

Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

**БЕРЕСТ ВОЛОДИМИР ПЕТРОВИЧ**

*УДК 577.352*

**БІОФІЗИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРИРОДНИХ МЕМБРАНОТРОПНИХ ПЕПТИДІВ**

03.00.02 - біофізика

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора фізико-математичних наук

Харків - 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна МОН України.

Науковий консультант: доктор фізико-математичних наук, доцент  
член-кореспондент НАН України,  
**Трусова Валерія Михайлівна**,  
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,  
завідувачка кафедри медичної фізики та біомедичних  
нанотехнологій.

**Офіційні опоненти:** доктор фізико-математичних наук, професор  
**Осецький Олександр Іванович**,  
Інститут проблем кріобіології  
і кріомедицини НАН України (м. Харків),  
провідний науковий співробітник лабораторії кріопротекторів;

доктор фізико-математичних наук,  
старший науковий співробітник  
**Єсилевський Семен Олександрович**  
Інститут фізики НАН України (м. Київ),  
провідний науковий співробітник  
відділу фізики біологічних систем;

доктор фізико-математичних наук,  
**Ніколаєнко Тимофій Юрійович**  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
доцент кафедри молекулярної фізики.

Захист відбудеться 24 грудня 2021 року о 15<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 у Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, к. VII-4.

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна МОН України: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4 та на веб-сторінці спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

Автореферат розісланий 24 листопада 2021 року

В.о. вченого секретаря  
спеціалізованої вченої ради



Дмитро БАТРАКОВ

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### Актуальність теми.

Розв'язання біофізичної проблеми механізмів функціонування біомолекул на межі поділу двох фаз та у поверхневому шарі є актуальним оскільки становить підґрунтя для практично важливих застосувань у фармакології – при створенні нових лікарських засобів, біомедицині – для очищення забруднених поверхонь, у біонанотехнологіях – при оптимізації протоколів культивування клітинних культур, екології – для очищення питної води та знезараження стоків, тощо. Серед великої кількості біомолекул особливе місце посідають пептиди, які є найпоширенішими в природі учасниками та регуляторами фізіологічних процесів. Специфічна функція мембранотропних пептидів (МП) залежить від їх первинної послідовності й конформаційної динаміки та полягає здебільшого в регуляції мембранного транспорту, протимікробній активності, опосередкованій впливом на біологічні мембрани та здатністю до проникнення крізь двошарові ліпідні мембрани, впливаючи на метаболізм в цитоплазмі. Вони також є потенційно антигенними сполуками і використовуються як патологічні біомаркери, оскільки їх можна легко виявити та кількісно визначити у різних біологічних рідинах. Широкий спектр функцій мембрано активних пептидів, малий розмір, низька імуногенність, стабільність, можливість хімічного синтезу та/або рекомбінантної експресії, роблять МП найбільш перспективним сімейством сполук з потенційним застосуванням у медичній діагностиці та терапії. Змінюючи первинну структуру МП можна конструювати сполуки зі зміненими біохімічними, функціональними або біофізичними властивостями, використовувати їх для медичної візуалізації *in vivo*, та для функціоналізації наночастинок. Використання комплексів наночастинок з МП дозволить розширити наявний терапевтичний і діагностичний потенціал МП та розробити нові ліки з адресною доставкою.

Серед великої кількості МП увагу в якості терапевтичних мішеней та нових фармпрепаратів привертають МП здатні формувати іонні канали та чинити протимікробну активність.

Пріони викликають летальні нейродегенеративні розлади у тварин і людей, пріонна інфекція може передаватися через видовий бар'єр. Вважається, що хвороба обумовлена перетворенням у патологічну форму ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) мембранного глікопротеїну  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Перетворення  $\text{PrP}^{\text{C}}$  в  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  є конформаційною зміною: клітинна ізоформа  $\text{PrP}^{\text{C}}$  багата альфа-спіралями, тоді як патологічна ізоформа  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  багата бета-лишковими структурами нерозчинними та стійкими до протеаз. Фізіологічна роль  $\text{PrP}$  до кінця не вивчена, припускають, що він виконує функцію підтримки гомеостазу іонів та окислювально-відновної рівноваги всередині клітини. Актуальною задачею є встановлення участі  $\text{PrP}$  у трансмембранному транспорті іонів.

Дослідженню конформаційного переходу від  $\text{PrP}^{\text{C}}$  до  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  часто заважають нерозчинність у воді та патогенність останнього. Синтетичні пептиди дозволяють подолати цю перешкоду. Деякі пептиди, отримані з послідовності людського  $\text{PrP}$ , виявляють амілоїдогенні властивості та здатність до утворення іонних каналів у модельних мембранах. Для пояснення механізмів пріон-індукованих

нейродегенеративних захворювань актуальним є з'ясування ролі певної частини молекули PrP у підтримці гомеостазу іонів у клітині. Для цього необхідно провести дослідження властивостей пептидних фрагментів PrP та їх природних мутантів стосовно утворення іонних каналів та впливу на іонний гомеостаз у внутрішньоклітинних мембранах.

Можливим розв'язанням проблеми зростаючої стійкості мікроорганізмів до існуючих протимікробних препаратів є використання природних антибіотиків. Створення аналогів антибіотиків, або пошук нових можливих антибіотиків і впровадження нового фармпрепарату у медичну практику – довготривалий і коштовний процес. Великі надії в «після-антибіотикову добу» покладають на природні антимікробні пептиди та їх синтетичні аналоги, здатні вбивати бактерії й грибки, що є стійкими до традиційних антибіотиків. Мембрани є мішенню для дії пептидних антибіотиків, однак при цьому, дестабілізація мембран клітин організму хазяїна може перешкоджати системному застосуванню цих антимікробних препаратів. Так, граміцидин S (GS) маючи широкий спектр антимікробної активності, застосовується лише місцево через свою високу гемолітичну активність. Відомі спроби створення аналогів GS, що мають більш високий терапевтичний індекс, який розраховується як відношення гемолітичної активності до антимікробної. Проте молекулярний механізм та фізичні принципи мембранотропної дії GS до цього часу встановлені лише частково.

Позаяк GS взаємодіє неспецифічно з ліпідним бішаром мембран різних клітин, він може порушувати структуру мембран й викликати зміну їх функціональної активності. Дисфункція тромбоцитів або епітеліальних клітин при системному застосуванні мембранотропних пептидів може не менш згубно впливати на організм, ніж гемоліз еритроцитів. Не вивчено взаємодію GS із природними мембранами й не досліджено морфологічні та функціональні зміни клітин при дії GS. Становить інтерес вивчення взаємодії МП, зокрема GS, з мембранами клітин крові та сполучної тканини для з'ясування можливих механізмів підвищення їх терапевтичного індексу, а також вивчення можливості застосування ліпідних везикул різного складу у якості нанорозмірних контейнерів для керованої доставки МП задля зменшення побічних ефектів.

Природно, при зміні стану ліпідного бішару буде змінюватися й взаємодія з ним молекули GS. Однак термотропна поведінка мембран при дії GS була досліджена лише для модельних систем і оцінювалася лише за гемолітичною дією. Актуальним є дослідження взаємодії GS з мембранами клітин крові, штучними мембранами та мембранами клітин, модифікованими різними фізичними й хімічними факторами, що дозволило б більш детально встановити механізм взаємодії й визначити напрямки зниження гемолітичної активності GS без втрати протимікробної дії. Наносії, модифікуючи електростатичні та гідрофобні взаємодії GS, можуть впливати на характер та кінетику взаємодії цього МП з ліпідними мембранами. Вивчення взаємодії МП – наночастинка може виявити нові фармакотерапевтичні властивості сертифікованих лікарських засобів і таким чином сприяти більш ефективному лікуванню з використанням зареєстрованих фармпрепаратів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконувалась відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри молекулярної і медичної біофізики ХНУ імені В.Н. Каразіна за темами: «Механізми впливу фізичних факторів і біологічно активних речовин на ДНК, білки та біомембрани», № держреєстрації 0197U016741; «Дослідження ролі нанорозмірних газових включень у фізичних механізмах біологічної дії електромагнітних хвиль низької інтенсивності», № держреєстрації 0110U001435; «Біофізичні моделі молекулярної взаємодії граміцидину S», № держреєстрації 0118U002041; та NATO Science Fellowship Programme.

**Мета і задачі дослідження.**

**Метою** роботи є встановлення (молекулярних) механізмів модуляції взаємодії мембранотропних пептидів з модельними та природними ліпідними мембранами.

Для досягнення цієї мети вирішувались такі **задачі**:

1. З'ясувати можливість утворення іонних каналів у бішарових ліпідних мембранах (БЛМ) пептидами  ${}_{169}\text{YSNQNNF}_{175}$  та  ${}_{170}\text{SSQNNF}_{175}$ , отриманими з послідовності людського пріону та оцінити можливу участь пептидів у розвитку нейропатологій вивчивши їх вплив на мембранний потенціал та швидкість дихання мітохондрій гіпокампа.
2. З'ясувати, чи є іонним каналом поліпептид, що кодується геном GEF1 в клітинах дріжджів *S. cerevisiae*, та як впливає на активність цього поліпептида його ковалентна модифікація С-кінцевим злиттям з зеленим флуоресцентним білком та колокалізація з маркерним білком апарату Гольджі.
3. Визначити вплив антимікробного пептиду граміцидину S на кінетику зміни форми й функціональну активність тромбоцитів, оцінити енергії активації цих процесів.
4. Дослідити дію температури (в області 4-44°C), перекисного окислення ліпідів і іонізуючого опромінення на характер взаємодії GS з мембранами тромбоцитів і встановити залежність зв'язування GS з мембранами тромбоцитів від стану ліпідів мембрани;
5. Вивчити гемоліз еритроцитів під дією GS у присутності різних модифікаторів мембран та обґрунтувати можливі шляхи підвищення терапевтичного індексу GS; встановити вплив складу мембран еритроцитів на взаємодію з ними GS.
6. Методом флуоресцентної спектроскопії визначити вплив щільності поверхневого заряду ліпідних везикул на зв'язування GS із ліпосомами.
7. Методами НВЧ-діелектрометрії та флуоресцентної спектроскопії визначити зміни ступеня гідратації GS, пептид-ліпідних комплексів, модельних ліпідних везикулярних мембран та клітинних плазматичних мембран при взаємодії з граміцидином S та холестерином.
8. Вивчити сумісну дію GS із речовинами, які модулюють мембранотропну дію: холестерином, зіркоподібним поліаніонним декстран-графт-поліакриламідним сополімером D-g-РАА(PE).

9. Дослідити вплив GS, інкапсульованого у ліпосоми, на морфофункціональні характеристики клітин крові для з'ясування можливості створення нових форм доставки пептиду.

**Об'єктом досліджень** є механізми модифікації взаємодії мембранотропних пептидів з природними та модельними ліпідними мембранами.

**Предмет дослідження** – дія мембраноактивних пептидів на модельні фосфоліпідні та клітинні мембрани, а також їх вплив на морфологічні та функціональні властивості клітин крові та нервової тканини.

**Методи дослідження** – світлорозсіювання, мікрохвильова діелектрометрія, УФ-спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, реєстрація струмів поодиноких іонних каналів, гель-електрофорез, світлова мікроскопія, мікрофлюїдика, імпедансна спектроскопія, проточна цитометрія, математичне моделювання.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Вперше встановлено, що заміна полярної амінокислоти аспарагіну на серин у пептиді з послідовності людського пріона PrP [170-175] N171S, сприяє агрегації пептиду у бішарових ліпідних мембранах з формуванням катіон-селективного іонного каналу.

Знайдено немонотонну залежність мембранотропних ефектів циклічного олігопептиду GS від вмісту холестеролу в мембрані, яка пояснює атенуацію гемолітичного ефекту пептиду при використанні холестеринових допантів.

Уперше показано можливість модуляції зв'язування GS з модельними ліпідними мембранами у присутності холестерину та поліаніонного зіркоподібного декстран-поліакриламідного кополімеру шляхом зміни сорбції GS на мембрану, а також сприянням зв'язуванню з мембраною олігомерів GS.

Вперше встановлено, що GS у сублітичних концентраціях викликає сферуляцію та веде до активації тромбоцитів за рахунок зміни проникності мембрани тромбоцитів для іонів  $Ca^{2+}$ .

Вперше показано, що GS зумовлює розпад агрегатів тромбоцитів, сформованих під дією природних індукторів агрегації. Показано, що GS дозо-залежним чином гальмує АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів, знижуючи як швидкість, так і ступінь агрегації.

Встановлено, що зменшення впорядкованості ліпідів у бішарі при гамма-опроміненні чи перекисному окисленні ліпідів мембран тромбоцитів та еритроцитів веде до полегшення вбудовування грамїцидину S до мембрани і, водночас, до зменшення міцності зв'язування пептиду з мембранами. Модифікація структурно-динамічного стану ліпідного бішару мембран гамма-опроміненням, перекисним окисленням ліпідів чи фармпрепаратами змінює гемолітичну активність циклопептидного GS.

Вперше зареєстровано токи поодиноких іонних каналів реконституйованого в БЛМ CLC-подібного білка Gef1 дріжджів *S. cerevisiae* та визначено, що поліпептид Gef1p є потенціал-керованим мембранним каналом для іонів  $Cl^-$ .

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дисертаційного дослідження розширюють і поглиблюють сучасні уявлення щодо механізмів дії мембранотропних пептидів й ролі в цьому процесі змін гідратації, мікрров'язкості та

ліпідного складу мембран. Встановлено можливість спрямованої модифікації структури мембран для підвищення їх стійкості до літичної дії антимікробного пептиду GS. З'ясовані біофізичні механізми вбудовування GS у мембрани клітин крові можуть бути використані для створення аналогів та нових лікарських форм мембранотропних препаратів.

Детальний аналіз мембранних та клітинних ефектів GS дозволяє створити методіку використання GS у якості тест-системи для виявлення патологічного стану організму та дослідження молекулярних механізмів перебудови в біооб'єктах за умов їх взаємодії з біологічно активними речовинами, наночастинками.

Відкрите у роботі явище індукованої GS дезагрегації тромбоцитів і встановлене пригнічення пептидом утворення агрегатів може бути використано для розробки антиагрегаційних та тромболітичних препаратів місцевої дії з антибактеріальним ефектом.

Відзначене п'ятикратне зменшення гемолітичної концентрації циклопептиду GS при інкапсуляції у ліпідні нанорозмірні везикули, створює підґрунтя для використання ліпосом для керованої доставки антимікробних пептидів і зменшення побічних ефектів ліків. Застосування полімерного декстран поліакриамідного наноносія відкриває можливість керування клітинними ефектами GS через комплексоутворення з іншими біологічно-активними речовинами.

#### **Особистий внесок здобувача.**

Наукові праці, в яких опубліковано результати дисертації, виконано у співавторстві. У всіх наведених роботах [1-41] здобувач брав безпосередню участь у постановці задачі, плануванні та проведенні експериментів, обробці результатів, інтерпретації експериментальних даних та написанні статей. Експерименти з реєстрації струмів поодиноких іонних каналів, утворених мембраноактивними пептидами; дослідження агрегації та дезагрегації тромбоцитів і гемолізу еритроцитів методом світлорозсіювання, математичного моделювання; створення апаратно-програмних вимірювальних комплексів, результати яких опубліковано в роботах [1-15, 20-30, 33-41], виконано автором самостійно. У роботах [31,41] постановку задачі та інтерпретацію результатів виконано спільно з Січевською Л.В., дані флуоресцентної спектроскопії, результати яких опубліковано в роботах [35, 41] отримано Січевською Л.В. У роботах [18,19,31,41] постановку задачі, інтерпретацію результатів виконано спільно з Горобченко О.О., НВЧ-діелетрометричні вимірювання, результати яких опубліковано в роботах [18, 19, 31, 41], виконано Горобченко О.О. У роботах [31, 32, 38, 39] постановку задачі та інтерпретацію результатів виконано спільно з Ващенко О.В., дані ДСК отримано й оброблено Будянською (Свечніковою) Л.В., спектри FTIR отримано Софроновим Д.С. В роботах [1-3, 14, 15, 21, 24-27] експерименти з GS було проведено спільно з О. В. Хакл. Зразки, які було досліджено, й мікроскопічні експерименти, представлені в [16] були отримані в співпраці з Мироною Г.Д. Опромінення та вимірювання зразків в [17] проведено спільно з Алмазовою О.Б. Обговорення та інтерпретацію результатів досліджень проведено спільно із співавторами робіт. Автором сформульовано та обґрунтовано висновки, узагальнення та положення всіх розділів дисертації. Таким чином, особистий внесок дисертанта є визначальним.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи за темою дисертації доповідались і обговорювались на:

- XIV Міжнародному біофізичному конгресі IUPAB 2002, (27 квітня - 1 травня 2002, Буенос Айрес, Аргентина);
- 28 International and 3 European Peptide Society Congress. – Prague, Czech Republic, September 5-8, 2004.
- 29th European Peptide Symposium (Gdansk, Poland, September 3 - 8, 2006);
  - IX Українському біохімічному з'їзді (Харків, 24-27 жовтня, 2006);
- IV, VI, VII та VIII З'їздах Українського біофізичного товариства (Донецьк, 19-21 грудня 2006 р.; Луцьк, 8–30 травня 2015 р.; Київ, 29-31 жовтня 2018 року; Київ і Луцьк, 12-15 листопада 2019 р.);
- 2nd Workshop on Biophysics of Membrane Active Peptides (Lisbon, Portugal, 1 - 4 April 2007)
- XI та XIII Міжнародних конференціях по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці (Київ, 4-6 листопада 2010 р.; Київ, 18-20 жовтня 2018 р.)
- VIII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ», г. Севастополь, 23 - 27 апреля 2012 г.
- 9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals, September 4-7, 2018, Odessa, Ukraine.
- IEEE 2nd and 3rd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering UKRCON (Lviv, July 2 - 6, 2019; Lviv, Ukraine, August 26 – 28, 2021)
- 8-th International Conference on Advanced Optoelectronics and Lasers, September 6 – 8, 2019. Sozopol, Bulgaria, 2019.
- 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> International Conference “NANOBIOPHYSICS: fundamental and applied aspects” (Kyiv, 1-4 October 2019, Kharkiv, 4 – 8 October 2021, Ukraine)
- XII International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials”, 1–5 червня 2020 р., Кам'янець-Подільський.

