БИОХИМИЯ
Т. 60, вып. 5 1995

УДК 577.152.3

ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТОВ И СПЕКТРА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ, ИНДУЦИРОВАННОЕ МЕЛИТТИНОМ, ФОСФОЛИПАЗОЙ А2 И ПЧЕЛИНЫМ ЯДОМ

© 1995 г. *С.В. РУДЕНКО**, *А.Ю. СЕМЕНЧЕНКО*

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, фосфолипаза А2, тритон Х-100, сапонин, хлорпромазин, эритроциты, мембранные дефекты.

Эритроциты человека и их тени были обработаны мелиттином (М), фосфолипазой А2 (ФА2) и цельным пчелиным ядом. Обработка клеток ядом или смесью М и ФА2 приводила к значительному уменьшению их объема, сферуляции и гемолизу. Когда М действовал отдельно, он увеличивал объем клеток в процессе гемолиза, а обработка ФА2, хотя и стимулировала М-индуцированный гемолиз, не изменяла формы и объема эритроцитов даже при относительно высоких концентрациях. Совместное действие М и других агентов показало, что тритон Х-100 стимулирует М-индуцированный гемолиз в концентрациях на 2 порядка меньших его литической концентрации; сапонин действует подобным образом, но в концентрациях, близких к литическим; хлорпромазин ингибирует М-индуцированный гемолиз в сублитических концентрациях. Действие этих агентов или ФА2 в отдельности на М-индуцированный гемолиз не сопровождалось уменьшением объема клеток в процессе гемолиза. Было обнаружено, что обработка клеток смесью М и ФА2 или пчелиным ядом приводила к элиминации белков полос 6 и 8 в электрофоретическом спектре мембранных белков и появлению некоторых новых полос с относительно низкой молекулярной массой. Отсутствие аналогичных изменений в объеме клеток и спектре мембранных белков в случае стимуляции детергентами М-индуцированного гемолиза указывает на специфичность взаимодействия мелиттина с мембраной в присутствии ФА2.

Взаимодействие мелиттина – низкомолекулярного пептида, выделенного из яда медоносной пчелы [1, 2], с мембраной эритроцитов приводит к нарушению ее барьерной функции, кренированию клеток и высвобождению мембранных фрагментов [3–8]. Величина лизиса эритроцитов зависит от концентрации мелиттина (М), а сам процесс гемолиза, как было показано, имеет коллоидно-осмотическую природу [4, 5, 9]. Эксперименты с производными мелиттина показали, что их гемолитическая активность хорошо коррелировала с их способностью агрегировать внутримембранные частицы (ВМЧ) и снижать вращательную подвижность белка полосы 3 в эритроцитарной мембране [10, 11] или бактериородопсина в липидных везикулах [12]. Предполагается, что помимо М-фосфолипидного взаимодействия, имеющего место в липидных везикулах [3, 6, 13, 14], взаимодействие между мелиттином и мембранными белками может приводить к М-индуцированному образованию дефектов мембраны [6, 10, 11]. Этим можно объяснить противоречивость, наблюдаемую при исследовании литического действия мелиттина на эритроциты и липидные везикулы различного липидного состава [6]. Цитотоксическое действие пчелиного яда, по-видимому, является более сложным, чем гемолитическое действие мелиттина и фосфолипазы А2 (ФА2), поскольку

* 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/1995/05/734.

в нем содержатся различные ферменты и пептиды, которые могут действовать в синергизме [2]. Явный синергизм М и ФА2 описан ранее [2, 15]. В настоящее время неясно, имеет ли механизм действия пчелиного яда на клетки коллоидно-осмотическую природу. Также не выяснена роль ФА2 и других ферментов пчелиного яда в поддержании литического действия мелиттина. Целью настоящего исследования было сравнение литического действия и изменения белкового состава мембран эритроцитов в результате обработки клеток цельным пчелиным ядом и двумя его основными компонентами – М и ФА2 – как в комбинации, так и раздельно. Смесь М и ФА2 использовали как модель пчелиного яда. В сравнительном аспекте было исследовано также влияние других хорошо известных мембранных пертурбантов, таких как тритон Х-100, сапонин или хлорпромазин (ХПР), на М-индуцированный гемолиз, что основывалось на том, что полилизин [6] и спирты способны модулировать лизис липидных везикул [16, 17], вызванный мелиттином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мелиттин, свободный от фосфолипазы А2, и ФА2 любезно предоставлены доктором К. Демпси (Бристольский университет, Англия); хлорпромазин, HCl, сапонин и L-α-лизолецитин фирмы «Calbiochem» (США); тритон Х-100 – «Merck» (Германия); лизолецитин (2-деокси-1-лаурил) – «Sigma» (США). Цельный пчелиный яд растворяли в фосфатно-солевом буфере (150 мМ NaCl, 5 мМ натрий-фосфат, pH 7,2) (ФСБ) и центрифугировали для удаления нерастворившихся компонентов. Концентрацию раствора пчелиного яда определяли по весу сухого остатка после выпаривания растворителя. Эритроциты человека получали из донорской крови, трижды промывая в 10-кратном объеме ФСБ. Слой лейкоцитов удаляли аспирацией после каждого центрифугирования. Тени эритроцитов получали, лизируя клетки в 5 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 8,0, при 0° с последующей троекратной промывкой в этом буфере [18] (тени по Доджу – ДТ) или инкубируя клетки в 1,5 М глицероле при 37° с последующим переносом клеток в ФСБ при 0° (глицериновые тени – ГТ) [19]. В обоих случаях тени осаждали центрифугированием (20 000 g, 20 мин). После обработки лизирующими агентами мембраны осаждали и солюбилизировали в 0,5 мл буфера (0,15 М Tris-HCl, 1%-ный Ds-Na, 0,01%-ный бромфеноловый синий, pH 8,8) 3 мин при 100°. Тени эритроцитов, не обработанные лизинами, использовали в качестве стандартных образцов. Электрофорез мембранных белков проводили в полиакриламидном геле (4–22,5%-ный градиент пористости) согласно методу Джордж и соавт. [20].

Определение гемолиза. Динамику гемолиза эритроцитов и изменения их формы в процессе взаимодействия с мелиттином и другими агентами измеряли спектрофотометрически [21–23]. Суспензия эритроцитов в спектрофотометрической кювете постоянно перемешивалась, а оптическое пропускание при 720 нм непрерывно регистрировалось самопишущим потенциометром. Получаемый фотосигнал при этом обусловлен только малоугловым рассеиванием света эритроцитами, но не поглощением [21–23]. Аликвоты агентов добавлялись непосредственно в кювету с эритроцитарной суспензией из концентрированных маточных растворов. Время смешивания ~2 с. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (20–22°).

