионы Zn не меняют сигнала. Присутствие ионов Zn в среде (рис. 3, кривые *3,5*) увеличивает время кренирования (соответственно время встраивания М в мембрану), а в случае введения клеток в среду, содержащую Zn и М (рис. 3, кривая *4*), или когда Zn добавляют в среду сразу после клеток (рис. 6, кривая *2*), кренирование и соответственно встраивание не происходят. Таким образом, ионы Zn конкурируют с мелиттином за места связывания на мембране, причем способность ионов препятствовать связыванию М зависит от состояния ВБМ. Хотя элементы, входящие в состав ВБМ, остаются не определенными, другие данные (как полученные нами, так и известные из литературы) позволяют предположить, что некоторыми его элементами могут являться сорбированные на мембране катионы типа Са и слабоассоциированные поверхностные белки. Так, увеличение концентрации в среде ЭДТА (1–5 мМ), хелатирующей двухвалентные катионы, стимулирует М-индуцированный гемолиз. К этому же приводит и интенсивное отмывание клеток в физиологическом растворе. С другой стороны, небольшие концентрации альбумина (1–5 мкг/мл) или белков плазмы ингибируют гемолиз. Уменьшение ионной силы при переводе клеток в изотоничную сахарозную среду или увеличение pH среды повышают чувствительность эритроцитов к М [5], а увеличение ионной силы уменьшает ее, что предполагает важную роль электростатических взаимодействий в ВБМ. На вариабельность ВБМ указывает также широкий диапазон чувствительности в одних и тех же экспериментальных условиях клеток различных доноров и даже клеток одного донора в разные дни. Учитывая эту вариабельность, при проведении описанных выше экспериментов мы периодически проверяли на чувствительность к действию М контрольный образец клеток, чтобы скорость гемолиза не изменялась более чем на 20% в начале и конце измерений. Неаддитивный синергизм в действии Zn и ВБМ хорошо виден из зависимостей скорости гемолиза от концентрации Zn (рис. 7), полученных при различных вариантах введения Zn в среду. Видно, что концентрация Zn, требуемая для уменьшения скорости гемолиза в 2 раза в случае предполагаемой максимальной эффективности ВБМ, т.е. при непосредственном введении клеток в среду с Zn и М, в 5–6 раз меньше соответствующей концентрации для случая, когда эффективность ВБМ уменьшилась за счет предварительного отмывания эритроцитов в кювете. Таким