**Публікації.** Результати дисертації опубліковано в 41 науковій праці, у тому числі в 21 статті у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах (з них 2 статті у виданнях, що входять до перших двох квартилів Q1/Q2 та 3 статті – до третього квартиля за класифікацією SCImago Journal and Country Rank) та в 20 матеріалах і тезах доповідей з'їздів, конгресів, конференцій. 14 робіт проіндексовано у наукометричних базах Scopus та/або Web of Science.

**Структура й обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, шести розділів, висновків і містить 101 рисунок та 10 таблиць, список використаних джерел 285 найменувань. Повний обсяг дисертації складає 321 сторінку.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**У вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми, сформульовано мету і задачі дослідження, визначено наукову новизну, практичну й теоретичну цінність отриманих результатів, наведено загальну структуру дисертації.

**У розділі 1** викладено огляд літератури за темою дослідження. У ньому розглядаються сучасні дані про структуру вивчених пептидів, плазматичних мембран клітин, ультраструктуру тромбоцитів й еритроцитів.



Вивчення можливості системного використання високоефективних місцевих антибіотиків або їх аналогів є однією з перспектив подолання зростаючої стійкості мікроорганізмів до традиційних антибіотиків. У випадку з мембраноактивними протимікробними препаратами мова йде про зниження їх літичної активності стосовно клітин організму хазяїна зі збереженням або збільшенням антибіотичної активності. Зміна мембранної проникності цитотоксичними антибіотиками не є специфічною, тому літичні концентрації останніх можуть викликати порушення функції й інших клітин крові.

Вказано, що для циклічного поліпептидного антибіотика GS показана можливість створення його аналогів зі зниженою гемолітичною активністю. Однак власне гемолітична активність GS досліджена недостатньо, а його взаємодія із клітинами крові практично й зовсім не вивчалася. Відзначено, що молекула GS не має специфічного білкового рецептора, вона взаємодіє безпосередньо з фосфоліпідами мембран. Напочатку взаємодії молекула GS фіксується на мембрані, зв'язуючись електростатично за допомогою  $\text{NH}^{3+}$ -груп L-орнітину з негативно зарядженими залишками фосфорної кислоти ліпідних молекул. Далі такий ліпід-граміцидиновий комплекс занурюється в мембрану.

У вступі детально розглянуто молекулярні механізми активації та агрегації тромбоцитів, проаналізовано механізм стійкості мембрани еритроцитів до дії літичних агентів. Визначено структурні зміни ліпідного бішару та плазматичних мембран клітин при дії температури, іонізуючого опромінення та при індукованому перекисному окисленні ліпідів (ПОЛ). На підставі аналізу літературних джерел передбачається, що при зміні стану ліпідного бішару буде змінюватися й взаємодія з ним молекули GS.

У розділі 2 наведено характеристику об'єктів та методів досліджень. Об'єктами досліджень були способи модифікації мембранотропних ефектів МП на модельні фосфоліпідні мембрани; мембрани нативних й опроміненених тромбоцитів та еритроцитів людини; мітохондрії гіпокампа.

Реєстрацію токів поодиноких іонних каналів виконували з використанням бішарових ліпідних мембран. Пласку ліпідну мембрану утворювали шляхом нанесення дисперсій фосфоліпідів на отвір діаметром 250 мкм, який розділяв дві камери (внутрішній об'єм *цис* 1,8 мл; *транс* 0,5 мл). Використовували розчин синтетичних ліпідів PS:PE (1:3) (Avanti Polar Lipids) або азолектину (Sigma) в *n*-декані в концентрації 25 мг/мл. Формування та витончення бішару контролювали за допомогою вимірювань ємності. Електричні з'єднання були здійснені за допомогою електродів Ag/AgCl та агарових містків з 3М KCl для мінімізації потенціалів поляризації. Злиття везикул, що містили пептид з бішаровою мембраною проводили у градієнті 150/600 мМ TEA-Cl, 20 мМ HEPES, pH 7,4 (*цис*/ *транс*). Всі вимірювання проводили при кімнатній температурі. Силу струму вимірювали за допомогою двоканального підсилювача (модель ID 562, IDB, Gwynadd, Великобританія). Сигнали були відфільтровані на частоті 0,2 кГц (4-полосний фільтр Бесселя низьких частот (Warner), оцифровані (аналого-цифровий перетворювач 1401 Cambridge Electronic Design, Великобританія) та передані на ПК для аналізу в режимі офлайн у пакетах для електрофізіології CED V6. 41 та pCLAMP8 (Axon Lab).  $P_o$  – ймовірність

перебування каналу у відкритому стані розраховували згідно з описом програми pCLAMP 8 для Fetcham та pSTAT (Фостер-Сіті, США).

Методами флуоресцентної спектроскопії та НВЧ-діелектрометрії досліджено комплекси GS з модельними ліпідними мембранами. Одношарові ліпосоми діаметром 100 нм із суміші фосфоліпідів отримували методом екструзії. В якості робочих розчинів використовували 10% етанольний розчин фосфатидилхоліну, етанольний розчин кардіоліпіну 5 мг/мл, розчин холестерину в хлороформі 10 мг/мл. Варіювання ліпідного складу ліпосомальних мембран молекулами кардіоліпіну та холестерину дозволяє модулювати щільність поверхневого заряду ліпосом та щільність упаковки ліпідних вуглеводневих хвостів в бішарі, відповідно. Ефективність комплексоутворення GS з модельними мембранами оцінювали з застосуванням флуоресцентного зонду пірену. Реєстрацію спектрів флуоресценції пірену в ліпосомальних мембранах в присутності GS в інтервалі концентрацій (0 – 80) мкМ здійснювали на спектрофлуориметрі «Hitachi-850 (Японія)» у кварцевих кюветах 1 см при 22-24°C.

Величину комплексної діелектричної проникності  $\varepsilon^*$  вимірювали за допомогою мікрохвильового діелектрометра резонаторного типу на робочій частоті 9,2 ГГц. Діелектрометрія дозволяє досліджувати процеси релаксації та виявляти унікальну інформацію щодо динамічних та структурних особливостей досліджуванних об'єктів, є чутливою до міжмолекулярних взаємодій, з'ясовує зв'язок між фізичними властивостями об'ємної фази та окремих компонентів складних суспензій чи досліджуваних зразків.

Зникнення поляризації молекул діелектрика після вимкнення зовнішнього поля завдяки тепловому руху описується функцією діелектричної поляризації  $\varphi(t)$

$$\varphi(t) = \frac{\vec{P}(t)}{\vec{P}(0)} \quad (1)$$

де  $\vec{P}(t)$  – вектор поляризації. Для діелектриків у змінному полі вектор індукції  $\vec{D}(t)$  має вигляд:

$$\vec{D}(t) = \varepsilon_0 \left[ \varepsilon_\infty \vec{E}(t) + \int_{-\infty}^t \dot{\Phi}(t') \vec{E}(t-t') dt' \right] \quad (2)$$

де  $\vec{D}(t) = \varepsilon_0 \vec{E}(t) + \vec{P}(t)$ , а функція діелектричного відгуку  $\Phi(t) = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)[1 - \varphi(t)]$  в якій  $\varepsilon_s$  та  $\varepsilon_\infty$  – статична та високочастотна діелектричні проникності. Комплексна діелектрична проникність  $\varepsilon^*(\omega)$  пов'язана із функцією релаксації:

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \hat{L} \left[ -\frac{d}{dt} \varphi(t) \right] \quad (3)$$

де зображення Лапласа  $F(\omega)$  довільної часозалежної функції  $f(t)$  визначається як

$$\hat{L}[f(t)] \equiv F(\omega) = \int_0^{\infty} e^{-\omega t} f(t) dt \quad (4)$$

тут  $p = x + i\omega$ , при  $\omega \rightarrow 0$ .

Коли макроскопічна релаксація відбувається за експоненціальним законом

$$\varphi(t) = \exp(-t/\tau_m) \quad (5)$$

у якому  $\tau_m$  – час релаксації, для розрахунку комплексної діелектричної проникності використовується формула Дебая:

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \frac{1}{1 + i\omega\tau_m} \quad (6)$$

За наявності кількох релаксаційних процесів у зразку не-Дебаєвська поведінка  $\varepsilon^*(\omega)$  пояснюється певним неперервним розподілом  $G(\tau)$  часів релаксації

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \int_0^\infty \frac{G(\tau)}{1 + i\omega\tau} d\tau \quad (7)$$

Найчастіше для опису таких процесів використовують емпіричну формулу Гавриляка-Негамі:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{[1 + (i\omega\tau_m)^\alpha]^\beta}, \quad 0 \leq \alpha, \beta \leq 1 \quad (8)$$

в якій  $\alpha$  та  $\beta$  визначають з апроксимації дисперсійних залежностей.

На відміну від широкосмугової діелектричної спектроскопії, яка використовує частотні залежності для дослідження дисперсійних характеристик об'єктів, ми використовували резонаторний метод на частоті релаксації вільної води. Для визначення часу релаксації використовували формулу Дебая для одного релаксаційного процесу – деполяризації молекул об'ємної води. Такими чином, молекули води слугували індикаторами змін структури та міжмолекулярних взаємодій у досліджуваних мембранних системах.

За зсувом резонансної частоти при навантаженні циліндричного резонатора зразком ми визначали дійсну частину  $\varepsilon'$  комплексної діелектричної проникності, а за зміною добротності резонатора з урахуванням низькочастотної провідності визначали діелектричні втрати  $\varepsilon''$  досліджуваних зразків. Замість частотного виконували «сканування» зразків за температурою, вимірюючи  $\varepsilon'$  та  $\varepsilon''$  в інтервалі від 4 до 40°C.

При вивченні температурної залежності часу релаксації води у зразках штучних мембран та клітинних суспензій використовували феноменологію хімічної кінетики для опису залежності константи швидкості реакції  $k(T)$  від температури, яка базується на теорії перехідного стану, коли частика долає потенціальний бар'єр  $E_a$  для переходу між двома станами:

$$k = \frac{k_B T}{\hbar} \exp\left(\frac{\Delta S}{k_B} - \frac{\Delta H}{k_B T}\right) \quad (9)$$

$\Delta S$  – ентропія,  $\Delta H$  – ентальпія переходу,  $\hbar$  – стала Планка.

Вважаючи, що час релаксації  $\tau \sim 1/k$  рівняння (9) використовували для опису температурної залежності часу діелектричної релаксації, вважаючи активаційним бар'єр для переходу між вільною водою, та водою включеною до складу гідратних оболонок макромолекул чи мембран.

Зв'язування GS з мембранами клітин крові оцінювалося опосередковано, на підставі аналізу світлопропускання або світлорозсіювання при агрегації, дезагрегації та лізисі клітин. У роботі використовувався розчин GS в 0,15 М NaCl (рН 7,4) у концентрації 4-80 мкмоль/л.

Досліди проведено на зразках крові 126 здорових донорів обох статей (Харківський обласний центр служби крові, добровольці). Зразки крові 24 пацієнтів з різними патологіями серцево-судинної системи були люб'язно надані Харківським Інститутом загальної та невідкладної хірургії НАМН України. Збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП) виділялась з крові, стабілізованої глюгіциром 4:1, шляхом центрифугування протягом 10 хв. при 167g, а безтромбоцитарна плазма (БТП) – центрифугуванням ЗТП впродовж 15 хв. при 1100g. Зразки ОТП розводилися безтромбоцитарною плазмою до концентрації тромбоцитів  $2,5 \times 10^5 \text{ мм}^{-3}$ . Концентрація клітин визначалася за допомогою світлової мікроскопії в камері Горяєва.

Агрегацію тромбоцитів викликали додаванням до 0,9 мл ЗТП 0,1 мл розчину індуктора. У роботі використовувались такі індуктори агрегації: АДФ (аденозин-5'-дифосфорна кислота динатрієва сіль у концентраціях  $2 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$  М), адреналін ( $2 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$  М), пероксид водню ( $7,1 \cdot 10^{-3}$  М). Зміну світлопропускання ЗТП під час агрегації реєстрували за допомогою агрегометра «Solar AP2110». Вимірювання проводилися в інтервалі температур 4–44°C. Щоб викликати дезагрегацію тромбоцитів, розчин GS в об'ємному співвідношенні ЗТП:GS=11:1 додавали до ЗТП через 10 хвилин після початку агрегації.

Еритроцити виділяли шляхом дворазового відмивання центрифугуванням у фізіологічному розчині протягом 10 хвилин при 146 g і протягом 10 хвилин при 168 g. Середня концентрація еритроцитів складала  $10^6$  кл/мл. Всі виміри проводилися не пізніше 48 годин з моменту забору крові. Гемоліз еритроцитів реєстрували за зміною мутності суспензії еритроцитів на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі  $\lambda = 670$  нм. Для модифікації поверхні еритроцитарної мембрани клітини попередньо інкубували у присутності нейрамінідази або трипсину. Лінійну швидкість клітин у електричному полі визначали у мікроелектрофоретичній камері за допомогою світлового мікроскопу «MicroMed XS-3330» з цифровою камерою «DCM-900 9.0 Mpixels». Електрофоретичну швидкість та дзета-потенціал еритроцитів розраховували за формулою Смолуховського.

Для модифікації в'язкості ліпідного бішару використовували  $\alpha$ -токоферол (розчин у гексані (50 мкг/мл)), який додавався по 25 мкл до 1 мл ЗТП або еритромаси. Для активації неферментативного ПОЛ перед дослідженням агрегації ЗТП витримували при кімнатній температурі 15 хвилин з 0,5 мМ аскорбіновою кислотою й 12 мкМ сіллю Мора, так само вчиняли при активації неферментативного ПОЛ в мембранах еритроцитів.

Зразки ЗТП у скляних контейнерах, опромінювали (у дозах 10 Гр, 20 Гр, 50 Гр, 100 Гр, 250 Гр) на обладнанні закритого типу "Дослідник". Потужність випроміненої дози гамма-променів  $^{60}\text{Co}$  в активній зоні становила 500 Р/хв.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням стандартних пакетів прикладних програм Microsoft Excel 2003, OriginPro 7.0. Розраховували

середні значення варіант у групі з 4-12 зразків та середньоквадратичні відхилення. Перевірку статистичних гіпотез в групах проводили в залежності від виду розподілу з використанням параметричних (t-критерій Стьюдента, F - критерій Фішера) та непараметричних (U — критерій Манна-Уїтні) критеріїв. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

У розділі 3 наведено результати експериментального дослідження біофізичних властивостей та наслідків модифікації МП, які утворюють іонні канали в природних та модельних мембранах, зокрема здатності рекомбінантного поліпептиду Gef1 утворювати іонні канали в модельних ліпідних мембранах та вивчення впливу його ковалентної модифікації та колокалізації з маркерним білком апарату Гольджі пекарських дріжджів *S. cerevisiae* Mnt1<sub>mys</sub> на його функціональну активність.