Спектроскопия импульсов сопротивления (СИС). Метод СИС, использовавшийся для измерения распределений по объему эритроцитов и теней, описан ранее [24, 25]. Сортировка клеток по размеру осуществлялась на оборудовании типа Coulter-Counter, в котором импульсы сопротивления индуцировались частицами, проходящими через ограничивающее поток отверстие, а скорость потока, проходящего через него, поддерживалась неизменной. Величины импульсов сопротивления представлялись в форме спектров (256-канальные гистограммы), модальные значения пиков которых и другие характеристики анализировались компьютером. В нашей работе было использовано калиброванное отверстие (50 мкм длиной и 50 мкм в диаметре), дающее возможность получить практически полное гидродинамическое фокусирование клеток. Скорость потока в экспериментах была ниже 1 м/с – линейной скорости суспензии, протекающей через отверстие. Каждый цикл измерений анализировал 32 000 клеток. При этом ток, проходящий через отверстие, не превышал 0,2 мА, чтобы избежать электрического пробоя [24] и значительной деформации клеточной мембраны [25], а полученные значения соответствовали истинному объему как эритроцитов, так и их теней (частиц) в суспензии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 показаны кривые изменения оптического пропускания суспензии эритроцитов, экспонировавшихся в средах, содержащих различные концентрации пчелиного яда (*а*) или мелиттина в сочетании с ФА2 (*б*). Введение яда в среду приводит к снижению оптического пропускания, что соответствует

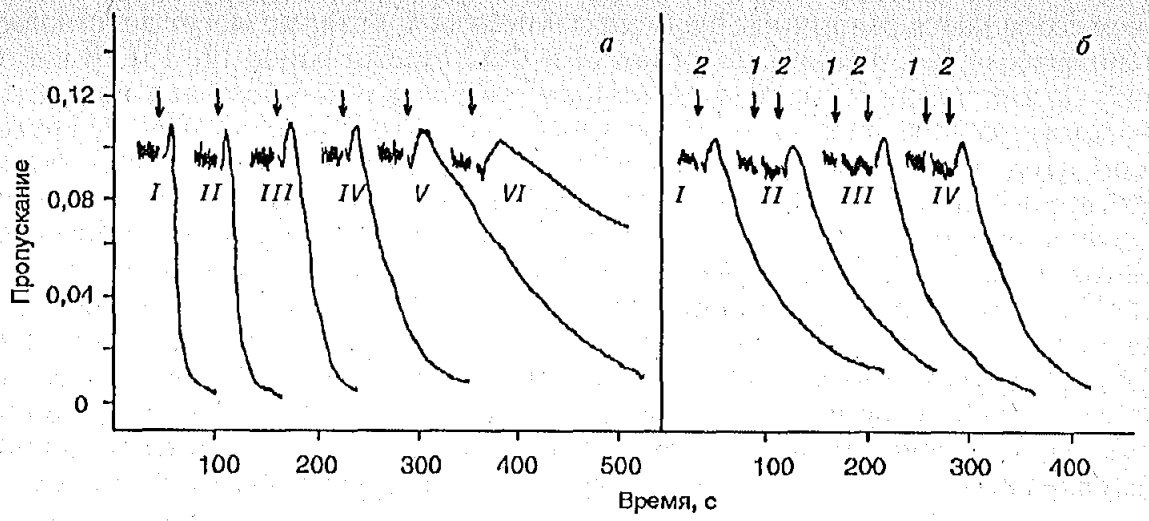


Рис. 1. Динамика гемолиза, индуцированная пчелиным ядом (*а*) или мелиттином и ФА2 (*б*). Конечные концентрации яда: 1,5 (*I*), 1,25 (*II*), 1 (*III*), 0,75 (*IV*), 0,5 (*V*), 0,25 мкг/мл (*VI*). *а* – Стрелка показывает момент добавления яда в суспензию эритроцитов ($7 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл). *б* – Стрелки *1* и *2* показывают момент добавления М в конечной концентрации (1 мкг/мл) и ФА2 в конечных концентрациях: 0 (*I*), 0,05 (*II*), 0,5 (*III*) и 1 мкг/мл (*IV*)

гемолизу эритроцитов. Как было показано ранее [22, 23], сигнал оптического пропускания пропорционален количеству интактных клеток в суспензии и флуктуирует относительно среднего значения. Амплитуда флуктуаций или «шума» максимальна для дискоидных клеток, в то время как сферические клетки дают нулевое значение этого параметра. Амплитуда шума приблизительно пропорциональна концентрации дискоидных клеток в суспензии. Если клетки меняют свою форму, например дискоидную на сферическую, значение шума снижается одновременно с повышением оптического пропускания [22, 23]. Это можно наблюдать на рис. 1, где после добавления в суспензию яда, мелиттина или мелиттина в сочетании с ФА2 происходит снижение величины шума, которая достигает нулевого значения. Это говорит о переходе формы клеток из дискоидной в сферическую с последующим гемолизом. Похожее изменение сигнала, но без дальнейшего гемолиза наблюдалось при обработке эритроцитов красителем бенгальским розовым [23]. Наши микроскопические анализы также подтверждают, что исчезновение шума сопровождается переходом клеток в гладкую сферическую форму (данные не приведены). Подобный эффект наблюдается при обработке клеток детергентами [4] или этанолом [26]. Повышение концентрации ФА2 ускоряет М-индуцированный гемолиз эритроцитов. Однако влияние ФА2 на крутизну кривой гемолиза становится заметным при относительно высоких концентрациях фермента, превышающих его содержание в пчелином яде [2]. Добавление к клеткам только ФА2 в концентрации до 2 мкМ не приводит к гемолизу или изменению формы клеток (не показано), что соответствует ранее опубликованным данным [27, 28]. Изменение объема частиц (клетки плюс тени), наблюдаемое в процессе гемолиза, когда он индуцировался ядом, смесью мелиттина с ФА2 или одним мелиттином, было разным. Влияние яда и мелиттина на изменение объема эритроцитов и изолированных теней (ГТ) показано на рис. 2. В то время как сам мелиттин увеличивает объем частиц, яд и М в сочетании с ФА2 концентрационно-зависимо снижают его. По сравнению с эритроцитами мелиттин лишь незначительно уменьшает объем теней, однако в сочетании с ФА2 (М + ФА2) наблюдалось выраженное снижение объема. Для исключения возможных артефактов, связанных с изменением объема или лизин-индуцированной фрагментацией клеток, мы провели сравнительное изучение динамики изменения клеточного объема в процессе лизиса, вызванного классическими агентами, такими как ХПР,

