

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України

*Кваліфікаційна наукова праця*

*на правах рукопису*

**БЕРЕСТ ВОЛОДИМИР ПЕТРОВИЧ**

УДК 577.352

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**БІОФІЗИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРИРОДНИХ МЕМБРАНОТРОПНИХ  
ПЕПТИДІВ**

Спеціальність 03.00.02 – біофізика

(фізико-математичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня

доктора фізико-математичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

\_\_\_\_\_ В. П. Берест

Науковий консультант: Трусова Валерія Михайлівна,  
член-кореспондент НАН України, доктор фізико-математичних наук, доцент

Харків – 2021

## АНОТАЦІЯ

Берест В. П. Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Мембраноактивні пептиди є природними регуляторами більшості функцій живих клітин. Їх взаємодія з мембранами визначається фізичними та хімічними чинниками, зокрема – зарядом поверхні мембран, в'язкістю мембран, ліпідним складом мембран, агрегацією пептидів у водній фазі чи в гідрофобній частині ліпідного бішару після адсорбції. Визначення молекулярних біофізичних особливостей таких взаємодій дозволить розробити технологію керування активністю природних мембранотропних пептидів для контролю перебігу фізіологічних процесів та можливості лікування патологічних станів. Вивчення розпочинається в модельних кількокомпонентних системах для визначення впливу окремих складових та верифікується в природних клітинних мембранах для з'ясування фізіологічного відгуку живих об'єктів клітинного рівня організації на знайдені та пропонувані способи модифікації взаємодії.

Метою роботи було встановлення молекулярних механізмів модуляції взаємодії мембранотропних пептидів з модельними та природними мембранами. Для досягнення цієї мети розв'язано низку завдань.

З'ясовано можливість утворення іонних каналів у модельних бішарових ліпідних мембранах пептидами  ${}_{169}\text{YSNQNNF}_{175}$  та  ${}_{170}\text{SSQNNF}_{175}$ , отриманими з послідовності людського пріону, та обґрунтовано можливу участь пептидів у розвитку нейропатологій через їх вплив на мембранний потенціал та швидкість дихання мітохондрій мозку.

Експериментально визначено, що поліпептид *gef1* з клітин *S.*

*cerevisiae* є аніонним каналом для  $Cl^-$ ; активність цього мембранного поліпептиду не залежить від ковалентної модифікації зеленим флуоресцентним білком GFP та колокалізації з маркерним білком апарату Гольджі.

Визначено вплив щільності поверхневого заряду ліпідних везикул та наявності іонів двовалентних металів на зв'язування GS із модельними ліпідними мембранами.

Методами НВЧ-діелектрометрії та флуоресцентної спектроскопії визначено зміни ступеня гідратації GS, пептид-ліпідних комплексів, модельних ліпідних везикулярних мембран та клітинних плазматичних мембран при взаємодії з граміцидином S та холестерином.

Вивчено спільний вплив декапептиду GS із речовинами, які модулюють мембранотропну дію: холестерином, зіркоподібним поліаніонним декстран-графт-поліакриламідним співполімером D-g-РАА(PE) на структуру модельних ліпідних мембран.

Для з'ясування можливості створення нових форм доставки пептиду досліджено вплив GS, інкапсульованого в ліпосоми, на морфо-функціональні характеристики клітин крові.

Визначено вплив антимікробного пептиду граміцидину S (GS) на кінетику морфологічних трансформацій й функціональну активність тромбоцитів, розраховано енергії активації цих процесів.

Досліджено дію фізичних факторів: температури (в області 4–44°C), гамма-опромінення, та хімічних чинників – перекисного окислення ліпідів – на характер взаємодії GS з мембранами тромбоцитів та встановлено залежність зв'язування GS з мембранами тромбоцитів від стану ліпідів мембрани.

Вивчено гемолітичну стійкість еритроцитів щодо GS у присутності різних модифікаторів мембран та визначено можливі шляхи підвищення терапевтичного індексу GS, зокрема через використання ліпосомальних наноносіїв.

Наукова новизна одержаних результатів визначається тим, що в дисертації вперше зареєстровано струми поодиноких іонних каналів, вбудованих у модельну пласку бішарову ліпідну мембрану поліпептиду *Gef1* з грибів *S. cerevisiae* та визначено, що поліпептид *Gef1* є потенціалзалежним аніонним мембранним каналом, селективним до іонів  $Cl^-$ .

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

Визначено оптимальний вміст холестеролу в нейтральних ліпідних мембранах, який сприяє зміні мембранотропних ефектів природного антимікробного пептиду GS та мінімізації GS-індукованого гемолізу еритроцитів при використанні холестеринових допантів.

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

Уперше показано, що GS зумовлює розпад агрегатів тромбоцитів, сформованих під дією природних індукторів агрегації. Побудовано математичну модель для аналізу кінетики дезагрегації тромбоцитів. 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 граміцидину до мембрани, але водночас призводить і до зменшення міцності зв'язування граміцидину з мембранами. Модифікація стану ліпідного бішару мембрани при перекисному окисленні ліпідів чи використанні біологічно активних сполук змінює гемолітичну активність

GS, зокрема із збільшенням вмісту холестерину в мембранах еритроцитів зменшується гемолітична активність GS.

Уперше показано можливість керування сорбцією циклічного пептиду GS на модельні ліпідні мембрани шляхом використання холестеролу або поліаніонного зіркоподібного декстран-поліакриламідного кополімеру для збільшення чи зменшення зв'язування GS з мембраною, а також сприянням перерозподілу в мембрани олігомерів GS із полярного водного середовища.

Практичне значення одержаних у дисертаційному дослідженні результатів полягає у тому, що, базуючись на поглибленні уявлень щодо механізмів мембранотропної дії антимікробних пептидів й ролі в цьому процесі зрушень у ліпідному складі мембран, встановлено можливість спрямованої модифікації структури мембран для підвищення їх стійкості до літичної дії GS. З'ясовані біофізичні механізми вбудовування GS у мембрани клітин крові може бути використано при розробці фармакологічних аналогів протимікробних мембранотропних препаратів.

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

Відкрите в роботі явище індукованої GS дезагрегації вже сформованих агрегатів тромбоцитів разом із показаним гальмуванням GS утворення агрегатів під час активації тромбоцитів індукторами агрегації може бути використано для розробки антиагрегаційних та тромболітичних препаратів місцевої дії з додатковим антибактеріальним ефектом.

Відзначене п'ятиразове зменшення гемолітичної концентрації GS, інкапсульованого в ліпідні нанорозмірні везикули, створює підґрунтя для використання ліпосомальних форм препарату для таргетованої доставки антимікробних пептидів і зменшення шкідливих побічних ефектів ліків.

Застосування полімерного наноносія фармпрепаратів відкриває можливість модуляції ефектів GS шляхом одночасного уведення з ним інших біологічно-активних речовин.

У дисертації розв'язано важливу наукову проблему – визначено способи модифікації зв'язування мембраноактивних пептидів з клітинними мембранами для модуляції функціональної відповіді клітин.

Визначено два різні за подальшим функціональним відгуком механізми взаємодії МП з мембранами – вбудовування та адсорбція. Вбудовування МП, наприклад, gef1 у мембрани апарату Гольджі, веде до впорядкування та компактизації пакування ліпідів у мембранах і є не чутливим до дії модифікаторів. Взаємодія МП з мембранами шляхом адсорбції, як у разі пріонних пептидів PrP [169-175] і PrP [170-175] N171S та граміцидину S, не веде до впорядкування ліпідів, реалізується через агрегацію МП у водній чи гідрофобній фазі. Показано можливість керування адсорбцією МП через зовнішні фізичні поля, біологічно активні речовини, наночастинки. Визначені способи керування є перспективними з огляду на створення технології контролю біологічної активності мембранотропних пептидів та нових засобів цілеспрямованої доставки лікарських препаратів.

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

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

Volodymyr P. Berest. Biophysical properties of natural membranotropic peptides. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

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

Membrane-active peptides are natural regulators of most functions in living cells. Their interaction with membranes is determined by physical and chemical factors, including membrane surface charge, membrane viscosity, lipid composition, aggregation of peptides in the aqueous phase or in the hydrophobic core of the lipid bilayer after adsorption. Determining the molecular biophysical features of such interactions will allow to develop a technology for controlling the activity of natural membranotropic peptides aiming at controlling the course of physiological processes and the opening possibility for treating pathological conditions. The study begins with model multi-component systems to determine the effect of individual components and is verified in natural cell membranes to determine the physiological response of living cells to the found or presumed ways to modify the interaction.

The aim of the work was to establish molecular mechanisms of modulation of interaction of membranotropic peptides with model and natural membranes. To achieve this goal, the following tasks were accomplished.

It has been experimentally determined that the *gef1* polypeptide from *S. cerevisiae* is an anion-selective channel for  $\text{Cl}^-$ ; the activity of this membrane polypeptide does not depend on the covalent modification by the green fluorescent protein GFP and colocalization with the marker protein of the Golgi apparatus.

The possibility of ion channel formation in model bilayer lipid membranes by peptides  $_{169}\text{YSNQNNF}_{175}$  and  $_{170}\text{SSQNNF}_{175}$  derived from the human prion sequence was elucidated, and the possible participation of peptides in the

development of neuropathologies due to their influence on membrane potential and respiration rate of hippocampal mitochondria was substantiated.

The influence of the surface charge density of lipid vesicles and the presence of divalent metal ions on the binding of GS to model lipid membranes was determined.

Changes in the degree of hydration of GS, peptide-lipid complexes, model lipid vesicular membranes and cellular plasma membranes in the interaction with gramicidin S and cholesterol were determined by microwave dielectrometry and fluorescence spectroscopy.

The synergistic effect of GS decapeptide and substances that modulate membranotropic action: cholesterol, star-like polyanionic dextran-graft-polyacrylamide copolymer D-g-PAA (PE) on the structure of model lipid membranes has been studied.

The effect of liposome-encapsulated GS on morphological and functional characteristics of blood cells was investigated to determine the possibility to use new nano-sized vehicles for targeted peptide delivery.

The influence of the antimicrobial peptide gramicidin S (GS) on the kinetics of morphological transformations and functional activity of platelets was studied, and the activation energies of corresponding processes were calculated.

The effect of physical factors, such as temperature in the range of 4-44°C and gamma-irradiation; and chemical factors involving lipid peroxidation on the nature of the interaction of GS with platelet membranes was studied. The dependence of GS binding to platelet membranes on the phase state of membrane lipids was analyzed.

The hemolytic resistance of erythrocytes to GS in the presence of various membrane modifiers was studied and possible ways to increase the therapeutic index of GS, in particular through the use of liposomal nanocarriers, were identified.



The scientific novelty of the obtained results is among others in following. By fusion of the GEF1 gene with a heterologous promoter for the first time a yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* overproducing the Gef1 was obtained. For the first time, single ion channel currents of the yeast polypeptide channel Gef1 reconstituted in a bilayer lipid membrane were recorded and it was determined that the Gef1 polypeptide is a potential-dependent anion CLC membrane channel.

It was first established that the replacement of the polar amino acid asparagine by serine in a peptide from the human prion sequence PrP [170-175] N171S promotes the aggregation of these peptides in bilayer lipid membranes with the formation of a cation-selective ion channel.

A critical value of cholesterol content in the model membrane of neutral lipids was established, for which a qualitative change of membranotropic effects of GS is observed, it explains the observed attenuation of the negative side effect of GS regarding RBC hemolysis when using cholesterol dopping.

It was found for the first time that GS in sublytic concentrations causes a shape change and eventually leads to platelet activation, which occurs due to changes in the permeability of the platelet membrane for  $\text{Ca}^{2+}$  ions.

It was first shown that GS causes the breakdown of platelet aggregates formed under the action of natural aggregation agonists. GS has been shown to inhibit ADP-induced platelet aggregation in a dose-dependent manner, reducing both the rate and degree of aggregation.

It has been found that a decrease in the order of lipids in the bilayer during gamma irradiation or peroxidation of lipids of platelet and erythrocyte membranes leads to easier incorporation of gramicidin S into the membrane, but also leads to a decrease in the binding strength of GS. Modification of the state of the lipid bilayer of the membrane by lipid peroxidation or the use of biologically active compounds alters the hemolytic activity of GS, in particular, high level of cholesterol in erythrocyte membrane decreases the hemolytic activity of GS.

The possibility of modulating the binding of GS to model lipid membranes in the presence of cholesterol and polyanionic star-like dextran-polyacrylamide copolymer was found. It is achieved either through changing (increasing or decreasing) the GS binding to the membrane, or by facilitating binding of GS oligomers to the membrane.

The practical significance of the results obtained in the dissertation is that it broadens our understanding of the mechanisms of membranotropic action of antimicrobial peptides and the role of shifts in the lipid composition of membranes, the possibility of targeted modification of membrane structure to increase their resistance to GS lytic action. The elucidated biophysical mechanisms of GS incorporation into blood cell membranes can be used in the development of pharmacological analogues of antimicrobial peptides.

Detailed analysis of the membrane and cellular effects of GS allows to create a method of using GS as a test system to detect pathological conditions of the organism and study the molecular mechanisms of rearrangement in biological objects under conditions of their interaction with external fields, biologically active substances and nanoparticles.

The phenomenon of GS-induced disaggregation of platelets along with the observed inhibition by GS of platelet aggregation can be used to develop antiplatelet and thrombolytic drugs of local action with additional antibacterial effect.

The observed five-fold reduction in the hemolytic concentration of GS encapsulated in lipid nanosized vesicles provides a basis for the use of liposomal formulations for targeted delivery of antimicrobial peptides and the reduction of harmful drug side effects. The use of a polymeric nanocarrier for pharmaceuticals opens the possibility of modulating the effects of GS by simultaneous administration with other biologically active substances.

The dissertation solves an important scientific problem it identifies the ways to modify the binding of membrane-active peptides to cell membranes aiming to modulate the functional response of cells.

Two mechanisms of MP interaction with membranes, which are different in terms of further functional response, are identified: incorporation and adsorption. The incorporation of MP, for example, gef1 into the membranes of the Golgi apparatus, leads to the ordering and compaction of the packaging of lipids in the membranes and is not sensitive to the action of modifiers. The interaction of MP with membranes by adsorption, in the case of prion peptides PrP [169-175] and PrP [170-175] N171S and gramicidin S, does not lead to lipid ordering, is realized through the aggregation of MP in the aqueous or hydrophobic phase. The possibility of controlling the adsorption of MP by external physical fields, biologically active substances, nanoparticles is shown. The identified methods of control are promising given the creation of technology to control the biological activity of membranotropic peptides and to create new vehicles for targeted drug delivery.

By using several experimental methods and mathematical modeling, a comprehensive analysis of the interaction of a number of membrane-active peptides with biological and model membranes of different lipid composition, as well as molecular mechanisms for modulating the interaction of natural membranotropic peptides with lipid membranes was performed.

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

## Список публікацій здобувача за темою дисертації

*Наукові праці, у яких опубліковано основні наукові результати 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. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, аналіз літературних даних, проведення експериментів, обробка, аналіз та інтерпретація результатів, написання статті*).
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 (*Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні завдання дослідження, участь в отриманні та обробці даних світлорозсіювання, узагальнення отриманих результатів, участь у аналізі результатів та підготовці публікації*).
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. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, участь в отриманні та обробці експериментальних даних, аналіз результатів та підготовка публікації*).
4. **Берест В.П.**, Аренкин П.В. Программно-аппаратный комплекс для изучения проводимости и емкости бислоиных липидных мембран. *Біофізичний вісник*. 2009. Вып. 23(2). С. 148–154. (*Особистий внесок*

здобувача: постановка завдання, участь у створенні прототипу обладнання, узагальнення отриманих результатів, написання статті).

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. (Особистий внесок здобувача: постановка завдання, підбір та аналіз літератури, участь у створенні устаткування, отримання та обробка агрегометричних даних, розрахунок параметрів моделі, участь у аналізі результатів та написання статті).
6. Шевченко Е.Е., **Берест В.П.** Приложение для симуляции осмотического поведения одиночного эритроцита. *Біофізичний вісник*. 2011. Вып. 27(2). С. 90–92. (Особистий внесок здобувача: постановка завдання, підбір та аналіз літератури, узагальнення отриманих результатів, підготовка публікації).
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. (Особистий внесок здобувача: постановка завдання, підбір та аналіз літератури, участь у обробці даних світлорозсіювання, узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).
8. Овсяннікова Т. М., Коваленко А. О., **Берест В. П.**, Боріков О. Ю. Зміни електрофізичних характеристик еритроцитів, індуковані грамїцидином С. *Біофізичний вісник*. 2021. Вип. 45. С. 32–43. (Особистий внесок здобувача: постановка завдання, підбір та аналіз літератури, участь в отриманні та обробці даних проточної цитометрії, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).
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. (Особистий внесок здобувача: постановка завдання, підбір та аналіз літератури, участь у розробці математичної моделі, узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).*

**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**). (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь в підготовці публікації).
11. Szewczyk A., Kicinska A., Debska G., Skalska J., **Berest V**. Wewnatrzkomorkowe kanały jonowe. *Działalność Naukowa PAN. Wybrane Zagadnienia.* 2001. № 12. S. 67–69. (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні завдань дослідження, участь у підготовці публікації).
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**). (Особистий внесок здобувача: участь у отриманні та обробці даних БЛМ експерименту, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).
13. **Berest V**, Rutkowski M, Rolka K, Łegowska 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**). (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, підбір та аналіз літератури, отримання та обробка даних БЛМ експерименту, флуоресценції та потенціометрії, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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**). (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, участь в отриманні та обробці даних кислотного гемолізу, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).
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**). (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, отримання та обробка даних агрегометрії, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).
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**). (Особистий внесок здобувача: узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).
17. Yemets B.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**). (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні завдань дослідження, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).