Для того, щоб з'ясувати, чи дійсно Gef1<sub>p</sub> є хлоридним каналом ми використовували спосіб включення збагачених Gef1<sub>p</sub> мікосом до ліпідного бішару (БЛМ). У мікосомальних фракціях штаму з підвищеним (у порівнянні з диким типом) рівнем Gef1<sub>p</sub> ми виявили наявність аніоселективної хлоридної каналоподібної активності. У штама, позбавленого Gef1<sub>p</sub> ( $\Delta$ gef1), така активність відсутня.

Для клітинного фракціонування та імуноблот-аналізу клітини дріжджів гомогенізували. Мікосомальну фракцію, для використання в експериментах з реконституції в БЛМ, було отримано після осадження органелярної фракції шляхом центрифугування. Мікосоми були отримані з трьох незалежних культур. Для візуалізації химерних білків, позначених GFP та *mys*, на вестерн-блотах зразки білків піддавали SDS-PAGE та маркували поліклональними анти-GFP антитілами (Living Colors, Clontech) або анти-*mys* моноклональними антитілами (Інвітроген).

Химерний білок Gef1-GFP присутній у мікосомальній фракції. Для підтвердження цього ми вивчали розподіл злитого білка в різних клітинних фракціях. Рис. 1 показує результати фракціонування клітин штаму KFY19, що несе плазмиду pKF19. За допомогою імунологічного мічення химерний білок Gef1-GFP виявлено у субклітинних фракціях, отриманих шляхом диференціального центрифугування клітинного гомогенату при 105000g. Нижня панель на рис. 1 засвідчує відсутність у мікосомальних фракціях мітохондріального дебрису. Така сама процедура виділення була застосована до двох штамів: KFY19 (що виробляє надлишок Gef1<sub>p</sub>) та RGY84 (позбавленого Gef1<sub>p</sub>).

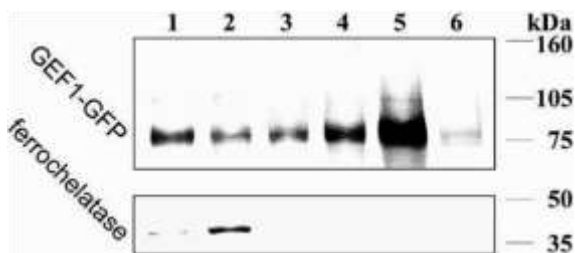


Рис. 1. Розподіл білка Gef1-GFP в клітинних фракціях штаму KFY19 за даними імуноблотингу  
Верхня панель: SDS-PAGE доріжки 1-5 – клітинні фракції, що осідають на 4000g, 12000g, 20 000g, 40 000g та 105 000g відповідно, доріжка 6 є фракцією цитозолу. Нижня панель: ті ж зразки досліджували антитілом до ферохелатази *S. cerevisiae*

Утворення аніонних каналів в плоских бішарових мембранах мікосомальними везикулами, збагаченими пептидом Gef1

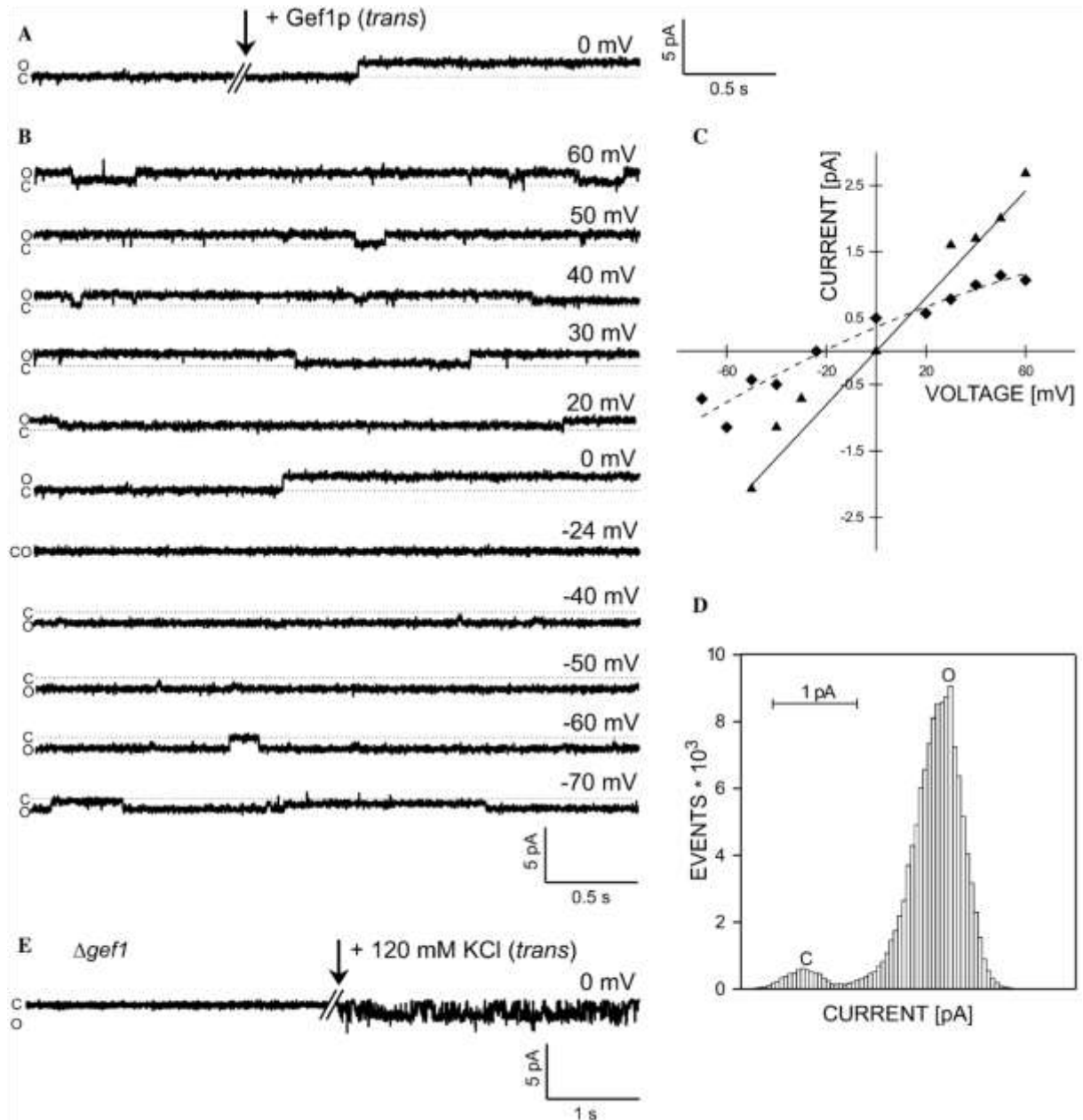


Рис. 2. Реєстрація струмів поодиноких хлоридних каналів, утворених Gef1 в БЛМ.

*C* та *O* вказують на стан закритого та відкритого каналів відповідно. (A) Записи струмів в градієнті TEA-Cl 150/600 мМ (цис/транс) до і після додавання (стрілка) мікросом з Gef1p, при 0 мВ. (B) Записи струмів поодинокого пептидного каналу при різних напругах. (C) Вольт амперні характеристики каналу у градієнті TEA-Cl 150/600 мМ ( $\blacktriangle$ ) та в симетричному розчині TEA-Cl 600/600 мМ ( $\blacklozenge$ ). (D) Струмова залежність розподілу перебування каналу у закритому та відкритому стані у градієнті TEA-Cl 150/600 мМ при 0 мВ. (E) Часова залежність струмів контрольного штаму Rgy84 у градієнті TEA-Cl 150/600 мМ при 0 мВ. Від'ємний напрямок уздовж вісі струму вказує на катіонний струм при 0 мВ.

Мікросоми, збагачені білком Gef1, були реконститутовані в бішарову ліпідну мембрану, в цих зразках зареєстровано струми, характерні для аніоноселективного каналу (рис. 2). У контрольних зразках, отриманих із штаму  $\Delta gef1$  RGY84, таких струмів не виявлено (рис. 2E). Часові залежності токів поодиноких іонних каналів записували у градієнті TEA-Cl 150/600 мМ (цис/транс) та в симетричних

600/600 мМ ТЕА-СІ. ТЕА-СІ був використаний для покращення вимірювань активності аніонних каналів, оскільки він блокує калієві канали. На рис. 2С наведено розраховані вольт-амперні характеристики утворених поодиноких каналів в тому ж градієнті та в симетричному розчині ТЕА-СІ 600/600 мМ. Потенціал реверсії становив  $24 \pm 4,7$  мВ для градієнта ТЕА-СІ 150/600 мМ. Такий зсув свідчить, що досліджуваний канал є аніон-селективним. У симетричному розчині ТЕА-СІ 600/600 мМ канал має провідність  $42 \pm 4$  пСм ( $n=4$ ), що відповідає приблизно 10 пСм у симетричному 150 мМ розчині КСІ. З гістограми на рис. 2D ми робимо висновок, що досліджуваний канал залишається переважно у відкритому стані.

Хоча формально не можна виключити, що білок Gef1 є лише допоміжним фактором для ще не ідентифікованого справжнього дріжджового CLC-каналу, наші результати свідчать, що Gef1p – аніон-селективний, потенціал-залежний канал. Модифікація досліджуваного пептиду шляхом його ковалентного з'єднання з зеленим флуоресцентним білком (GFP) з С-кінця з утворенням химерного Gef1-GFP не впливає на функцію Gef1p в клітині, химерний поліпептид є фізіологічно настільки ж ефективним, як і нативний білок Gef1 й повністю компенсує дефекти росту штамів дріжджів з делецією *Agef1*.

Представлено результати вивчення впливу пептидів, отриманих з послідовності людського пріону, на іонний гомеостаз клітини. За допомогою техніки БЛМ було охарактеризовано вплив пріонних пептидів на електропровідність плаского модельного ліпідного бішару. Для оцінки фізіологічного значення та можливих патологічних функцій пептидів також вивчено їх вплив на мембранний потенціал та швидкість дихання мітохондрій гіпокампа щурів.

У досліді використано пептид, що містить послідовність людського білка пріону YSNQNNF (PrP [169-175]) та пептид SSQNNF (PrP [170-175]), що несе природну мутацію [N→S] в положенні 171, пов'язану з шизоафективними захворюваннями у людей.

Було відомо, що пептид з послідовністю PrP 106-126 утворює катіонні канали в бішарових ліпідних мембранах, що вказує на роль цієї частини молекули PrP у підтримці гомеостазу іонів у клітині. Ми вирішили перевірити властивості іншого фрагменту PrP, що містить амінокислоти 169-175 разом з пептидом, що несе природну мутацію 171N → S. Такий вибір обумовлений наступними фактами: а) послідовність  ${}_{169}\text{YSNQNNF}_{175}$  багата амінокислотами аспарагіном та глутаміном, які, як відомо, відповідають за агрегацію пріонних білків дріжджів; б) пептид, отриманий з пріонного білка дріжджів Sup35 з дуже подібною послідовністю (GNNQQNY), виявляє амілоїдогенність, а його агрегати демонструють подвійне променезаломлення з Congo Red; в) кристали обох досліджених пептидів виявляють двопроменезаломлення при фарбуванні Congo Red (дані не наведено).

Виконане передбачення вторинної структури за допомогою десяти різних методів вказує, що ця частина молекули PrP фланкована областями з найбільшим потенціалом формування бета-структури (Рис. 3), що вказує на те, що цей фрагмент молекули PrP може легко трансформуватися зі спіралі до розпластанної структури.

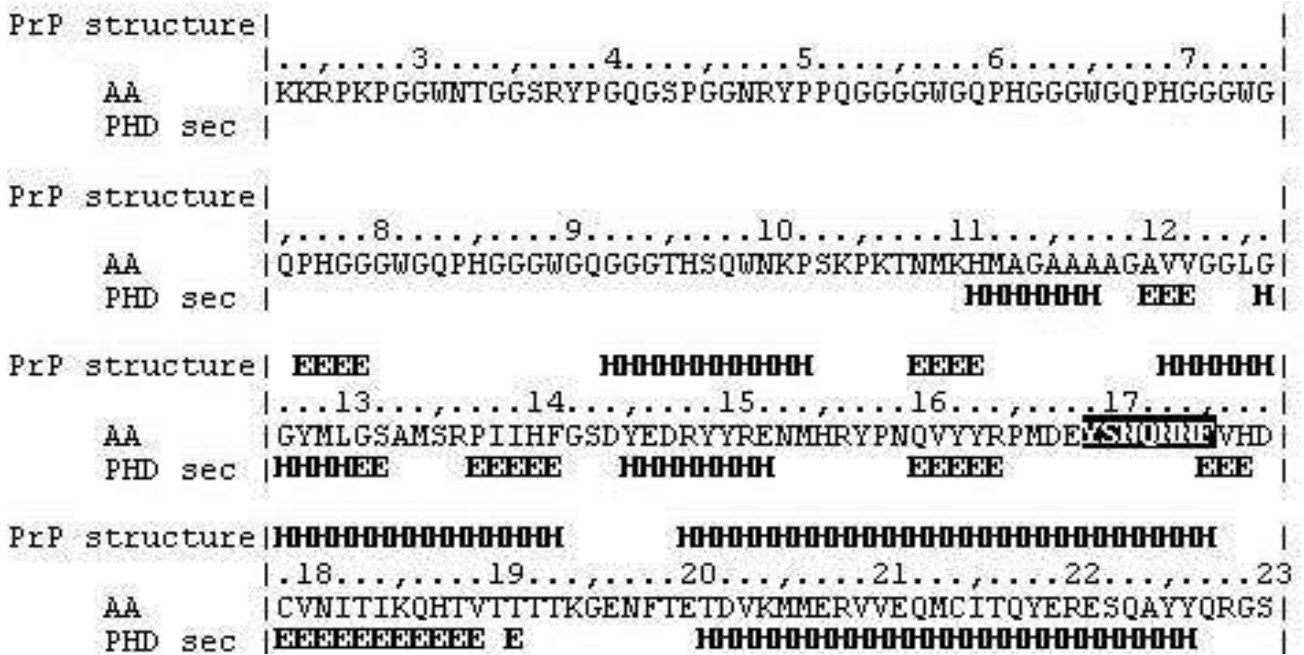


Рис. 3. Приклад прогнозування вторинної структури PrP методом PHD з використанням машинного навчання.

Верхній рядок – елементи вторинної структури людського рекомбінантного PrP, розшифровані методом ЯМР. Нижній рядок – передбачувана структура. Досліджуваний пептид позначено чорним тлом. Н – спіраль; Е – бета-структура.

Встановлено, що пептид PrP [170-175] N171S дискретно збільшує провідність плоских ліпідних бішарових мембран, утворених з азолектину. Виходячи з ВАХ струмів, зареєстрованих у симетричних розчинах 500/500 мМ КСІ цис/транс, ми розрахували провідність поодиноких іонних каналів від 7,6 до 21,6 пС (рис. 4).

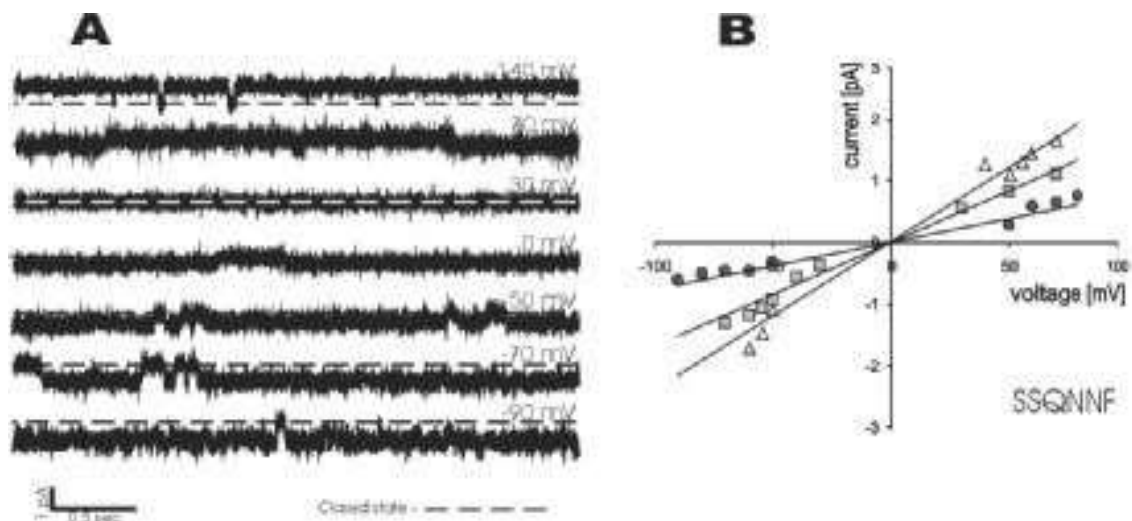


Рис. 4. Вплив пріонного пептиду SSQNNF на БЛМ.