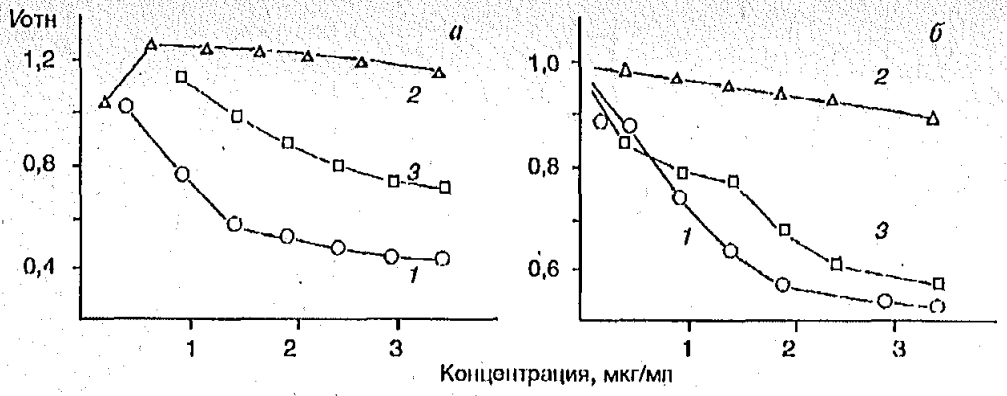


Рис. 2. Зависимость среднего относительного объема $V_{отн}$ эритроцитов (*а*) и теней (*б*) от концентрации пчелиного яда (*1*), мелиттина (*2*) и мелиттина в присутствии ФА2 (1 мкг/мл, *3*). Клетки или их тени в концентрации $7 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл инкубировались в ФСБ в течение 5 мин (pH 7,2) при комнатной температуре. Относительный объем был измерен методом СИС. Иллюстративные данные – из 3–4 экспериментов

тритон Х-100 и сапонин. Динамические кривые лизиса эритроцитов, индуцированного различными агентами, имеют сходство с процессом лизиса, индуцированного мелиттином (рис. 3). Как хлорпромазин (ХПР), так и тритон Х-100 индуцировали быструю трансформацию клеток в сфероциты. Позже наблюдался лаг-период между началом действия агентов и началом гемолиза. Сапонин медленнее трансформировал форму клеток, что имело сходство с действием мелиттина. Лизис, индуцированный хлорпромазином и сапонином, наступал после увеличения объема эритроцитов, что свидетельствует о коллоидно-осмотической природе этого типа гемолиза. Степень набухания была выше в присутствии хлорпромазина. Вместе с тем лизис, индуцируемый тритоном Х-100, сопровождался формированием сильно деформированных частиц (тритоновые тени) [25], что обнаруживалось при изменении скорости потока в СИС-методе. Двукратное увеличение скорости потока сопровождалось 5–6-кратным снижением кажущегося объема. Напротив, тени, образующиеся после действия ХПР, М, М + ФА2 и цельного яда, имели объем, который не зависел от скорости потока, что указывает на более высокую ригидность этих теней по сравнении с тритоновыми тенями. В случае сапонин-индуцированного гемолиза наблюдалось значительное снижение концентрации частиц (клетки плюс тени). Это объясняется тем, что сапонин индуцирует в эритроцитарной мембране крупные поры [29], что в свою очередь приводит к снижению электрического сопротивления мембраны до уровня, не детектируемого в СИС-методе. При всех остальных обработках, включающих мелиттин или М + ФА2, концентрация частиц не изменялась, что, очевидно, означает незначительную фрагментацию клеток. Данные, приведенные на рис. 1,*б*, показывают, что ФА2 при высокой концентрации действует в синергизме с М, ускоряя гемолиз. Тритон Х-100 также сильно стимулирует М-индуцированный гемолиз, действуя при этом в очень низких концентрациях (рис. 4,*б*). Сапонин стимулирует М-индуцированный лизис, но в относительно более высоких концентрациях, в то время как ХПР ингибирует М-индуцированный гемолиз. В последнем случае эффект был одинаковым независимо от того, добавлялся ХПР до или после мелиттина. Это показывает, что ХПР-индуцированное блокирование не является результатом взаимодействия ХПР с М, а обусловлено блокированием М-индуцированных «пор». Аналогичный эффект проявляют дивалентные катионы [7, 8, 17, 30]. Следует обратить внимание на то, что эффект уменьшения объема эритроцитов в присутствии смеси М и ФА2 или пчелиного яда не наблюдается, если клетки обрабатывались М в сочетании с другими агентами. В этом проявляется специфика совместного действия ФА2 и М в отличие от совме-