**Праці, 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. (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, узагальнення отриманих результатів).
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. (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, узагальнення отриманих результатів).
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. (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні завдань дослідження, участь в отриманні та обробка агрегометричних даних, узагальнення отриманих результатів, написання статті).
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. (Особистий внесок здобувача: постановка завдання, отримання та обробка експериментальних даних, узагальнення отриманих результатів, написання статті).



***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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, отримання та обробка експериментальних даних, аналіз результатів та участь у підготовці публікації).
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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у отриманні та обробці даних, участь у підготовці публікації).
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**) (Заочна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).
25. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Alamush A., Gatash S.V., Vasył'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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдань, отримання та обробка даних світлорозсіювання, участь у підготовці публікації).
26. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Al-Amoush A., Gatash S.V. Interaction of antimicrobial peptide with model and cell membranes. *Тези доповідей ІV з'їзду Українського біофізичного товариства*. м. Донецьк, 19–21 грудня 2006 р. Донецьк, 2006. С. 94–95. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдань, підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні задач дослідження, отримання

та обробка калориметричних даних, узагальнення отриманих результатів, участь у підготуванні публікації, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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*) (Заочна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, отримання та обробка даних, участь у підготовці публікації).
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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдань, адаптація кінетичної моделі, узагальнення отриманих результатів, підготовка публікації).
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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдань, участь у модифікації математичної моделі, узагальнення отриманих результатів, підготовка публікації).
30. **Берест В.П.**, Лонгус К.С. Моделирование взаимодействия грамицидина S с липидным бисаром методом молекулярной динамики. *Матеріали VI з'їзду Українського біофізичного товариства*. Луцьк : СНУ імені Лесі Українки, 2015. С. 98. (Заочна форма участі. Особистий внесок

здобувача: постановка завдань, участь у проведенні моделювання, підготовка публікації).

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*). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, підбір та аналіз літератури, узагальнення отриманих результатів, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).
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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: робота з літературними джерелами, участь у аналізі результатів та підготовці публікації)
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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, участь в отриманні та обробці даних імпедансної спектроскопії, аналіз результатів та підготовка публікації).
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*). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, аналіз літератури, участь у розробці

устаткування мікрофлюїдики, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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)*. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдань дослідження, узагальнення отриманих результатів, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).
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.* (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, узагальнення отриманих результатів, написання тез).
37. Kalinovich V.S., **Berest V.P.** Similarity of Gramicidin S and Cryoprotectant Polyethylene Glycol Membrantropic Effects *Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019 № 29(2). P. 161. (Scopus)* (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, участь у аналізі результатів та підготовка публікації).
38. **Berest V.**, Budianska L., Vashchenko O., Kutsevol N., Harahuts Yu., Kasian N., Lisetski L. Membrantropic 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.* (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдання дослідження, узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).

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. (*Он-лайн участь. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні завдання дослідження, участь у аналізі результатів та підготовці публікації*).
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*) (*Он-лайн участь. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, участь в отриманні даних проточної цитометрії, аналіз результатів та підготовка публікації*).
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. (*Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка завдання, обробка, аналіз та інтерпретація результатів, написання тез*)

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ.....	26
ВСТУП.....	27
Розділ 1 МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ МЕМБРАНОАКТИВНИХ ПЕПТИДІВ З КЛІТИНАМИ ТА МОДЕЛЬНИМИ ЛІПІДНИМИ СИСТЕМАМИ .....	37
1.1. Біофізична характеристика мембраноактивних пептидів.....	37
1.1.1 Роль агрегації пептидів в утворенні комплексів з мембранами..	39
1.1.2 Способи взаємодії АМП з біологічними мембранами .....	42
1.1.3 Не літичні механізми дії мембраноактивних пептидів .....	46
1.1.4 Синергізм у взаємодії МП з мембранами .....	47
1.1.5 Здатність мембраноактивних пептидів до формування іонних каналів.....	48
1.2. Структура й мембранотропна активність поліпептиду граміцидину S .....	49
1.2.1 Хімічна будова граміцидину S .....	50
1.2.2 Прогнозований механізм антимікробної дії GS.....	51
1.2.3 Залежність біологічної активності граміцидину S від його структури.....	56
1.3 Структура біологічних мембран .....	59
1.3.1 Динамічний стан ліпідів у бішарі.....	60
1.3.2 Структурна роль холестерину в мембранах клітин.....	62
1.3.3 Білок-ліпідні взаємодії в мембрані.....	64
1.3.4 Відмінності в складі мембран.....	66
1.4 Мембраноактивні пептиди внутрішньоклітинних мембран.....	68
1.5. Ультраструктура й функції тромбоцитів .....	69
1.5.1 Ультраструктура тромбоцитів людини.....	69
1.5.2 Молекулярні механізми активації й агрегації тромбоцитів .....	71
Висновки до розділу 1 .....	74

Розділ 2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ Й МЕТОДИКА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ .....	76
2.1 Вивчення мембранотропних ефектів пріонних пептидів .....	76
2.1.1 Вимірювання токів поодиноких іонних каналів .....	76
2.1.2 Вплив пріонних пептидів на мембранний потенціал мітохондрій гіпокампа щурів .....	77
2.2 Приготування зразків для дослідження мембранних CLC іонних каналів .....	78
2.3 Отримання модельних ліпідних мембран різного складу .....	80
2.4 Метод НВЧ діелектрометрії .....	81
2.5 Оптичні методи дослідження агрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів .....	92
2.6 Приготування зразків, вивчення впливу GS на мембрани тромбоцитів й еритроцитів .....	99
2.6.1 Виділення тромбоцитів і вимірювання набухання, зміни форми, агрегації й дезагрегації .....	99
2.6.2 Оптичний метод дослідження гемолітичної стійкості мембран еритроцитів .....	101
2.6.3 Стійкість еритроцитів до гемолізу .....	102
2.6.4 Вплив антимікробного пептиду граміцидину S на морфологічні та електрофізичні характеристики еритроцитів .....	106
2.6.5 Визначення потенціалу пробою мембрани .....	111
2.6.6 Мембранотропна активність циклічного олігопептиду граміцидину S щодо тромбоцитів й еритроцитів .....	116
Висновки до розділу 2 .....	118
Розділ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОФІЗИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА НАСЛІДКІВ МОДИФІКАЦІЇ МЕМБАРНОАКТИВНИХ ПЕПТИДІВ, ЗДАТНИХ УТВОРЮВАТИ ІОННІ КАНАЛИ В ПРИРОДНИХ ТА МОДЕЛЬНИХ МЕМБРАНАХ .....	120

3.1 Вплив ковалентної модифікації та колокалізації з мембранним білком на функціональну активність рекомбінантного поліпептиду Gef1 .....	120
3.1.1 Внутрішньоклітинна локалізація химерного білка <i>Gef1</i> та його біофізичні характеристики.....	121
3.1.2 Поліпептид Gef1 утворює Cl <sup>-</sup> -селективні іонні канали в модельних плоских бішарових ліпідних мембранах .....	126
3.2 Модифікація первинної послідовності пептиду з метою посилення агрегаційної спроможності.....	131
3.2.1 Вплив первинної структури на схильність пріонних пептидів до агрегації.....	133
3.2.2 Утворення іонних каналів унаслідок агрегації пептидів у ліпідній мембрані .....	134
3.2.3 Наслідки агрегації пріонних пептидів у мембранах для іонного гомеостазу клітини.....	137
Висновки до розділу 3. ....	140
 Розділ 4 СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНИЙ СТАН ЛІПІДІВ МЕМБРАН ВИЗНАЧАЄ ХАРАКТЕР ВЗАЄМОДІЇ ЦИКЛІЧНОГО ОЛІГОПЕПТИДУ GS З ТРОМБОЦИТАМИ.....	142
4.1 Зміна форми тромбоцитів під дією граміцидину S .....	142
4.2 Дезагрегація тромбоцитів під дією граміцидину S .....	151
4.3 Математична модель дезагрегації тромбоцитів.....	159
4.4 Морфологічна оцінка методом флуоресцентної мікроскопії адгезивної активності тромбоцитів при дії GS .....	167
4.5 Вплив динамічного стану мембранних ліпідів на взаємодію GS з тромбоцитами .....	173
4.5.1 Вплив перекисного окиснення ліпідів мембран тромбоцитів на взаємодію з ними граміцидину S .....	173



4.5.2 Гамма-опромінення тромбоцитів <i>in vitro</i> під впливом вбудовування GS в мембрани кров'яних пластинок.....	178
Висновки до розділу 4 .....	185
Розділ 5 МОДИФІКАЦІЯ ГЕМОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ	
ГРАМІЦИДИНУ S .....	188
5.1 Гемоліз еритроцитів під дією граміцидину S.....	188
5.2 Вплив біофізичних характеристик мембран еритроцитів на зв'язування циклопептидного GS.....	197
5.3 Вплив відмінності морфології та складу плазматичних мембран клітин крові на активність GS щодо тромбоцитів та еритроцитів .....	200
5.4 Вплив рухливості та гідратації ліпідів мембран еритроцитів на ступінь гемолітичної дії GS .....	202
5.5 Модулювання взаємодії GS з мембранами клітин крові під дією холестеролу.....	207
5.6 Вплив поверхневого потенціалу та структури глікокаліксу клітини на сорбцію граміцидину S на мембрану еритроциту .....	212
5.6.1 Визначення електрокінетичних властивостей еритроцитів .....	212
5.6.2 Вплив модифікації поверхні клітин на взаємодію з GS, визначення локалізації GS у мембранах еритроцитів .....	216
5.7 Вплив інкапсуляції пептидів у сферичні нанорозмірні ліпосоми на кінетику накопичення пептиду GS в плазматичних мембранах еритроцитів .....	223
5.8 Вплив ліпосомальних форм GS на гемолітичну стійкість еритроцитів .....	226
Висновки до розділу 5 .....	250
Розділ 6 СПОСОБИ КЕРУВАННЯ ВЗАЄМОДІЄЮ АНТИМІКРОБНОГО ПЕПТИДУ GS З ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ .....	
	253

6.1 Модуляція мембранних ефектів граміцидину S зміною ліпідного складу мембрани та міжмолекулярних взаємодій.....	253
6.2 Вплив гідратації ліпідів та в'язкості полярної області бішару на взаємодію пептиду GS з модельними ліпідними мембранами.....	255
6.3 Керування мембранними ефектами GS шляхом зміни вмісту холестерину в модельній мембрані .....	268
6.4 Модуляція мембранотропної дії граміцидину S декстран-поліакриламідним полімером .....	274
Висновки до розділу 6 .....	278
ВИСНОВКИ.....	280
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	284
Додаток А. Список публікацій здобувача за темою дисертації .....	313

**ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ**

- ВАХ – вольт-амперна характеристика
- ФЕ – фосфатидилетаноламін (1-пальмітоїл-2-олеоїл-sn-гліцеро-3-фосфетаноламін)
- ФХ – фосфатидилсерин (1-пальмітоїл-2-олеоїл-sn-гліцеро-3-фосфо-Lсерин)
- БЛМ – бішарова ліпідна мембрана
- ДМФХ – *L*- $\alpha$ -диміристоїлфосфатидилхолін
- ДПФГ – *L*- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилгліцерін
- ДПФХ – *L*- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилхолін
- ДПФЕ – *L*- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилетаноламін
- МП – мембранотропний пептид
- АМП – антимікробний пептид
- КЛ – кардіоліпін
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЗТП – збагачена тромбоцитами плазма
- ФЕ – фосфатидилетаноламін
- ФХ – фосфатидилхолін
- Хол – холестерин
- GS – граміцидін S
- TEA-Cl – хлорид тетраетиламонію
- CLC – загальна назва сімейства потенціалкерваних хлоридних каналів
- NMDG – N-метил-D-глутамін
- PrP<sup>Sc</sup> – патологічна амілоїдна форма мембранного пріонного глікопротеїну
- PrP<sup>C</sup> – нативна форма мембранного пріонного глікопротеїну

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

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-листковими 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  $\text{PrP}$  у підтримці гомеостазу іонів у клітині. Для цього необхідно провести дослідження властивостей пептидних фрагментів  $\text{PrP}$  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. «Після-антибіотикова доба» покладає великі сподівання 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. Наночастинки, 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 завдання дослідження**

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

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

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-діелектометрії 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 холестеринном.
8. Вивчити сумісну дію GS із речовинами, які модулюють мембранотропну дію: холестеринном, зіркоподібним поліаніонним декстран-графт-поліакриламідним сополімером D-g-PAA(PE).
9. Дослідити вплив GS, інкапсульованого в ліпосоми, на морфо-функціональні 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, мікрофлюїдіка, 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 атенюацію 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  $\text{Ca}^{2+}$ .

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 граміцидину 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, мікров'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 методику 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-діелектрометричні 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 (Свєчніковою) 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 в 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.

## РОЗДІЛ 1

### МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ МЕМБРАНОАКТИВНИХ ПЕПТИДІВ З КЛІТИНАМИ ТА МОДЕЛЬНИМИ ЛІПІДНИМИ СИСТЕМАМИ

#### 1.1. Біофізична характеристика мембраноактивних пептидів

Пандемія Covid-19 вкотре нагадала про небезпеку інфекційних захворювань та необхідність підтримки нормального рівня функціонування імунної системи людини та згортуючої системи крові. Пептиди є учасниками та модуляторами імунної відповіді на мікробні та вірусні ураження, антимікробні пептиди нерідко виявляють протівірусну активність, природні пептиди використовуються у комплексній терапії постковідного синдрому. Мембраноактивні пептиди проявляють свою біологічну активність, взаємодіючи з клітинною мембраною, порушуючи її і призводячи до лізису клітини, або проникаючи крізь мембрану. Біофізичні методи дозволяють вивчати взаємодію пептид-мембрана для створення на основі МП нових медичних препаратів чи засобів для доставки ліків і генів [42]. Великий клас мембрано активних пептидів (МП) – антимікробні пептиди, які порушують цілісність мембрани або пригнічують клітинні функції бактерій, вірусів і грибів. Розробка нових антибіотиків є тимчасовим вирішенням проблеми резистентності внаслідок того, що стійкість до більшості антибіотиків у бактерій розвивається протягом кількох років. Для боротьби з резистентними мікроорганізмами потрібні препарати, що принципово відрізняються за механізмом дії від наявних антибактеріальних засобів. Альтернативою синтетичним антибіотикам можуть бути сполуки природного походження, зокрема, компоненти системи вродженого імунітету багатьох організмів - антимікробні пептиди (АМП). АМП інгібують розвиток бактерій, мають ряд переваг у порівнянні з традиційними антибіотиками і розглядаються як новий клас протимікробних засобів.

Загальною рисою МП є здатність вибірково взаємодіяти з поверхнею клітин, склад і морфологія яких відрізняються. Мішенями МП можуть бути різні молекули або молекулярні комплекси [43, 44]; деякі МП навіть мають кілька терапевтичних цілей. Крім того, тип мішені змінюється залежно від рН, концентрації солі та інших факторів навколишнього середовища [44]. Мембранно-активні пептиди володіють такими властивостями, як амфіпатичність і позитивний заряд, при цьому амінокислотні послідовності та 3D-структури МП є дуже різними [44, 45]. АМП еволюційно не призначені для взаємодії з конкретною ціллю, внаслідок цього не існує єдиного механізму їх дії. Різноманітність АМП та їх здатність виконувати свої функції різними способами дозволяють сподіватися на розв'язання з їх допомогою проблеми резистентності мікроорганізмів до традиційних антибіотиків [46].

Здатність пептиду асоціюватися з певною ділянкою або проходити через мембрану визначається фізико-хімічними властивостями пептиду (виражається його амінокислотною послідовністю) і складом ліпідного бішару. Концентрація пептидів також є важливим фактором, який може визначити результати взаємодії АМП-мембрана [47]. Конкретний пептид може змінювати свою поведінку залежно від його концентрації або складу бішару. Ефективна концентрація на поверхні мембрани визначає здатність АМП викликати збурення в просторовій структурі ліпідного бішару. Як правило, склад фосфоліпідів визначає тип фаз і просторове впорядкування бішару [49], а отже, впливає на поведінку АМП. Склад і структура клітинної стінки також можуть бути визначальними для концентрації АМП на поверхні ліпідного бішару, а отже, і для способу взаємодії з плазматичною мембраною [50].

Взаємодія АМП з клітинами може призвести до різних результатів: (i) пригнічення життєво важливих шляхів у зовнішньому шарі клітинної мембрани (наприклад, пригнічення транспорту пептидоглікану синтез ліпідом II [51]; (ii) пермеабілізація плазматичної мембрани (наприклад,

шляхом руйнування мембрани через утворення пор або покритт мембрани «килимом» з пептидів чи пептидних агрегатів [52, 53]); (iii) порушення структури плазматичної мембрани без невідновних змін (наприклад, перерозподіл мембранних білків між ліпідними рафтами через взаємодію з ліпідними мікродоменами [54]); (iv) транслокація через плазматичну мембрану (без руйнування мембрани) та інгібування метаболічних шляхів у цитоплазмі [55].