Концентрація ліпідів 40 мг/мл, концентрація пептиду 4 мкг/мл. **А:** Кінетика струму через канал. **В:** Вольт амперні характеристики каналів, утворених в мембранах з азолектину пріонним пептидом SSQNNF (симетричний розчин 500 мМ КСІ, 10 мМ HEPES, pH 7,0).



Зареєстровані нами різні провідності іонних каналів вказують на те, що канали, ймовірно, утворюються внаслідок агрегації молекул пептиду, що узгоджується з агрегаційними властивостями застосованого пептиду. Експерименти з різною концентрацією солі по обидва боки мембрани (100/500 мМ КСІ цис/транс) дозволяють простежити катіонну вибірковість каналів, утворених PrP [170-175] N171S з потенціалом реверсії 30 мВ. Це близько до потенціалу реверсії для  $K^+$ -селективного каналу у 40,5 мВ, розрахованого за рівнянням Нернста. Нативний пріонний пептид PrP [169-175] лише тимчасово порушує провідність ліпідного бішару без дискретних змін провідності, що спостерігається для PrP [170-175] N171S (дані не наведено).

Ми провели вимірювання мітохондріального потенціалу в ізолюваних мітохондріях гіпокампа щурів після застосування PrP [170-175] N171S та PrP [169-175] (рис. 5). Жоден із досліджених пептидів суттєво не змінив мембранний потенціал або швидкість дихання мітохондрій. Це спостереження можна пояснити тим, що, по-перше, пептиди додавали не до очищених мітохондрій, а до гомогенатів гіпокампа, і таким чином мікромолярні концентрації пептидів могли поглинатися синаптосомальними мембранами. По-друге, низької провідності каналів може бути недостатньо для деполаризації внутрішньої мембрани мітохондрій з її високим трансмембранним потенціалом та існуючими механізмами підтримки потенціалу в мітохондріях.

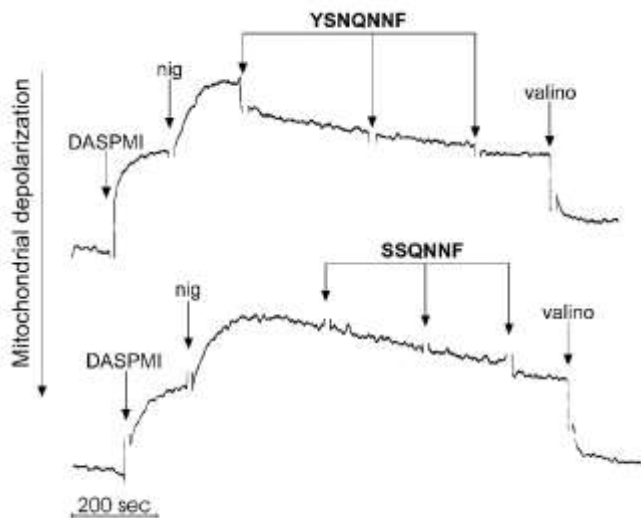


Рис. 5. Вплив пріонних пептидів на мембранний потенціал мітохондрій гіпокампа щурів.

Деполаризація мітохондрій супроводжується зниженням флуоресценції потенціал чутливого зонду DASPMI (у відносних одиницях). Щоб максимізувати потенціал мітохондріальної мембрани додавали 0,5 мг/мл нігерицину (nig) з подальшим додаванням 4 мг/мл пептиду YSNQNNF (верхній) або SSQNNF (нижній) та 2 мкг/мл валіноміцину (valino).

Тим не менш, ми вважаємо, що канал, утворений PrP [170-175] N171S, може впливати на іонну рівновагу на клітинній плазматичній мембрані, і здатність мутованого пептиду утворювати іонні канали, на відміну від немутованого пептиду, може бути причиною відповідного нервового розладу.

**У розділі 4** наведено результати експериментального дослідження взаємодії циклічного олігопептиду граміцидину S з мембранами тромбоцитів.

Пептид GS викликає двофазну зміну світлопропускання суспензії тромбоцитів. При додаванні GS у концентрації  $4,15 \times 10^{-6}$  моль/л до ЗТП спостерігалася збільшення світлопропускання зразка, вочевидь пов'язане з набряканням

тромбоцитів, індукованим GS.

Концентрація GS, яка викликає набрякання тромбоцитів, виявилася нижчою його гемолітичної активності визначеної іншими дослідниками при більшій температурі й тривалішій експозиції еритроцитів до GS.

При збільшенні концентрації GS ( $7,47 \times 10^{-6}$  моль/л) збільшення світлопропускання змінюється його зменшенням, яке настає через 20-60 с. GS у більш високій концентрації ( $8,3 \times 10^{-6}$  –  $16,6 \times 10^{-6}$  моль/л) викликає тільки зменшення світлопропускання зразка. Подібне зменшення світлопропускання є характерним для початкової фази агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ, і пояснюється зміною форми клітин від дископодібної до сферичної. Така зміна форми тромбоцитів відбувається й при їх активації. Таким чином, у концентрації вище  $7,5$  мкмоль/л GS активує тромбоцити.

Ми встановили, що тромбоцити, після дії GS, не втрачають здатності до агрегації при наступному додаванні індуктора агрегації – АДФ, адреналіну,  $H_2O_2$  або тромбіну. Також, ми визначили що, блокатори агрегації не впливають на зміну форми тромбоцитів, викликану GS, тобто, активація тромбоцитів GS не залежить від механізмів агрегації, при цьому вона опосередкована іонами  $Ca^{2+}$ . Набрякання тромбоцитів під дією GS є неспецифічним процесом, тоді як активація тромбоцитів, яка характеризується зміною форми клітин і веде до зменшення світлопропускання, – специфічним для тромбоцитів і опосередкована іонами  $Ca^{2+}$ . Інші досліджені в роботі катіони:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  не впливали на GS-індуковані зміни форми тромбоцитів.

Наші результати свідчать, що механізм активації тромбоцитів пов'язаний саме зі збільшенням проникності мембрани для іонів  $Ca^{2+}$  в результаті вбудовування GS у мембрану, а не з вивільненням  $Ca^{2+}$  із примембранних депо. Ми припускаємо наступний механізм. Взаємодіючи з фосфатними групами фосфоліпідів, GS утворює ліпід-граміцидиновий комплекс, здатний занурюватися в гідрофобну область мембрани, що спричиняє фазове («видове») відокремлення фосфоліпідів і утворення «рідкої» зони нейтральних ліпідів. Після занурення ліпід-граміцидинового комплексу відбувається «заморожування» одних ділянок ліпідного бішару й «розрідження» інших, що приводить до перерозподілу мембранних білків і ліпідів у площині мембрани, утворення дефектів у мембрані й зміни проникності мембрани для малих молекул.

Додавання GS до тромбоцитів після завершення агрегації викликає зменшення світлопропускання зразка. Для всіх використаних нами індукторів агрегації – АДФ, адреналіну,  $H_2O_2$  – загальний вид кінетичних залежностей світлопропускання зразка ЗТП був однаковий. Подібне зменшення світлопропускання пов'язане з розпадом агрегатів тромбоцитів. Зникнення агрегатів у кюветі після додавання GS спостерігали й за допомогою світлового мікроскопа.

Ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів пропорційна концентрації GS. Дезагрегацію тромбоцитів під дією GS можна пояснити в такий спосіб. Молекула GS, вбудовуючись у мембрану, порушує ліпід-ліпідні й ліпід-білкові взаємодії і забезпечує більшу свободу обертального руху для вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів. З'являються ділянки спотвореної ламелярної структури мембрани

навколо вбудованих молекул GS. При цьому руйнуються кластери тромбоцитарних мембранних рецепторів для фібриногену і розриваються білкові місточки, що з'єднують тромбоцити в агрегати. При розриві цих зв'язків агрегати будуть розпадатися, при цьому кількість центрів, що розсіюють світло, буде збільшуватися, що приведе до зменшення світлопропускання.

Зв'язування граміцидину з мембраною клітини є динамічним процесом, який складається з кількох стадій і включає електростатичні й гідрофобні взаємодії. Ефективність і швидкість вбудовування GS у мембрану повинна залежати від рухливості ліпідів мембрани, від мікрів'язкості ліпідного бішару.

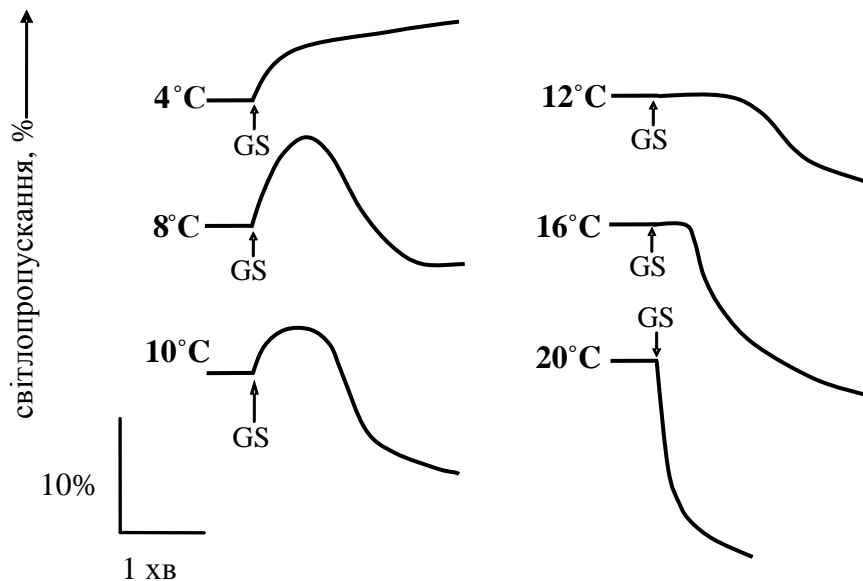


Рис. 6. Типові криві зміни світлопропускання ЗТП з часом при додаванні GS після завершення агрегації тромбоцитів.

Показано початкові ділянки кінетичних кривих дезагрегації тромбоцитів. Стрілками вказано моменти додавання GS, числа біля кривих – температура, при якій проводилися виміри. Концентрація GS -  $8,3 \times 10^{-6}$  моль/л. Агрегація тромбоцитів була індукована АДФ у концентрації 0,18 мг/мл.

На рис. 6 наведено фрагменти кривих розпаду агрегатів, що ілюструють початкову стадію зміни світлопропускання зразка ЗТП при додаванні GS при різних температурах. При низьких температурах (4-8°C) додавання GS до тромбоцитів, що проагрегували, викликає незначне збільшення світлопропускання зразка; через 45 - 90 с світлопропускання починає повільно зменшуватися. Початкове збільшення світлопропускання може пояснюватися набряканням тромбоцитів або їх додатковою агрегацією під дією GS при низьких температурах. При температурах 10-18°C додавання GS не викликає збільшення світлопропускання зразка, проте з'являється лаг-період – проміжок часу (20-60 с) між додаванням GS і початком розпаду агрегатів, протягом якого світлопропускання зразка не змінюється. Очевидно, виявлений лаг-період пов'язаний саме з різною швидкістю взаємодії молекули GS з мембраною, яка визначається різною рухливістю ліпідів при різних температурах, а за наявності та величиною лаг-періоду можна судити про рухливість ліпідів у мембранах тромбоцитів.

Слід зауважити, що GS перед вбудовуванням в мембрану клітини маж подолати шар примембранного глікокалікса й лімітуючи фактором є дифузія в ліпідах. Для опису процесу можна використовувати як модель багаточислової адсорбції Брунауэра-Еммета-Теллера так і модель подвійної сорбції. В рамках цієї моделі передбачається, що є два співіснуючі механізми взаємодії GS з мембраною, оточеною глікокаліксом. Частина молекул GS має досить високу рухливість, і

сорбція цих молекул описується лінійним законом Генрі. Частина GS частково втрачає рухливість. Сорбція цих молекул описується за допомогою ізотерми Ленгмюра. Таким чином, концентрація GS, «розчиненого» в мембрані, подається у вигляді суми двох доданків:

$$c = c_H + c_L = k_D p + \frac{c'_H b p}{1 + b p} \quad (10)$$

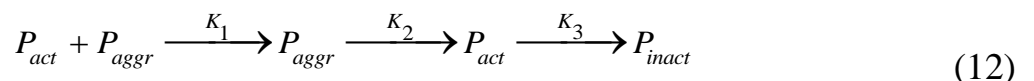
де  $k_D$  – константа розчинності закону Генрі (моль/(м<sup>3</sup> × Па)),  $c'_H$  – ленгмюрівський параметр насичення (сорбційна ємність) (моль/м<sup>3</sup>),  $b$  – константа ленгмюрівської ізотерми (константа спорідненості) (Па<sup>-1</sup>),  $p$  – тиск.

При описі вбудовування GS передбачається, що існує локальна рівновага між молекулами пептиду, які сорбуються за двома різними механізмами. Молекули GS, сорбція яких описується законом Генрі, є рухомими. Молекули GS, сорбція яких описується законом Ленгмюра є частково іммобілізованими. Згідно з розглянутою моделлю, транспорт GS в мембрані з глікокаліксом описується за допомогою співвідношення:

$$I = I_H + I_L = -D_H \frac{dc_H}{dx} - D_L \frac{dc_L}{dx} \quad (11)$$

Отримана залежність лаг-періоду дезагрегації від температури є немонотонною, наявність максимуму свідчить, що при певній температурі адсорбція/конденсація GS в напрямку нормалі до мембрани тромбоцита йде швидше, ніж у латеральному.

Для аналізу дезагрегації тромбоцитів було вдосконалено математичну модель динаміки оборотної агрегації тромбоцитів для адекватного визначення кінетичних параметрів дезагрегації клітин. Для відомої кінетичної схеми переходів клітин між різними станами в процесі агрегації:



де  $P_{act}$ ,  $P_{inact}$ ,  $P_{aggr}$  – кількості активованих, інактивованих та тих тромбоцитів, що перебувають у агрегатах;  $K_1$ ,  $K_2$  і  $K_3$  – відповідно швидкості утворення, розпаду агрегатів й інактивації тромбоцитів. Для задовільного опису оборотної агрегації тромбоцитів було уведено додатковий параметр, що відповідає інактивації, яка відбувається внаслідок спонтанного відривання тромбоцитів з поверхні агрегатів у зсувному потоці та їх руйнування через зіткнення.

Швидкість переходу активованих тромбоцитів у агреговані залежить від імовірності зустрічі активованого тромбоцита з агрегатом – від ефективного перерізу  $\sigma_{PA}$  та їх кількостей ( $P_{act}$  та  $A$  відповідно):

$$K_1 = k_1 \sigma_{PA} P_{act} A \quad (13)$$

Швидкість  $K_2$  має дві складові: перша визначає втрату тромбоцитів поверхнею агрегатів (пропорційна загальній площі їх поверхні), а друга – втрату внаслідок зіткнень (пропорційна їх імовірності). Константи розпаду агрегатів унаслідок вивільнення тромбоцитів поверхневого шару й унаслідок зіткнень агрегатів не є однаковими – ймовірність зіткнень агрегатів квадратично залежить від їх розміру і,

крім того, малі агрегати менш схильні до поверхневих руйнувань унаслідок зіткнень.

Вираз для  $K_2$  має вигляд:

$$K_2 = \begin{cases} k_{2.1} 4\pi R_{pl}^2 (N - N_{end})^{2/3} + k_{2.2} \pi R_{aggr}^2 A^2, & N - N_{end} > 0 \\ 0, & N - N_{end} \leq 0 \end{cases} \quad (14)$$

де  $R_{pl}$  та  $R_{aggr}$  – радіуси тромбоцита та агрегату відповідно;  $N$  – кількість тромбоцитів в агрегаті. Внеском другого доданка на початку досліду, коли  $N - N_{end} \leq 0$ , можна знехтувати.

При розгляді оборотної агрегації врахування інактивації тромбоцитів є обов'язковим. Дезагрегація настає через певний час для тромбоцитів, які не зазнали взаємодії з великими концентраціями індуктора, або через вплив різних біологічно активних речовин, концентрації яких змінюються за рахунок вибіркової секреції з самих клітин, отже константа швидкості реакції інактивації збільшується з часом від початку досліду. Ми припустили, що цей процес є подібним до хімічних реакцій першого роду, адже зіткнення тромбоцитів не є необхідною умовою їх інактивації, тому швидкість буде залежати лише від одного динамічного параметра системи – доступної кількості активованих тромбоцитів  $P_{act}$ . На піку агрегації кількість активованих тромбоцитів  $P_{act}$  знижується до значень, близьких до 0, і потім тримається таких значень до кінця досліду. Обмежувальну роль для інактивації відіграє швидкість дезагрегації. Тобто майже всі тромбоцити, що дезагрегують, за будь якого варіанту часової залежності  $K_3$  інактивуються миттєво.

$$K_3 = \begin{cases} P_{act} (t/\tau), & t/\tau < 1 \\ P_{act}, & t/\tau \geq 1 \end{cases} \quad (15)$$

За експериментальними даними світлорозсіювання розраховували усереднену кількість тромбоцитів в агрегаті та визначали константи швидкостей відповідних реакцій.