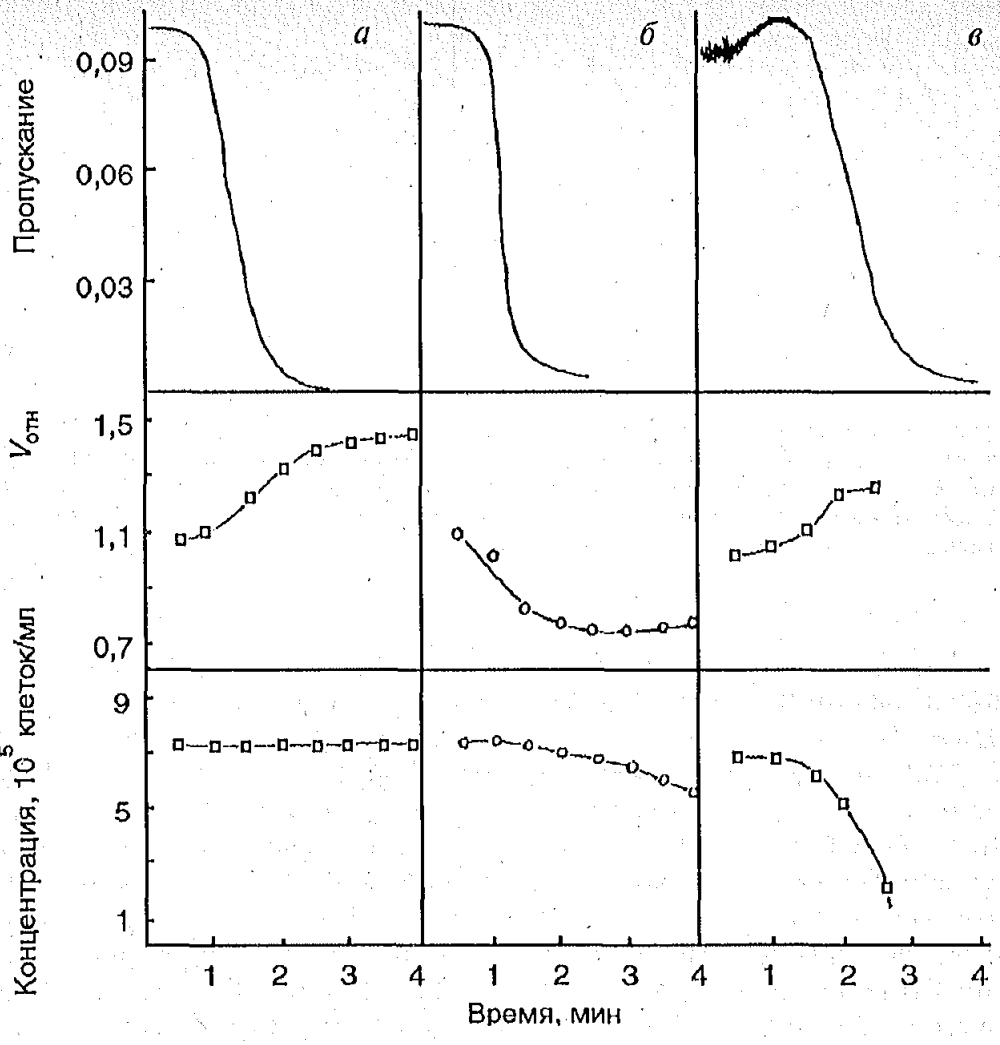


Рис. 3. Динамика изменений пропускания, среднего относительного объема $V_{отн}$ и концентрации частиц в суспензии эритроцитов, индуцированная 100 мкМ хлорпромазином (*а*), тритоном Х-100 (116 мкг/мл, *б*) и сапонином (40 мкг/мл, *в*). Эритроциты ($7 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл) инкубировались в ФСБ, pH 7,2, при комнатной температуре в присутствии тритона Х-100 или сапонина или при pH 6,6 в случае хлорпромазина

стного действия М и других агентов. Для выяснения возможной роли продуктов гидролиза ФА2 в М-индуцированном гемолизе мы провели исследования, в которых фосфолипазная активность повышалась в присутствии Ca^{2+} или понижалась с помощью ЭДТА. В других экспериментах действие продуктов гидролиза моделировалось добавлением в суспензию клеток экзогенных лизолипидов перед их экспонированием с мелиттином. Как видно из рис. 5, ни Ca^{2+}, ни ЭДТА не приводят к заметным изменениям в кривых гемолиза, когда они добавлялись после пчелиного яда. Вместе с тем скорость гемолиза, индуцированного ядом, повышалась, когда яд добавлялся в присутствии ЭДТА (рис. 5, кривая *III*), и снижалась в присутствии Ca^{2+}. Более того, ионы Ca^{2+} существенно замедляли формотрансформацию эритроцитов, индуцированную пчелиным ядом (кривая *V*). Данные об изменении максимальной скорости гемолиза и значений среднего объема клеток, обработанных ФА2 в присутствии Ca^{2+} и ЭДТА, суммированы в таблице. Обращает на себя внимание тот факт, что обработка ФА2 в присутствии Ca^{2+} значительно меняет скорость гемолиза, в то время как объем эритроцитов при этом постоянен. Следовательно, образование гидролитических продуктов фосфолипазой А2 *in situ* не является причиной сжатия клеток, индуцируемого пчелиным ядом или М + ФА2. Включение в эритроцитарную мембрану экзогенных лизолипидов (что проявлялось в повышении оптического пропу-

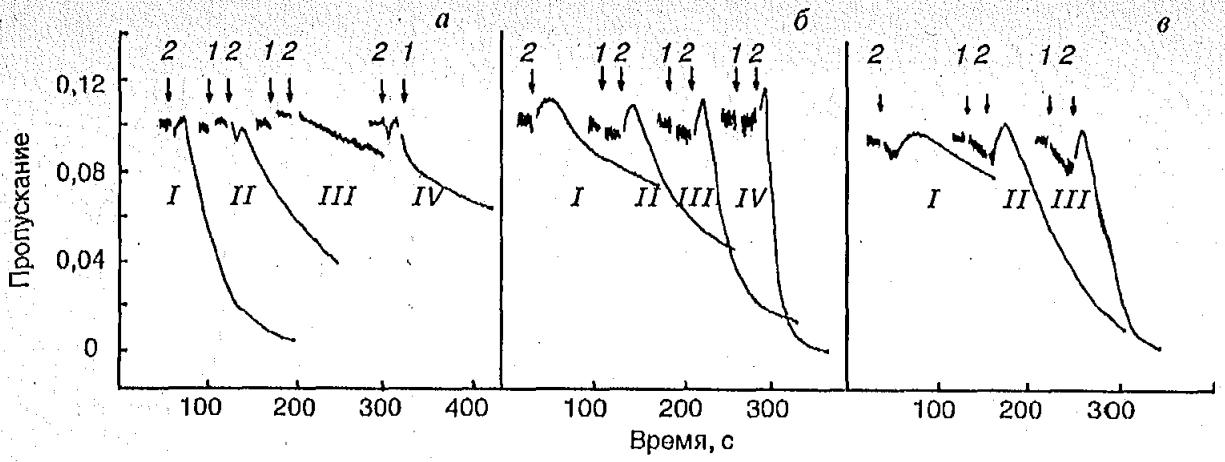


Рис. 4. Влияние хлорпромазина (*а*), тритона Х-100 (*б*) и сапонина (*в*) на М-индуцированный гемолиз. Стрелка *1* показывает момент добавления хлорпромазина, тритона Х-100 или сапонина к суспензии эритроцитов ($7 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл); стрелка *2* обозначает добавление мелиттина в конечных концентрациях 2 (*а*) или 0,75 мкг/мл (*б, в*). *а* – Конечные концентрации хлорпромазина: 0 (*I*), 2,5 (*II*), 12,5 мкМ (*III, IV*). *б* – Конечные концентрации тритона Х-100: 0 (*I*), 0,5 (*II*), 2 (*III*), 3,75 мкг/мл (*IV*). *в* – Конечные концентрации сапонина: 0 (*I*), 15 (*II*), 25 мкг/мл (*III*)