За просторовою структурою МП поділяють на альфа-спіральні, бета-структурні, альфа+бета, неупорядковані тощо [56]. Але ця класифікація умовна, оскільки структура багатьох МП визначається середовищем і змінюється залежно від зміни середовища та/або інших факторів (наприклад, локальної концентрації пептиду). Більше того, взаємодії МП-мембрана дуже динамічні та відбуваються шляхом взаємної адаптації конформації пептиду до конкретної структури мембрани. У мембранах правила формування вторинних структур і фолдингу поліпептидного ланцюга дуже відрізняються від водного середовища й водневі зв'язки стають, ймовірно, більш важливими для динаміки вторинної структури та утворення агрегатів у мембрані [57].

Циклічні, як і більшість пептидів, що мають дисульфідні внутрішньомолекулярні зв'язки, мають у водному певну структуру, яка може змінюватися пр. зануренні в мембрану. Наприклад, PG-1 утворює олігомерні трансмембранні  $\beta$ -бочки в бактеріоміметичних аніонних ліпідних мембранах, тоді як у багатих холестерином мембранах, які імітують еукаріотичні клітини, пептид утворює  $\beta$ -листові агрегати на поверхні бішару [58].

### 1.1.1 Роль агрегації пептидів в утворенні комплексів з мембранами

Амінокислотний склад пептиду дозволяє зробити припущення щодо його вторинної структури та схильності до агрегації. Вторинна структура і



схильність до агрегації разом з гідрофобністю і зарядом є визначальними детермінантами антимікробної дії. Вторинна структура пептиду та його схильність до агрегації залежать від середовища. Наприклад, лінійні МП можуть приймати різні конформації залежно від середовища.

Амілоїдні пептиди є класичним прикладом пептидів, які зазнають конформаційного переходу від нативної, переважно  $\alpha$ -спіральної структури, до ізоформи з високим вмістом бета-листів. Ці пептиди поділяють ключові структурні та функціональні особливості з АМП [59].

Приєднання АМП до ліпідного бішару й утворення ліпід-пептидних комплексів є необхідним етапом дії на клітину. Поряд зі здатністю зв'язуватись з ліпідами, схильність до самоагрегації має вирішальне значення для здатності АМП впливати на мембрану мікроорганізмів [60].

Самозбирання пептидів зумовлене електростатичними силами, водневими зв'язками, гідрофобними взаємодіями та  $\pi$ - $\pi$  стекінгом [61], схильність до агрегації залежить від умов середовища.

Властивості МП та АМП у розчинах електролітів важливі для їх взаємодії з мембранами, оскільки пептиди дістаються мембран через водну фазу [42]. Агрегація пептидів у водній фазі може впливати на їх антибактеріальну активність [62]. Прогностичні моделі з використанням штучних нейронних мережах показують, що агрегація пептидів у розчині дійсно сприяє низькій антимікробній активності [63]. Показано, що додавання катіонних залишків до пептидів інгібує агрегацію в розчині, одночасно покращуючи антимікробну дію [64].

Схильність МП до агрегації визначається первинною послідовністю та особливостями просторової структури. Замикання поліпептидного ланцюга в цикл або формування ковалентних внутрішньоланцюгових зв'язків забезпечує певну структурну стабільність МП у водному розчині та обумовлює можливість агрегації як у воді так і у неполярній фазі ліпідної мембрани [42].

Самоагрегація катіонних МП в основному регулюється електростатичними взаємодіями. Відмінності в поведінці МП залежно від середовища (полярного водного або неполярного мембранного) пояснюються змінами діелектричної проникності розчинника у при мембранному шарі та в гідروفобній товщі мембрани.

Все більшу увагу дослідників привертає вивчення антибактеріальних властивостей супрамолекулярних збірок на основі пептидів. Так для самозбираючогося дифенілаланіну антибактеріальну активність було вивчено з метою визначення залежності між самозбіркою та антимікробною активністю [65]. Дифенілаланін є центральним модулем розпізнавання  $\beta$ -амілоїдного пептиду. Дослідження продемонструвало, що взаємодія дифенілаланіну з бактеріями викликає пошкодження бактеріальної морфології, особливо мембрани, і тим самим пригнічує ріст бактерій. Неагреговані пептиди дифенілаланіну в субкритичних концентраціях інгібували ріст бактерій лише на 15–20%. Гідрофобна і некатіонна природа дифенілаланіну робить його привабливою сполукою для боротьби з резистентністю, оскільки, як добре відомо, кілька штамів бактерій розробляють контрзаходи в основному шляхом модифікації клітинної оболонки, для зменшення електростатичного притягування до мембрани.

Припускається, що поряд з водневими зв'язками, гідрофобними та електростатичними кулоновськими взаємодіями самозбирання пептидів може також регулюватися ароматичними  $\pi$ - $\pi$  взаємодіями [65]. Ароматичні амінокислоти не завжди легше індукують самозбирання, ніж неароматичні амінокислоти подібної гідрофобності. У той же час ароматичні амінокислоти можуть створювати унікальну морфологію фібрил [61].

Сучасні уявлення щодо механізмів самоасоціації макромолекул слугують розробці антимікробних самозбираних наноматеріалів і сприяють розв'язанню проблеми мікробної резистентності [66]. АМП, що

складаються із заряджених, гідрофобних та ароматичних амінокислот, мають високий потенціал до само збирання та утворення фібрилярної амілоїдоподібної наноструктури або спіральних пучків у мембранних середовищах; ці структури дозволяють їм проявляти свою антимікробну активність через взаємодію з бактеріальними мембранами [67, 68]. Перевагою самозбірних наноструктур є підвищення стабільності та періоду напіврозпаду пептидів, підвищення та можливість керування локальною концентрацією пептидів, що забезпечує посилення взаємодії з мембранами-мішенями [66].

Для деяких АМП зв'язок між самозбіркою та вторинною структурою в мембранному середовищі є вирішальним для впливу на мембрану та для появи антимікробної дії, у той же час, механізми дії деяких інших АМП не вимагають самоагрегації, а інші властивості зумовлюють їх антимікробну дію.

### 1.1.2 Способи взаємодії АМП з біологічними мембранами

АМП можуть спричиняти зміну проникності мембрани та/або проникати крізь неї та впливати на внутрішньоклітинні мішені без порушення цілісності мембрани [44].

Наприклад, у [69] розраховано профіль вільної енергії та шлях вбудовування модельного гексапептиду, що складається з триптофану та п'яти лейцинів (WL5), коли він рухається з об'ємної водної фази через товщу мембрани. Знайдено два мінімуми: локальний мінімум на поверхні розділу вода-мембрана або в області голівок фосфоліпідів та глобальний мінімум на гідрофобно-гідрофільному інтерфейсі поблизу залишків гліцерину (рис. 1.1). У неполярній товщі мембрани існує досить невеликий бар'єр, приблизно 1 ккал/моль, що пояснюється підвищеною гнучкістю пептиду при глибокому зануренні в мембрану. Кожен моношар мембрани можна розділити на три області на основі полярності складових атомів:

інтерфейс вода – голівки фосfolіпідів (S/HG), де зовнішня оболонка розчинника ( $\sim 6 \text{ \AA}$ ) контактує з холіною і фосфатною групами голівок фосfolіпідів; інтерфейс гліцерин – гідрофобна товща (HG/C), де групи ліпідних головок контактують з гідрофобними ланцюгами залишків жирних кислот; і неполярна середня частина, регіон, зайнятий аліфатичними ліпідними хвостами. Початкова орієнтація пептида впливає на енергетику вбудовування (пунктирна лінія). Такий асиметричний профіль означає, що існує кілька шляхів вбудовування МП в мембрани.

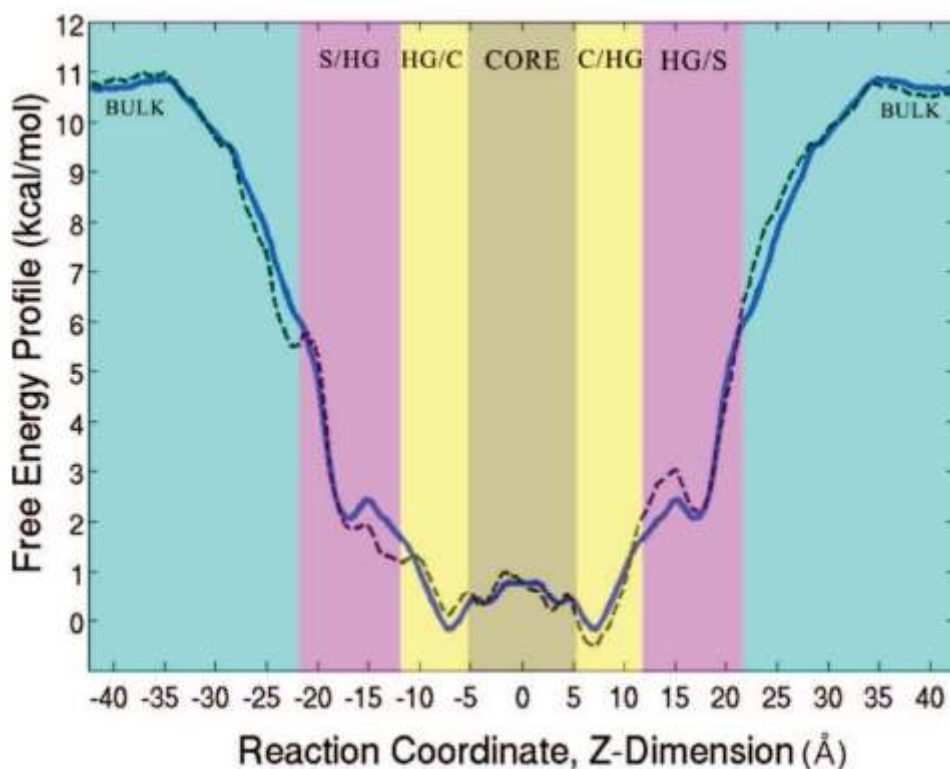


Рисунок 1.1 Профіль вільної енергії пептиду як функція положення вздовж нормалі до мембрани (від'ємні/додатні значення відповідають нижньому/верхньому моношару відповідно). Бірюзовий з обох боків позначає ділянки об'ємного розчинника. Рожевим кольором позначені ділянки на межі розділу розчинник/ліпід. Бежевий колір позначає інтерфейс голівки/неполярна частина. Світло-коричнева область з центром в нулі – неполярна товща мембрани [69].

Дослідження пермеабілізації мембрани, спрямовані на розуміння способів дії АМП, проведено багатьма теоретичними та експериментальними методами [70–72]. Експерименти в основному проводилися на модельних мембранних структурах: великих одношарових везикулах або гігантських одношарових везикулах, з використанням різних біофізичних методів, які переважно розглядали можливість витоку вмісту везикул [73–76]. Припускається, що більшість АМП викликають пермеабілізацію мембрани одним із трьох можливих шляхів (рис. 1.2): утворенням килиму, формуванням циліндричної пори або тороїдальні пори [77, 78]. Детальний огляд цих механізмів був поданий в [79, 80], проте консенсусу в розумінні дії АМП все ще немає.

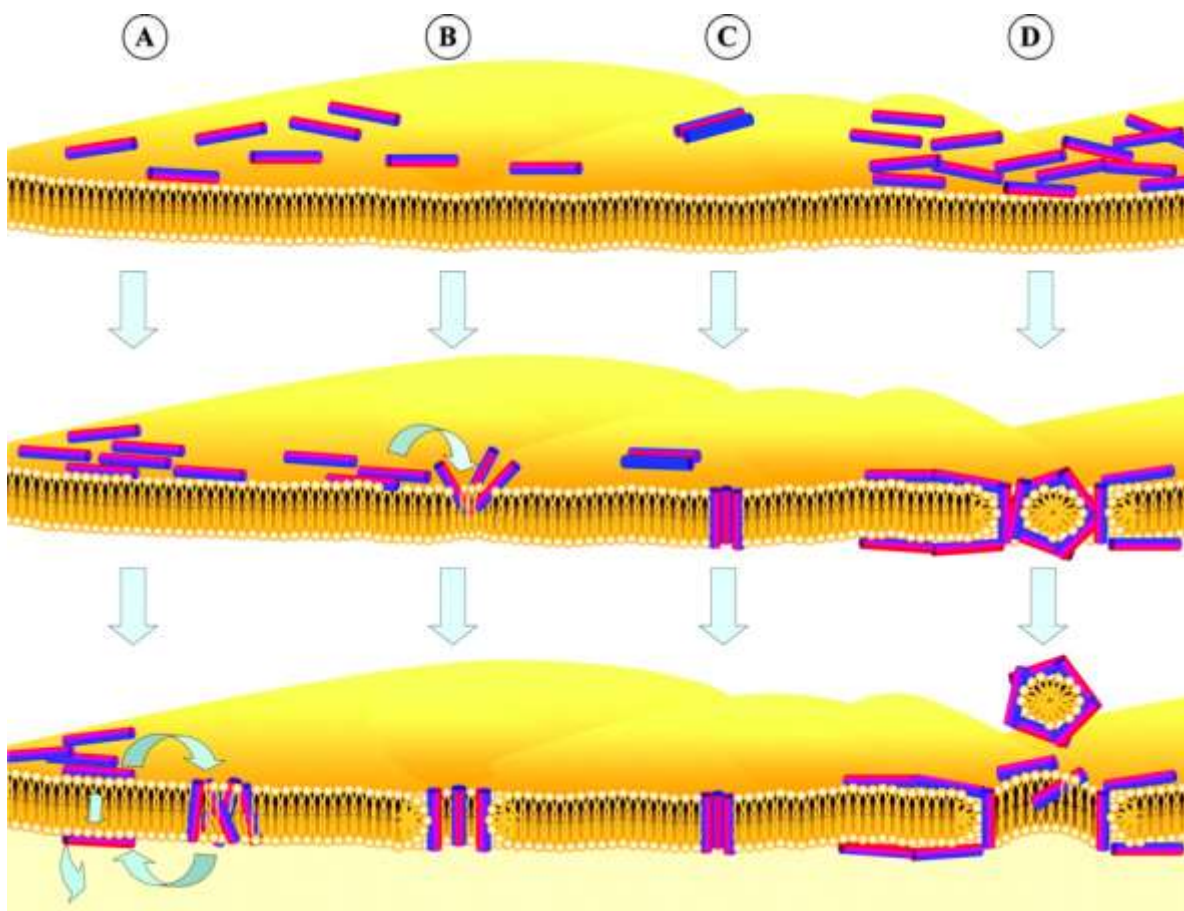


Рисунок 1.2 Можливі механізми мембранних ефектів АМП

А – модель агрегації, В – модель тороїдальної пори, С – модель циліндричної пори, D – модель килима [адаптовано з 82].

Використовують 3 базові механізми дії АМП на мембрани, існує кілька підвидів і модифікацій цих механізмів. В моделі циліндричної пори молекули АМП вбудовуються в мембрани і утворюють олігомерні пори. Додатно заряджені гідрофільні амінокислотні залишки створюють внутрішню поверхню пор [81]. Для утворення пори має бути форми –  $\alpha$ -спіралі чи  $\beta$ -складки. Ця модель використовується для аніон-селективних, слабо заряджених пептидів [83]. В моделі тороїдальної пори олігомерні канали (пори) утворюються молекулами пептиду та ліпідами бактеріальної мембрани [84,85]. Стабільність комплексу зростає за рахунок електростатичного притягання катіонного пептиду та аніонних голівок ліпідів. Модель килима постулює, що лізис клітини мішені забезпечується не через утворення довгоживучих пор і специфічних пептид-пептидних взаємодій, а завдяки схожій на детергенту дії пептиду [86,87]. Висока концентрації пептидів на поверхні бактерій веде до стоньшення мембрани, утворення пор, дезінтеграції бішару. Коли наявні у водній фазі у високій концентрації амфіфільні молекули АМП спроможні утворювати олігомерні агрегати, які перерозподілюються в гідрофобну товщу мембран і формують трансмембранні пори (рис. 1.2), це модель двох станів [88]. Процес взаємодії мембрано активних пептидів з бактеріальними та клітинними мембранами залишається актуальною темою досліджень біофізиків. Виконуються дослідження нелітичних механізмів дії, коли АМП діють на мішені всередині мікробної клітини і порушують важливі метаболічні процеси [89]. Деякі нелітичні антимікробні пептиди проявляють противірусну та протиракову активність. Часто пептид впливає на бактерії одночасно кількома способами. Реалізація того чи іншого механізму залежить від фізико-хімічних властивостей пептиду, його концентрації та

складу навколишнього середовища, а також від особливостей клітин мішеней.

### 1.1.3 Не літичні механізми дії мембраноактивних пептидів

Існують способи взаємодії МП з ліпідними мембранами, за яких не відбувається перфорація мембрани, замість раптової відбувається поступова пермеабілізація мембран пептидами, витік вмісту клітин та ліпідних везикул можна пояснити утворенням тимчасових пор [72, 90]. Причиною цих тимчасових неструктурованих пор вважають спричинені пептидами порушення розташування ліпідів, що призводять до фазових переходів та появи дефектів у мембрані. Наприклад, для магаїніну 2 припущено механізм дії, який передбачає появу значного натягу зовнішнього моношару мембрани, викликаного збільшенням його площі за рахунок введення в нього амфіпатичних пептидів. Вплив такого напруження на внутрішній моношар може стати причиною розриву моношару і призвести до стохастичного утворення пори. Радіус пор залежить від концентрації магаїніну 2 [76]. Інколи пептид може спричинити стоншення мембрани та позитивну деформацію, відкриваючи пори, через які може повністю вийти назовні вміст везикули [74]. Нестабільний стан пори релаксує завдяки перенесенню ліпідів через транзиторні отвори.

