БИОХИМИЯ, 1996, том 61, вып. 12, с. 2116- 2124

УДК 577.152.3

МОДУЛЯЦИЯ МЕЛИТТИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

© 1996 г. С.В. Руденко*, Е.Е. Нипот

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

Поступила в редакцию 11.05.96
После доработки 16.07.96

Ключевые слова: мелиттин, эритроциты, гемолиз, двухвалентные катионы, альбумин, DIDS, мембранные дефекты.

Установлено, что различные химические вещества в отношении влияния на мелиттин-индуцированный гемолиз могут быть разбиты на три основные группы: нейтральные вещества, ингибиторы и активаторы гемолиза. Ингибиторы, к которым относятся двухвалентные катионы Zn^{2+} и Ca^{2+}, альбумин, DIDS и ряд других веществ, ингибируют гемолиз, причем их блокирующая способность значительно возрастает, если они присутствуют на ранних стадиях пептид-мембранных взаимодействий. Показано, что скорость мелиттин-индуцированного гемолиза зависит от времени предварительной инкубации клеток в физиологическом растворе независимо от присутствия или отсутствия в среде ингибиторов или активаторов. Скорость гемолиза увеличивается при увеличении времени инкубации. Предполагается, что эти эффекты обусловлены наличием мембранных ингибирующих компонентов (МИК), имеющих специфическое сродство к мелиттину, и исходно защищающих мембрану от его литического действия, которые, вероятно, десорбируются с поверхности клеток при их разведении и инкубации в физиологическом растворе. Предложена схема, согласно которой характер протекания пептид-индуцированного гемолиза эритроцитов определяется последовательными стадиями взаимодействия пептидов с мембраной и зависит от того, формируется или нет тройной нелитический комплекс, включающий мембранный ингибирующий компонент, блокатор и пептид, который препятствует разрушению мембраны.

Несмотря на обширную литературу, посвященную различным аспектам действия мелиттина (М) на биологические и модельные мембраны (см. обзор [1]), механизм его гемолитического действия остается неизвестным. Распространенной точкой зрения относительно механизма действия не только М, но и других литических агентов состоит в том, что если рассматриваемый агент обладает способностью увеличивать проницаемость липидных везикул или формировать ионные каналы в плоских липидных бислоях, то для объяснения его действия нет особой необходимости привлекать представления о специфических рецепторах, которые являются его мишенью [2–6]. С другой стороны, данные, полученные в последнее время, свидетельствуют о том, что мелиттин оказывает свой литический эффект на эритроциты за счет преимущественного взаимодействия с белковыми, а не липидными компонентами их мембран [7–10]. Это не позволяет полностью исключить модель, согласно которой М-индуцированный гемолиз обусловлен взаимодействием пептида с рецептором, регулирующим лизис. Альтернативно, мембранные белки могут выполнять роль модуляторов взаимодействия М с теми участками мембран, в которых в конечном итоге образуются литические поры. Известно, что двухвалентные катионы, хлорпромазин и ряд других веществ ингибируют М-индуцируемый гемолиз, что связывают с их способностью «закрывать» М-индуцируемые поры [11, 12]. Если же гемолитический механизм включает взаимодействие М с некими мембранными рецепторами, следует ожидать, что ингибиторы будут также дополнительно модулировать и этот процесс, в особенности на его ранних стадиях, т.е. на стадиях рождения и формирования поры. Таким образом исследование модуляции гемолиза может дать важную информацию о механизме литического действия пептида.

Настоящая работа посвящена изучению влияния веществ различной химической природы

Принятые сокращения: DIDS – 4,4′-диизотиоцианостильбен-2,2′-дисульфонат; СССР – карбонилцианид-м-хлорофенилгидразон; ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид; ЛУС – литический участок связывания; НЛУС – нелитический участок связывания; МИК – мембранные ингибирующие компоненты.

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

©1996 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/1996/12/2116.

на модуляцию пептид-мембранных взаимодействий. Для этого было исследовано влияние различных блокаторов М-индуцированного гемолиза, таких, как двухвалентные катионы Zn^{2+} и Ca^{2+}, хлорпромазин [9, 10], DIDS, альбумин, сыворотка и других веществ, на протекание гемолиза, когда они действовали до или одновременно с мелиттином.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что обнаруженное значительное увеличение блокирующей способности ингибиторов в ситуации, когда они действуют одновременно с М, объясняется наличием мембранных ингибирующих компонентов (МИК), выполняющих защитную роль и представляющих собой особый класс нелитических участков связывания для мелиттина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты человека получали, добавляя несколько капель крови донора к 10 мл физиологического раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4), перемешивали и дважды отмывали путем центрифугирования (2000 g, 3 мин). Слой лейкоцитов удаляли и 30 мкл полученного осадка эритроцитов разводили в 0,5 мл физиологического раствора и использовали в течение нескольких часов как сток-суспензию. Плазму и сыворотку крови получали путем осаждения форменных элементов цельной или разведенной в физиологическом растворе крови. В экспериментах использовались только свежеотобранные аутологичные плазма и сыворотка. Концентрацию белков в плазме измеряли фотометрическим способом, описанным в [13]. Мелиттин, свободный от фосфолипазы A_2, был любезно предоставлен доктором К. Демпси (Бристольский университет, Англия). Хлорпромазин-HCl, ЭДТА, трифторперазин, сывороточный альбумин человека, иодацетамид, валиномицин, СССР, DIDS фирмы «Serva» (США); A23187, ЦТАБ, N-этилмалеимид, Ds-Na фирмы «Sigma» (США); дитиотреитол фирмы «Reanal» (Болгария); маннитол фирмы «Chemapol» (Чехословакия); колхицин фирмы «Fluka» (Швейцария); тритон-X100 фирмы «Merck» (Германия); L-α-лизолецитин фирмы «Calbiochem» (США); меркаптоэтанол фирмы «Ferak» (Германия); адреналина гидрохлорид, норадреналина гидрохлорид (Россия). Остальные реактивы были квалификации х.ч. или ч.д.а. Эксперименты проводились при комнатной температуре 22–24°.