скания и исчезновении его шума, т.е. в трансформации клеток в гладкие сфероциты), приводило либо к стимулированию, либо к ингибированию М-индуцированного гемолиза в зависимости от типа применяемого лизолипида. (В последнем случае также не наблюдался эффект сжатия клеток или теней.) Эти данные показывают, что нет корреляции между гидролитическими свойствами фосфолипазы и ее способностью уменьшать объем клеток при совместном действии с мелиттином. На рис. 6 приведены результаты электрофоретического анализа мембранных белков эритроцитов и теней после обработки мелиттином, М + ФА2, ХПР, тритоном Х-100 и сапонином. Из приведенных данных можно заключить, что, во-первых, мелиттин, тритон и сапонин не меняют белкового состава мембран, полученных из обработанных эритроцитов и теней, по сравнению с контрольными образцами, за исключением белка полосы 6, не обнаруживаемого после обработки; во-вторых, М + ФА2 и цельный пчелиный яд (помимо белка полосы 6) элиминируют из мембран и белок полосы 8; в-третьих, после обработки М + ФА2, ХПР и цельным пчелиным ядом наблюдалось появление дополнительных белковых полос между полосой 8 и гемоглобином, имеющих кажущуюся молекулярную массу 18 и 19 кДа соответственно. Все эти изменения имели сходный характер как для обработанных эритроцитов, так и для изолированных теней. К тому же цельный пчелиный яд практически полностью элиминировал остаточный гемоглобин, который присутствовал в контрольных препаратах теней. Обработка эритроцитов ФА2 в соответствующих концентрациях не приводила к гемолизу или изменению белкового спектра мембран в сравнении с обычными тенями по Доджу (данные не приведены). В то же время аналогичные изменения полипептидного состава, вызванные пчелиным ядом, происходили и в присутствии в инкубационной среде ЭДТА (1 мМ). Это показывает, что остаточный Ca^{2+} (вероятным источником которого может быть яд) не является причиной наблюдаемых изменений. Эти данные позволяют сделать вывод, что пчелиный яд и его компоненты (М + ФА2) в отличие от мелиттина, тритона и сапонина синергично влияют на мембранные белки эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо известно, что мелиттин – основной пептид пчелиного яда – приводит к гемолизу эритроцитов и лизису липидных везикул [1–8, 16, 17].

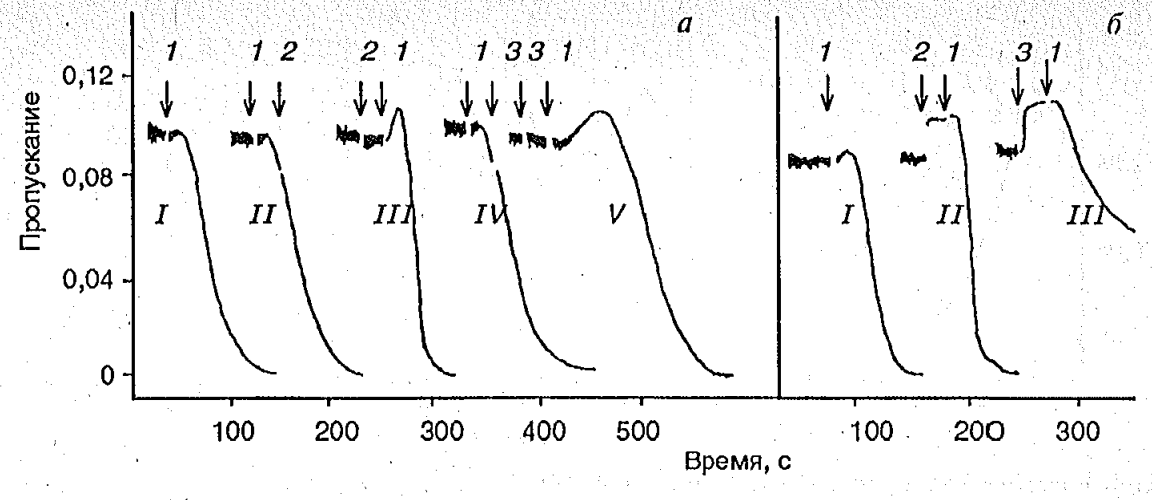


Рис. 5. Влияние Ca^{2+} и ЭДТА на гемолиз, индуцированный пчелиным ядом (*а*), и лизолипидов на гемолиз, индуцированный мелиттином (*б*) в физиологическом растворе на Tris-буфере, pH 7,2. *а* – Стрелка *1* показывает момент добавления яда в концентрации 1 мкг/мл, стрелки *2* и *3* – добавление соответственно ЭДТА или Ca^{2+} до конечной концентрации 1 мМ; *б* – стрелки показывают добавление мелиттина (*1*) до концентрации 1 мкг/мл, L-α-лизолецитина (*5* мкг/мл, *2*), лизолецитин(2-дезокси-1-лаурила) (*0,5* мкг/мл, *3*)

Однако остается неясным, какие особенности в конформации мелиттина ответственны за разрушение мембраны эритроцитов, что приводит к их последующему лизису. Некоторые авторы считают, что в основе механизма лизиса клеток лежат их коллоидно-осмотические свойства [4, 5, 9]. Корреляция, обнаруженная между гемолитической активностью производных мелиттина и их способностью агрегировать ВМЧ, подчеркивает возможную роль взаимодействия мелиттина с мембранными белками в инициации лизиса [10, 11, 15]. Таким образом, процесс разрушения эритроцитарной мембраны, может быть результатом как взаимодействия мелиттина с мембранными липидами, так и с мембранными белками, в особенности с комплексом белка полосы 3 и гликофорина [10, 11]. Наблюдаемая сферуляция эритроцитов и увеличение их объема, происходящие при действии литических концентраций мелиттина (рис. 2), подтверждают предполагаемое внедрение молекул мелиттина в мембрану и образование пор. Последние вначале непроницаемы для гемоглобина, но увеличивают свой размер с повышением концентрации мелиттина [4, 5, 9]. В противоположность мелиттину литическое действие пчелиного яда, содержащего помимо мелиттина различные ферменты [2], приводит к иному изменению объема, несмотря на то, что кривые гемолиза в обоих случаях сходны (рис. 1, 2). В упрощенном виде сжатие клеток можно рассматривать как проявление более комплексного механизма действия мелиттина, когда в инкубационной среде присутствуют дополнительные ферменты. Это относится в первую очередь к гидролитическим свойствам ФА2, которая совместно с М приводит к росту скорости гемолиза и изменению формы клеток (рис. 1) – изменениям, схожим с таковыми, когда к клеткам добавляется пчелиный яд. Следует добавить, что М + ФА2 также приводит к сжатию эритроцитов и их теней. В наших исследованиях в противоположность данным Хабермана [2], который наблюдал сжатие теней фазовоконтрастной микроскопией, ни М, ни ФА2 в отдельности не приводили к сжатию клеток или теней. Подобные результаты были получены Тостесоном и соавт. [9], которые обнаружили набухание эритроцитов и незначительное влияние М на объем теней. Более того, обработка эритроцитов ФА2 в концентрациях, превышающих используемые нами, приводила к кренированию и лишь незначительному набуханию эритроцитов, которые становились более чувствительными к осмотическому гемолизу [27, 28]. При использо-