Результати диференційної скануючої калориметрії, ядерного магнітного резонансу та кріо-ЕМ [91, 92] показують, що кластеризація катіонних антимікробних пептидів з аніонними ліпідами може бути причиною «перенасичення» (crowding) мембрани. Припускають, що поділ фаз та/або утворення доменів можуть бути альтернативним механізмом дії антимікробних пептидів [93]. Дослідження невеликих катіонних пептидів за допомогою атомно-силової мікроскопії виявило, що вони індукують утворення доменів, збагачених кардіоліпіном, зі зменшенням

упорядкування ацильних хвостів ліпідів [73, 75]. Специфічна перебудова мембрани може бути причиною делокалізації периферичних мембранних білків, що впливає на енергетичний метаболізм та/або біосинтез клітинної стінки [54]. Кластеризація аніонних ліпідів при зв'язуванні з катіонними пептидами може одночасно створювати передумови для звичайних способів пермеабілізації мембрани [77].

Можна припустити, що процеси транслокації та пермеабілізації мембрани пептидами мають деякі спільні риси, і обидва процеси характеризуються кооперативністю дії пептидів на мембрану. Нещодавно було показано, що деякі пептиди можуть і переноситись крізь мембрану і одночасно утворювати тимчасові пори. Спосіб взаємодії таких пептидів з мембраною залежить від їх концентрації [94, 95, 96]. Показано, що пептид РигоА одночасно проходить і створює пори в мембрані, при цьому ці дві події зміщені в часі [97]. Результати зв'язування окремих молекул мають визначатися співвідношенням між кінетикою подій і часом, необхідним для накопичення достатньої кількості мономерів. Тому необхідним є вивчення кінетики зв'язування пептиду з мембранами, що ми і робили в дисертації? визначаючи мембранотропні ефекти циклічного катіонного олігопептиду граміцидину S (GS) після різних часів преінкубації мембранних структур з пептидом.

#### 1.1.4. Синергізм у взаємодії МП з мембранами

Механізм мембранотропної дії конкретного пептиду включає взаємодію пептиду з ліпідним бішаром та з іншими пептидами. Результатами цих взаємодій може бути агрегація пептиду з іншими або просто створення умов для того, щоб інші молекули могли легше зв'язуватися з мембраною [98]. Наприклад, згідно з механізмом дії макулатина, зв'язування та розподілення одного пептиду в мембрану призводять до зниження енергетичного бар'єру для вбудовування інших пептидів [72]. Еволюція зробила АМП здатними взаємодіяти один з одним



і підсилювати загальну мембранотропну дію [99] що є додатковим аргументом на користь можливості протидії розвитку резистентності шляхом застосування АМП [46].

Сучасні стратегії подолання проблеми резистентності до наявних антибіотиків не лише використовують певні АМП для знищення стійких бактерій, а також використовують АМП разом із звичайними антибіотиками. Комбінація препаратів потенційно елімінує резистентні штами, затримує розвиток несприйняття ліків, зменшує дозу кожного з препаратів і побічні ефекти [100, 101, 102].

PGLa і магаїнін 2 (MAG2) є найбільш добре вивченими АМП, які виявляють синергічну протимікробну активність. Синергетична дія магаїніну 2 і PGLa відбувається внаслідок утворення гетеродимерного комплексу [103]. Комплекс характеризувався швидким формуванням і помірною стабільністю. Показано, що комплекс не утворюється у водній фазі, кожен пептид окремо зв'язується з мембраною і комплекс утворюється в бішарі. Утворення комплексу сприяє зміщенню рівноваги розподілу кожного компонента в бік посиленого зв'язування, синергізм частково пов'язаний із посиленням зв'язування та утворенням гетеромолекулярного комплексу [103]. В роботі [104] було висловлено припущення, що орієнтація пептиду відносно ліпідного бішару у зв'язаному стані зумовлює спосіб мембранотропної дії. Розглядаються два стани: поверхневий («S-стан») і трансмембранний (інтеркальований «I-стан»), стан пептиду в певній мембрані залежить від кривизни та концентрації пептиду [104].

#### 1.1.5. Здатність мембарноактивних пептидів до формування іонних каналів

Хлоридні канали широко поширені в прокаріотичних та еукаріотичних клітинах і належать до кількох сімейств білків. Вони відіграють ключову роль у основних функціях клітини та тканин, таких як

регулювання клітинного об'єму та збудливості, підкислення внутрішньоклітинних органел та трансепітеліальний транспорт. Особливо важливими є нове сімейство хлоридних потенціал залежних каналів CLC. Виявлено дев'ять генів сімейства CLC ссавців. Мутації деяких з них пов'язані з генетичними захворюваннями (наприклад, міотонія для CLC-1, хвороба Дента для CLC-5, остеопороз для CLC-7). На клітинному рівні CLC-канали присутні в плазматичній мембрані (CLC-1), у внутрішньоклітинних органелах (наприклад, CLC-5, CLC-7) або мають більш ніж одну локалізацію (наприклад, CLC -2). Функції деяких каналів CLC дуже добре охарактеризовані, але біологічна роль багатьох інших залишається невідомою. У дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* єдиний передбачуваний гомолог хлоридного каналу CLC кодується геном GEF1. Білок Gef1p, ймовірно, локалізований у медіальному відділенні апарату Гольджі, і його роль до кінця не вивчена, припускають, що він відіграє роль у гомеостазі везикулярних катіонів. Білок дріжджів Gef1p може бути хлоридним каналом, але до цього часу не проводилися прямі електрофізіологічні вимірювання з Gef1p та не вивчено можливості модифікації його активності.

## **1.2 Структура й мембранотропна активність поліпептиду грамїцидину S**

Вивчення численних фрагментів і аналогів циклопептидних антибіотиків дозволило з'ясувати важливість амінокислотного складу й циклічної структури для біологічної активності, встановити біологічно активні групи й ділянки молекули. Ці дані дозволяють пояснити методи руйнівного впливу антибіотиків на живу клітину та встановити характер взаємодії речовини з біологічними макромолекулами й системами [105].

### 1.2.1 Хімічна будова грамїцидину S

Грамїцидин S – циклічний декапептид з первинною структурою [цикло-(валін-орнітин-лейцин-D-фенілаланін-пролін)<sub>2</sub>] (рис. 1.3), уперше виділений з *Bacillus brevis* var. G-B [107].

Молекула грамїцидину S складається з двох однакових пентапептидів, з'єднаних за типом «голова-хвіст». Кожен пентапептид складається із залишків L-валіну, L-орнітину, L-лейцину, D-фенілаланіну й L-проліну, з'єднаних у наведеній послідовності [108], з'ясовано повну просторову будову молекули грамїцидину S [105].

Встановлена структура відноситься до антипаралельного  $\beta$ -складчастого типу. Вона характеризується наявністю осі симетрії другого порядку, транс-конфігурацією вторинних амідних груп, жорсткою системою трансанулярних водневих зв'язків між групами CO- й NH-групами залишків валіну й лейцину, транс-орієнтацією протонів NH—CH в залишках валіну, лейцину й орнітину та гош-орієнтацією протонів NH—CN в залишках фенілаланіну.

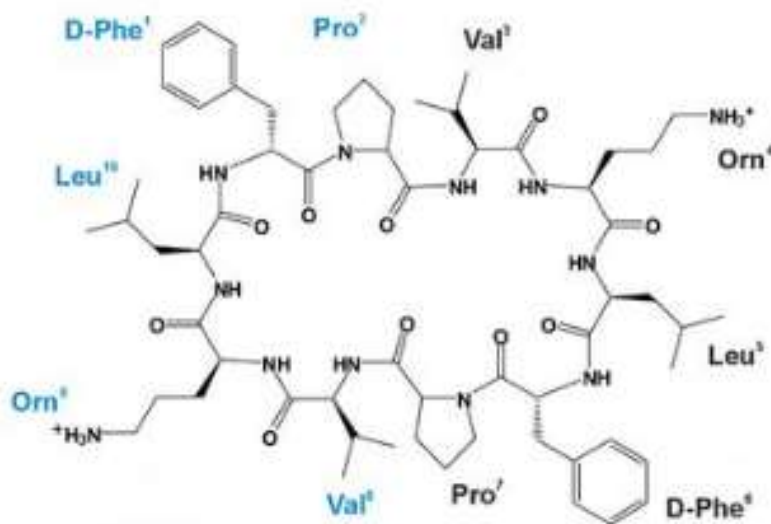


Рис. 1.3 Структура грамїцидину S [106]

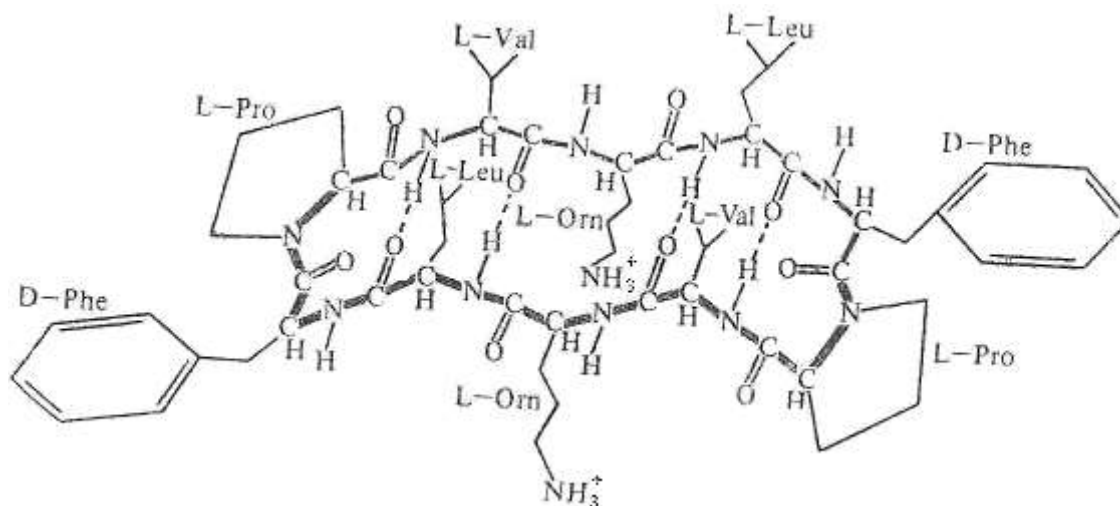


Рис.1.4 Конформація молекули граміцидину S в розчині [105]

Заряджені й гідрофобні групи залишаються орієнтованими в різні сторони від площини  $\beta$ -структури. Слід особливо відзначити, що знайдена структура має виняткову жорсткість і її конформація не залежить від характеру розчинника. У розчинах молекула набуває конформації складчастої  $\beta$ -структури (рис. 1.4) [109] з вільною  $\delta$ -аміногрупою орнітину [106].

### 1.2.2 Прогнозований механізм антимікробної дії GS

Точного молекулярного механізму дії граміцидину S ще не встановлено. Дія антибіотика виражається в порушенні структури й функції цитоплазматичної мембрани [105]. Порушення проникності мембрани в чутливих мікроорганізмів супроводжується виділенням з клітин нуклеотидів, амінокислот та інших компонентів цитоплазми. GS не проникає в цитоплазму, тому для його дії важливий характер зв'язування з поверхневими шарами клітини [108].

Дослідження зв'язування граміцидину S уже в перших роботах показало, що цей антибіотик добре адсорбується клітинами як чутливих, так і стійких до нього бактерій. Адсорбція поліпептидних антибіотиків є

першим етапом їх взаємодії з клітиною. Адсорбований антибіотик спричиняє сильне порушення цитоплазматичної мембрани. Існують також відомості про розподіл зв'язаного грамїцидину S між клітинною стінкою й цитоплазматичною мембраною в чутливих і стійких бактерій. При руйнуванні й фракціонуванні клітин грампозитивних бактерій, оброблених грамїцидином S, антибіотик перебував здебільшого в мембранній фракції і лише в кількості 0,4–2,5% – у фракції клітинних стінок. Тим часом у стійких штамів грампозитивних бактерій і кишкової палички в клітинних стінках було виявлено 60–50% адсорбованого антибіотика. Мабуть, у чутливих клітинах адсорбований антибіотик зв'язується здебільшого з мембранами, спричиняючи порушення їх функціонування та втрату клітинами низькомолекулярних сполук. У стійкому до грамїцидину S стафілококу ця залежність знижується в 2–3 рази порівняно з чутливим штамом. Припускаємо, що у стійких бактерій набагато менша кількість антибіотика проникає і зв'язується з мембраною, основна ж частина адсорбованого грамїцидину S зв'язується з поверхневими структурами [110].

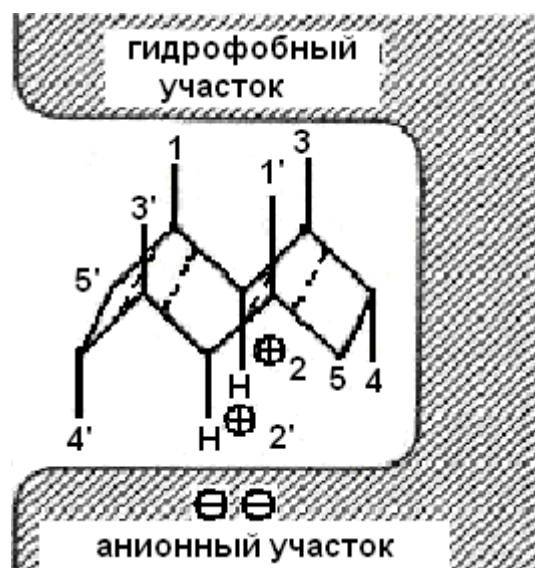


Рис.1.5 Схема взаємодії грамїцидину S з біологічною мембраною [110].

Важливою є електростатична взаємодія. Встановлено здатність протонуваних вільних аміногруп залишків орнітину взаємодіяти з фосфатними групами фосфоліпідів. При цьому відбувається утворення ліпідно-граміцидинового комплексу з поверхнево-активними властивостями (рис. 1.5) [110]. Блокування аміногрупи шляхом ацилування або її зняття шляхом дезамінування призводить до значного зниження, а в деяких випадках – і до повного пригнічення антибіотичної активності [106].

GS більше збурює динаміку аніонних ніж цвітертійонних фосфоліпідних мембран. Ультразвукова денситометрія свідчить, що GS зменшує щільність та об'ємну стисливість фосфоліпідного бішару за рахунок збільшення рухливості фосфоліпідних вуглеводневих ланцюгів. ЯМР та МУРР свідчать, що GS в менших концентраціях викликає витончення ліпідних бішарів з утворенням фосфоліпідних дисперсій у більш високих концентраціях. ІЧ спектроскопія показує, що GS розташований у міжфазній області бішару і проникає глибше в аніонні та більш рідкі ліпідні мембрани. Присутність холестеролу послаблює перелічені ефекти GS, частково зменшуючи заглиблення пептиду в бішар [111–116]. Результати F-ЯМР припускають, що молекула GS у формі  $\beta$ -листа лежить в площині мембрани, полярні та позитивно заряджені залишки Orn виступають з бішару, для взаємодії з від'ємно зарядженими фосфатами фосфоліпідів, гідрофобні залишки Val та Leu розвернуті до центру бішару, де вони взаємодіють з вуглеводневими ланцюгами фосфоліпідів [117].

В роботі [118] запропоновано якісну модель взаємодії GS та GS-подібних пептидів з біологічними мембранами (рис. 1.6). У концентраціях 10, 20, 50, 70, 80, 100 мкМ мономери пептидів знаходяться в напруженій конформації у водному середовищі. Спочатку пептиди наближаються до поверхні бішару у своїх напружених конформаціях (коротка інтерароматична відстань 7,2 Å) (рис. 1.6 (0)). На наступному етапі (рис. 1.6 (1)) адсорбція пептиду на ліпідах супроводжується перерозподілом молекул

води пов'язаних як з бішаром так і з пептидами (переважно ендотермічна реакція). Кулонівське притягання між додатньо зарядженим пептидом та від'ємними зарядами поверхні мембрани також сприяють і посилюють адсорбцію пептидів.

На наступній стадії (рис. 1.6 (2)), після початкової взаємодії пептидів з поверхнею бішару, пептиди «розширюючись» змінюють свою конформацію з напруженого до розслабленого стану (довга інтерароматична відстань 13,3 Å), відбувається стабілізація внутрішньомолекулярних Н-зв'язків, збільшення  $\Delta S$ , і міцніше зв'язуються з поверхнею ліпідної матриці. На цьому етапі бішарова структура поверхні порушується, а площа бішару розширюється пропорційно площі поперечного перерізу пептиду. Площа поперечного перерізу GS  $\sim 258 \text{ \AA}^2$ , приблизно дорівнює площі поперечного перерізу чотирьох молекул ліпідів ДПФХ [119]. Розширення поверхні (збільшення  $\Delta S$ ) веде до збільшення поверхневого натягу та витончення бішару. Циклічні пептиди можуть компенсувати таке розширення поверхні за рахунок зменшення площі їх поперечного перерізу (нахилу чи перевертання орієнтації), за рахунок більш міцної взаємодії з поверхнею бішарів та гідрофобних областей мембрани [120].