Определение гемолиза. Динамику гемолиза эритроцитов в процессе взаимодействия с литическими пептидами измеряли спектрофотометрически на длине волны 720 нм, как описано ранее [9, 10, 14]. Скорость гемолиза υ вычисляли как тангенс угла наклона α линейного участка зависимости оптического пропускания от времени. На рис. 1 показаны типичные зависимости оптического пропускания суспензии эритроцитов от времени при введении клеток в среду, содержащую пептиды (*1*), или среду, содержащую пептиды и двухвалентные катионы (*2*). Взаимодействие пептидов с эритроцитами приводит сначала к увеличению оптического пропускания, что соответствует фазе формотрансформации, а затем к его снижению, что соответствует фазе набухания и гемолиза клеток [9, 10, 14, 15]. Видно, что присутствие двухвалентных катионов увеличивает период (время задержки) между введением клеток и достижением максимума оптического пропускания и уменьшает скорость гемолиза. Определенное таким образом время задержки гемолиза $T_з$ является достаточно точным и объективным количественным показателем блокирующей способности катионов и других блокаторов, которую они проявляют на ранних стадиях взаимодействия с клетками. Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлюориметре Hitachi F-4010.

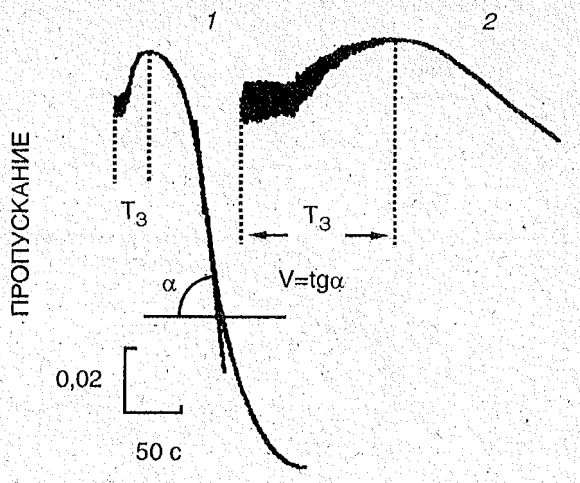


Рис. 1. Типичные зависимости оптического пропускания суспензии эритроцитов от времени при введении клеток в среду, содержащую пептиды (*1*), и в среду, содержащую пептиды и двухвалентные катионы Zn^{2+} или Ca^{2+} (*2*). $T_з$ – время задержки начала гемолиза, измеряемое от момента введения клеток до достижения максимальной величины пропускания

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлены данные о способности двухвалентных катионов Zn^{2+} и Ca^{2+} задерживать развитие гемолиза, индуцирован-

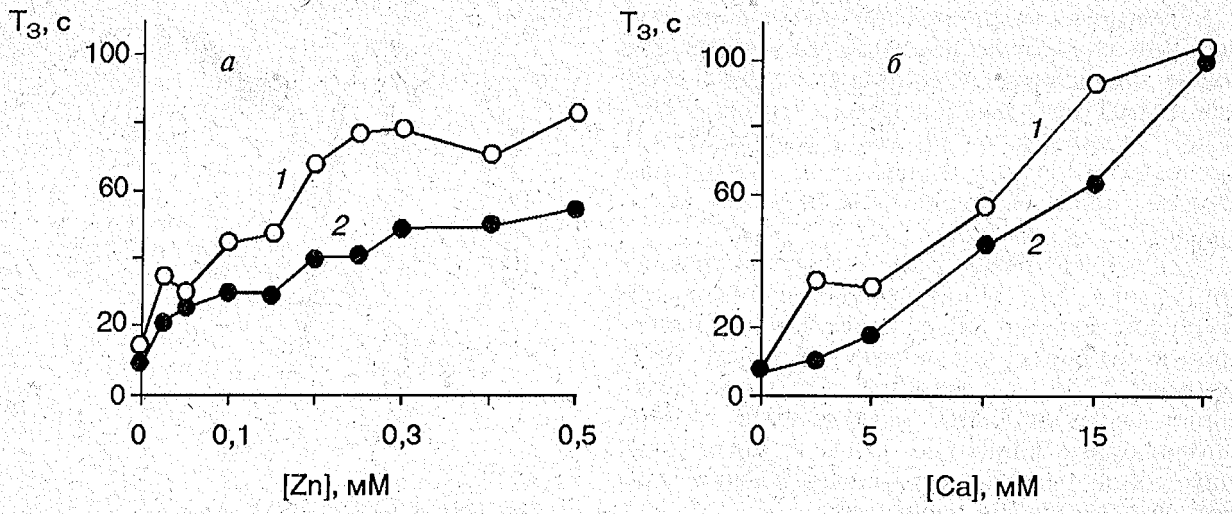


Рис. 2. Зависимость времени задержки $T_З$ гемолиза, индуцированного мелиттином, от концентрации катионов Zn^{2+} (*а*) и Ca^{2+} (*б*): *1* – клетки вводили в среду, содержащую пептиды и катионы; *2* – клетки вводили в среду, содержащую катионы, а пептиды добавляли через 50 с после клеток

ного М. Как видно, наибольшее влияние на ингибирование гемолиза катионы оказывают тогда, когда клетки вводят в среду, содержащую одновременно пептиды и катионы (кривые *1*). Если же пептиды добавляли к суспензии эритроцитов через 50 с после введения клеток в среду, то ингибирующее влияние катионов уменьшалось (кривые *2*).