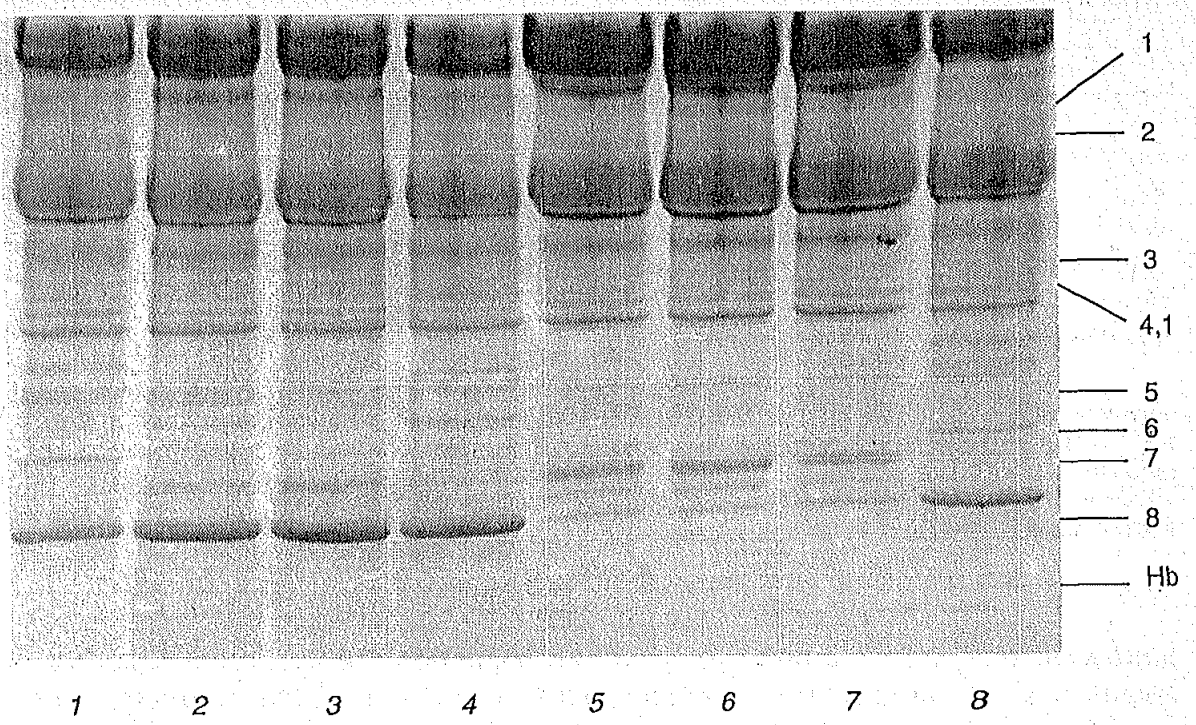
Влияние обработки эритроцитов фосфолипазой А2 на максимальную скорость ($V_{макс}$) М-индуцированного гемолиза и средний относительный объем ($V_{отн}$) эритроцитов до и после взаимодействия с мелиттином

Параметр	Контроль	ЭДТА	Ca^{2+}	ФА2	ФА2 + ЭДТА	ФА2 + Ca^{2+}
$V_{макс}$, $\times 10^{-4} с^{-1}$ (дисперсия 1,0)	8	18	12	8,4	14,8	11.6
$V_{отн}$ (дисперсия 0,03)	1	1,01	1	1	1,01	1,1
$V_{отн}$ после обработки М (дисперсия 0,03)	1,17	1,04	1,23	1,16	1,05	1,18

Примечание. Эритроциты в концентрации $2 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл инкубировались в физиологическом растворе (10 мМ Tris-HCl, pH 7,2) в отсутствие или в присутствии 5 мМ ЭДТА, 5 мМ Ca^{2+} и ФА2 (3 мкг/мл). Клетки инкубировались 1,5 ч при комнатной температуре, после чего динамика гемолиза, индуцированная М (0,5 мкг/мл), измерялась спектрофотометрическим и СИС-методами. Относительный объем эритроцитов был измерен через 5 мин после обработки клеток мелиттином.

вании метода электронной микроскопии образцов после замораживания-скалывания было показано, что обработка ФА2 не нарушала липидный бислой мембран [31] и не приводила к изменению белкового состава мембран, о чем свидетельствовали данные гель-электрофореза [27]. Было установлено также, что значительный гидролиз мембранных липидов не сопровождался гемолизом [27, 28]. В то же время гемолиз, индуцированный лизолецитином, протекал по коллоидно-осмотическому механизму и сопровождался набуханием клеток [32]. Полученные данные подтверждают мнение о том, что синергическое действие ФА2 с мелиттином не связано с ее гидролитическими свойствами, а скорее является результатом действия фермента самого по себе, поскольку: 1) мелиттин-индуцированное сжатие клеток и лизис в присутствии ФА2 происходят сразу же после добавления агента, но до какого-либо значительного гидролиза; 2) применение среды, свободной от ионов Ca^{2+}, которая не является оптимальной для активности ФА2 [33], дает сходный эффект; 3) добавление ЭДТА стимулирует гемолиз, индуцированный пчелиным ядом, в то время как Ca^{2+} ингибирует его (рис. 5); 4) отсутствие изменений объема и формы клеток при добавлении ФА2 показывает, что образуется небольшое количество лизолипидов, поскольку в экспериментальных условиях, приводящих к значительному гидролизу, объем клеток возрастает и формируются эхиноциты [27, 28]; 5) сжатия клеток не происходит после включения экзогенных лизолипидов, которые могут как активировать, так и ингибировать М-индуцированный гемолиз; 6) обработка эритроцитов ФА2 в среде, содержащей ионы Ca^{2+}, не приводит к сжатию клеток, в то время как скорость гемолиза клеток значительно возрастает. Действие М + ФА2 на сжатие эритроцитов и теней коррелирует с элиминацией из мембран белков полос 6 и 8 и появлением нескольких новых низкомолекулярных белков (рис. 6). Каким образом такое изменение мембранных белков связано с литическими процессами – остается неясным. Подобное, но не идентичное явление активации М-индуцированного гемолиза было обнаружено при комбинированном действии мелиттина в присутствии сублитических концентраций тритона Х-100 (рис. 4) и сапонина. Как известно, тритон Х-100 взаимодействует как с мембранными липидами, так и с белками, в результате чего из мембран эритроцитов солюбилизируются липиды и гликопротеины [34, 35]. При этом при физиологических значениях pH образуются тритон-гликофориновые комплексы [36], повышается проницаемость мембран с ограниченной селективностью для ионов K^+ [37], а в клеточных