Пропонована модель задовільно описує експериментальні кінетичні залежності кількості тромбоцитів в агрегаті, розраховані за даними світлової трансмісійної агрегометрії (Рис. 7) і дозволяє досліджувати оборотну агрегацію тромбоцитів і насамперед – фазу дезагрегації клітин.

Також у розділі 4 наведено результати вивчення впливу перекисного окислення ліпідів й іонізуючого опромінення на дезагрегацію тромбоцитів під дією GS. Відомо, що прооксиданти розріджують ліпідний бішар, підвищуючи швидкість реакцій, що залежать від дифузії молекул у бішарі. Антиоксиданти, навпаки, зміцнюють ліпідний бішар, знижуючи швидкість таких реакцій.

Ми встановили, як взаємодія GS із тромбоцитами залежить від стану ліпідів мембрани, який був модифікований перекисним окисленням і гамма-опроміненням. Ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів, попередньо інкубованих протягом 15 хвилин із прооксидантами (аскорбатом і іонами  $Fe^{2+}$ ), збільшується в порівнянні з контролем. Швидкість розпаду агрегатів теж підвищується (рис. 10). Таким чином, прооксиданти розріджуючи ліпідний бішар, полегшують вбудовування GS у

мембрану.

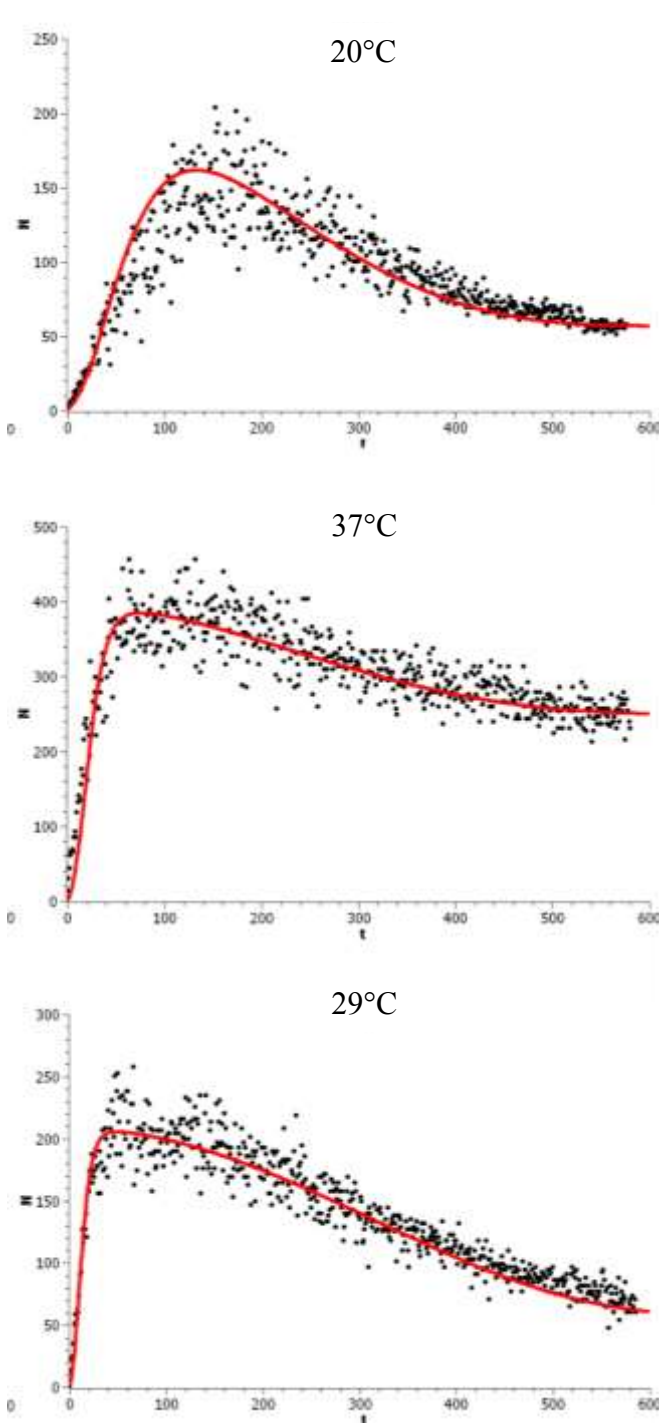


Рис.7. Апроксимація кінетичних залежностей кількості тромбоцитів в агрегаті за рівняннями моделі

Як видно з рис. 8, вплив попередньої інкубації ЗТП із  $\alpha$ -токоферолом (ТФ) на ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS носить більш складний характер, ніж у випадку преінкубації ОТП із прооксидантами. До  $\sim 20^\circ\text{C}$  преінкубація ЗТП із ТФ веде до збільшення ступеня розпаду агрегатів тромбоцитів у порівнянні з контрольними тромбоцитами. Після  $20^\circ\text{C}$  ступінь розпаду агрегатів, утворених тромбоцитами, преінкубованими із ТФ, стає меншою ступеня розпаду агрегатів, утворених нативними тромбоцитами. Тобто ТФ по-різному впливає на ліпиди при температурах вище й нижче деякої критичної температури  $T_{\text{кр}}$ . Вбудовування ТФ у фосfolіпідний бішар викликає як порушення квазікристалічного упакування жирнокислотних ланцюгів ліпідів при температурі нижче  $T_{\text{кр}}$ , так і зменшення рухливості (зростання впорядкованості) ланцюгів при температурі вище  $T_{\text{кр}}$ .

Ще одним фізичним фактором, що змінює щільність упакування й рухливість ліпідів мембран, що був використаний

нами, є іонізуюче випромінювання. Гамма-опромінення тромбоцитів *in vitro* дозами 1 – 5 кР найбільш розвпорядковує ліпиди мембран, ведучи до збільшення ступеня GS-індукованої дезагрегації тромбоцитів.

Ці результати повністю узгоджуються з попередніми: ступінь і швидкість взаємодії GS з мембранами тромбоцитів визначається рухливістю ліпідів мембрани. Зовнішні впливи, що модифікують ліпідний бішар, змінюють ступінь і швидкість взаємодії GS з мембранами тромбоцитів. Вивчення взаємодії GS із тромбоцитами й факторів, що впливають на цю взаємодію, дозволить вирішувати зворотне завдання

– визначати стан ліпідів мембран тромбоцитів на підставі аналізу взаємодії GS із тромбоцитами і викликаній грамїцидином дезагрегації тромбоцитів.

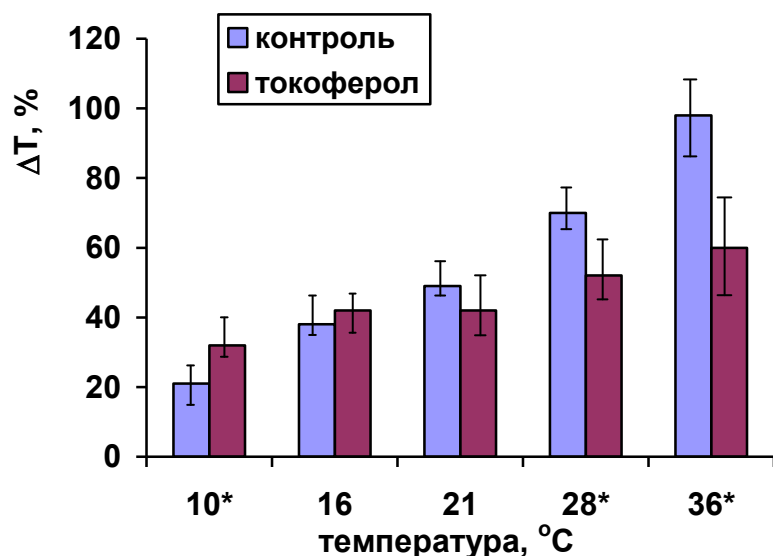


Рис. 8. Залежність ступеня ( $\Delta T$ ) розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS від температури для нативних (контроль) тромбоцитів і тромбоцитів, преінкубованих протягом 15 хвилин з  $\alpha$ -токоферолом (токоферол).

Агрегація тромбоцитів викликала АДФ у концентрації 0,18 мг/мл.  $[GS] = 8,3 \times 10^{-6}$  моль/л;  $[\alpha\text{-ТФ}] = 1$  мкг/мл.

\*Достовірно відрізнялись від контролю ступені розпаду агрегатів при 10, 28 та 36° C ( $p < 0,05$ ).

У розділі 5 наведено результати досліджень впливу структурно-динамічних змін мембран на взаємодіє пептиду GS з еритроцитами. Ми вивчили гемоліз еритроцитів під дією GS і вказали фактори, які впливають на гемолітичну активність GS.

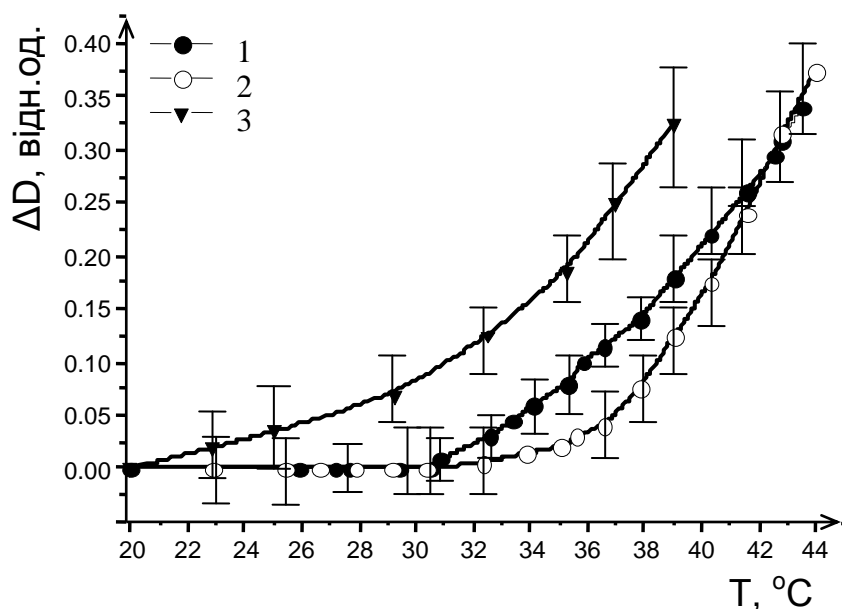


Рис. 9. Залежності ступеня гемолізу від температури для нативних еритроцитів (1) й еритроцитів, преінкубованих протягом 10 хвилин з  $\alpha$ -токоферолом (крива 2) і прооксидантами ( $\text{Fe}^{2+}$  + аскорбат) (крива 3). Концентрація МДА становила в контролі  $4,1 \pm 0,53$  нмоль/л, в клітинах з підвищеним рівнем ПОЛ  $7,25 \pm 0,74$  нмоль/л.

Додавання GS до суспензії еритроцитів викликає ушкодження мембран клітин, що веде до гемолізу еритроцитів. При підвищенні концентрації GS зростає швидкість гемолізу еритроцитів і зменшується час повного гемолізу.

При збільшенні температури швидкість і ступінь гемолізу еритроцитів збільшуються, очевидно, за рахунок розрідження ліпідного компонента мембран

при збільшенні температури, що полегшує вбудовування GS у мембрану.

Ми вивчили вплив факторів, що змінюють стан ліпідного бішару (температура й перекисне окислення ліпідів) (рис. 9), на GS-індукований гемоліз еритроцитів, і розрахували енергії активації відповідних процесів.

При зростанні температури ступінь гемолізу збільшується. Тобто, при підвищенні температури концентрація GS, необхідна для гемолізу еритроцитів, знижується і GS у концентрації, що не викликає гемолізу еритроцитів при кімнатній температурі, може індукувати гемоліз при підвищенні температури. При зростанні температури й збільшенні рухливості ліпідів взаємодія GS з мембранами підсилюється, при цьому необхідна для гемолізу еритроцитів концентрація GS знижується, що й спостерігалось в експерименті (крива 1, рис. 13). Попередня інкубація еритроцитів із прооксидантами збільшує ступінь гемолізу еритроцитів під дією GS (крива 3, рис. 13), у той час як преінкубація з антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферол) - зменшує (крива 2, рис. 13). Отримані результати добре узгоджуються з даними про взаємодію GS з мембранами тромбоцитів попередньо інкубованих із про- і антиоксидантами. Відрізняються величини енергій активації відповідних процесів (табл. 1).

Таблиця 1.

Енергії активації процесів розпаду агрегатів тромбоцитів і гемолізу еритроцитів людини під дією GS

	Енергія активації, кДж/моль	
	Гемоліз еритроцитів	Дезагрегація тромбоцитів
контроль	178 ± 23	415 ± 38
Підвищений рівень ПОЛ*	109 ± 17	325 ± 27

\*Концентрація МДА в еритроцитах становила: в контролі  $5,1 \pm 0,53$  нмоль/л, в клітинах з підвищеним рівнем ПОЛ  $7,25 \pm 0,72$  нмоль/л. Базальний рівень МДА в тромбоцитах становив  $1,38 \pm 0,05$ , індукований –  $4,15 \pm 0,78$  нмоль/ $10^9$  тромбоцитів.

Отримані значення енергії активації є ефективними величинами. Руйнування агрегату тромбоцита вимагає подолання більше високого енергетичного бар'єра, ніж лізис еритроцитів. Очевидно, це обумовлено відмінністю в будові мембран двох типів клітин, більшим вмістом білків у мембрані тромбоцита або необхідністю крім вбудовування в мембрану молекулам граміцидину розривати фібриногенові місточки між тромбоцитами в агрегаті для ініціації дезагрегації. Розраховані енергії активації виявилися нижче отриманих іншими авторами величин енергії активації термогемолізу еритроцитів - 298,3 або 290 кДж/моль, який вимагає більш глибокого руйнування ліпідного бішару еритроцитів.

Крім ефекту зовнішніх чинників, взаємодія GS з мембранами має залежати від структурного стану самих мембран. Одним з важливих структурних компонентів біологічних мембран є холестерин, що визначає такі властивості мембран, як в'язкість і проникність.



Щоб показати вплив холестерину на GS-індукований гемоліз еритроцитів, ми досліджували гемоліз еритроцитів, виділених із крові здорових донорів і донорів з різними захворюваннями серцево-судинної системи.

Відзначається негативна кореляція ( $r = -0,79$ ;  $p < 0,05$ ) між швидкістю гемолізу еритроцитів і вмістом холестерину (рисунок 10), підвищення рівня холестерину в мембранах клітин приводить до значного зниження ступеня й швидкості GS-індукованого гемолізу еритроцитів.

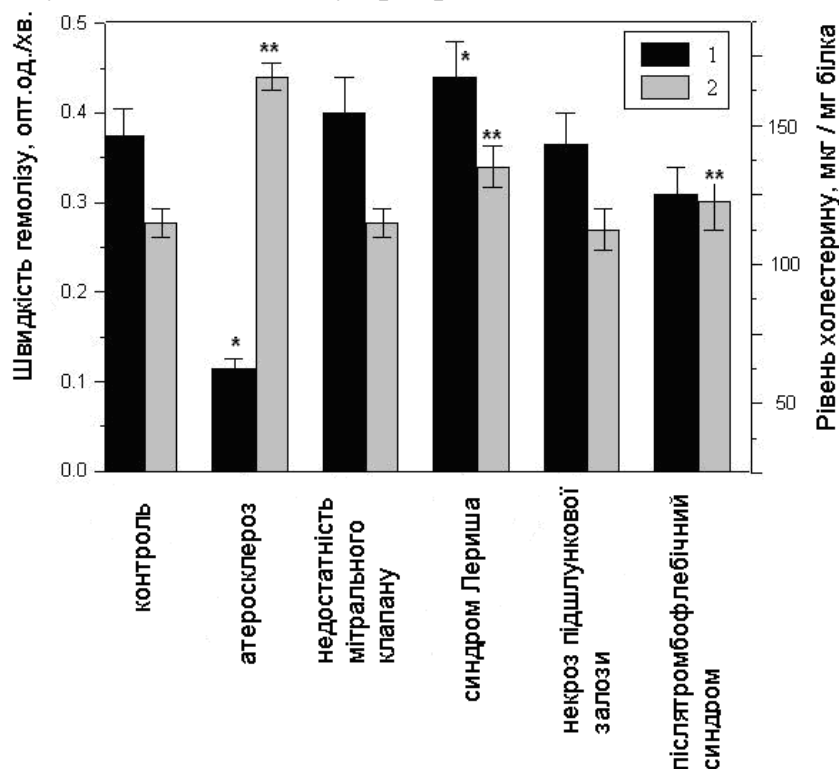


Рис. 10. Вплив холестерину на GS-індукований гемоліз еритроцитів.