На рис. 3 показана зависимость скорости гемолиза от времени инкубации клеток в кювете до момента добавления пептида, а также влияние на этот процесс катионов Zn^{2+} и Ca^{2+}. Видно, что присутствие катионов в среде в несколько раз снижает скорость гемолиза по сравнению с контролем, однако она увеличивается после эквилибрации клеток в физиологическом растворе как с катионами, так и в их отсутствие с характерным временем 50–100 с, при этом эффект катионов может отличаться в несколько раз для разных образцов крови.

В таблице приведены подобные данные о влиянии ряда других веществ на гемолиз эритроцитов, индуцированный мелиттином, которые подтверждают, что влияние ингибиторов на скорость гемолиза существенно зависит от порядка приведения в контакт клеток, ингибиторов и пептида в экспериментальной системе определения гемолиза. Наибольший эффект ингибиторов достигается, если клетки вводить в среду, предварительно содержащую пептиды и заданное количество ингибитора. Действие ингибиторов уменьшается, если клетки инкубируются в физиологическом растворе в присутствии ингибитора в течение 100–200 с перед добавлением того же количества пептида. Поэтому для количественной характеристики влияния исследуемых веществ на гемолиз были использованы оба параметра: υ_0 – скорость гемолиза при введении клеток в среду, содержащую пептид и исследуемое вещество, и υ_{200} – скорость гемолиза при добавлении того же количества пептида к клеткам, которые инкубировались в течение 200 с с исследуемым веществом. Оба этих параметра нормировались на скорость гемолиза, измеренного для контрольного образца клеток, который осуществлялся при их введении в среду, содержащую М, но не содержащую дополнительных веществ.

Видно, что по своему действию вещества могут быть разделены на три группы: неактивные вещества, активаторы и ингибиторы М-индуцированного гемолиза. Интересно, что некоторые из них меняют свое действие по отношению к типу изучаемого гемолиза, а именно, измерялась ли скорость гемолиза при введении клеток в среду с пептидом и веществом (υ_0) или при добавлении пептида после инкубации клеток в течение 200 с в среде с веществом (υ_{200}). Например, лизолецитин был ингибитором в отношении (υ_0), но становился активатором для (υ_{200}). Подобная смена действия проявлялась и в случае А23187, валиномицина и меркаптоэтанола. Это показывает, что при инкубации клеток в физиологическом растворе в мембранах клеток происходят изменения, которые меняют их чувствительность не только

к действию пептидов, но и к действию, иногда противоположным образом, дополнительных модификаторов – активаторов или ингибиторов гемолиза. В группе ингибиторов наибольшей ингибирующей способностью обладали альбумин и DIDS, поэтому особенности их действия были изучены более подробно.

На рис. 4,*а* представлены данные о способности альбумина замедлять скорость гемолиза при различных вариантах введения клеток и пептида в среду с альбумином. Видно, что эффективное замедление гемолиза происходит в обоих случаях и при определенной концентрации альбумина $\upsilon_0 = \upsilon_{200}$, что не характерно для катионов Zn^{2+} и Ca^{2+} (рис. 3) и многих других веществ (таблица). На рис. 4,*б,в* приведены зависимости скорости гемолиза от концентрации ингибиторов в координатах Диксона. В случае альбумина эта зависимость практически линейна для (υ_{200}), но ее линейность нарушается для (υ_0), где наблюдается отрицательная кооперативность процесса ингибирования, т.е. увеличение концентрации ингибитора сопровождается уменьшением его эффективности, при этом обе зависимости характеризовались примерно одинаковыми константами ингибирования. Аналогичный результат был по-

Влияние различных веществ на скорость гемолиза эритроцитов, индуцированного мелиттином в концентрации 1,5 или 4 мкг/мл в случае альбумина, сыворотки и плазмы

υ_0 – скорость гемолиза при введении клеток в конечной концентрации 10^6 клеток в 1 мл в среду, содержащую мелиттин и исследуемое вещество; υ_{200} – скорость гемолиза после добавления мелиттина к клеткам, инкубировавшимся в присутствии исследуемого вещества в течение 200 с; $\upsilon_к$ – скорость гемолиза контрольного образца клеток после его введения в среду с мелиттином в отсутствие дополнительных веществ. Вещество определялось как неактивное (НА), если оно изменяло скорость гемолиза не более чем в 2 раза в ту или иную сторону, как активатор (А) или ингибитор (И), если оно более 2 раз соответственно увеличивало или уменьшало скорость гемолиза по сравнению с контролем, и как сильный ингибитор (СИ), если оно более чем в 10 раз уменьшало скорость гемолиза