образом, различия в блокирующих свойствах Zn объясняются его действием в синергизме с внутренним блокирующим механизмом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку М обладает способностью лизировать как эритроциты, так и липидные везикулы [2, 3, 5–11], а также формировать ионные каналы в плоских бислоях [3, 4], долгое время считалось, что литическая способность мелиттина может быть объяснена М-липидными взаимодействиями. При этом предполагалось, что закономерности М-индуцированного лизиса эритроцитов и липидных везикул должны быть схожи. Однако более подробное сравнение показало, что наблюдаются существенные различия в характере влияния двухвалентных катионов и ионной силы среды на М-индуцированный лизис этих объектов [5]. Так, катионы Ca и Zn оказались способными как активировать, так и ингибировать М-индуцированный гемолиз в зависимости от концентрации и ионной силы, чего не наблюдалось при лизисе липидных везикул. Ионы фосфата ингибировали гемолиз эритроцитов, но не влияли на лизис везикул [5]. Было показано также, что концентрации катионов, необходимые для ингибирования или активирования М-индуцированного лизиса везикул, в $\sim$10 раз больше, чем в случае эритроцитов [5, 6]. На основании этих и других данных было предположено, что механизм гемолиза эритроцитов включает взаимодействие М по крайней мере с двумя типами сайтов, только один из которых участвует в процессе гемолиза и может быть связан с мембранными белками [5, 18]. Это подтверждается также тем, что существует прямая корреляция между способностью мелиттина и его производных лизировать эритроциты и агрегировать внутримембранные частицы, представляющие собой комплекс белка полосы 3 и гликофорина [17, 18]. Полученные в настоящей работе результаты также допускают сравнение закономерностей М-индуцированного гемолиза с известными данными, касающимися лизиса липидных везикул. Зависимость скорости гемолиза от концентрации М (рис. 4) имеет слабую степенную зависимость с показателем степени меньше 2, в то время как для липидных везикул она пропорциональна третьей степени от концентрации М [7]. Этот результат согласуется с данными работы [8], в которой показана прямо пропорциональная зависимость быстрой фазы гемолиза от концентрации клеток в сахарозной среде. Зависимость скорости гемолиза от концентрации эритроцитов (рис. 4) пропорциональна $\sqrt{1/c}$, тогда как для везикул показана зависимость $1/c^3$ [7]. Коэффициент распределения мелиттина между синтетическими липидами и средой имеет величину, равную 10^4 M^{-1} [7]. Наши оценки показывают, что соответствующая величина в проведенных экспериментах порядка 10^6 M^{-1}, что согласуется с литературными данными [8]. Эта величина ближе к константе связывания М с белками, например с кальмодулином – $4 \cdot 10^8$ M^{-1} [27]. Большие различия обнаруживаются и в характере действия ионов Zn. Если Zn может как активировать, так и ингибировать М-индуцированный лизис везикул в зависимости от их фосфолипидного состава [5], то для эритроцитов характерно только ингибирующее действие Zn в изотоничной солевой среде, эффективность которого зависит от состояния клеток. Как видно (рис. 5), эффективность действия М зависит от условий преинкубации клеток. То же самое относится и к действию Zn, эффективность которого как блокатора М-индуцированного гемолиза может возрастать до 10 раз в зависимости от условий эксперимента (рис. 7). В последнем случае Zn становится эффективным в очень малых концентрациях, что предполагает его связывание с высокоаффинным участком на клеточной мембране. Поскольку подобные эффекты отсутствуют на липидных везикулах разного фосфолипидного состава, включающих как нейтральные, так и заряженные липиды, весьма вероятно, что таким участком могут быть мембранные белки. Известно, что

процесс связывания М с мембраной липидных везикул протекает за время менее 1 с [1, 28]. Наши данные (рис. 3) показывают, что время кренирования эритроцитов и, следовательно, встраивания М в наружный монослой эритроцитов увеличивается в присутствии ионов Zn и значительно превосходит характерное время встраивания в случае везикул. Таким образом, сравнение показывает, что между М-индуцированным гемолизом эритроцитов и М-индуцированным лизисом липидных везикул не только мало, но практически и нет ничего общего за исключением того, что кинетики гемолиза и лизиса могут быть описаны одной и той же функцией, включающей экспоненциальный и линейный члены [7, 8]. Из этого следует, что модель липидных везикул, которая широко используется для анализа М-липидных взаимодействий, мало подходит для анализа механизмов литического действия М на эритроциты человека, в которых липиды играют небольшую роль. С другой стороны, это показывает, что основной мишенью для мелиттина являются мембранные белки, которые представляют собой участок для его литического действия. Конкурирующее действие ионов Zn как самих по себе, так и в синергизме с внутренним блокирующим механизмом будет уменьшать литический эффект М. Наши данные показывают, что анализ механизма М-индуцированного гемолиза осложнен существованием ВБМ, способного действовать в синергизме с дивалентными катионами. Поскольку природа этого механизма не совсем ясна и отсутствуют способы его контроля, не удивительно, что результаты, полученные в разных работах, могут различаться [5, 8, 18]. В любом случае, однако, для понимания механизма М-индуцированного гемолиза основное внимание должно быть перенесено с М-липидных на М-белковые взаимодействия. Это особенно важно, поскольку недавно показана существенная роль белков в стабилизации пор в мембранах эритроцитов в случае гипотонического гемолиза [29].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dempsey, C.E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**, 143–161.
2. Bashford, C.L., Alder, G.M., Graham, J.M., Menestrina, G., and Pasternak, C.A. (1988) *J. Membrane Biol.*, **103**, 79–94.
3. Dempsey, C.E., Bazzo, R., Harvey, T.S., Syperek, I., Boheim, G., and Campbell, I.D. (1991) *FEBS Lett.*, **281**, 240–244.
4. Pawlak, M., Stankowski, S., and Schwarz, G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 94–102.
5. Portlock, S.H., Clague, M.J., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1030**, 1–10.
6. Kaszuba, M., and Hunt, G.K. (1990) *J. Inorg. Biochem.*, **40**, 217–225.
7. Schwarz, G., Zong, R.T., and Popescu, T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1110**, 97–105.
8. De Grado, W.F., Musso, G.F., Lieber, M., Kaiser, E.T., and Kezdy, F.J. (1982) *Biophys. J.*, **37**, 329–338.
9. Katsu, T., Ninomiya, C., Kuroko, M., Kobayashi, H., Hirota, T., Fujita, Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **939**, 57–63.
10. Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Fujita, Y., Yamamura, H., and Oda, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **983**, 135–141.
11. Tosteson, M.T., Holmes, S.J., Rasin, M., Tosteson, D.C. (1985) *J. Membr. Biol.*, **87**, 35–44.
12. Malencik, D.A., and Anderson, S.R. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 22–29.
13. Kataoka, M., Head, J.F., Seaton, B.A., and Engelman, D.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6944–6948.
14. Mahaney, J.E., Kleinschmindt, J., Marsh, D., and Thomas, D.D. (1992) *Biophys. J.*, **63**, 1513–1522.
15. Cuppoletti, J., and Abbott, A.J. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 249–257.
16. Cuppoletti, J. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 409–415.
17. Hu, K.-S., Dufton, M.J., Morrison, I., and Cherry, R.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **816**, 358–364.
18. Hui, S.W., Stewart, C.M., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 335–340.
19. Bashford, C.L., Rodrigues, L., and Pasternak, C.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **983**, 56–64.
20. Tomita, T., Watanabe, M., and Yarita, Y. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1145**, 51–57.
21. Young, J.D-E., Leong, L.G., Dinome, M.A., and Cohn, Z.A. (1986) *Analyt. Biochem.*, **154**, 649–654.
22. Ibani, A., and Granoth, R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1027**, 199–204.