При більших P/L взаємодія пептиду з бішаром може спричинити подальше збурення ліпідної матриці (збільшення  $\Delta S$  та гідрофобних взаємодій) і спровокувати утворення перехідних ліпід-пептидних зон нерегулярного розміру та посилення неспецифічної проникності мембрани (рис. 1.6).

Використання парамагнітного зонда показало збільшення в'язкості, начебто «заморожування» ліпідних ділянок мембран при зв'язуванні ними антибіотика. При цьому, зв'язуючись із фосфоліпідами поблизу білкових глобул мембран, граміцидин S спричиняє розпушування ліпідного шару, що межує з білком, і як вторинний процес – внутрішньомембранну білкову агрегацію. При високих концентраціях антибіотика відбувається значна

сепарація білків і ліпідів у мембрані й агрегація білків як наслідок порушення взаємодії анулярного ліпиду з білком [105].

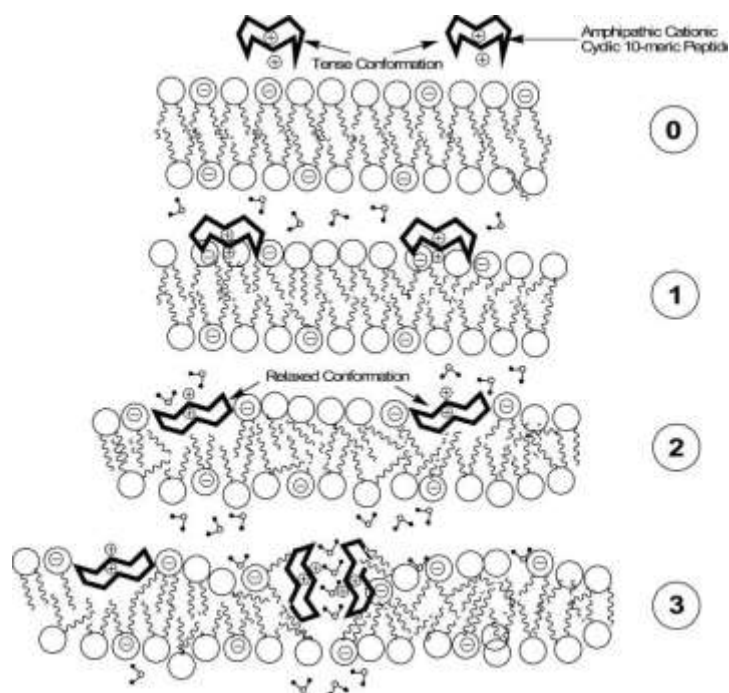


Рис. 1.6 Механізм зв'язування GS з ліпідним бішаром.

(0) Мономерні циклічні пептиди притягуються до поверхні бішару в напруженій конформації. (1) Циклічні пептиди адсорбуються на поверхні бішару та зв'язуються з поверхнею за рахунок гідрофобного ефекту та електростатичних взаємодій; напружена конформація циклічних пептидів змінюється на розслаблену конформацію. (2) Циклічні пептиди приймають розслаблену конформацію, проникають глибше в бішар, деформують структуру мембрани без формування пептид-пептидних комплексів та індукують лізис (низьке співвідношення P/L (пептид/ліпід)). (3) Комплекси пептид-ліпідів утворюють неспецифічні перехідні пороподібні зони, що посилюють вивільнення внутрішнього вмісту крізь мембрану (високе співвідношення P/L) [118].



### 1.2.3 Залежність біологічної активності грамїцидину S від його структури

Для високого рівня антибактеріальної активності необхідна циклопептидна структура й наявність незвичайних амінокислот в грамїцидині S [105]. У лінійного декапептиду, що складається з тих самих амінокислотних залишків і з тою самою послідовністю їх розташування, як і в грамїцидині S, біологічна активність була майже в 30 разів меншою, ніж у природного антибіотика. Заміна в лінійному аналогу залишків орнітину на залишки лізину, а також залишків D-фенілаланіну на залишки D-тирозину супроводжувалося ще більшим зниженням активності [106].

Важливу роль в антибіотикоактивності відіграє вільна амінова група. Блокування аміногрупи шляхом ацилування або її зняття шляхом дезамінування призводить до значного зниження, а в деяких випадках і до повного пригнічення антибіотичної активності. Рівень антибактеріальної активності похідних грамїцидину S залежить не тільки від наявності аміногрупи, але й від її положення в молекулі. Якщо віддалити ці основні, біологічно активні групи по відношенню до циклопептидної частини молекули грамїцидину на 2, 5 і 9 атомів вуглецю від їх положення в природному антибіотику, біологічна активність знижується в 7 разів [106]. Антибактеріальна активність грамїцидину S зумовлена певним співвідношенням в його молекулі полярних і гідрофобних угруповань.

Аналіз даних, отриманих в різний час різними дослідниками, дозволяє зробити висновок, що первинна структура грамїцидину S не має вирішального значення для його біологічної активності, оскільки відомі еквівалентні за активністю циклодекапептиди, які різняться за амінокислотним складом. Навпаки, існує суворя закономірність. Залишки орнітину можна замінити тільки залишками діамінокислот, гідрофобні ділянки – тільки гідрофобними. Це свідчить, що для грамїцидину S важливим є певне співвідношення між полярними й неполярними ділянками молекули [105].

За цими даними, граміцидин S має оптимальну для антибактеріальної дії вторинну структуру й жорсткість конформації. Паралельно з ослабленням жорсткості конформації знижується антибактеріальна активність [106].

Спираючись на наявні дані, можна описати формування антибактеріальних властивостей у граміцидині S.

Найбільш важливим моментом тут є наявність циклодекапептидної структури типу «складчаста  $\beta$ -структура» за рахунок утворення вторинних внутрішньомолекулярних водневих зв'язків. Ця структура забезпечує стабільність конформації основного циклопептидного остова й орієнтацію полярних і гідрофобних бічних ланцюгів у протилежні сторони. Амінокислотний склад, безсумнівно, має важливе значення для формування цієї конформації. При цьому головну роль відіграє D-фенілаланін. Мабуть, тільки D-ізомер придатний для формування конформації «складчастої  $\beta$ -структури». Інші амінокислоти менш специфічні. Їх головна роль, здається, полягає в забезпеченні поверхнево-активних речовин. Тому взаємозамінність одних амінокислот на інші можлива, але тільки в певних межах. Залишки орнітину в молекулі граміцидину S відіграють роль гідрофільних радикалів і забезпечують позитивний заряд. Для стабільності й високого рівня біологічної активності конформації «складчаста  $\beta$ -структура» велике значення має певне співвідношення між гідрофільними й гідрофобними ділянками молекули.

Було проведено багато досліджень щодо взаємозв'язку між хімічною структурою аналогів граміцидину S та їх антибактеріальною та гемолітичною діями. Показано, що одночасно змінюючи розмір кільця граміцидину S й орієнтацію бічних ланцюгів амінокислотних залишків відносно площини кільця енантіомірною заміною, можна домогтися розподілу антибактеріальної та гемолітичної дії граміцидину S [3]. Так, у роботі [118] представлено аналог граміциду S – пептид GS14dK<sub>4</sub>,

циклічний тетрадекамер з порівнянню з GS антимікробною дією, проте в 15–20 разів меншою гемолітичною. На його взаємодію з ліпідними мембранами сильніше впливає упорядкованість ліпідного бішару, і, на відміну від граміцидину S, він цілком виключається з холестериновмісних фосфоліпідних бішарів [118].

Одним з традиційних підходів біофізики, спрямованих на отримання фундаментальних знань про загальні закони й особливості функціонування клітинних систем, є порівняння молекулярної організації та функції будь-якої клітинної структури під дією різних біологічно активних речовин з модельним системами. Вибір мембрани еритроцитів як об'єкта дослідження було продиктовано тим, що їй притаманні загальні принципи молекулярної організації плазматичних мембран. Тому закономірності змін структури й функції мембрани еритроцитів з певним ступенем корекції, зумовленим насамперед видовою специфікою клітин, можуть бути екстрапольовані на інші мембранні системи. Крім того, очевидна простота організації еритроцита дає можливість вивчати функціональні властивості плазматичної мембрани без перешкод, створюваних внутрішньоклітинними мембранними утвореннями й органелами. Вибір тромбоцитів як ще одного об'єкта дослідження зумовлений тим, що еритроцити й тромбоцити як клітини крові, що завжди рухаються в циркуляторному руслі і є першими клітинними мішенями для дії інфузійних препаратів. Крім того, як буде показано нижче, ці клітини мають різний ліпідний склад плазматичних мембран, що дає можливість порівнювати взаємодію GS з мембранами різного складу.

Розгляньмо докладніше структуру й динаміку мембран клітин крові й позначмо відмінності в будові мембран клітин вищих тварин і бактерій.

### 1.3 Структура біологічних мембран

Рідинно-мозаїчна модель мембран (рис. 1.7) передбачає, що молекули ліпідів, які утворюють рідку основу мембрани, здатні здійснювати різного роду рухи: сегментарну рухливість, обертальні рухи, латеральну дифузію, обмін між моношарами. Мембранні білки також досить лабільні, час їх обертальної дифузії в бішарі може бути меншим за 1 мкс [121].

Латеральну рухливість білка визначають не тільки його властивості, але й мікрор'язкість ліпідного оточення, фазовий стан ліпідів. Таким чином, рухливість білкових молекул та їх асоціацію в мембрані контролюють ліпіди. Шари ліпідів, прилеглі до білка (анулярні), упорядковані, їх рухливість (порівняно з вільними ліпідами) обмежено часом порядку  $10^{-5} \div 10^{-7}$  с. Це на 2–3 порядки більше, ніж рухливість ліпідів в безбілковому бішарі [123]. Анулярне оточення включає різну кількість ліпідних шарів залежно від умов середовища. Так, кільце анулярних ліпідів з підвищенням температури, очевидно, стискається, при зниженні температури воно зростає, досягаючи максимуму при  $T_{кр}$ , нижче якої мало змінюється.

Час обміну молекулами між анулярним шаром і сумарним ліпідним фондом також залежить від структурованості мембрани, а отже, і від температури, жирнокислотного складу компонентів, характеру взаємодії молекул ліпідів одна з одною та ін. Ліпіди здатні утворювати впорядковані ділянки зі спільною «системою координат» – кластери, у яких щільність упаковки може значно відрізнятись від сусідніх з ними частин. Час існування кластерів становить близько  $10^{-6} \div 10^{-7}$  с, кількість молекул у кластері – від декількох десятків до сотень, а міжкластерні зони можуть утворювати зони дефектів, які полегшують проникнення модифікаторів у бішар.

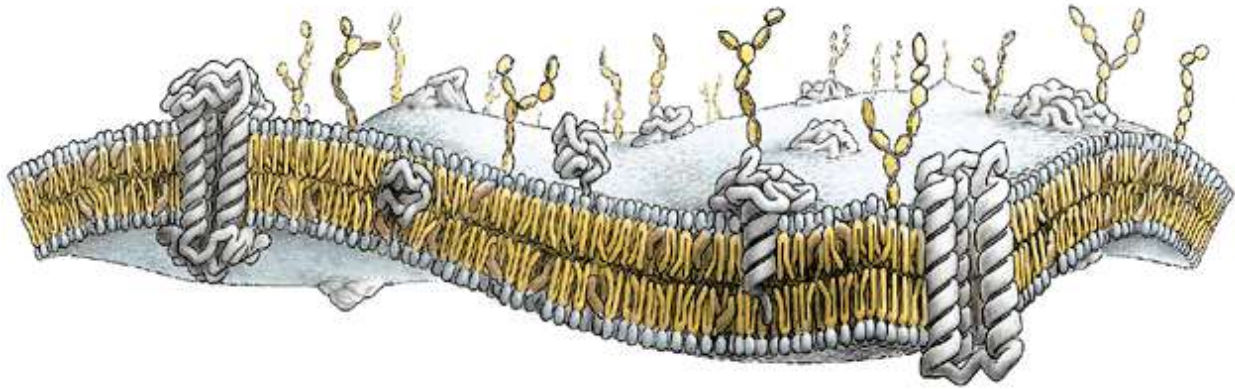


Рис. 1.7. Рідинно-мозаїчна модель плазматичної мембрани.

Подвійний шар ліпідів пронизаний різними білками. Зовнішня поверхня білків з'єднана з цукрами, що утворюють глікокалікс. Ліпіди складаються з гідрофобної частини, розташованої всередині бішару (помаранчевий) і гідрофільної зовнішньої частини (сіра) [122].

Важливою особливістю мембрани є асиметрія бішару, створювана внаслідок дії внутрішньоклітинних ферментів, відмінностей іонного складу цитоплазми й інтерстиціальної рідини, а також структурних особливостей молекул фосфоліпідів і асиметричної локалізації білків і ліпідів в бішарі.

### 1.3.1 Динамічний стан ліпідів у бішарі

Жирнокислотні радикали бішару не випрямлені повністю, а утворюють пухкі структури, а тому площа мембрани дещо більша, ніж випливає з розрахунку теоретичного простору на молекулу фосфоліпиду. Таку упаковку бішару спричинюють багато чинників.

Наявність у мембрані у складі фосфоліпідів цис-ізомерів жирних кислот, розгалужених або з циклічними кільцями вуглеводневих ланцюгів, а також висока швидкість обертання навколо С–С-зв'язків жирнокислотних радикалів роблять бішар досить пухким.

Потенційний бар'єр для обертання навколо одиниці С–С-зв'язку становить  $8 \div 15$  кДж/моль, а обертання навколо подвійного С=C-зв'язку

становить близько 150 кДж/моль. Оскільки транс-гош-перехід оцінюється приблизно в 2 кДж/моль, його ймовірність дуже висока і значно зростає зі збільшенням температури. При переході двох сусідніх транс-конфігурацій у гош-конформацію, утворюється згин, або кінк.

Можливість утворення таких конструкцій забезпечує виникнення рухливих дефектів, здатних захоплювати цілі блоки мембрани – кластери. Їх концентрація й рухливість залежать від температури. Межі кластерів визначає їх упаковка, тобто загальні осі симетрії, однакові параметри впорядкованості, спільний кут нахилу ланцюгів.

Ланцюжки фосфоліпідів у бішарі зазвичай скошені відносно перпендикулярної осі мембрани. Кут нахилу ланцюгів визначається характером полярної голови молекули: нахил виникає, якщо об'єм гідратованої голови молекули більший за площу поперечного перерізу її хвостової частини. У тому разі, якщо ці значення однакові (наприклад, для фосфатидилетаноламіну), скосу практично не спостерігаємо. Таким чином, кут нахилу молекул фосфоліпідів в мембрані визначається характером фосфоліпиду й може служити критерієм відбору для формування кластерів у бішарі. Наявність означених особливостей забезпечує певну пухкість упаковки (рідинність, або плинність) мембранного бішару за нормальних умов. Ця рідинність визначає функціональну динамічність мембрани.

Отже, динамічний стан бішару з високою рухливістю його компонентів визначається одночасно декількома чинниками: обертальною рухливістю окремих молекул фосфоліпідів і транс-гош-ротамеризацією вуглеводневих ланцюгів. Поблизу метильного кінця вона здійснюється для кожної молекули незалежно, але з наближенням до полярної голови й зі зростанням щільності упаковки (особливо починаючи з 9-го атома вуглецю, ближче за який до поверхні бішару майже не трапляється цис-подвійних зв'язків), транс-гош-ротамеризація може відбуватися тільки для декількох ланцюгів одночасно. При цьому упаковка бішару порушується набагато менше, якщо в кожному ланцюжку одночасно відбуваються два

гош-повороти й утворюється кінк. Синхронні гранс-гош-перетворення може бути представлено як рух кінків уздовж ланцюжка. Разом з цим рухом через бішар можливе проникнення молекул гідрофільних речовин [124]. Існування асоціатів фосфоліпідних молекул з однорідно похиленими ланцюгами (кластери), організованими більш впорядковано, ніж їх оточення, було показано експериментально [125].

### 1.3.2 Структурна роль холестерину в мембранах клітин

Значення холестерину та систем, що регулюють його рівень в організмі, дуже важливе для стану та динаміки мембранної структури. Молекула холестерину легко вбудовується в бішар, особливо в зони дефектів бішару (рис. 1.8). Специфіка структури холестерину забезпечує можливість взаємодії його гідроксильної групи з карбонільним киснем ацильних ланцюгів фосфоліпідів, а також великий гідрофобний контакт між жирнокислотними ланцюгами й стероїдним кільцем молекули холестерину. Саме ця частина молекули відповідає за структуруючий ефект стероїду. Метиленовий хвіст молекули не значно впливає на щільність упаковки бішару (рис. 1.9) [126].