Вещество	$\upsilon_0/\upsilon_к$	$\upsilon_{200}/\upsilon_к$	Характеристика
Контроль	1	2,59 ± 0,67	
Иодацетамид (1 мМ)	0,81	3,81	НА
N-этилмалеимид (1 мМ)	0,44	3,3	НА
Дитиотреитол (6,5 мМ)	0,39	3,8	НА
Сахароза (50 мМ)	0,89	3,9	НА
Маннитол (50 мМ)	1,64	3,8	НА
Адреналин (1 мг/мл)	0,77	1,55	НА
Норадреналин (2 мг/мл)	0,68	1,55	НА
Колхицин (0,3 мкМ)	0,8	3,4	НА
ССССР (20 мкМ)	0,85	4,0	НА
Тритон Х-100 (4 мкг/мл)	3,48	8,9	А
Ds-Na (0,5 мкМ)	2,38	6,2	А
L-α-лизолецитин (0,84 мкМ)	0,17	6,2	И, А
ЭДТА (5 мМ)	4,8	8,85	А
А23187 (5 мкМ)	0,8	5,7	НА, А
Цинк (75 мкМ)	0,28	1,2	И
Кальций (7,5 мМ)	0,08	0,73	И
Альбумин (20 мкг/мл)	0,3	0,36	И
Сыворотка (20 мкг/мл)	0,3	0,3	И
Плазма (20 мкг/мл)	0,19	0,35	И
Валиномицин (1мкМ)	0,32	3,2	И, НА
Хлорпромазин (20 мкМ)	0,32	1,32	И
Трифторперазин (10 мкМ)	0,37	1,19	И
Меркаптоэтанол (0,2%)	0,02	2,95	И, НА
ЦТАБ (10 мкМ)	0	0	СИ
DIDS (10 мкМ)	0	0	СИ

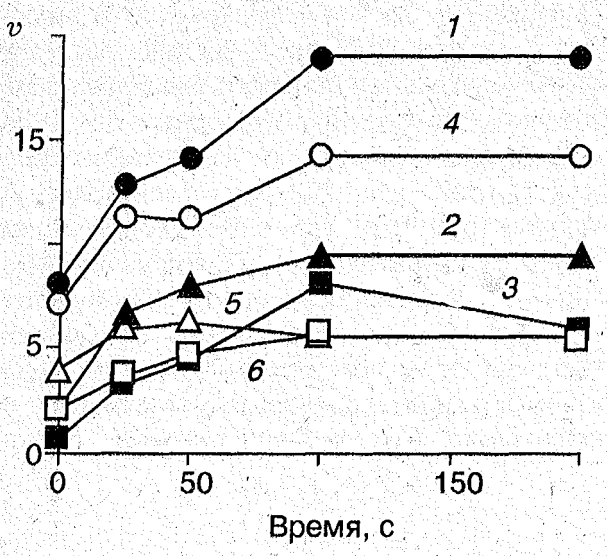


Рис. 3. Зависимость скорости гемолиза, индуцированного мелиттином (1,5 мкг/мл), от времени инкубации эритроцитов в кювете до момента введения мелиттина в отсутствие катионов (*1, 4*) и в присутствии катионов Zn^{2+} (75 мкМ) (*2, 5*) и Ca^{2+} (7,5 мМ) (*3, 6*). *1, 2, 3* – донор 1; *4, 5, 6* – донор 2. Скорость гемолиза определена на рис. 1

лучен и для DIDS, однако константы ингибирования при этом были различными.

Требует объяснения, почему же блокирующий эффект ингибиторов зависит от времени экспонирования клеток в физиологическом растворе. В отдельных экспериментах было установлено, что наблюдаемое явление не связано с деформацией клеток при их перемешивании в кювете. Следовательно, деформацию клеток можно исключить как возможный фактор, определяющий их чувствительность к действию пептида.

Можно предположить, что увеличение скорости гемолиза связано с увеличением способности М связываться с мембраной эритроцитов. Однако расчет значений коэффициента распределения мелиттина между эритроцитом и средой, который имел порядок $3 \cdot 10^6$ M^{-1} [16], после введения клеток в среду с пептидом (нулевое время) и в случае, когда пептиды добавлялись к клеткам через 200 с после их введения в среду для трех доноров, показал, что наблюдается не увеличение, а наоборот, уменьшение значения коэффициента распределения на 25, 34 и 49% соответственно. Это означает, что несмотря на вариации среди доноров, во всех случаях через 200 с клетки связывают меньше пептида, чем в начальный момент времени, хотя гемолизируют с большей скоростью (рис. 3, таблица). Таким образом, мы видим, что между связыванием пептидов и тем гемолитическим эффектом, который они проявляют, нет прямой корреляции. В этом отношении эритроциты отличаются от липосом, для которых увеличение концентрации пептидов в мембране пропорционально увеличивает скорость лизиса [17]. Можно предположить, что изменение чувствительности клеток к гемолизу определяется изменениями в структуре мембран, которые происходят на начальных стадиях пептид-мембранных взаимодействий.