*Ліва шкала: швидкість гемолізу  $V$  (1) для GS-індукованого гемолізу еритроцитів, виділених із крові здорових донорів (контроль) і донорів з різними патологіями.*

*Права шкала: рівень холестерину в крові донорів (2). Температура 37 °C.*

*Примітка: \* та \*\* - швидкості гемолізу та вміст холестерину відрізняються від контролю з достовірністю  $p < 0,05$ .*

Отримані результати становлять особливий інтерес, тому що однією з основних відмінностей у ліпідному складі мембран бактерій і клітин вищих тварин є наявність холестерину в останніх. При розробці антимікробних препаратів на основі GS необхідно брати до уваги вплив холестерину на взаємодію GS з мембранами клітин.

Досліджено вплив GS та GS вбудованого у 100 нм ліпосоми з ДПФХ на розподіл еритроцитів за об'ємом та стійкістю мембрани до електричного пробоя і кислотного гемолізу. Інкубація еритромаси з водним розчином GS приводить зміни об'ємного розподілення клітин (рис. 11). Співвідношення субпопуляцій еритроцитів в пулі клітин одного і того ж донора при різних концентраціях GS розрізнялися як між собою, так і з контролем.

Формуються групи еритроцитів, які за розмірами відрізняються від клітин переважального пулу. Чітко виділяється група невеликих за розмірами еритроцитів, яка з'являється при інкубації з GS в концентрації 5 мкМ, стає значимо представленою при 10 мкМ, зменшується при 20 мкМ і практично зникає при інкубації еритромаси з граміцидином S у концентрації 40 мкМ. Зміни об'єму еритроцитів для кожної серії вимірювань мали тенденцію до відтворення, наводимо

криві для типового донора. Спостережуване зменшення середнього об'єму еритроцита при інкубації з GS може бути викликано феноменом мікровезикуляції еритроцитів, коли амфифільний GS або розподіляється між ліпідними рафтами та основною мембраною, або перерозподіляється між моношарами мембрани. Для еритроцитів, інкубованих з GS в концентрації 10 мкМ, також зберігається такий самий спосіб зміни об'єму під час інкубації, однак при цій концентрації вимірювання після перших 15 хвилин інкубації не виявили істотних відмінностей від контролю. Ця тенденція також має місце для більш високих досліджених концентрацій GS і може бути пояснена агрегацією молекул GS у водному розчині перед зв'язуванням з мембраною еритроцитів і подальшим перерозподілом димерів і олігомерів GS в мембрану.

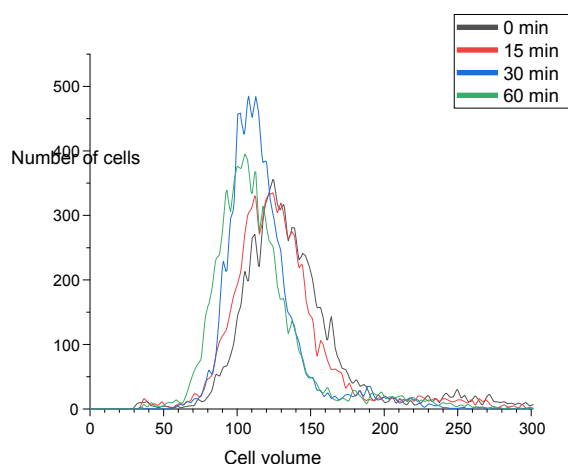


Рис. 11. Об'ємний розподіл еритроцитів, інкубованих з GS протягом різного часу. (Кольорові лінії відповідають різним інтервалам попередньої інкубації еритроцитів з GS: 0 хв – інтактні клітини. Концентрація GS 5 мкМ).

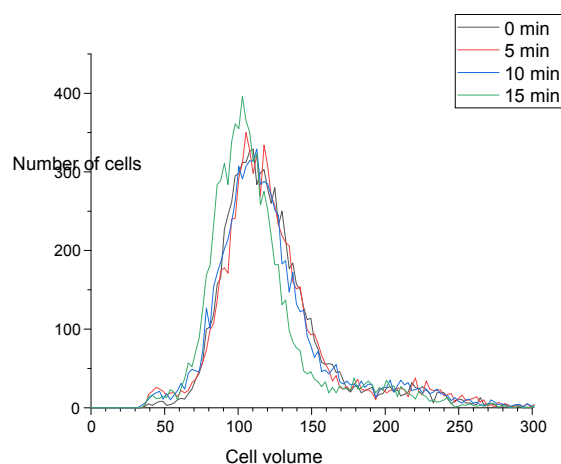


Рис. 12. Об'ємний розподіл еритроцитів, інкубованих з ліпосомальним GS. (Кольорові лінії відповідають різним інтервалам попередньої інкубації еритроцитів з ліпосомою+GS: 0 хв – інтактні клітини. Кінцева концентрація GS становить 20 мкМ)

Зморщування еритроцитів викликане сорбцією GS у зовнішній моношар мембрани еритроцита, формуванням обернених або кубічних ліпідних фаз та провокуванням «відшнуровування» фрагментів мембран або збільшенням площі зовнішнього моношару та збільшенням деформації зісую. Цей ефект імовірно не залежить від роботи ліпід-траслюючих ферментів та цитоскелету. Вищі концентрації GS, використані в нашій роботі, викликають збільшення об'єму клітин також не через осмотичні ефекти. Часова залежність цих змін дає нам можливість припустити, що зміна об'єму в цьому випадку відбувається за рахунок перерозподілу GS у внутрішній моношар плазмалеми та може бути опосередкована викликанною GS зміною проникності мембран еритроцитів до іонів  $Ca^{2+}$ , активацією моторних нанодоменів цитоскелету, транслоказ та скрамблаз. Подібну кальцій-залежну активацію ми спостерігали для тромбоцитів.

При дослідженні впливу ліпосомальних форм GS на структурно-функціональні властивості еритроцитів було виявлено, що при інкубації еритроцитів зі зв'язаним з

ліпосомами GS спостережуване зменшення середнього об'єму еритроцита є менш вираженим. Наприклад, при інкубації еритроцитів з ліпосомами, які містили GS в концентрації 20 мкМ (рис. 12), зменшення об'єму в 5 разів менше порівняно з дією самого GS. Таке зменшення зморщування еритроцитів, викликаного GS у складі ліпосом, може свідчити про ефективне утримання пептиду ліпосомами, залежність мембранотропного ефекту GS від орієнтації пептиду на початку взаємодії з мембраною, або про репаративну роль ліпосомальних ліпідів у відновленні морфології клітинної мембрани.

Розраховані величини потенціалу пробою мембрани еритроцитів в діапазоні  $90 \pm 15$  мВ добре узгоджуються з даними інших досліджень. Під дією GS у концентраціях до 30 мкМ за різний час попередньої інкубації не виявлено істотних змін електромеханічної стабільності мембран еритроцитів.

Для тих же умов попередньої інкубації еритроцитів з GS досліджено стійкість плазматичних мембран еритроцитів до HCl-індукованого гемолізу. З експериментальних кінетичних кривих світлорозсіювання побудовано диференціальну та інтегральну криві гемолізу та визначено набір параметрів стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу: форм-фактор, лаг-період та швидкість гемолізу.

Порівняння кривих гемолізу еритроцитів, інкубованих з різними концентраціями GS, свідчить про зменшення лаг-періоду при незмінній швидкості процесу. Ефект дестабілізації мембрани залежить від концентрації GS: чим вона вища, тим більший ефект; однак дестабілізація мембрани не має чіткої залежності від часу преінкубації. Таке зниження стабільності мембрани еритроцитів, викликане GS, обумовлене ефективним розподілом GS у мембрану клітин, зміною білок-ліпідних взаємодій і свідчить про те, що навіть впродовж годин після пред'явлення дифузії та перерозподіл GS у плазматичній мембрані еритроцитів не завершилися, новий стаціонарний стан мембранного матриксу не досягнуто.

#### *Вплив ДПФХ ліпосом, насичених GS, на гемолітичну чутливість еритроцитів*

Для вивчення впливу ліпосомальних комплексів GS на параметри гемолізу еритроцитів ми спочатку дослідили вплив самих ліпосом на параметри HCl-індукованого гемолізу еритроцитів. Додавання ліпосом до суспензії еритроцитів не впливає на стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу. Кінетичні характеристики гемолізу, індукованого HCl, не змінюються порівняно з нативними еритроцитами. У той же час змінюється коефіцієнт форми клітин після завершення гемолізу, що свідчить про те, що злиття 100 нм ліпосом з еритроцитами відбувається ефективно, а вбудовані везикули змінюють форму еритроцитів.

Аналізуючи криві кислотного гемолізу еритроцитів, інкубованих з ліпосомами, навантаженими GS, можна відзначити збільшення часу відставання гемолізу при концентрації GS 20 мкМ та зниження швидкості гемолізу. Включення GS відбувається швидше, але з часом вбудований пептид стабілізує мембрану, запобігаючи її кислотному гемолізу.

Однак ліпосоми, завантажені більшими концентраціями GS (до 40 мкМ), зменшують лаг-період. Також спостерігається залежність від часу інкубації, що свідчить про більш ефективний перерозподіл GS з ліпосом до мембран еритроцитів і

свідчить про перспективність використання ліпосом для цілеспрямованої доставки та можливість ефективного таргетованого вивільнення GS у мембрани клітин.

Захоплення GS в нанорозмірні ліпідні везикули змінює початкові стадії взаємодії лікарського засобу та мембрани-мішені під впливом електростатичних сил. На мікроскопічному клітинному рівні це дозволяє застосовувати більш високі дози антимікробних пептидів без шкідливих побічних ефектів для клітини. Збільшення таким чином дози антибіотика може бути корисним для його антимікробної дії. Поряд з можливістю збільшення ефективної місцевої дози протимікробного засобу, ліпосомальні засоби доставки демонструють ефективність відновлення на місці дестабілізуючої дії GS на плазматичну мембрану еритроцитів. Це може відбуватися через пряме злиття ліпосомальних ліпідних мембран із зовнішньою мембраною еритроцитів.

Показано, що субгемолітичні концентрації антимікробного пептиду GS викликають приховані зміни електромеханічної стабільності та гемолітичної стійкості плазматичних мембран еритроцитів, інкубованих з водними розчинами препарату. Такі зміни можуть вплинути на загальну роботу кровоносної системи. Концентрації GS 10 - 20 мкМ значно впливають на об'ємний розподіл еритроцитів здорових донорів, зменшують середній об'єм еритроцитів, скорочують лаг-період кислотного гемолізу та підвищують швидкість гемолізу. Порівняно з ефектом чистого GS, нанесеного з водних розчинів, використання комплексів 100 нм ліпосом з ДПФХ, що несуть пептид в концентраціях від 10 мкМ до 75 мкМ, зменшує GS-індуковані зміни об'єму еритроцитів та їх об'ємного розподілу, підвищує стійкість мембрани еритроцитів до кислотного гемолізу і чітко демонструє здатність ліпосом зливатися з клітинними мембранами та вивільняти пептидні «корисні навантаження» до цільових клітин протягом хвилин. Отримані результати можуть бути використані для оптимізації системного медичного застосування ліпосомальних та інших інкапсульованих форм препаратів на основі мембраноактивних пептидів.

**У розділі 6** для одного з досліджених мембрано активних пептидів, зареєстрованого медичного препарату – GS, молекулярні механізми спостережуваних нами у попередніх розділах біологічної та мембранотропної дії GS було досліджено з використанням різноманітних методичних підходів, направлених на всебічне та цілковите з'ясування міжмолекулярних взаємодій саме цього поліпептиду, а не низки аналогів та похідних, у кількокомпонентних модельних ліпідних системах. Ми намагались верифікувати ідеї щодо вирішального внеску електростатичних та гідрофобних взаємодій у формування комплексів GS із природними та модельними мембранами, зокрема перевірити гіпотези стосовно: визначального внеску електростатичних взаємодій на початковому етапі приєднання/адсорбції GS до мембрани; можливої агрегації молекул GS перед їх зануренням до гідрофобної частини бішару; зміни ступеня гідратації мембрани при її комплексоутворенні з GS; можливості проникнення молекул GS крізь мембрану.

Граміцидин S характеризується безпосереднім зв'язуванням з ліпідним бішаром бактеріальних та еукаріотичних клітин, яке обумовлено ентропійним

фактором, причому GS розташовується під полярною поверхнею ліпідної мембрани таким чином, що його полярні групи обернені у бік водного шару. При зв'язуванні з GS підвищується площа перерізу ліпідної молекули у мембрані, зменшується впорядкованість її вуглеводневих ланцюгів, відбувається зменшення товщини гідрофобної частини мембрани на  $\sim 1 \text{ \AA}$ , а  $d_L$  – на  $5 \text{ \AA}$ . Отже, спостережувані нами мембранні ефекти обумовлені розупорядкувальною та дегідратуючою дією GS у ліпідній мембрані.

Втім, молекулярний механізм дії GS розкритий далеко не повністю, й одним з важливих його аспектів є залежність ефекту GS від ліпідного складу мембран, особливо від гідрофільної частини ліпідів та присутності холестерину. Зокрема показано, що вміст холестерину 40 моль % зменшує ентропійну складову вільної енергії зв'язування GS із мембраною, тож, перешкоджає цьому процесу. У той же час, наші результати і дані інших авторів свідчать, що вміст холестерину близько 10 моль %, навпаки, сприяє зв'язуванню GS із мембраною.

Відомо, що мембрани бактеріальних та еукаріотичних клітин суттєво розрізняються за ліпідним складом: принциповими відмінностями останніх є вміст ФХ та стеринів. Інформація щодо взаємодії GS із мембранами різного складу важлива для визначення можливості розділення антибактерійної та побічної гемолітичної дії GS.

*Керування мембранними ефектами GS шляхом зміни вмісту холестерину в модельній мембрані*

Нами було показано, що при вмісті GS у мембрані ДПФХ спостерігається зв'язування з мембраною олігомерів GS. В Мембранах ДПФХ із вмістом 5 мас. % GS при варіюванні вмісту Хол знайдено критичне значення концентрації  $c_{хол} \sim 18 \text{ мас. \%}$  ( $\sim 30 \text{ моль \%}$ ), за якого у системі з'являється додатковий вільний об'єм. Вірогідним уявляється механізм підвищення розподілення пептиду в мембрану на межах розділу доменів різної щільності. Згідно з літературою, 10 % холестерину не викликає фазового розділення мембрани, втім, приводить до неоднорідності упаковки ліпідів.

Таким чином, у мембрані ДПФХ в присутності 5 мас. % GS встановлене критичне значення вмісту Хол ( $\sim 30 \text{ моль \%}$ ), при якому спостерігається якісна зміна мембранотропних ефектів, що пояснює суперечливі експериментальні та літературні дані щодо протилежних ефектів Хол за концентрацій 10 моль % та 40 моль % у мембрані.