23. Alder, G.M., Arnold, W.M., Bashford, C.L., Drake, A.F., Pasternak, C.A., and Zimmermann, V. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 111–120.
24. Hoffman, J.F. (1987) *Blood Cells*, 12, 565–586.
25. Chi, L.-M., Wu, W.-G., Sung, K.-L.P., and Chien, S. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1027, 163–171.
26. Isomaa, B., Hagerstrand, H., and Paatero, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, 899, 93–103.
27. Maulet, Y., and Cox, J.A. (1983) *Biochemistry*, 22, 1995–2001.
28. Schwarz, G., and Beschiaschvili, G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 979, 82–90.
29. Sato, Y., Yamakose, H., and Suzuki, Y. (1993) *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 188–207.

Поступила в редакцию
21.07.94
После доработки
01.11.94

THE EFFECT OF Zn IONS ON ERYTHROCYTES HEMOLYSIS INDUCED BY MELITTIIN

S.V. RUDENKO, E.E. NIPOT., O.M. PAVLYUK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of the Ukraine, 310015 Khar'kov, Pereyaslavskaya ul., 23, Ukraine; fax: (0572)72-00-84, E-mail: cbi@ilt.kharkov.ua

Key words: melittin, erythrocytes, hemolysis, divalent cations.

Divalent cations – Ca^{2+} and Zn^{2+} – were shown to produce inhibition of melittin-induced hemolysis of erythrocytes in the hemolysis phase, the degree of blocking increasing with a rise in the cation concentration. Besides, Zn^{2+} ions altered, in a concentration-dependent manner, the initial stages of interaction between melittin and red cell membranes, resulting in a slowdown of the melittin insertion and hemolysis rate. A comparison of dependencies between the hemolysis rate and melittin and cells concentrations in the medium as well as the regularities of the blocking activity of cations under various conditions with the corresponding data concerning melittin-induced lysis of lipid vesicles indicates that melittin-induced hemolysis and lysis of lipid vesicles have little in common, thus being suggestive of an insignificant role of melittin-lipid interactions in the mechanism of cell hemolysis. The data obtained provide evidence that the erythrocyte membrane contains an intrinsic blocking mechanism whose efficacy can be sinergistically enhanced by Zn^{2+} ions protecting the cells against the lytic effect of melittin.