Важность этих стадий для последующего хода гемолиза иллюстрируется данными, представленными на рис. 5. Здесь видно, что ЭДТА и эквимолярная смесь Zn^{2+} и ЭДТА практически не изменяют динамику гемолиза по сравнению с контролем (кривые *1, 2* и *3*). При концентрациях, больших 1 мМ, ЭДТА уже является стимулятором гемолиза. Первый результат можно объяснить тем, что и Zn^{2+} и ЭДТА, образующие комплекс Zn^{2+}-ЭДТА, теряют способность ингибировать или активировать гемолиз за счет того, что аффинность связи компонентов в комплексе больше, чем их соответствующая способность реагировать с местами связывания на мембране. Введение ЭДТА в среду инкубации, после того как клетки прореагировали одновременно с пептидом и Zn^{2+}, вызывает гемолиз, скорость которого также равна скорости контрольного (кривая *4*). Это означает, что, удаляя блокирующие ионы Zn^{2+} с соответствующих мест связывания на мембране, ЭДТА позволяет пептидам проявить свой литический эффект. Для дальнейшей интерпретации здесь важно особо подчеркнуть, что равные скорости гемолиза в этих вариантах экспериментов показывают, что чувствительность клеток к гемолизу после инкубации в присутствии пептидов и Zn^{2+} не изменилась во времени, что обычно происходит при инкубации в присутствии только ионов Zn^{2+} или других блокаторов (рис. 3, таблица). Это же отчетливо видно из кривых *5* и *6*, полученных для удвоенной концентрации М. В этом случае М вызывает гемолиз клеток с одинаковой скоростью независимо от того, помещались ли они сразу в среду, содержащую конечные концентрации М и Zn^{2+}, или конечные концентрации М формировались после 200 с предварительной инкубации клеток с Zn^{2+} и половинной концентрацией М. Это показывает, что для увеличения блокирующей способности ионов Zn^{2+} на ранней стадии необходимо присутствие в среде самого мелиттина. Когда же клетки инкубируются в среде только в присутствии ионов Zn^{2+}, те же концентрации М лизируют их с

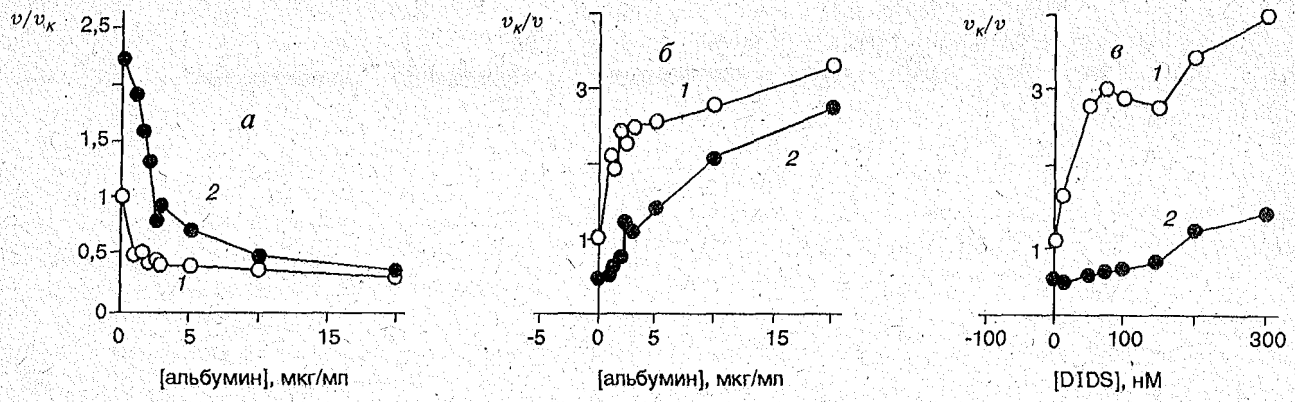


Рис. 4. Зависимости скоростей гемолиза, нормированных на скорость гемолиза контрольного образца $v_к$, которая определяется при введении клеток в среду, содержащую мелиттин (4 мкг/мл), от концентрации альбумина в среде инкубации (*а*) и зависимость обратной нормированной скорости гемолиза, индуцированного мелиттином, от концентрации альбумина (*б*) и DIDS (*в*) в среде инкубации: *1* – клетки вводили в среду, содержащую мелиттин и блокатор; *2* – мелиттин добавляли к клеткам через 200 с после их введения в среду с блокатором

большей скоростью (ср. кривые *5* и *7*; начало кривой *6* и кривую *8*).

Чтобы установить, в какой степени ингибиторы могут модифицировать сам мелиттин, методом флуоресценции было также изучено его взаимодействие с некоторыми блокаторами. На рис. 6 показаны спектры флюоресценции триптофана М (М содержит единственный триптофан в положении 19) в присутствие катионов Ca^{2+}, DIDS и хлорпромазина, в концентрациях, в которых они выраженным образом блокируют М-индуцированный гемолиз. Видно, что ни катионы кальция, ни DIDS, а также лантан и ЦТАБ (данные не приведены) не меняют интенсивность и положение максимума флюоресценции М, что свидетельствует об отсутствии изменений в структуре молекулы и, следовательно, отсутствии между ними прямого взаимодействия. Исследование взаимодействия М с катионами Zn^{2+} методом флюоресценции провести не удалось из-за интенсивного испускания препаратов Zn^{2+} в области длин волн, характерных для эмиссии самого М. Однако по данным кругового дихроизма не было зарегистрировано взаимодействия Zn^{2+} и М как в отсутствие, так и в присутствии липидов [11]. Хлорпромазин достоверно уменьшал интенсивность флуоресценции М и приводил к длинноволновому сдвигу ее максимума. В свою очередь присутствие М в смеси с ХПР вызывало увеличение интенсивности флуоресценции ХПР на 22%. Идентичные спектры были получены при длине волны возбуждения 270 нм (данные не приведены). Изменения, наблюдаемые одновременно в спектрах флуоресценции обеих молекул, свидетельствуют, что между ними определенно происходит взаимодействие, вероятно, с образованием комплексного соединения, в результате которого триптофан мелиттина переходит в более полярное окружение [18]. Таким образом, М непосредственно не взаимодействует с такими блокаторами, как катионы, DIDS и ЦТАБ, что позволяет исключить предполагаемое взаимодействие пептидов с блокаторами как возможное объяснение увеличения их ингибирующей способности на ранних стадиях пептид-мембранных взаимодействий.