Аналіз результатів калориметричних та ІЧ спектроскопічних експериментів, в результаті якого було визначено та охарактеризовано 2 типи зв'язування GS із ліпідними мембранами, які відповідають зв'язуванню мономерів та олігомерів GS дозволяє пояснити немонотонність та різноспрямованість ефектів GS на модельні мембрани із різним ліпідним складом та вмістом Хол агрегацією пептиду при його контакті з полярною поверхнею ліпідного бішару, а також впливом змін гідратації фосфатних та карбонільних груп ліпідів при вбудовування Хол чи GS. Амфіфільний GS перебуває у полярному водному середовищі у формі міцелярних агрегатів – димерів чи олігомерів. При сорбції на поверхню модельної мембрани з цвіттеріонних чи аніонних ліпідів імовірно відбувається дисоціація димерів завдяки

підсиленій електростатичній взаємодії (зменшення діелектричної проникності води в приповерхневому шарі) зарядів орнітину GS з фосфатами чи гідроксилами ліпідних молекул ДПФХ та ДПФГ на межі поділу полярної фази розчинника та неполярної області бішару. Після цього відбувається розподілення / занурення мономерів GS в гідрофобну товщу бішару. При такому способі взаємодії GS з ліпідними мембранами подальша агрегація пептиду в бішарі не відбувається, GS залишається радше адсорбованим в області інтерфейсу бішару, ніж зануреним у неполярну частину мембрани. Електростатична взаємодія заряджених орнітинів пептиду з фосфатами та гідроксилами пояснює спостережувану дегідратацію поверхні мембран та утворення зв'язків GS з P=O групами ліпідів. Присутність Хол в модельних мембранах полегшує вбудовування GS в ліпідні мембрани, сприяючи розподіленню димерів GS у бішар. При збільшенні вмісту Хол в мембранах збільшується відстань між від'ємно зарядженими групами сусідніх фосфоліпідів і при адсорбції димерів GS із водної фази не формується оптимальна відстань між зарядами поверхні для про-горизонтальної орієнтації димерів GS та їх наступної дезагрегації. Димери та олігомери GS занурюються в бішар, при цьому глибина занурення буде більшою, ніж у мембранах без Хол, можливо утворення Н-зв'язків димерами GS із гідроксилами Хол. Наступна дисоціація димерів/олігомерів GS імовірно відбуватиметься у гідрофобній частині бішару – «нижче» рівня карбонілів жирних кислот та гідроксилів холестеролу. Енергія, що вивільняється внаслідок дисоціації димерів (зменшення ентропії), буде витратитися на латеральний перерозподіл ліпідів в моношарі й утворення кластерів. Тому спостереження, виконані в різний час після такого вбудовування GS в мембрани, свідчатимуть про розвпорядкування – на початку, чи навпаки збільшення гомогенності пакування метиленових груп залишків жирних кислот – після латерального розділення та формування ліпідних кластерів. Подальше збільшення вмісту Хол (понад 30 мол%) в ліпідних мембранах викликає розшарування ліпідів через утворення кластерів, через це оптимальні відстані між від'ємними зарядами ліпідних голівок ліпідів або холестеролу для адсорбції димерів не формуються, адсорбція димерів GS відбувається повільніше. Через тіж самі причини зменшується й розподілення мономерів GS у бішар з попередньою дезагрегацією димерів у приповерхневому шарі. Отже збільшення вмісту Хол понад визначену критичну концентрацію веде до зменшення вбудовування GS в ліпідні мембрани, що і спостерігається за даними використаних експериментальних методів.

З огляду на те, що в мембранах бактеріальних клітин стерини відсутні, отримані результати створюють підґрунтя для мінімізації негативних побічних ефектів GS, зокрема гемолізу еритроцитів. При цьому, забезпечити підвищення зв'язування GS з мембраною за механізмом збільшення її вільного об'єму можна реалізувати у бактеріальних клітинах штучно – наприклад, шляхом уведення разом із GS допоміжної речовини.

Цікавим було вивчення впливу розгалуженого поліаніонного наноносія на взаємодію GS з мембранами. Молекули D-g-PAA(PE) можуть слугувати моделлю глікокаліксу природних мембран і таким дати змогу зінтерпретувати результати

експериментів з клітинами крові та епітеліальної тканини висновками модельного експерименту.

*Модуляція мембранотропної дії GS у присутності декстран-поліакриламідного сополімеру.*

У якості речовини, яка може модулювати властивості мембрани та, відповідно, зв'язування з нею GS, нами був обраний зіркоподібний поліаніонний декстран-графт-поліакриламідний сополімер D-g-РАА(РЕ), синтезований д. х. н. Куцевол Н. В. (Київський національний університет імені Тараса Шевченка). Цей полімер молекулярною масою близько 7 кДа та гідродинамічним радіусом близько 70 нм містить 5 поліакриламідних ланцюгів; частка негативно заряджених карбоксилатних груп у цих ланцюгах складає близько 37 %.

При концентрації GS 8 мас. % первинний ефект пептиду на мембрану у присутності D-g-РАА(РЕ) зменшується, тоді як мембранна гетерогенність підвищується. Напівширина піків фазових переходів мембрани ДПФХ із вмістом GS не зазнає істотних змін у присутності D-g-РАА(РЕ). Можна зробити висновок, що у присутності полімеру теж має місце зв'язування GS з мембраною у вигляді мономерів та олігомерів GS.

Встановлено, що присутність полімеру викликає зсув рівноваги для перерозподілу в мембрану із полярного розчинника мономерів та олігомерів GS у бік останніх (рис. 13), що може розглядатися як підвищення ступеня зв'язування з мембраною олігомерів GS за рахунок мономерів.

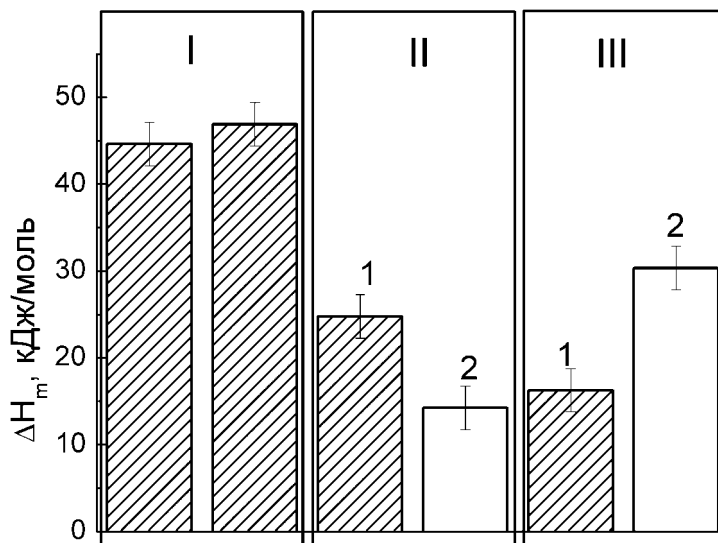


Рис. 13. Значення ентальпії піків плавлення модельних мембран в присутності GS та D-g-РАА(РЕ).

ДСК-піки мономерів (1) та олігомерів (2) для мембран з GS (II) та GS разом із D-g-РАА(РЕ) (III). Окремо наведено значення ентальпії для мембран без GS (I). Вміст GS в усіх випадках становив 5 мас. % відносно ДПФХ.

Разом усі спостережувані ефекти свідчать про наявність взаємодій GS та D-g-РАА(РЕ) у мембранному середовищі – безпосередніх або опосередкованих мембранним середовищем. Безпосередні взаємодії стосуються утворення

міжмолекулярних комплексів між катіонним GS та аніонним D-g-РАА(PE), які перешкоджають зв'язуванню обох компонентів з мембраною. Взаємодії, опосередковані мембранним середовищем, можуть полягати у конкурентному зв'язуванні обох речовин з мембраною, з перевагою для полімеру. Загалом, не можна виключати й одночасної реалізації обох механізмів, втім на користь другого з них свідчить той факт, що достовірні зміни ефекту GS спостерігаються при високих концентраціях цього пептиду. Можливою причиною того, що катіон-аніонний комплекс GS – D-g-РАА(PE) у дослідженій системі не утворювався, може бути використання буферного розчину, складові якого здатні формувати оболонку протиіонів навколо кожного з компонентів, перешкоджаючи їх безпосередньому зв'язуванню.

Таким чином, присутність полімеру D-g-РАА(PE) модулює взаємодію GS з мембраною ДПФХ шляхом зменшення загального мембранотропного ефекту та сприяє переважному зв'язуванню з мембраною олігомерів, а не мономерів пептиду.

## ВИСНОВКИ

В дисертації вирішено важливу наукову проблему – встановлено способи модифікації зв'язування мембраноактивних пептидів з ліпідними мембранами для керування відгуком біологічних об'єктів.

За допомогою низки експериментальних методів і математичного моделювання проведено комплексне дослідження взаємодії ряду мембраноактивних пептидів з біологічними та модельними мембранами різного ліпідного складу, а також встановлено молекулярні механізми модуляції взаємодії природних мембранотропних пептидів з ліпідними мембранами.

Визначено два різні за наступним функціональним відгуком механізми взаємодії МП з мембранами – вбудовування та адсорбція. Вбудовування МП веде до впорядкування та компактизації пакування ліпідів в мембранах і є не чутливим до дії модифікаторів. Взаємодія МП з мембранами шляхом адсорбції не веде до впорядкування ліпідів, реалізується через агрегацію МП у водній чи гідрофобній фазі. Показано можливість керування адсорбцією МП на мембранах зовнішніми полями, біологічно активними речовинами, наночастинками. Отримані у роботі результати сприяють більш ґрунтовному розумінню молекулярних механізмів дії мембраноактивних пептидів та розробці нових ефективних стратегій подолання антибіотикової резистентності. Визначені способи керування мембранотропною дією пептидів є підґрунтям для створення технології контролю біологічної активності МП.

1. Встановлено кореляцію між структурою пріонних пептидів та дезінтеграцією ліпідного бішару пласких модельних мембран. Вперше показано, що формування дискретних катіонселективних пор індукується мутантними варіантами людського пріону PrP [170-175] N171S, тоді як нативний пептид має лише модифікуючий вплив на провідність модельних мембран. Запропоновано гіпотезу, у рамках якої утворення каналів з різною провідністю пріонним пептидом PrP [170-175] N171S може бути обумовлено різним агрегаційним потенціалом пептидів.



2. За допомогою реєстрації струмів поодиноких іонних каналів в бішарових ліпідних мембранах охарактеризовано закономірності впливу химерного поліпептиду Gef1 дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на утворення потенціал-залежних хлоридних каналів в бішарових ліпідних мембранах, які перебувають в закритому стані при високих від'ємних трансмембранних потенціалах. Показано, що ковалентна модифікація С-кінцевим злиттям з зеленим флуоресцентним білком та колокалізація з маркерним білком апарату Гольджі Mnt1 не впливає на мембранотропну активність цього поліпептидного аніонселективного іонного каналу.

3. Запропоновано концептуальну модель сорбції циклічного антимікробного олігопептиду граміцидину S на ліпідні мембрани, у рамках якої перемикає між двома типами зв'язування GS із мембранами, що відповідають розподілу в бішар мономерів та олігомерів пептиду, контролюється агрегацією-деагрегацією димерів GS на поверхні ліпідної мембрани. Зміщення рівноваги відбувається за рахунок зміни заряду поверхні та щільності пакування ліпідів. Присутність зіркоподібного полімеру D-g-РАА(PE) є модулюючим фактором взаємодії GS з мембраною ДПФХ забезпечуючи зменшення загального мембранотропного ефекту GS та сприяючи зв'язуванню з мембраною олігомерів пептиду за рахунок мономерів.

4. З'ясовано молекулярні механізми впливу антимікробного пептиду GS на фізичний стан ліпідного бішару модельних мембран. Встановлено збільшення анізотропії біофізичних характеристик ліпідного бішару у напрямку нормалі до поверхні мембрани при сорбції GS. У цвіттеріонних та від'ємно заряджених мембранах декапептид GS викликає дегідратацію фосфатних груп, розупорядкування упаковки полярної частини та спричиняє ущільнення пакування ацильних вуглеводневих ланцюгів. При великих (надлітичних) концентраціях GS його ефекти не залежать від присутності холестеролу та кривизни мембрани і спостерігаються як у мультишарових модельних мембранах із фосфатидилхоліну, так і у сферичних ліпосомах.

5. Визначено немонотонний модулюючий ефект холестеролу на утворення комплексів циклопептидного антибіотика GS з модельними та природними мембранами. Механізм модифікуючого впливу холестеролу на структурно-динамічний стан мембран обумовлений зміною ступеня гідратації ліпідів, збільшенням мікрів'язкості ліпідного бішару та сприянням латеральному фазовому розділенню ліпідів з утворенням кластерів. В діапазоні фізіологічних концентрацій холестерол сприяє більш ефективному вбудовуванню GS в бішар і підвищенню ступеня гідратації цвіттеріонних ліпідів, це послаблює гемолітичну активність GS. Підвищений вміст холестерину й активація перекисного окислення ліпідів у мембрані еритроцитів майже повністю пригнічують гемолітичну активність GS. Показано, що зміну гідратації комплексів пептиду з ліпосомами, можна використовувати для контролю накопичення та вивільнення мембраноактивних пептидів з ліпідних везикул і оцінки стійкості утворених комплексів.

6. Охарактеризовано особливості впливу граміцидину S на функціонування тромбоцитарної ланки системи гемостазу. Встановлено, що GS

викликає сферуляцію та активацію тромбоцитів, опосередковану іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Граміцидин S порушує роботу згортаючої системи крові зменшуючи дозозалежним чином як ступінь, так і швидкість агрегації тромбоцитів, призводить до зниження їх адгезивної здатності, реорганізації цитоскелету та формування псевдоподій при контакті з поверхнею скла. Встановлено, що GS викликає розпад агрегатів тромбоцитів людини. Математичне моделювання кінетики дезагрегації тромбоцитів дозволило визначити домінуючий молекулярний механізм руйнування клітинних агрегатів. Виявлені антиагрегаційна та тромболітична активності антимікробного пептиду матимуть практичне застосування при розробці місцевих протитромбозних фармпрепаратів.

7. Продемонстровано модулюючий ефект щільності пакування, мікров'язкості, ступеня окислення ліпідів мембран на індуковані GS морфофункціональні зміни клітин крові. Модифікація гідрофобних, а також електростатичних взаємодій в мембрані впливає на зв'язування GS з клітинними крові та веде до зміни функціональної активності тромбоцитів й еритроцитів. Встановлено кореляцію між ступенем модифікації структурного стану та фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під впливом гамма-опромінення, про- та антиоксидантів, фармпрепаратів та кінетичними характеристиками дезагрегації тромбоцитів і гемолізу еритроцитів під дією GS. Зокрема показано, що зменшення щільності пакування ліпідів у бішарі при перекисному окисленні й гамма-опроміненні *in vitro* полегшує вбудовування, але знижує міцність зв'язування GS з мембранами еритроцитів і тромбоцитів. Розраховані енергії активації процесів дезагрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів під дією GS свідчать що дифузія GS в напрямку нормалі до мембрани йде швидше, ніж у латеральному й зумовлена відмінностями в структурі глікокаліксу та складі мембран клітин крові.

8. Детально охарактеризовано клітинні ефекти й особливості впливу водних розчинів GS та комплексів нанорозмірних ліпосом з пептидом на величину потенціалу пробою плазматичних мембран та гемолітичну стійкість еритроцитів людини. Уперше продемонстровано приховані зміни електромеханічної стабільності та об'ємного розподілу еритроцитів при сорбції сублітичних кількостей GS із водної фази. Використання комплексів олігопептиду з 100 нм ліпосомами зменшує GS-індуковані зміни об'єму еритроцитів, підвищує стійкість мембран еритроцитів до кислотного гемолізу і чітко демонструє здатність ліпосом зливатися з клітинними мембранами і вивільняти адсорбований пептид в клітини протягом хвилин. Отримані результати сприятимуть оптимізації системного медичного застосування антимікробних пептидів, інкапсульованих у нанорозмірні ліпідні носії.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Наукові публікації, які розкривають основний зміст дисертації*

#### *статті у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України*

1. Хакл Е.В., Берест В.П., Аламуш А.Х.Ф., Гаташ С.В. Влияние ПОЛ и ионизирующего излучения на дезагрегацию тромбоцитов под действием

- полипептидного антибиотика грамицидина S. *Біофізичний вісник*. 2007. Вип. 18 (1). С. 96–101.
2. Хакл Е. В., **Берест В. П.** Изменение подвижности липидов мембраны влияет на взаимодействие грамицидина S с эритроцитами человека. *Біофізичний вісник*. 2008. Вип. 21. С. 56–63.
  3. Хакл Е. В., **Берест В. П.**, Гаташ С. В. Устойчивость эритроцитов человека к гемолизу под действием полипептидного антибиотика грамицидина S. *Біофізичний вісник*. 2008. Вип. 20. С. 114–120.
  4. **Берест В.П.**, Аренкин П.В. Программно-аппаратный комплекс для изучения проводимости и емкости бислойных липидных мембран. *Біофізичний вісник*. 2009. Вып. 23(2). С. 148–154.
  5. **Берест В.П.**, Гаташ С.В., Николов О.Т. Исследование агрегации тромбоцитов при разных температурах. *Біофізичний вісник*. 2010. Вып. 25(2). С. 163–172.
  6. Шевченко Е.Е., **Берест В.П.** Приложение для симуляции осмотического поведения одиночного эритроцита. *Біофізичний вісник*. 2011. Вып. 27(2). С. 90–92.
  7. Астаповіч Д.Ф., **Берест В.П.**, Батюк Л.В., Муравейник О.А. Спосіб аналізу кінетики гемолізу еритроцитів. *Біофізичний вісник*. 2016. Вип. 36. С. 63–70.
  8. Овсянникова Т. М., Коваленко А. О., **Берест В. П.**, Боріков О. Ю. Зміни електрофізичних характеристик еритроцитів, індуковані граміцидином С. *Біофізичний вісник*. 2021. Вип. 45. С. 32–43.
  9. Перцов А.А., **Берест В.П.** Аналіз кінетики світлорозсіювання суспензії клітин при агрегації: математичне моделювання дезагрегації тромбоцитів // *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Радіофізика та електроніка»*. 2021. Вип. 34. С. 79–89.