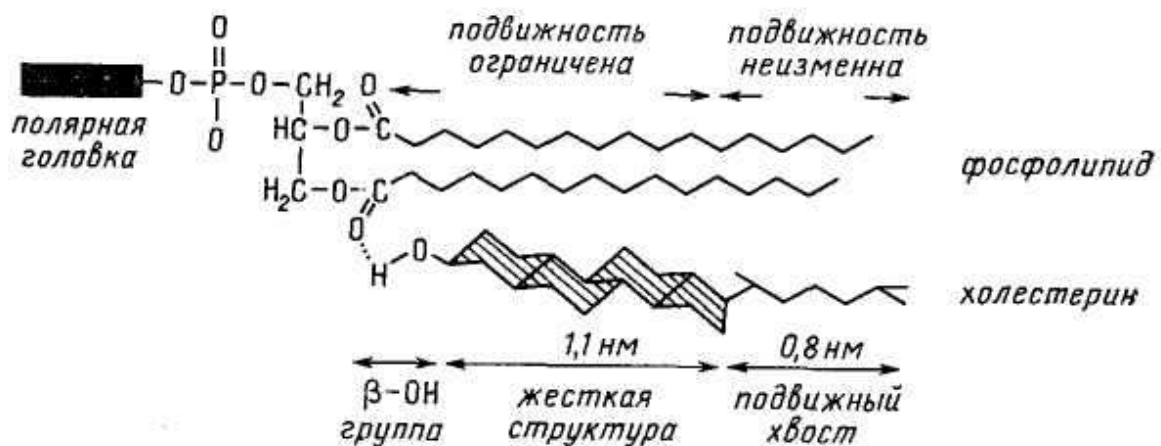


Рис. 1.8. Взаємодія холестеринової молекули з бішаром. Розташування молекули холестерину відносно молекули фосфоліпиду.

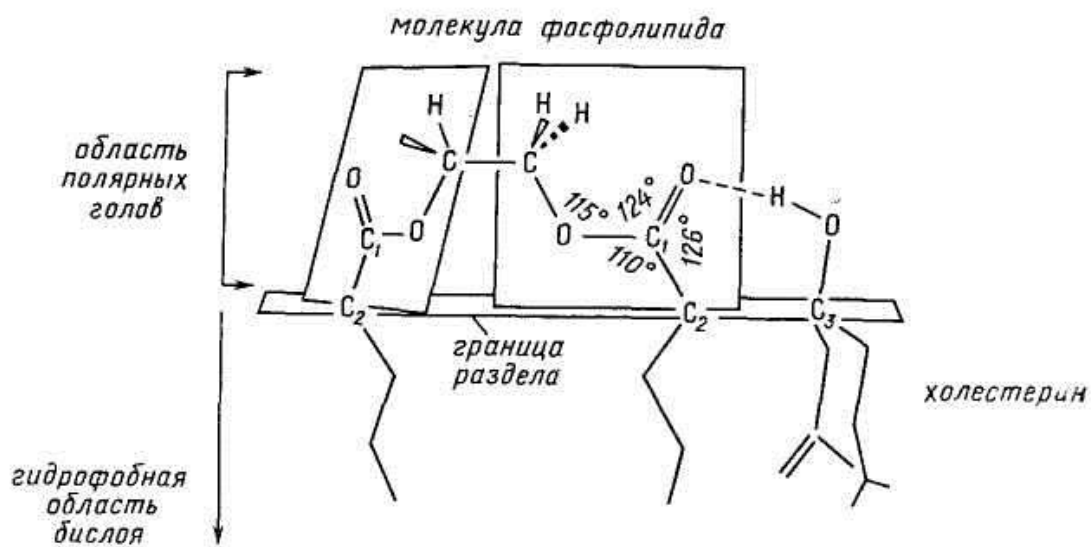


Рис. 1.9. Схема орієнтації  $\beta$ -гідроксилу холестерину на розділі фаз між полярними головами ліпідів та гідрофобною ділянкою бішару.

Вбудовування холестерину у фосфоліпідний бішар спричиняє як порушення квазікристалічної упаковки жирнокислотних ланцюжків за нормальної температури, нижчої за  $T_{кр}$ , так і зменшення рухливості (зростання впорядкованості) ланцюжків за нормальної температури, вищої за  $T_{кр}$ . Ці ефекти холестерину називають відповідно «розріджувальним» та «конденсуючим». Надлишок холестерину збільшує мікрров'язкість бішару й знижує швидкість таких реакцій, які мають дифузійно-залежні обмежувальні стадії [126]. Зростання рівня холестерину в мембранах – характерна риса спадкових гіперхолестеринемій, ішемічної хвороби серця, атеросклерозу [127, 128].

Тромбоцити не синтезують холестерин, і зміни в його вмісті зумовлено обміном із холестерином ліпопротеїдів плазми. У мембрані тромбоцитів вільний холестерин взаємодіє із фосфоліпідами. Молярне співвідношення холестерин/фосфоліпіди в мембранах тромбоцитів дорівнює 0,53. Зміна співвідношення холестерин/фосфоліпіди в тромбоцитах супроводжується зміною мікрров'язкості мембрани та чутливості тромбоцитів до індуктора [129].



Значення мікров'язкості тромбоцитів при 37°C дорівнює 0,28 Па·с, а при 28°C – 0,37 Па·с [130]. При збільшенні в тромбоцитах співвідношення холестерол/фосфоліпіди на 118% в'язкість їх ліпідної мембрани при температурі 37°C зростає на 43% [130]. В'язкі властивості ліпідного бішару тромбоцитів змінюються при дії на клітини вільних ненасичених жирних кислот, індукторів та інгібіторів агрегації. Так, наприклад,  $\alpha$ -токоферол та жирні кислоти – інгібітори агрегації зменшують мікров'язкість ліпідного бішару, а тромбін, навпаки, збільшує [130].

### 1.3.3 Білок-ліпідні взаємодії в мембрані

Використання білка впорядковує фосфоліпідний бішар, роблячи його структуру більш жорсткою. Вважають, що це відбувається через «прилипання» та обмеження рухливості фосфоліпідних молекул анулярного шару [131]. Глобулярні білки мають підвищену лабільність у водному оточенні. Вода збільшує вільний обсяг білкових глобул, сприяючи прояву їхньої внутрішньої конформаційної рухливості. Інша ситуація виникає в разі гідрофобного білка в мембрані. У той час як обертання метиленових груп навколо C—C-зв'язків майже не потребує вільного гідрофобного об'єму, він необхідний для прояву конформаційної лабільності мембранного білка [132]. Внутрішня лабільність білків зростає при утворенні асоціатів із кількох молекул. Можливо, саме ця властивість зумовлює тенденцію мембранних білків до олігомеризації [134].

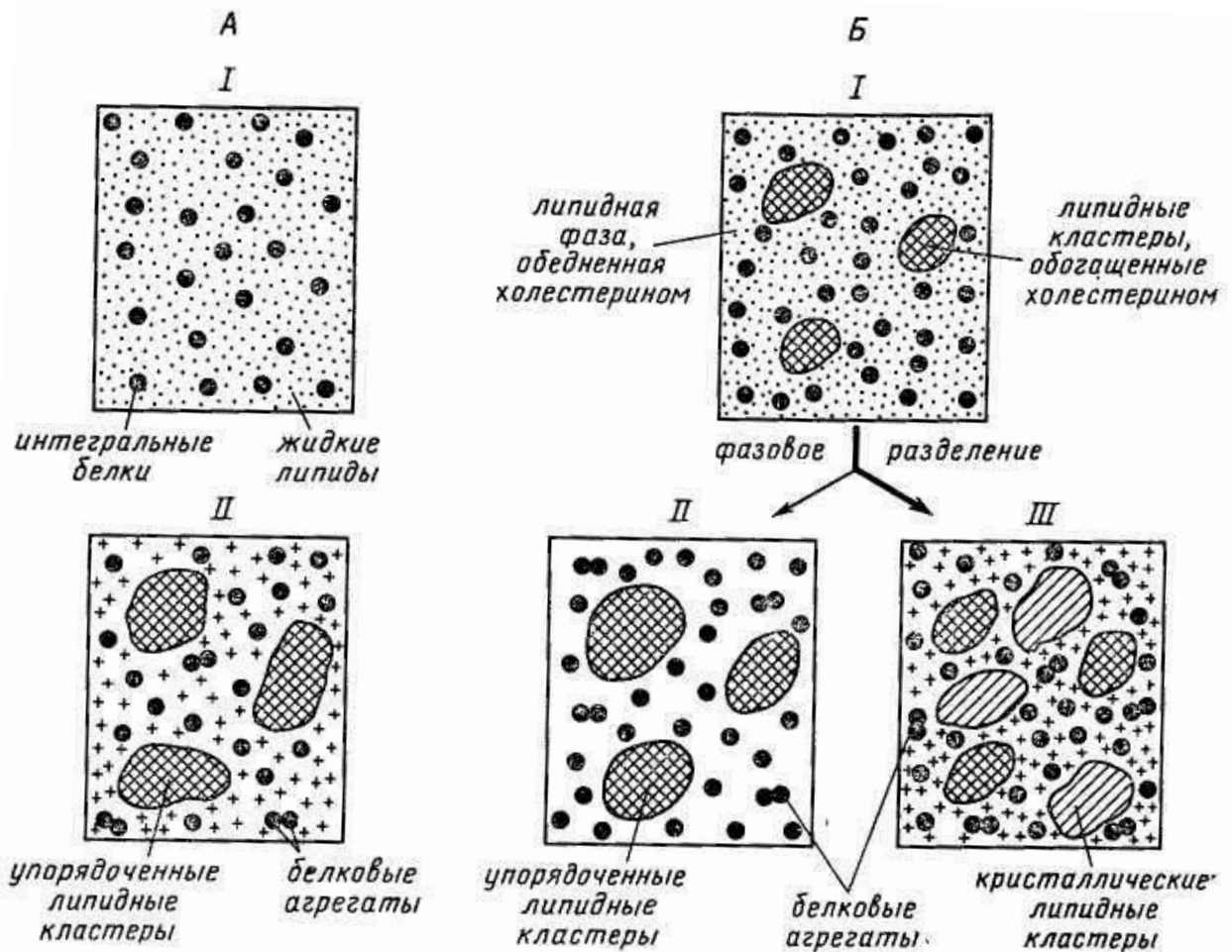


Рис. 1.10 Фазовий розподіл у біомембранах.

А – у позбавленій холестерину мембрані при температурі, вищій за фазовий перехід (I) інтегральні білки дифузно розподілені в рідкому бішарі, при зниженні температури нижче за фазовий перехід (II) утворюються кластери ліпідів, що легко кристалізуються; білки «виморожуються» в більш рідку ділянку. Б – у мембранах, збагачених холестерином, білки займають переважно ділянки, вільні від холестерину (I). Зниження температури також спричиняє розподіл фаз, що призводить до ще більш вираженого «виморожування» білкових молекул та їх агрегації. Холестерин або залишається у складі кластерів більш упорядкованих ліпідів (II) або (при утворенні кристалічних ділянок з

ліпідів, що утворюють тверду фазу (III) за високої температури) модифікує весь ліпідний бішар.

Зміна рідинності мембрани контролює взаємодію між окремими молекулами інтегральних білків (рис. 1.10). У разі, коли бішар перебуває при температурі, вищій за  $T_{кр}$  й латеральну рухливість білків ніщо не обмежує, молекули білка розподілено в мембрані довільно. Зниження температури й розподіл фаз, що призводять до утворення більш упорядкованих ділянок бішару, обмежують рухливість білків, що витісняються в ділянки бішару, які залишаються більш рідкими: відбувається «виморожування» білків, яке збільшує ймовірність їх асоціації. У присутності холестерину білки займають переважно ділянки мембрани, збіднені стероїдом. Зниження температури у цьому разі також індукує агрегацію білків, але в умовах, що значно обмежують їх рухливість [133].

### 1.3.4 Відмінності у складі мембран

Найбільш поширеними фосфоліпідами для бактеріальних мембран є фосфатидилетаноламін і фосфатидилгліцерин [131]. Основною відмінністю ліпідного складу поверхневих мембран бактеріальних та тваринних клітин є наявність холестерину в останніх (табл. 1.1). У бактеріальних клітинах не знайдено холестерину й лецитину, які у великих кількостях містяться у клітинах тварин (табл. 1.1) [135]. На сьогодні вважають загально визнаним, що додавання холестерину до фосфоліпідів, які перебувають у стані гелю, «розріджує» бішар, збільшуючи рухливість вуглеводневих ланцюгів, тоді як у рідкокристалічній фазі фосфоліпідів таке додавання спричиняє ефект «ущільнення» [123].

Як видно, ліпідний склад еритроцитів і тромбоцитів багато в чому схожий [136], хоча є й важливі відмінності, наприклад, у тромбоцитах

людини відношення холестерол/фосфоліпіди дорівнює 0,55, у той час як в еритроцитах воно становить 0,85 [136, 137], отже, очікуємо менших значень коефіцієнтів дифузії ліпідів у мембранах еритроцитів.

Таблиця 1.1. Ваговий вміст ліпідів у мембранах еритроцитів та тромбоцитів людини та *E.coli*. [135]

Ліпід	Ваговий вміст ліпідів у зовнішніх мембранах, %		
	еритроцити	<i>E. coli</i>	тромбоцити
Фосфатидилхолін	28 36	0	40 31
Фосфатидилетаноламін	27 36	65	26,8 31
Фосфатидилгліцерол	0	18	< 1
Фосфатидилінозитол	1	0	5,2
Фосфатидилсерин	13 7	0	9 12
Сфінгомієлін	26 22	0	17,1 23
Гліколіпід	10	0	5
Холестерол	25	0	30
Інші	1,5	17	1

Іншою важливою відмінністю у структурі мембран клітин крові є різний вміст у них білків [138]. Так, плазматична мембрана тромбоцитів містить близько 11 000 білків  $1 \text{ мкм}^2$  при площі поверхні тромбоциту у  $20 \text{ мкм}^2$  і діаметрі в 3,2 мкм; еритроцити містять 4000 білків на клітину [139]. Відома залежність між щільністю білків на поверхні клітини та латеральною рухливістю ліпідів: білки обмежують дифузію ліпідів, займаючи вільні місця, у які можуть перестрибувати ліпіди, крім того, самі по собі білки менш рухливі, ніж ліпіди через більший розмір і заякореність на структури цитоскелета. Коефіцієнт латеральної дифузії ліпофільних флуоресцентних зондів у мембранах тромбоцитів та еритроцитів людини дорівнює відповідно  $4,5 \times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$  та  $8,2 \times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$  [140].

Зазначені відмінності будуть проявлятися в характері взаємодії граміцидину з мембранами тромбоцитів та еритроцитів.

#### **1.4 Мембраноактивні пептиди внутрішньоклітинних мембран**

Хлоридні канали поширені в прокаріотичних та еукаріотичних клітинах і належать до кількох сімейств білків. Вони відіграють ключову роль у основних функціях клітини та тканин, таких як регулювання клітинного об'єму та збудливості, підкислення внутрішньоклітинних органел та трансепітеліальний транспорт. Особливо важливими є нове сімейство хлоридних потенціал залежних каналів CLC. Виявлено дев'ять генів сімейства CLC ссавців. Мутації деяких з них пов'язані з генетичними захворюваннями (наприклад, міотонія для CLC-1, хвороба Дента для CLC-5, остеопороз для CLC-7). На клітинному рівні CLC-канали присутні в плазматичній мембрані (CLC-1), у внутрішньоклітинних органелах (наприклад, CLC-5, CLC-7) або мають більш ніж одну локалізацію (наприклад, CLC -2). Функції деяких каналів CLC дуже добре охарактеризовані, але біологічна роль багатьох інших залишається невідомою. У дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* єдиний передбачуваний гомолог хлоридного каналу CLC кодується геном GEF1. Білок Gef1p, ймовірно, локалізований у медіальному відділенні апарату Гольджі, і його роль до кінця не вивчена, припускають, що він відіграє роль у гомеостазі везикулярних катіонів. Білок дріжджів Gef1p може бути хлоридним каналом, але до цього часу не проводилися прямі електрофізіологічні вимірювання з Gef1p та не вивчено можливості модифікації його активності.

## 1.5 Ультраструктура й функції тромбоцитів

### 1.5.1 Ультраструктура тромбоцитів людини

Тромбоцити є без'ядерними клітинами крові, що активно пересуваються. Вони відіграють важливу роль у системі гемостазу, будучи сполучною ланкою тромбоцитарно-судинного та коагуляційного механізмів гемостазу, центрами формування гемостатичного тромбу. Вони мають здатність до активного обміну речовин і клітинного дихання. Їм властива також ферментативна активність. Вони беруть участь у захисних реакціях організму.

Інтактні тромбоцити мають форму гладких двоопуклих дисків діаметром 2–5 мкм, товщиною 0,5–0,75 мкм. Це найменші за розмірами клітини крові. Плазматична мембрана тромбоцитів, що складається з полярних фосфоліпідів та білків, має товщину 7–8 нм. Вуглеводневі залишки гліколіпідів і глікопротеїдів плазматичної мембрани утворюють зовнішню оболонку клітин, яка називається глікокаліксом.

У цитоплазмі тромбоцитів є безліч характерних органел. До них відносяться три типи гранул:  $\alpha$ -гранули, щільні гранули та лізосоми, а також мітохондрії, пероксисоми, вакуолі, апарат Гольджі. Кожна з цих органел має власну мембрану, а мітохондрії – подвійну мембрану. Щільні гранули містять АДФ, АТФ, серотонін, пірофосфат, іони  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\alpha$ -гранули – фактор росту, фактор VIII, антиген фактора Віллебранда, фактор V, фібриноген, тромбоспондин, фібронектин; лізосомальні гранули – фосфатази, арилсульфатази, кислі гідролази [141].