С другой стороны, инкубация эритроцитов в присутствии ингибирующих концентраций блокаторов никак не сказывалась на форме и объеме клеток, которые, как правило, происходят, если агенты обладают значительным мембранотропным действием [19]. Это делает маловероятным и то, что наблюдаемые эффекты вызваны непосредственным взаимодействием блокаторов с самими клетками.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные могут быть объяснены с помощью следующей модели. Предполагается, что гемолиз клетки является результатом связывания пептида с литическим участком связывания (ЛУС), в результате чего активируется литическая пора. Пептид также может связаться с нелитическим участком связывания (НЛУС) – такая связь не вызывает гемолиза. На основании

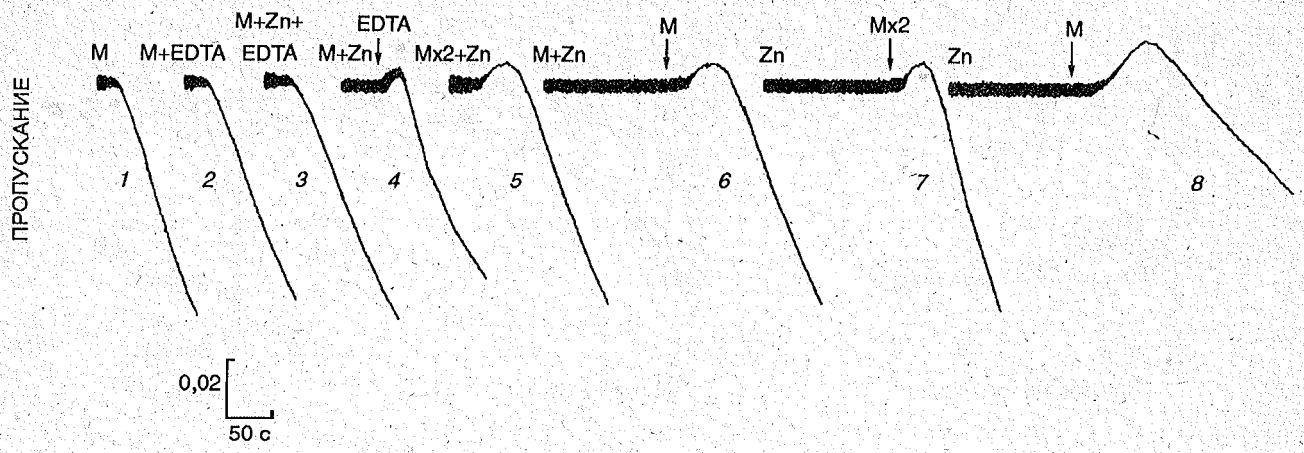


Рис. 5. Типичные зависимости оптического пропускания суспензии эритроцитов при их помещении в среду, содержащую мелиттин (1 мкг/мл), и дополнительно ЭДТА (75 мкМ) или Zn^{2+} (75 мкМ). Стрелками показан момент добавления реагентов. Подписи без стрелок означают присутствие реагентов в среде инкубации до добавления туда клеток. Обозначения: M – мелиттин, EDTA – ЭДТА, Zn – ионы Zn^{2+}

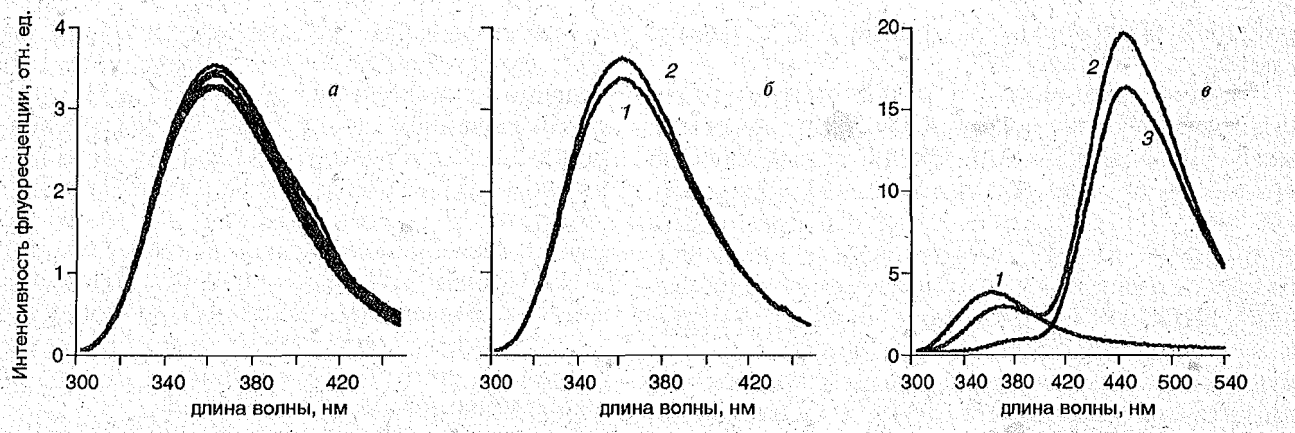


Рис. 6. Спектры флюоресценции мелиттина (1,5 мкг/мл) в физиологическом растворе NaCl в отсутствие и в присутствии Ca^{2+} (*а*), DIDS (*б*) и хлорпромазина (*в*): *а* – кривые для мелиттина и мелиттина в присутствии Ca^{2+} в концентрациях 5, 10, 15 и 20 мМ; *б* – *1* – мелиттин, *2* – мелиттин и DIDS (200 нМ); *в* – *1* – мелиттин, *2* – мелиттин и хлорпромазин (60 мкг/мл), *3* – хлорпромазин (60 мкг/мл). Длина волны возбуждения 290 нм