**Статті у наукових періодичних виданнях інших держав із напрямку дисертації**

10. Debska G, Kicińska A, Skalska J, **Berest V**, Szewczyk A. Mitochondrialne kanały jonowe [Mitochondrial ion channels]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2002. № 56(3). S 315–321. (**SCOPUS**).
11. Szewczyk A., Kicinska A., Debska G., Skalska J., **Berest V**. Wewnatrzkomorkowe kanały jonowe. *Działalność Naukowa PAN. Wybrane Zagadnienia*. 2001. № 12. S. 67–69.
12. Flis K, Bednarczyk P, Hordejuk R, Szewczyk A, **Berest V**, Dolowy K, Edelman A, Kurlandzka A. The Gef1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with chloride channel activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. № 294(5). S. 1144–1150. (**SCOPUS**) (**Q1**).
13. **Berest V**, Rutkowski M, Rolka K, Łęgowska A, Debska G, Stepkowski D, Szewczyk A. The prion peptide forms ion channels in planar lipid bilayers. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2003. № 8(2). S. 353–62. (**SCOPUS**).
14. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Gatash S.V. Effect of Cholesterol Content on Gramicidin S-Induced Hemolysis of Erythrocytes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2012. V. 18. Issue 2. P. 163–170. (**SCOPUS**) (**Q3**).
15. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Gatash S.V. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S

with platelets. *Journal of Peptide Science*. 2012. Vol. 18. Issue 12. P. 748–754. (SCOPUS) (Q2).

16. Pavlik L.L., Mikheeva I.B., Al'-Mughrabi Y.M., **Berest V.P.**, Kirova Y.I., Germanova E.L., Luk'yanova L.D., Mironova G.D. Specific Features of Immediate Ultrastructural Changes in Brain Cortex Mitochondria of Rats with Different Tolerance to Hypoxia under Various Modes of Hypoxic Exposures. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018. V. 164. N 3. P. 376–381. (SCOPUS) (Q3).
17. Yemets V.G., Almazova E.B., **Berest V.P.** Gas redistribution between bulk and bubble in water phase under irradiation by low-intensive electromagnetic waves. *Telecommunications and Radio Engineering*. 2018. V. 77. Issue 12. P. 1097–1101. (SCOPUS) (Q3).

**Статті, які додатково відображають наукові результати дисертації**

18. Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В., **Берест В.П.** Зависимость гидратации фибриногена от дозы гамма-облучения по данным СВЧ-диэлектрметрии. *Вісник Харківського університету*. 2000. № 488. *Біофізичний вісник*. Вип.6. С. 108–111.
19. Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В., **Берест В.П.** Влияние  $\gamma$ -облучения и температуры на плазму и сыворотку крови по данным СВЧ-диэлектрметрии. *Вісник Харківського університету*. 2000. № 497. *Біофізичний вісник*. Вип.7. С. 24–28.
20. Ал-Амуш А.Х.Ф., **Берест В.П.**, Гаташ С.В., Перский Е.Э. Влияние катионов на агрегацию тромбоцитов. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*. 2006. Вип. 3. № 729. С. 5–9.
21. Ал-Амуш А.Х.Ф., **Берест В.П.**, Хакл Е.В., Перский Е.Э. Влияние температуры на дезагрегацию тромбоцитов, вызванную грамицидином S. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*. 2007. Вип. 5. № 768. С. 3–9.

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

22. **Berest V.**, Stepkowski D., Szewczyk A. Prion Derived Peptides Increase Lipid Bilayer Conductance. *XIV International Biophysics Congress*. Buenos Aires. 2002. – P. 97.
23. Szewczyk A., Kicińska A., Skalska J., Dębska G., **Berest V.** Mitochondria and potassium channel openers. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2002. Vol. 7. Supplement. P. 222.
24. **Berest V.P.**, Hackl E.V., Gatash S.V. Effect of the erythrocyte membrane state on the gramicidin S - induced haemolysis of erythrocytes. *Journal of Peptide Science*. 2004. Vol. 10. Supplement. P. 237. (Web of Science).
25. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Alamush A., Gatash S.V., Vasyl'eva L.V. Calcium dependent pathway of gramicidin S effect on human blood platelets. *Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду*. м. Харків, 24–27 жовтня 2006 р. Т. 1. Харків, 2006. С. 112.
26. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Al-Amoush A., Gatash S.V. Interaction of antimicrobial

- peptide with model and cell membranes. *Тези доповідей IV з'їзду Українського біофізичного товариства*. м. Донецьк, 19–21 грудня 2006 р. Донецьк, 2006. С. 94–95.
27. Hackl E., **Berest V.**, Alamoush A., Gatash S. Gramicidin S effect on human blood platelets depends on the mobility of membrane lipids. *Journal of Peptide Science*. 2006. Volume 12. Issue S1. P. 161. (*Web of Science*)
  28. **Берест В.П.**, Пащенко В.В. Адаптация математической модели осмотического поведения одиночной эпителиальной клетки для анализа структурно-функциональных превращений тромбоцитов при агрегации. *Матеріали XI конференції по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці*, м. Київ, 4–6 листопада 2010 р. Київ, 2010. С. 91
  29. Шевченко Е.Е., **Берест В.П.** Математическое моделирование осмотической релаксации одиночной клетки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2012* : материалы VIII Междунар. науч.-техн. конф., г. Севастополь, 23–27 апреля 2012 г. Севастополь : СевНТУ, 2012. С. 72–73.
  30. **Берест В.П.**, Лонгус К.С. Моделювання взаємодії граміцидину S із ліпідним бішаром методом молекулярної динаміки. *Матеріали VI з'їзду Українського біофізичного товариства*. Луцьк : СНУ імені Лесі Українки, 2015. С. 98.
  31. **Berest V.P.**, Gorobchenko O.O., Vashchenko O.V., Kasian N.A., Nikolov O.T. Narrow Band Dielectrometry as a Tool to Monitor Drug Release and Accumulation in Liposomes. *9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals : Abstracts*, Odessa, 4–7 September 2018, Odessa, 2018. P. 285–289. (*SCOPUS*).
  32. **Берест В.П.**, Будянская Л.В., Ващенко О.В., Софронов Д.С. Грамицидин S в многокомпонентных липидных мембранах: роль липидного состава. *XIII Міжнародна конференція по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці*, м. Київ, 18–20 жовтня 2018 р. Київ, 2018. С. 10.
  33. **Берест В.П.**, Січевська Л.В., Дягелева О.А., Сотніков А.А., Жигалова Н.М. Зміна електрокінетичних та осмотичних властивостей еритроцитів при дії граміцидину S. *Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства*, м. Київ, 29–31 жовтня 2018 р. Київ, 2018. С.14.
  34. Borikov O.Y., Morozova O.M., **Berest V.P.** Sub-Microfluidic Setup to Quantify Cell Surface & Charge Density. *2019 IEEE 2nd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering*, Lviv, 2019. P. 256–259. (*SCOPUS*).
  35. Sichevska L., Gerasimova A., **Berest V.**, Ovsyannikova T., Levchenko A., Laser-controlled Interaction of Cytochrome c with Lipids May Not Disrupt Apoptotic Pathway. *8-th International Conference on Advanced Optoelectronics and Lasers : Conference Proceedings*, Sozopol, 6 – 8 September 2019. Sozopol, 2019. P.329–332. (*SCOPUS*).
  36. Дудко Н.В., Сотніков А.А., Січевська Л.В., Дягелева О.А., **Берест В.П.** Вплив ліпосомних комплексів граміцидину S на структурно-функціональні властивості еритроцитів. *Збірник тез чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства*, м. Київ – Луцьк, 12–15 листопада 2019 р. Київ : КНУ імені Тараса Шевченка, 2019. С. 14.

37. Kalinovich V.S., **Berest V.P.** Similarity of Gramicidin S and Cryoprotectant Polyethylene Glycol Membranotropic Effects *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019 № 29(2). P. 161. (**SCOPUS**).
38. **Berest V.**, Budianska L., Vashchenko O., Kutsevol N., Harahuts Yu., Kasian N., Lisetski L. Membranotropic action of gramicidin S and its relation to lipid membrane composition. *6<sup>th</sup> International Conference «Nanobiophysics: fundamental and applied aspects» : Book of abstracts*, Kyiv, 1–4 October 2019. – Kyiv : Institute of Physics of NAS of Ukraine, 2019. P. 15.
39. **Berest V.P.**, Budianska L.V., Kutsevol N.V., Kuziv Y.I., Vashchenko O.V. Interplay of antibiotic gramicidin S with cholesterol and dextran-polyacrylamide copolymers in lipid membranes. XII International Conference «Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials» 1-5 June 2020, Kamianets-Podilskyi, UKRAINE. S. 7.
40. **Berest V.**, Sotnikov A., Sichevska L. Lipid Nanocarriers Impede Side Effects of Delivered Antimicrobial Peptide. *2021 IEEE 3rd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering*, Lviv, 26–28 August 2021. Lviv, 2021. P. 513–518. (**SCOPUS**).
41. **Berest V.**, Sichevska L., Gorobchenko O. Adsorption of gramicidin S on nanosized liposomes can mitigate severe side effects of antimicrobial peptide. *7th International Conference «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects» : Book of abstracts*, Kharkiv, 4–8 October 2021, Kharkiv, 2021. P. 29.

## АНОТАЦІЯ

Берест В. П. «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки), Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України. – Харків, 2021.

В дисертаційній роботі вивчено особливості кінетики та динамічної поведінки біомолекул (пептидів) на межі поділу полярної та неполярної фаз та у ліпідних мембранах. Визначено вплив точкових замінів амінокислот в пептидній послідовності на агрегацію пріонних пептидів у бішарі з утворенням катіон-селективних іонних каналів. Встановлено, що ковалентна модифікація білка gef1 з сімейства CLC каналів не впливає на потенціал керуваність каналу та його аніонну селективність. Експериментально доведено, що склад мембран, ступень окислення ліпідів, присутність допантів  $\alpha$ -токоферолу та холестеролу визначають кінетику та міцність зв'язування антимікробного пептиду граміцидину S з модельними та природними мембранами, що впливає на функціональний відгук клітин. Знайдено критичне значення концентрації холестеролу, для використання у технології модифікації терапевтичного ефекту GS та розділення його протимікробної та гемолітичної активності. Молекулярні особливості дії антимікробного декапептиду GS на біоміметичні мембранні структури та живі клітини дозволили сформулювати способи управління його мембранотропною активністю. Створено та випробувано нову форму доставки GS в організм за допомогою інкапсуляції в ліпосоми та в комплексі із полімерним декстран-поліакриламідним наноносієм. Зареєстровано дезагрегацію тромбоцитів при дії GS, побудовано математичну модель та розраховано енергії активації цього процесу. Визначені особливості агрегації та дезагрегації тромбоцитів закладають підвалини нової концепції використання GS не лише у якості антибіотика, а й місцевого протизгортуючого та тромболітичного препарату.

**Ключові слова:** поверхневі явища, адсорбція, мембранотропні пептиди, мембрани, гідратація, іонні канали, дифузія, пріони, граміцидин S, холестерол, ліпосоми, тромбоцити, еритроцити, агрегація, флуоресцентна спектроскопія, діелектрометрія, математичне моделювання.

## ABSTRACT

Berest V. P. “Biophysical properties of natural membrane-active peptides” – Manuscript.

Thesis for a Doctoral Degree in Physics and Mathematics: Speciality 03.00.02 – biophysics. – V. N. Karazin Kharkiv National University of Ministry of Education and Science of Ukraine. – Kharkiv, 2021.

Biophysical characterization of small molecules adsorption onto lipid membranes and redistribution within bilayer may open up new insights for practical application of membrane active peptides in biomedicine and nanotechnologies. We have characterized the interaction of several classes of peptides including integral

membrane ion channels, self-assembling prion derived peptides and antimicrobial cyclic oligopeptide with model and natural cell membranes. It was shown that incorporation of polypeptide into the membrane is less prone for external modulation, while adsorption onto membranes could be controlled by external fields, membrane lipid composition and a rigidity of membrane. Substitution of polar uncharged asparagine to serine in a primary sequence of prion derived peptide leads to the homologous aggregation of peptides in a lipid bilayer with the formation of a family of cation selective ion channels. Another type of peptide-membrane interactions were documented for antimicrobial peptide gramicidin S. Aggregation of peptide molecules in water prior to redistribution into bilayer was postulated for zwitterionic and anionic model lipid membranes, while binding of GS dimers or oligomers with subsequent dissociation in the hydrophobic core of the membrane is more favorable for membranes containing cholesterol. Different diffusion rates were observed for GS interacting with native cell membranes of platelets and red blood cells in longitudinal and transverse directions. The role of membrane glycocalyx in such interactions could be modeled by joint application of GS with dextran-polyacrylamide star-like polymer.

Of particular practical importance is the comprehensive characterization of biophysical mechanisms of GS interaction with model membranes, blood cells and cell cultures of epithelial cells. The Covid-19 pandemic has reminded humanity of the dangers of infectious diseases and the possibility of using known pharmaceuticals for new purposes. The rapidly growing resistance of microorganisms to antibiotics is a global problem that threatens the existence of mankind. In the search for new anti-infective drugs natural antimicrobial peptides have become especially relevant. The targets of these peptides are mainly cell membranes, resistance to these peptides rarely develops, and their disadvantage is low specificity and side effects. GS has a broad spectrum of biological activity against Gram-positive, some Gram-negative bacteria and fungi, at the same time it has a detrimental effect on the human cells and is therefore used in medicine only externally. Accomplishment of the task of the dissociation of a positive antimicrobial effect from a negative lytic action towards host cells can be achieved through determining the molecular mechanisms of interaction of antimicrobial peptides with membranes of different composition, this may also allow to expand the scope of antimicrobial peptides in the fight against infections and to open ways for a registered drug's redeployment.

Ideas on the crucial contribution of electrostatic and hydrophobic interactions in the formation of GS complexes with natural and model membranes have been verified; the possibility of aggregation of GS molecules before immersion in the hydrophobic part of the bilayer; changes in the degree of hydration of the membrane during its complexation with GS; the possibility of penetration of GS molecules through the membrane. The studies were performed by fluorescence spectroscopy, microwave dielectrometry, confocal and fluorescence microscopy, which are sensitive to changes in hydration, mobility of membrane components and their microenvironment. We have elucidated the physical principles of GS interaction with membranes and the methodology for counteracting the possibility of resistance to it were developed, the technology of managing its membranotropic activity and



expanding the range of its medical application were addressed as well. At the same time we failed to witness the possibility of GS penetration through the membrane, so did not confirm the theory of intracellular targets of antimicrobial peptides, at least for GS. In experiments with human red blood cells we demonstrated that deposition of GS onto liposomes decreases hemolytic susceptibility of RBC towards side effect of gramicidin S. Doping of phosphatidylcholine liposomes with cholesterol further increases resistance of RBC membranes to the lytic effect of GS. We assume that affecting hydrophobic interactions of an amphipathic peptide with target membrane changes GS partitioning to the plasma membrane and finally causes increase of the GS concentration required to the hemolytic action. Such a change can widen therapeutic window for systemic GS application.

Understanding the physical mechanism of the biological activity of the GS antimicrobial peptide is a valuable contribution to overcoming microbial resistance. The experimental results on the nature of the interaction of gramicidin S with intact blood cells and with modified model membranes expand the understanding of the mechanisms of interaction of peptide antibiotics with cell membranes and can be used in the development of new antibiotics, antimicrobial control technologies. The obtained data are the basis for the development of a reference and test system for the study of molecular mechanisms of rearrangement in biological objects under the conditions of their interaction with biologically active substances and nanoparticles. The technology for controlling the biological activity of polypeptide antibiotics is of great value for studying the problems of biological recognition.

**Key words:** surface phenomena, adsorption, membraneotropic peptides, membranes, hydration, ion channels, diffusion, prions, gramicidin S, cholesterol, liposomes, platelets, erythrocytes, aggregation, fluorescence spectroscopy, dielectrometry, mathematics.

Підписано до друку 05.11.2021 р. Формат паперу 60x84/16  
Папір офсетний 80 гр/м<sup>2</sup>. Офсетний друк. Ум. –др. аркушів 1.9.  
Наклад 100 примірників. Замовлення №237

---

61108, ФОП Старолат В.М.,  
Свідоцтво АЖ № 579485 від 14.10.1999 р.  
м. Харків, просп. Академіка Курчатова 12/21