Крім того, тромбоцити людини містять дві дискретні системи мембран: систему відкритих каналів та щільну тубулярну систему (рис. 1.11). Щільну тубулярну систему (ЩТС) представлено вузькими трубочками діаметром близько 50 нм. Частину каналців розташовано по екватору тромбоцита, інші можна знайти серед органел. Вони не

контактують із плазматичною мембраною тромбоцитів, органелами та системою відкритих каналів.

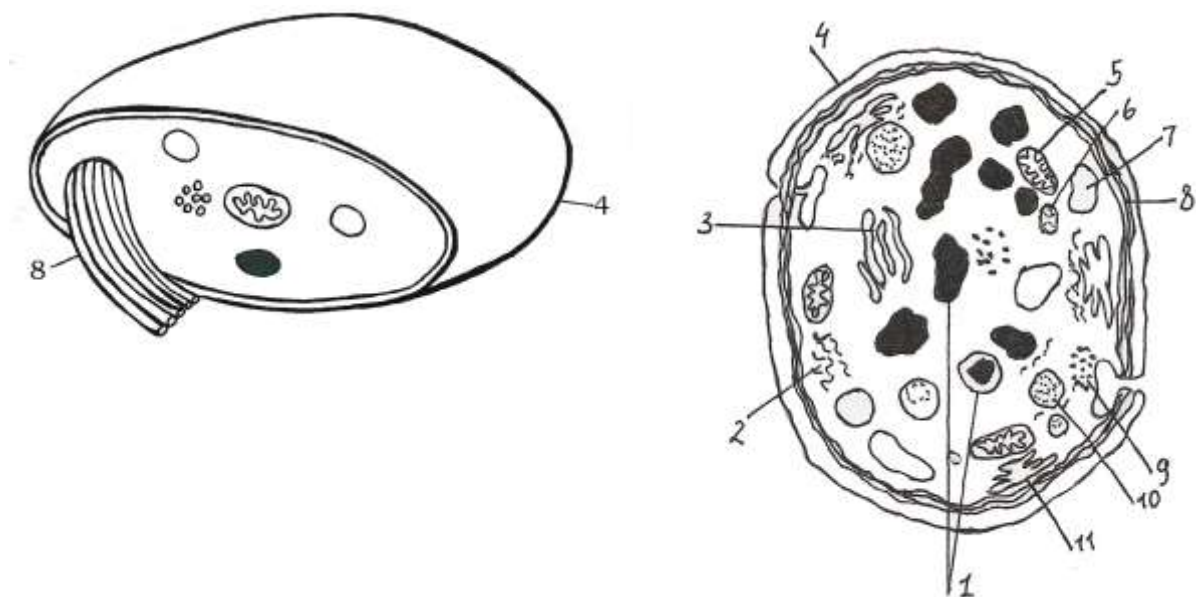


Рис. 1.11. Будова тромбоцита.

1 – щільні гранули; 2 – мікрофіламенти; 3 – апарат Гольджі; 4 – плазматична мембрана; 5 – мітохондрія; 6 – лізосома; 7 – система відкритих каналів; 8 – кільце мікротрубочок; 9 – гранули глікогену; 10 –  $\alpha$  гранула; 11 – щільна тубулярна система.

Тромбоцити людини – секреторні клітини. Секреторні процеси тромбоцитів визначаються функціонуванням поверхнево пов'язаної системи відкритих каналів. Канали поєднуються один з одним та з поверхневою мембраною. За рахунок системи відкритих каналів поверхня тромбоцитів може значно збільшуватися. Поверхнево пов'язана система відкритих каналів служить для транспортування речовин, що містяться в гранулах, у позаклітинне середовище в процесі реакції вивільнення.

### 1.5.2 Молекулярні механізми активації й агрегації тромбоцитів

*In vivo* тромбоцити циркулюють у кровотоку, практично не взаємодіючи один з одним, з іншими клітинами крові та ендотелієм судин. При пошкодженні кровеносної судини тромбоцити зазнають дії різних речовин, які ініціюють процеси агрегації (склеювання тромбоцитів один з одним) та адгезії (прилипання клітин до пошкодженої поверхні), унаслідок яких утворюється тромбоцитарна пробка [141].

Агрегація тромбоцитів у плазмі ініціюється додаванням індуктора агрегації. Агрегацію тромбоцитів спричиняють різні за хімічною природою речовини: тромбін, колаген, АДФ, адреналін, серотонін, кальцієвий іонофор A23187, простагландини G<sub>1</sub> і H<sub>2</sub>, арахідонова кислота, тромбоксан A<sub>2</sub>, вазопресин, конканавалін, іономіцин, фактор активації тромбоцитів (ФАТ), антитіла, а також речовини, відсутні в організмі – форболові ефіри, латекс, лектини. Ступінь агрегації тромбоцитів та реакції вивільнення (викиду вмісту гранул у навколишнє середовище) залежить від природи агента агрегації та його дози [141]. Слід відзначити мультифакторну природу ініціювання та регулювання процесів агрегації. Найрізноманітніші за хімічною природою речовини, що вибірково зв'язуються з рецепторами плазматичної мембрани тромбоцитів, індукують агрегацію. При активації з тромбоцитів вивільняється понад десять хімічних речовин – індукторів агрегації. Одні виходять із гранул зберігання, інші синтезуються при активації. Дія вивільнених із тромбоцитів речовин на додаток до дії індукторів агрегації створює ефекти посилення процесу агрегації. Як підсилювачі виступають серотонін, арахідонова кислота, тромбоксан A<sub>2</sub> та інші. Різні за природою первинні індуктори агрегації залучають у події, що відбуваються в клітинах, ті самі месенджери: діацилгліцерол, фосфатидну кислоту, тромбоксан A<sub>2</sub>, цАМФ, іони Ca<sup>2+</sup> та інші.



Агрегації тромбоцитів, тобто процесу безпосередньої взаємодії клітин з утворенням агрегатів, передують стадія їх активації й зміни форми від дископодібної до сферичної та утворення псевдоподій. Саме в таких перетворених формах тромбоцити взаємодіють один з одним, формують агрегати та викидають вміст гранул [138].

Зміна форми тромбоцитів, утворення псевдоподій, їх взаємодія один з одним та реакція вивільнення відбуваються за участі глікопротеїдів та скорочувальних білків тромбоцитів, активність яких регулюється іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Реакцію тромбоцитів у відповідь на дію агентів, що спричиняють агрегацію, можна поділити на три етапи. Перший етап включає взаємодію агреганта з рецепторами плазматичної мембрани та передачу сигналів усередину клітини, другий – перетворення сигналу за участі вторинних месенджерів, унаслідок чого відбувається вихід іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазму. Третій етап, який є зовнішнім проявом відповіді клітини, включає агрегацію та реакцію вивільнення хімічних речовин із клітини. Основним кофактором агрегації є фібриноген, з його допомогою клітини зв'язуються одна з одною в процесі агрегації [142].

У механізмах активації тромбоцитів загальною дією для всіх відомих агрегантів є збільшення в цитоплазмі концентрації вільних іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Шляхи, що призводять до здійснення цього процесу, пов'язані з утворенням кальцієвих іонофорів, регуляцією рівня цАМФ і зміною проникності плазматичної мембрани. Дія того чи іншого агента агрегації пов'язана із запуском цих механізмів, які на початковому етапі включають метаболізм арахідонової кислоти, фосфатидилінозитолів та лізолецитинів [143].

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  є важливим внутрішньоклітинним регулятором, і підвищення їхньої концентрації в цитоплазмі відіграє ключову роль у визначенні функціональної активності тромбоцитів, пов'язаної з агрегацією тромбоцитів та реакцією вивільнення. Загальний вміст кальцію в тромбоцитах становить близько  $60 \text{ нмоль}/10^9$  клітин [142]. Частина цього

кальцію (25%) зв'язана з мембранами тромбоцитів, але значна його кількість міститься в тубулярній системі та щільних гранулах. Концентрація вільних іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі тромбоцитів ( $10^{-7}$  моль/л) майже в 1000 разів нижча, ніж у плазмі ( $10^{-3}$  моль/л) [143]. При взаємодії тромбоцитів з індуктором концентрація внутрішньоклітинного кальцію підвищується. Кальцій мобілізується з плазматичної мембрани та щільної тубулярної системи внутрішньоклітинними іонофорами кальцію – тромбоксаном  $\text{A}_2$  та фосфатидною кислотою, а також виходить із внутрішньоклітинних органел за градієнтом концентрації при зниженні в цитоплазмі рівня цАМФ. Такі агреганти, як ФАТ та тромбін, стимулюють надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з плазми всередину тромбоцитів через рецепторкеровані канали для двовалентних катіонів [144].

Імовірно кальцій, що вивільняється із зовнішньої мембрани тромбоцитів, зумовлює зміну їх форми, а внутрішньоклітинний катіон, що мобілізується із щільної тубулярної системи, забезпечує реакцію вивільнення [142].

Позаклітинні іони  $\text{Ca}^{2+}$  необхідні для агрегації тромбоцитів. Агрегація та реакція вивільнення вмісту гранул залежать від концентрації цього катіону. Однак зміна форми та реакція вивільнення під дією низки речовин спостерігається за відсутності позаклітинних іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Адреналін викликає початкову активацію тромбоцитів лише у присутності позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , але подальші реакції – секреція, агрегація – зумовлені залученням внутрішньоклітинного катіону [145].

При збільшенні концентрації вільних іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі тромбоцитів активуються  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ферменти, що ініціюють скорочувальні процеси, які призводять до структурно-морфологічних змін тромбоцитів, агрегації та реакції вивільнення [144].

Активація тромбоцитів починається при взаємодії індукторів із рецепторами плазматичної мембрани. Спочатку вивільняється мембрано-зв'язаний кальцій, взаємодія кальцію з мікротрубочками та

скорочувальними білками спричиняє зміну форми клітин та першу хвилю агрегації. Утворені агрегати, можуть дезагрегувати. Процес дезагрегації вивчено недостатньо. Вважають, що його здійснення пов'язане з активацією аденілатциклази та збільшенням концентрації цАМФ, спрямованих на відкачування іонів  $Ca^{2+}$  із цитоплазми [146].

### Висновки до розділу 1

Плазматичні мембрани можна розглядати як основну мішень дії МП на клітини. Основними факторами, що визначають спосіб взаємодії МП з мембраною, є фізико-хімічні властивості пептидів (амінокислотний склад, розподіл гідрофільних та гідрофобних залишків уздовж ланцюга та 3D-структура). Особливості вторинної структури забезпечують гнучкість і структурну адаптивність МП, які відповідають за різні способи взаємодії з бішаром мембрани. Також слід враховувати такі детермінанти як концентрація пептидів і фізико-хімічні властивості мембрани. Отже, тонкий баланс фізичних взаємодій з мембраною відповідає за мембранотропний ефект пептиду. Знання біофізичних властивостей пептиду є важливим для розуміння способів його взаємодії з мембраною та прогнозування результатів цих взаємодій.

Головна проблема при клінічному застосуванні антимікробних пептидів полягає в зменшенні їх систематичної токсичності, зокрема граміцидин S спричиняє гемоліз еритроцитів у концентрації всього втричі більшій за мінімальну пригнічуючу зростання мікроорганізмів концентрації. Однак, власне гемолітичну активність граміцидину S досліджено неповно. Оскільки GS взаємодіє неспецифічно з ліпідним бішаром мембран будь-яких клітин, він може порушувати структуру мембран як еритроцитів, так і інших клітин крові й спричиняти зміну їх функціональної активності. У зв'язку з цим цікавим є вивчення впливу

граміцидину S на клітини крові, зокрема на тромбоцити людей, та їх функціональну активність.

Крім того, важливо встановити, як взаємодія GS з тромбоцитами та еритроцитами залежить від стану ліпідів мембрани, модифікованого фізичними та хімічними чинниками. Отримані таким чином дані дозволяють краще зрозуміти механізм впливу GS на клітини людини.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [10, 11, 20, 23].

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ Й

### МЕТОДИКА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

#### 2.1 Вивчення мембранотропних ефектів пріонних пептидів

##### 2.1.1 Вимірювання токів поодиноких іонних каналів

Обидва пептиди, нативний пріонний пептид PrP [169–175] та природний мутант PrP [170–175] N171S, було синтезовано твердофазним методом з використанням Fmoc. Як опору використовували TentaGel S Ram (RAPP Polymere, Німеччина). Під час синтезу захищені залишки амінокислоти з'єднували з пептидиловою смолою з використанням еквімолярного розчину DIC (N, N' діізопропілкарбодіїмід) та HOBT (1-гідроксибензотріазолу). Після завершення синтезу пептиди видаляли зі смоли разом, захищаючи бічний ланцюг за одноетапною процедурою, використовуючи TFA-фенол-триетилсілан H<sub>2</sub>O (88: 5: 2: 5). Пептиди очищали методом HPLC із зворотною фазою у 0,1% TFA з лінійним градієнтом ацетонітрилу до чистоти 95%. Правильні молекулярні маси пептидів було підтверджено мас-спектроскопією [13, 22].

Азолектин, використаний для БЛМ, очищували за такою процедурою: 10 г азолектину розчиняли в 50 мл хлороформу з подальшим додаванням крижаного ацетону. Цю суміш витримували при 4 °C протягом 1 години. Осад ліпідів центрифугували при 2500 об/хв протягом 15 хвилин і надосадову рідину видаляли. Азолектин зберігали при -70 °C.

Реєстрацію токів поодиноких іонних каналів виконували за методом бішарових ліпідних мембран. Пласку ліпідну мембрану було утворено шляхом нанесення дисперсій фосфоліпідів на отвір діаметром 250 мкм, який розділяв дві камери (внутрішній об'єм *цис* 1,8 мл; *транс* 0,5 мл). Контур отвору покривали суспензією ліпідів і висушували N<sub>2</sub>. перед

утворенням бішару [4]. Пласкі фосфоліпідні бішари формували у водному оточенні. Використовували розчин синтетичних ліпідів PS:PE (1:3) (Avanti Polar Lipids) у *n*-декані в концентрації 25 мг/мл. Спочатку цис-відсік містив 150мМ TEA-Cl (Sigma), 20мМ HEPES (Sigma), рН 7,4, а транс-відділення, визначене як відділення, до якого додавали мікросоми, було заземлене й містило 600мМ TEA-Cl, 20 мМ HEPES, рН 7,4 доведений NMDG (Sigma). За необхідності після злиття везикул з бішаром концентрацію TEA-Cl у цис-камері збільшували до 600 мМ TEA-Cl. Формування та витончення бішару контролювали за допомогою вимірювань ємності. Електричні з'єднання було здійснено за допомогою електродів Ag/AgCl та агарових містків з 3М KCl для мінімізації потенціалів поляризації. Злиття везикул, що містили пептид з бішаровою мембраною проводили в градієнті 150/600 мМ TEA-Cl, 20 мМ HEPES, рН 7,4 (цис/транс). Усі вимірювання проводили при кімнатній температурі. Силу струму вимірювали за допомогою двоканального підсилювача (модель ID 562, IDB, Gwynedd, Великобританія). Сигнали було відфільтровано на частоті 0,2 кГц (4-полюсний фільтр Бесселя низьких частот (Warner), оцифровано (аналого-цифровий перетворювач 1401 Cambridge Electronic Design, Великобританія) та передано на ПК для аналізу в режимі офлайн у пакетах для електрофізіології CED V6. 41 та pCLAMP8 (Axon Lab).  $P_o$  – імовірність перебування каналу у відкритому стані – розраховували згідно з описом програми pCLAMP 8 для Fetcham та pSTAT (Фостер-Сіті, США) [12, 13, 22, 23].

### 2.1.2 Вплив пріонних пептидів на мембранний потенціал мітохондрій гіпокампа щурів

Гомогенати гіпокампа. Самців щурів Wistar (130-200 г) було вбито шляхом дислокації шийного хребця, їх мозок швидко видалено, промито й уміщено в крижаний розчин сахарози 250 мМ. Потім було виділено гіпокампа. Для приготування гомогенатів близько 50 мг вологої тканини

двічі гомогенізували протягом 20 с при 8000 об/хв за допомогою гомогенізатора Ultra-Turrax T 25 (ІКА, Штауфен, Німеччина) у 0,5 мл крижаного середовища, що містить 0,25 М сахарози, 0,5 мМ ЕДТА та 50 мМ трис-НСІ (рН 7.4) [10, 11].

Вимірювання потенціалу мітохондріальної мембрани проводили при кімнатній температурі в кюветі об'ємом 1 мл спектрофлюориметра Shimadzu RF-5000 (Японія), використовуючи 5 мкМ мембранно-чутливого флуоресцентного барвника DASPMI у середовищі, що містить 10 мМ пірувату, 5 мМ малату, 60 мМ КСІ, 110 мМ манітолу, 10 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,5 мМ Na<sub>2</sub>ЕДТА та 60 мМ трис-НСІ (рН 7,4). Концентрація білка гомогенатів гіпокампа становила 0,5–0,7 мг/мл. Для проникнення синаптосомальних мембран додавали 100 мкг дигітоніну на 1 мг білка. Зразки збуджено при 450 нм, а флуоресценцію DASPMI зареєстровано при 520 нм [10, 11, 23].