а



б

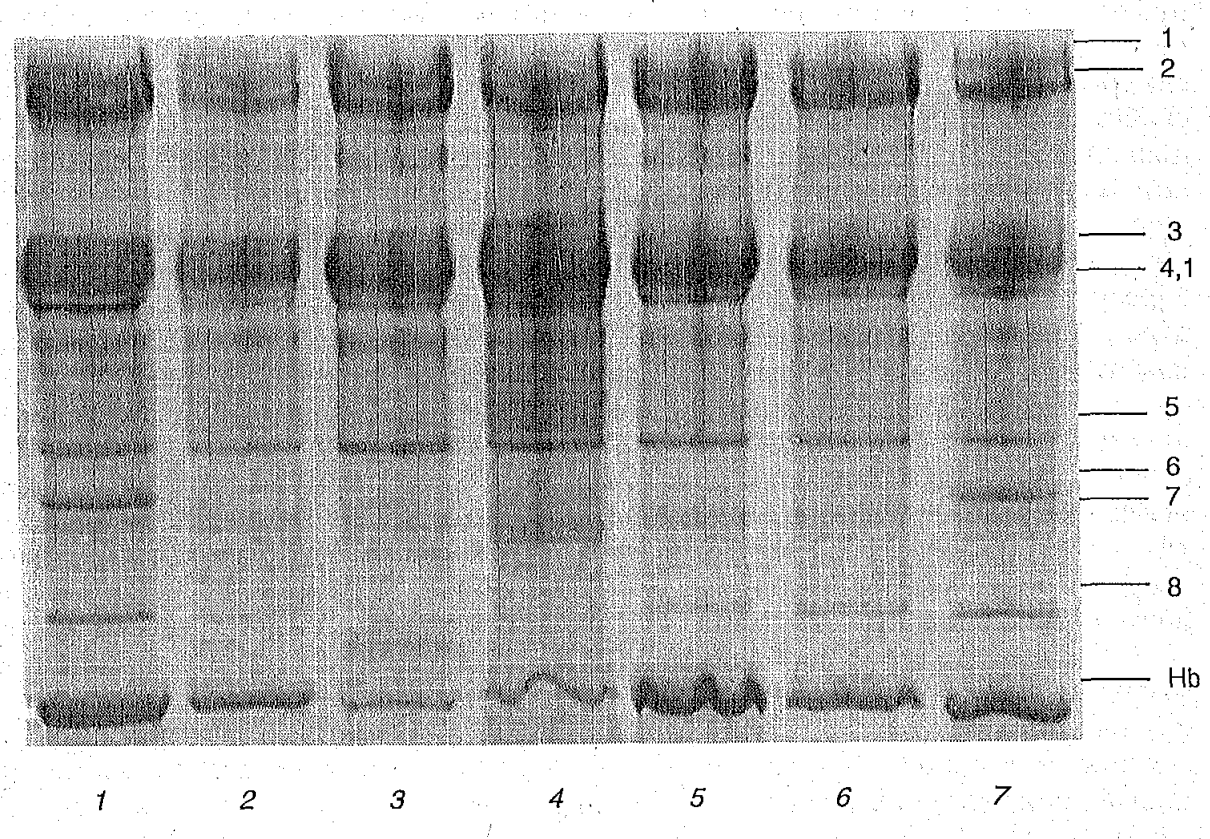


Рис. 6. Элекрофореграммы мембранных белков эритроцитов (полосы *2–4*) и теней (полосы *5–7*), обработанных пчелиным ядом (*а*) или другими агентами (*б*). Эритроциты и тени в концентрации ~ $1{,}3 \cdot 10^9$ клеток на 1 мл инкубировались 10 мин в ФСБ, pH 7,2, в присутствии агентов в следующих концентрациях: *а* – контрольные тени (*1, 8*), 94 (*2, 5*), 47 (*3, 6*), 12 мкг/мл (*4, 7*); *б* – контрольные тени (*1, 7*), мелиттин (30 мкг/мл) (*2*), мелиттин (15 мкг/мл) + ФА2 (7,5 мкг/мл) (*3*), хлопромазин (2,5 мМ) (*4*), сапонин (50 мкг/мл) (*5*), тритон Х-100 (160 мкг/мл) (*6*). Hb – гемоглобин

мембранах образуются поры, чувствительные к дивалентным катионам [8]. Вместе с тем при добавлении детергента в сублитических концентрациях существенного изменения формы и объема клеток не происходило, что обнаружилось методами светорассеяния и СИС, однако детергент значительно повышал скорость М-индуцированного гемолиза (рис. 4). Действие тритона Х-100 на М-индуцированный гемолиз отличалось от такового для сапонина, активировавшего гемолиз только при литических концентрациях. Это означает, что солюбилизация холестерина, с которым взаимодействует сапонин, не является определяющим фактором в М-индуцированном гемолизе. Наконец, ни мелиттин, ни тритон Х-100 или сапонин, взятые в литических концентрациях, не изменяют картины распределения белков при Ds-Na-электрофорезе в препаратах полученных теней (рис. 6). Тот факт, что в этих условиях не происходит сжатие клеток или теней, обработанных мелиттином в присутствии этих агентов, позволяет утверждать, что механизм их стимулирующего действия на М-индуцированный гемолиз отличается от механизма действия ФА2. Последний из использовавшихся нами агентов – ХПР, являясь амфипатическим катионом, переводит клетки в форму стоматоцитов [38] и ингибирует М-индуцируемый гемолиз подобно таким катионам, как Ca^{2+}, Zn^{2+} [7, 8, 30] или полилизин [6]. В отличие от других агентов, использовавшихся в нашей работе, ХПР изменял полипептидные спектры эритроцитов, при этом на электрофореграммах присутствовали новые низкомолекулярные белки, как и в образцах, обработанных М + ФА2 и пчелиным ядом. Это согласуется с особым влиянием ХПР на мембранные белки [39, 40]. Следует напомнить, что сублитические концентрации хлорпромазина не меняют полипептидный состав мембран эритроцитов [41]. Корреляция между гемолитической способностью мелиттина и его производных и агрегацией ВМЧ [10, 11] и характерное противоречие, наблюдаемое между действием мелиттина на эритроциты и липидные везикулы различного липидного состава [6], дают основание предположить, что мелиттин-белковые взаимодействия могут играть существенную роль в процессе лизиса. Хотя точная роль таких взаимодействий остается пока неясной, результаты, полученные в нашей работе, дополнительно подтверждают эту мысль. Очевидно, ФА2 помимо гидролитической активности обладает специфической способностью модулировать взаимодействие М с мембранными белками, что проявляется в контрактильных свойствах эритроцитов и их теней и в изменении белкового спектра мембран, выявленного Ds-Na-электрофорезом. Полученные данные показывают, что белок полосы 8, находящийся в эритроцитарной мембране в тетрамерной форме [42], является весьма вероятным кандидатом на участие в мелиттин-белковом взаимодействии. Мы предполагаем, что другие агенты модифицируют механизм М-индуцированного лизиса с коллоидно-осмотического [3, 4, 13] до структурного [43], когда крупные повреждения могут быть обусловлены усилением мелиттин-белкового взаимодействия. Этот механизм специфичен для ФА2 и отличается от такового при применении детергентов, стимулирующий эффект которых не связан с их влиянием на мелиттин-белковые взаимодействия в мембранах. Можно предположить, что ФА2 и, вероятно, другие ферменты пчелиного яда, являются неэнзиматическими модуляторами цитотоксического действия мелиттина в том смысле, что их эффект не связан с их способностью расщеплять мембранные липиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dempsey, C.E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 143–161.
2. Haberman, E. (1972) *Science*, 177, 314–322.
3. Tosteson, M.T., and Tosteson, D.C. (1981) *Biophys. J.*, 36, 109–116.

4. Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Fujita, Y., Yamamura, H., and Oda, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 983, 135–141.
5. Katsu, T., Ninomiya, C., Kuroko, M., Kobayashi, H., Hirota, T., and Fujita, Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 939, 57–63.
6. Portlock, S.H., Clague, M.J., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1030, 1–10.
7. Bashford, C.L., Rodrigues, L., and Pasternak, C.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 983, 56–64.
8. Alder, G.M., Arnold, W.M., Bashford, C.L., Drake, A.F., Pasternak, C.A., and Zimmerman, V. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 111–120.
9. Tosteson, M.T., Holmes, S.J., Razin, M., and Tosteson, D.C. (1985) *J. Membr. Biol.*, 87, 35–44.
10. Clague, M.J., and Cherry, R.J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 980, 93–99.
11. Hui, S.W., Stewart, C.M., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1023, 335–340.
12. Hu, K.-S., Dufton, M.J., Morrison, I.E.G., and Cherry, R.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 816, 358–364.
13. Dempsey, C., and Sternberg, B. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 175–184.
14. Pawlak, M., Stankowski, S., and Schwartz, G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1062, 94–102.
15. Dufton, M.J., Hider, R.C., and Cherry, R.J. (1984) *Eur. Biophys. J.*, 11, 17–24.
16. Kaszuba, M., and Hunt, G.R.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 985, 106–110.
17. Kaszuba, M., and Hunt, G.R.A. (1990) *J. Inorg. Biochem.*, 40, 217–225.
18. Dodge, J.T., Mitchell, C., and Hanahan, D.J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119–130.
19. Billan, M.M., Finean, J.B., Coleman, R., and Michell, R.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 433, 54–62.
20. Gorg, H., Postel, W., Weser, J., Schiwara, H.W., and Boesken, W.H. (1985) *Science Tools*, 32, 5–9.
21. Ibani, A., and Granoth, R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1027, 199–204.
22. Дегтярев А.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А. (1990) *Авторское свид.* 15733429 СССР.
23. Hoffman, J.E. (1987) *Blood Cells*, 12, 565–586.
24. Richiery, C.V., and Mel, H.C. (1986) *Cell Biophys.*, 8, 243–259.
25. Akeson, S.P., and Mel, H.C. (1986) *Biorheology*, 23, 1–15.
26. Chi, L.-M., Wu, W.-G., Sung, K.-L.P., and Chien, S. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1027, 163–171.
27. Fujii, I., and Tamura, A. (1979) *J. Biochem.*, 86, 1345–1352.
28. Vaysse, J., Pilardeau, P., Gattegno, L., and Garnier, M. (1987) *Brit. J. Haematol.*, 65, 361–365.
29. Lieber, M.R., and Steck, T.L. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 11651–11659.
30. Bashford, C.L., Alder, G.V., Graham, J.M., Menestrina, G., and Pasternak, C.A. (1988) *J. Membrane Biol.*, 103, 79–84.
31. Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., and Van Deenen, L.L.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 178–193.
32. Tanaka, Y., Mashino, K., Inoue, K., and Nojima, S. (1983) *J. Biochem.*, 94, 833–840.
33. Slotboom, A.J., Verheij, H.M., and De Haas, G.H. (1982) *Phospholipids* (Hawthore, J.N., and Ansell, G.B., eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 359–434.
34. Pratt, R.S., and Cook, G.N.W. (1979) *Biochem. J.*, 179, 299–303.
35. MacDonald, R.T. (1980) *Biochemistry*, 19, 1916–1922.
36. Arvinte, T., Schulz, B., Cudd, A., and Nicolau, C. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 981, 51–60.
37. Herzyk, E., and Minc, S. (1986) *Bioelectrochem. and Bioenerget.*, 15, 7–18.
38. Lange, Y. (1984) *Prog. Clin. Biol. Res.*, 159, 137–151.
39. Horie, T., Sugiyama, Y., Awazu, S., and Hanano, M. (1981) *J. Pharm. Dyn.*, 4, 116–122.
40. Lieber, M.R., Lange, Y., Weinstein, R.S., and Steck, T.L. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 9225–9234.
41. Reinhart, W.H., Sung, L.A., Schuessler, G.B., and Chien, S. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 862, 1–7.
42. Mizukami, H., Bartnicki, D.E., and Chaplin, L. (1984) *Progr. Clin. Biol. Res.*, 159, 47–55.
43. DeGrado, W.F., Musso, G.F., Lieber, M., Kaiser, E.T., and Kezdy, F.J. (1982) *Biophys. J.*, 37, 329–338.

Поступила в редакцию
10.08.94
После доработки
01.11.94

CHANGES IN HUMAN ERYTHROCYTES VOLUME AND MEMBRANE PROTEINS INDUCED BY MELITTIN, PHOSPHOLIPASE A2 AND BEE VENOM

S.V. RUDENKO, A.Y. SEMENCHENKO

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

Key words: melittin, phospholipase A2, Triton X-100, saponin, chlorpromazine, erythrocytes, membrane defects.

Human erythrocytes and erythrocyte ghost membranes were treated with melittin (M), phospholipase A2 (PLA2) and whole bee venom. Treatment by whole bee venom or M + PLA2 resulted in a significant decrease of the cell volume, cell spherulation and hemolysis. Used separately, M produced an increase in the cell volume during hemolysis, while treatment with PLA2 stimulated M-induced hemolysis without any effect on the cell shape or volume even at relatively high concentrations. Combined action of M and other agents revealed: stimulation of M-induced hemolysis by Triton X-100 used at concentrations by two orders of magnitude lower than lytic concentrations; saponin acted similarly but at concentrations closer to those known to lyze cells: chlorpromazine inhibited the hemolysis at sublytic concentrations. The effects of these agents on M-induced hemolysis was unaccompanied by a decrease in the cell volume. Erythrocytes or ghosts treated with M + PLA2 or bee venom showed altered SDS-electrophoretic protein patterns: bands 6 and 8 were markedly reduced, while new bands of relatively low molecular weights were identified. The absence of volume or protein pattern changes during detergent-stimulated M-induced hemolysis points to the specificity of M-membrane interactions in the presence of PLA2.