вышеприведенных и других данных [7–9, 20], существование НЛУС на мембране эритроцита, которые имеют предположительно белковую природу, по-видимому, можно считать доказанным. Двухвалентные катионы и другие блокаторы, конкурируют с М за связывание с ЛУС, препятствуя связыванию с ними пептида, и тем самым оказывают ингибирующий эффект. Это конкурирующее действие блокаторов коренным образом отличается от их известного свойства блокировать уже сформированную литическую пору, когда необходимо использовать более высокие концентрации этих веществ [4, 11, 12]. Отличительной чертой представленной модели является наличие мембранных ингибирующих компонентов (МИК), которые представляют собой особый класс нелитических участков связывания. Эти элементы слабо связаны с мембраной и в норме, по-видимому, находятся в динамическом сорбционном равновесии. Значительное увеличение блокирующей способности двухвалентных катионов и других блокаторов на ранних стадиях взаимодействия пептидов с мембраной в рамках данной модели

объясняются тем, что создается тройной комплекс, включающий пептиды, блокатор и МИК. Основное свойство этого комплекса, позволяющее объяснить полученные данные и, в частности, почему во всех случаях (υ_0) меньше, чем (υ_{200}), заключается в том, что тройной комплекс, по-видимому, прочнее связан с мембраной и не способен десорбироваться с ее поверхности. Это следует из того, что, во-первых, при этих условиях отсутствуют времязависимые изменения чувствительности клеток к действию мелиттина (рис. 5, кривые *5* и *6*), характерные для условий формирования двойных комплексов МИК с блокаторами (рис. 3), что указывает на отсутствие десорбции МИК с мембраны; во-вторых, клетки в меньшей степени реагируют на дополнительное увеличение концентрации пептида (рис. 5, кривые *6* и *7*); в-третьих, не происходит изменений в морфологии эритроцитов (рис. 5, ср. начало кривой *6* и кривую *8*). Далее, пептид, хотя и входит в состав тройного комплекса, но непосредственно не связан с мембраной, поскольку ранее было установлено, что в этих условиях прочного связывания не происходит [16]. Мы объясняем этот факт тем, что пептид не взаимодействует с мембраной непосредственно, а связан с ней через промежуточный элемент – МИК. Таким образом, с одной стороны, ингибитор (например, Zn^{2+}) увеличивает блокирующую способность МИК, не давая возможности пептидам взаимодействовать с ЛУС, с другой стороны, сами пептиды также необходимы для увеличения прочности связи МИК с Zn^{2+} и с мембраной. Как видно, с помощью представлений о МИК удается удовлетворительно описать все имеющиеся экспериментальные данные.

Наши представления о МИК находятся в хорошем соответствии с недавно обнаруженным гомологическим ограничительным фактором (HRF) [21] или мембранным белком CD59 [22], которые играют роль натуральных блокаторов против гемолиза эритроцитов гомологичным комплементом. Не исключено, что МИК и эти природные блокаторы имеют близкую молекулярную основу, представляя собой систему защиты клетки от действия внешних (но не всех) разрушительных агентов. В нашем случае среди всех исследованных ингибиторов только альбумин обладал свойством устранять зависимость чувствительности клеток к литическому действию пептидов от времени инкубации клеток в физиологическом растворе (рис. 4,*а*). Это позволяет предположить, что альбумин может быть одним из МИК, в отличие от других исследованных блокаторов, таких, как двухвалентные катионы и хлорпромазин.

Действие других химических веществ также согласуется с представленной моделью. Так, неэлектролиты, SH-реагенты, редуцирующие агенты, и катехоламины существенно не влияли на ход гемолиза, что свидетельствует о том, что модификация SH-групп мембранных белков, по крайней мере в течение небольшого отрезка времени, в течение которого проводится эксперимент, не играет роли в механизме гемолиза. Нейтральный эффект катехоламинов показывает также, что адренорецепторы мембран эритроцитов также не включены в гемолитический механизм. Следует указать, что обработка клеток реагентами, приводящими к активации эндогенных липаз (валиномицин, A23187) и в конечном итоге к накоплению в мембране свободных жирных кислот и лизолипидов, ведет к активации гемолиза. Вероятно, этим можно объяснить тот факт, что эти вещества меняют во времени свое действие с ингибирующего до активирующего (таблица). Это подтверждается и тем, что обработка клеток фосфолипазой A_2 также приводит к активации [10]. Активация гемолиза может быть объяснена тем, что активаторы, представленные в основном детергентами (таблица), селективно взаимодействуют с другим классом НЛУС, прочно связанных с мембраной, вытесняя с них М и тем самым увеличивая его литический эффект [8]. Предположение о наличии такого класса НЛУС подтверждается данными о том, что встраивание белка полосы *3* в липосомы снижает литическую активность М [20]. Это же находится в соответствии и с тем, что DIDS, который ковалентно взаимодействует по преимуществу с белком полосы *3* [23], является сильным ингибитором М-индуцированного гемолиза.

Наблюдаемые эффекты не могут быть истолкованы как результат непосредственного взаимодействия мелиттина и ингибиторов за счет формирования между ними двойных комплексов с пониженной литической активностью, поскольку очень трудно предположить, что все исследованные вещества абсолютно одинаково взаимодействуют с самим мелиттином (таблица). Флуоресцентный анализ также показывает, что в большинстве случаев не наблюдается прямого взаимодействия мелиттина с блокаторами гемолиза. Это же подтверждается и методом кругового дихроизма в случае ионов Zn^{2+} как в отсутствие, так и в присутствии липидов [11].

Таким образом, становится ясным, что мембрана эритроцита содержит два класса НЛУС – прочно связанных с мембраной и слабо связанных с мембраной, последние из которых и являются мембранными ингибирующими компонентами.

М-индуцированном гемолизе, вероятно, может иметь значение и в случае взаимодействия эритроцитов или иных типов клеток с другими агентами типа вирусов, токсинов или порообразующих веществ, что в каждом конкретном случае, однако, требует отдельного подтверждения. Например, другой, еще более токсичный литический агент, эквинатоксин-II [3, 5, 6], примененный в данной работе для сравнения, не показал закономерностей, характерных для мелиттина. Для этого токсина не удалось обнаружить никакой разницы между υ_{200} и υ_0 как в присутствии, так и в отсутствие двухвалентных катионов, из которых только цинк сохранил ингибирующие свойства (данные не представлены).

Авторы выражают искреннюю благодарность доктору К. Демпси за предоставленные пептиды и А.Д. Рошалю за помощь в проведении флуоресцентных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dempsey, C.E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta,* **1031**, 143–161.
2. Cauci, S., Monte, R., Quadrifoglio, F., Ropele, M., and Menestrina, G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1153**, 53–58.
3. Macek, P., Belmonte, G., Pederzolli, C., and Menestrina, G. (1994) *Toxicology,* **87**, 205–227.
4. Tomita, T., Watanabe, M., and Yarita, Y. (1993) *Biochim. Biophys. Acta,* **1145**, 51–57.
5. Belmonte, G., Menestrina, G., Pederzolli, C., Krizaj, I., Gubensek, F., Turk, T., and Macek, P. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1192**, 197–204.
6. Belmonte, F., Pederzolli, C., Macek, P., and Menestrina, G. (1993) *J. Membr. Biol.,* **131**, 11–23.
7. Hui, S.W., Stewart, C.M., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 335–340.
8. Portlock, S.H., Clague, M.J., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta,* **1030**, 1–10.
9. Руденко С.В., Нипот Е.Е., Павлюк О.М. (1995) *Биохимия*, **60**, 723–733.
10. Руденко С.В., Семенченко А.Ю. (1995) *Биохимия*, **60**, 734–744.
11. Alder, G.M., Arnold, W.M., Bashford, C.L., Drake, A.F., Pasternak, C.A., and Zimmermann, U. (1991) *Biochim. Biophys. Acta,* **1061**, 111–120.
12. Bashford, C.L., Alder, G.M., Graham, J.M., Menestrina, G., and Pasternak, C.A. (1988) *J. Membrane Biol.,* **103**, 79–94.
13. Скопс Р.К. (1985) *Очистка белков*, Мир, Москва.
14. Ilani, A., and Granoth, R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta,* **1027**, 199–204.
15. Hoffman, J.E. (1987) *Blood Cells,* **12**, 565–586.
16. Rudenko, S.V., and Nipot, E.E. (1996) *Biochem. J.,* **317**, 747–754.
17. Schwarz, G., Zong, R.T., and Popescu, T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta,* **1110**, 97–105.
18. Лакович Д. (1986) *Основы флуоресцентной спектроскопии,* Мир, Москва.
19. Isomaa, B., Hagerstrand, H., and Paatero, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta,* **899**, 93–103.
20. Van Veen, K., and Cherry, R.J. (1992) *FEMS Microbiol. Immunol.*, 105, 147–150.
21. Zalman, L.S., and Muller-Eberhard, H. (1994) *Mol. Immunol.*, **31**, 301–305.
22. Tomlinson, S., Whitlow, M.B., and Nussenzweig, V. (1994) *J. Immunol.*, **152**, 1927–1934.
23. Macara, I.G., and Cantley, L.C. (1981) *Biochemistry,* **20**, 5695–5701.

MODULATION OF MELITTIN-INDUCED ERYTHROCYTE HEMOLYSIS

S.V. Rudenko, E.E. Nipot

Institute of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Pereyaslavskaya 23, Kharkov, 310015, Ukraine; fax: (0572)72-0084; E-mail: cbi@ilt.kharkov.ua

Submitted May 11, 1996
Accelerated publication July 16, 1996

Key words: melittin, erythrocyte, hemolysis, divalent cation, albumin, DIDS, membrane defect.

Three main groups of chemicals influence melittin-induced hemolysis including neutral compounds and inhibitors and activators of hemolysis. Inhibitors include divalent cations Zn^{2+} and Ca^{2+}, albumin, DIDS, etc.; their potency significantly increases if they are present at early stages of peptide-membrane interaction. The rate of melittin-induced hemolysis depends on time of preincubation with the cells in physiologic saline but does not depend on the presence of inhibitors or activators. Longer incubation increases the rate of hemolysis. These effects can be due to membrane inhibitory components with specific affinity to melittin which initially protect the membrane from its lytic effect; these components can dissociate from the cell surface after dilution and incubation in physiologic saline. According to the suggested model, characteristics of peptide-induced hemolysis of erythrocytes are determined by sequential stages of peptide-membrane interaction and depend on the formation of triple non-lytic complex comprising the membrane inhibitory component, the blocker, and the peptide; the complex inhibits destruction of the membrane.