Швидкість дихання гомогенатів гіпокампа вимірювали при 30 ° С за допомогою кисневого електроду типу Кларка (Yellow Springs Instruments, ОН) у середовищі, описаному для вимірювання потенціалу мембрани. Обробку дигітоніном (100 мкг/мг білка) використовували для екстракції мітохондрій з синаптосом. Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій гіпокампа проводили з використанням флуоресцентного зонда DASPMI. Деполяризація мітохондрій супроводжується зниженням флуоресценції DASPMI (у відносних одиницях). Для того, щоб максимізувати потенціал мітохондріальної мембрани, додавали 0,5 мг/мл нігерицину з подальшим додаванням 4 мг/мл досліджуваних пептидів та 2 мкг/мл валіноміцину [10, 11, 13, 16].

## **2.2 Приготування зразків для дослідження мембранних CLC іонних каналів**

Штами *S. cerevisiae* вирощували в мінімальних середовищах, доповнених необхідними амінокислотами (метіонін, репресор каталізатора

MET25, був відсутній), і 2% розчином глюкози як джерелом вуглецю. Для приготування зразків для БЛМ клітини вирощували до щільності приблизно  $6 \times 10^7$  клітин/мл [12].

Конструювання плазмиди та перетворення дріжджів. Центромірну плазмиду pKF19, що несе С-кінцеве злиття GEF1–GFP під контролем промотору MET25 та термінатора CYC1, було сконструйовано з використанням елементів плазмиди pDR46/GEF1/GFP від Jentsch та плазмиди pUG36 від J.H. Гегеманн (J.H. Hegemann, Universitat Dusseldorf). Деталі конструкції: фрагмент XbaI 720bp (містить послідовність, що кодує GFP) було видалено з плазмиди pUG36; і в отриману плазмиду прибіл. 3,1 кб фрагмент BamHI/EcoRI pDR46/GEF1/GFP було вставлено з отриманням pKF19. Епісомальна (багатокопійна) плазміда pRG151, що несе злиття GEF1–GFP під вихідним промотором GEF1 від R. Gaxiola. Плазміда pSM3M-414, що містить С-кінцевий Mc-мічений Mnt1p (α-1,2-манозилтрансфераза, що бере участь у O-глікозилюванні, маркер Гольджі), було отримано від S. Munro (Лабораторія молекулярної біології MRC, Кембридж, Великобританія).

Для клітинного фракціонування та імуноблот-аналізу клітини дріжджів гомогенізували. Мікросомальну фракцію для використання в експериментах з реконституції в БЛМ, було отримано після осадження органелярної фракції шляхом центрифугування при 35000 g протягом 20 хвилин та подальшого поділу цитозольної та мікросомальної фракцій шляхом ультрацентрифугування при 105,000 g протягом 1 години [12]. До всіх буферів додавали інгібітор протеази Coctail Complete (Roche) та 0,1 mM PMSF (фенілметилсульфонілфторид) і всю процедуру проводили при 0–4 °C. Мікросоми було отримано з трьох незалежних культур. Для візуалізації химерних білків, позначених GFP та мус, на вестерн-блотах зразки білків піддавали SDS-PAGE з подальшим промочуванням на Hybond-C extra та зондували поліклональними анти-GFP антитілами (Living Colors, Clontech) або анти-мус моноклональними антитілами



(Інвітроген).

### 2.3 Отримання модельних ліпідних мембран різного складу

Для одержання одношарових ліпосом діаметром 100 нм методом екструзії використовували 10 мМ розчин цвіттеріонного L- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфа-тидилхоліну (ДПФХ).

Модельні мембрани різного складу:

- 1) ДПФХ, яка використовувалась як реперна мембрана;
- 2) ДПФХ + 10 % ДПФГ (ДПФХ-ДПФГ) – для відтворення негативного поверхневого заряду нативних клітинних мембран;
- 3) ДПФХ + 5 % церамідів (ДПФХ-Ц) – для наближення до ліпідного складу шкіряних покривів та мембран деяких видів бактерій;
- 4) ДПФХ + 10 % холестерину (ДПФХ-ХЛ) – для наближення до ліпідного складу мембран ссавців.

Одношарові ліпосоми діаметром 100 нм із фосфатидилхоліну (ФХ) отримували методом екструзії. Як робочі розчини використовували 10% етанольний розчин фосфатидилхоліну, етанольний розчин кардіоліпіну (КЛ) 5 мг/мл, розчин холестерину (ХЛ) у хлороформі 10 мг/мл. Загальна концентрація ліпосомальної суспензії становила 10 мМ. Отримували зразки ліпосом з різним процентним вмістом фосфоліпідів: ФХ – 100%, 90% ФХ + 10% КЛ, 90% ФХ + 10% ХЛ, 70% ФХ + 30% ХЛ, 40% ФХ + 60% ХЛ Кінцева концентрація ліпідів у досліджуваних зразках – 0,5 мМ.

У дослідженнях використовували спиртовий розчин грамїцидину S з робочою концентрацією 1 мг/мл. Кінцеві концентрації антибіотику в зразках ліпосом становили 1 мкМ, 2 мкМ та 4 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ та 80 мкМ.

Методами флуоресцентної спектроскопії та НВЧ-діелектрометрії досліджено комплекси GS з модельними ліпідними мембранами. Одношарові ліпосоми діаметром 100 нм із суміші фосфоліпідів

отримували методом екструзії. Як робочі розчини 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 моделювати щільність поверхневого заряду ліпосом та щільність упаковки ліпідних вуглеводневих хвостів у бішарі, відповідно. Ефективність комплексоутворення GS з модельними мембранами оцінювали із застосуванням флуоресцентного зонду пірену. Реєстрацію спектрів флуоресценції пірену в ліпосомальних мембранах у присутності GS в інтервалі концентрацій (0–80) мкМ здійснювали на спектрофлуориметрі «Hitachi-850» (Японія) у кварцевих кюветах 1 см при 22–24 °С.

Модельні ліпідні мембрани створювали з фосfolіпідів: L- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилхолін (ДПФХ) «Avanti Polar Lipids» (США) та його гомолог L- $\alpha$ -диміристоїлфосфатидилхолін (ДМФХ) «Sigma», L- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (ДПФГ), L- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилетаноламін (ДПФЕ) «Fluka», а також кардіоліпін (КЛ) та холестерин (X) «Sigma-Aldrich» (Німеччина).

#### 2.4 Метод НВЧ діелектрометрії

Метод мікрохвильової діелектрометрії було використано для вимірювання діелектричних параметрів водних суспензій ліпосом. На підставі вимірювань комплексної діелектричної проникності на частоті 9,2 ГГц (у діапазоні дисперсії об'ємної води) було оцінено гідратацію ліпідних везикул. Показано, що величину гідратації, розраховану з декременту статичної діелектричної проникності, може бути використано для моніторингу взаємодії ліпосом з антимікробним пептидом та відстеження вивільнення лікарського засобу з наноносіїв. Перерозподіл вільної та зв'язаної води в суспензії ліпосом при зв'язуванні та дисоціації

малих молекул з ліпідними мембранами нанорозмірних сферичних частинок можна відстежувати за змінами діелектричних параметрів у мікрохвильовому діапазоні частот [18, 19, 31, 41]. Ці показники може бути використано в технологіях цілеспрямованої доставки ліків для контролю якості та моніторингу зв'язування й вивільнення лікарського засобу.

Цільова доставка ліків розглядається як пріоритетний напрям персоналізованої медицини та майбутньої охорони здоров'я. Цей підхід використовують для сенсibilізації при фотодинамічній терапії зовнішніх пухлин. Транспортування ліків всередині людського організму здійснюється завдяки використанню нанорозмірних контейнерів або носіїв, здатних доставляти ліки до потрібного місця призначення. Вони дозволяють застосовувати більш низькі концентрації діючої речовини, орієнтовані на конкретне місце призначення, здійснюють менш шкідливі побічні впливи на здорові тканини.

При проектуванні та розробці таких комбінованих препаратів в підсумку необхідна можливість моніторити та контролювати утримування та вивільнення лікарських речовин з наноносів. Крім того, необхідно передбачити окремі механізми для ліквідації невикористаної або надмірної кількості лікарської речовини з організму пацієнта після лікування.

На сьогодні найбільш поширеною системою для цільової терапевтичної доставки ліків є ліпосома – мульти- або уніламельярна ліпідна везикула сферичної форми діаметром від десятків до сотень нанометрів [31]. Ліпосоми підходять для транспортування як водорозчинних, так і неполярних сполук [224]. Середовище всередині ліпосоми, наповнене водою, призначене для гідрофільних лікарських засобів, тоді як його двошарова ліпідна мембрана може накопичувати й переносити гідрофобні або амфipатичні речовини [228].

На сьогодні використовуються різні механізми контролю виділення лікарських речовин із ліпосом. Це може бути фотоактивація, зв'язування з певними молекулами, магнітне поле [224,228] тощо. Для забезпечення

належного та своєчасного цільового вивільнення ліків з ліпосом слід передбачити механізм, що дозволяє швидко й надійно відстежувати здійснення зв'язування та дисоціацію/вивільнення речовини.

Широкопasmову діелектричну спектроскопію зазвичай використовують для визначення переходів між стаціонарними станами біологічних зразків. Для характеристики рідких матеріалів з високими значеннями втрат широкопasmове обладнання зазвичай використовує методи відбиття або передачі; однак їх точність обмежена [147, 283]. Резонансні методи використовують для характеристики матеріалів з низькими значеннями діелектричних втрат у вузькому діапазоні частот [237-239]. Ми застосували резонансний метод, розроблений для вимірювання діелектричних властивостей водних біологічних систем з високими втратами [148-150] на частоті 9,2 ГГц. Цей метод засновано на високій точності вимірювань діелектричних параметрів на конкретній частоті, що дозволяє відстежувати зміни, що відбуваються на молекулярному рівні, та дає можливість аналізувати процеси діелектричної релаксації в біологічних середовищах.

Використовуваний метод є швидким, неруйнівним, не потребує використання додаткових зондів для спостереження за зв'язуванням та вивільненням ліків із ліпосом. Метод засновано на вимірюванні комплексної діелектричної проникності водних суспензій сферичних ліпідних везикул. Мікрохвильова діелектрометрія в ділянці дисперсії молекул вільної води (так звана гамма-дисперсія) дозволяє вивчати стан води в біологічних системах [18, 19, 285]. Вода визначає рухливість біомолекул, дозволяє їм асоціювати та дисоціювати й полегшує велику кількість біохімічних процесів. Воду в суспензіях клітин, розчинах біомолекул або біоміметичних систем може бути віднесено до одного з таких типів: вільна вода, зв'язана вода і сильно зв'язана структурована вода [18, 282]. Фізичні властивості цих трьох типів води різні. Молекули зв'язаної води мають меншу рухливість, ніж молекули вільної води.

Імобілізація певної частини води в гідратаційні оболонки макромолекул, клітинних мембран або водно-ліпідних систем в суспензіях призводить до зменшення діелектричної проникності розчину/суспензії порівняно з чистим розчинником. Кількість зв'язаних молекул води змінюється при адсорбції та десорбції дрібних молекул на ліпідній мембрані суспендованої вісікули [31,149,150]. Мікрохвильова діелектрометрія на частоті 9,2 ГГц дозволяє виділити внесок об'ємної води в діелектричні властивості зразка [19, 31, 41, 150]. Дипольна релаксація молекул вільної води найбільшою мірою впливає на діелектричну константу водних суспензій клітин або модельних ліпідних систем у мікрохвильовому діапазоні частот, завдяки чому можна простежити за вмістом вільної води або за перерозподілом між кількістю вільної та зв'язаної води в них, таким чином, вміст вільної води у зразку може бути використано як маркер структурних змін у мембранах ліпосом під час зв'язування та з'єднання з терапевтичними препаратами.

Моніторинг вивільнення препаратів з нано-контейнерів за допомогою методу НВЧ-діелектрометрії може слугувати як доповненням до прямих методів, так і використовуватися окремо. На відміну від багатьох традиційних методів дослідження, цей підхід дає можливість вивчати об'єкти в режимі реального часу без впливу на їхній стан, без використання додаткових індикаторів або маркерів.

Величину комплексної діелектричної проникності 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 досліджуваних об'єктів, є чутливою до міжмолекулярних взаємодій, з'ясовує зв'язок між фізичними властивостями об'ємної фази та окремими компонентами складних суспензій чи досліджуваних зразків.

Зникнення поляризації молекул діелектрика після вимкнення

зовнішнього поля завдяки тепловому руху описує функція діелектричної поляризації  $\varphi(t)$

$$\varphi(t) = \frac{\vec{P}(t)}{\vec{P}(0)} \quad (2.1)$$

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

$$\vec{D}(t) = \varepsilon_0 \left[ \varepsilon_\infty \vec{E}(t) + \int_{-\infty}^t \dot{\Phi}(t') \vec{E}(t-t') dt' \right] \quad (2.2)$$

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

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \hat{L} \left[ -\frac{d}{dt} \varphi(t) \right] \quad (2.3)$$

де лапласіан для довільної часозалежної функції  $f(t)$  визначається як

$$\hat{L}[f(t)] \equiv F(\omega) = \int_0^{\infty} e^{-pt} f(t) dt \quad (2.4)$$

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

Коли макроскопічна релаксація відбувається за експоненціальним законом

$$\varphi(t) = \exp(-t/\tau_m) \quad (2.5)$$

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

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \frac{1}{1 + i\omega\tau_m} \quad (2.6)$$

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

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \int_0^\infty \frac{G(\tau)}{1 + i\omega\tau} d\tau \quad (2.7)$$

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

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{[1 + (i\omega\tau_m)^\alpha]^\beta}, \quad 0 \leq \alpha, \beta \leq 1 \quad (2.8)$$

у 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  $\varepsilon'$ , а за зміною добротності резонатора з урахуванням низькочастотної провідності –  $\varepsilon''$  досліджуваних зразків. Замість частотного «сканування» зразків виконували за температурою, вимірюючи  $\varepsilon'$  та  $\varepsilon''$  в інтервалі від 4 до 40°C.

Комплексну діелектричну проникність ліпосомальних суспензій вимірювали за допомогою мікрохвильового діелектрометра резонаторного типу, розробленого та зібраного на кафедрі молекулярної і медичної біофізики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна [18, 19, 148–150]. Використовували циліндричний резонатор  $H_{01n}$  на робочій частоті 9,2 ГГц. Для вимірювання діелектричних параметрів суспензії ліпосом її набирали в капіляр діаметром 2 мм та поміщали в резонатор. Реєстрували зсув резонансної частоти між резонансною частотою порожнього й навантаженого резонатора та коефіцієнт

ослаблення НВЧ-потужності зразком. Помилка вимірювання показника  $\epsilon''$  не перевищувала  $\pm 0,5$ , а  $\epsilon'$  не перевищувала  $\pm 0,2$ . Значення діелектричних параметрів  $\epsilon'$  та  $\epsilon''$  було розраховано з використанням рівнянь регресії (градувальних залежностей), отриманих для зразків з відомими значеннями  $\epsilon'$  та  $\epsilon''$  [148].

Діелектричні характеристики чистої води можна описати рівняннями Дебая:

$$\epsilon'(f) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + \left(\frac{f}{f_d}\right)^2}, \quad (2.9)$$

$$\epsilon''(f) = \frac{(\epsilon_s - \epsilon_{\infty}) \left(\frac{f}{f_d}\right)}{1 + \left(\frac{f}{f_d}\right)^2} \quad (2.10)$$

де  $\epsilon_{\infty}$  та  $\epsilon_s$  – високочастотна та низькочастотна (статична) діелектрична проникність (асимптотичні значення діелектричної проникності на частотах вищих і нижчих за ділянку дисперсії, відповідно),  $f_d$  та  $f$  – частоти діелектричної релаксації та частоти зовнішнього мікрохвильового поля. У наших розрахунках ми використовували  $\epsilon_{\infty} = 5,6$  (як діелектричну проникність в інфрачервоному діапазоні). Дебаївську модель (2.9) – (2.10) може бути використано в разі будь-якого поляризаційного механізму за наявності одиночного часу релаксації, зокрема в нашому випадку, коли ми вивчаємо сферичні частинки, суспендовані у воді. Ця теорія дає такі вираження для частоти діелектричної релаксації молекул води у розчинах/суспензіях  $f_d$  та статичної діелектричної проникності  $\epsilon_s$  зразків:

$$\epsilon_s = \epsilon' + \frac{(\epsilon'')^2}{\epsilon' - \epsilon_{\infty}}, \quad (2.11)$$

$$f_d = \frac{f(\epsilon' - \epsilon_{\infty})}{\epsilon''}. \quad (2.12)$$

Частота діелектричної релаксації характеризує рухливість молекул вільної води в мікрохвильовому полі, і, як наслідок, ступінь їх взаємодії з



оточенням. Величина  $\varepsilon_s$  не залежить від частоти і то менша, що більша концентрація розчиненої або суспендованої речовини в зразку та що більша кількість зв'язаної цією речовиною води.

Оцінка кількості зв'язаної води або ступінь гідратації може проводитись як безпосередньо за зменшенням статичної діелектричної проникності зразка порівняно з водою, так і на основі теорії діелектричної проникності дисперсних систем. У першому випадку ступінь гідратації  $h$ , моль/моль, розраховується за формулою

$$h = \frac{1000(\varepsilon_s^W - \varepsilon_s^l)}{\varepsilon_s^W CM}, \quad (2.13)$$

де  $\varepsilon_s^l$  та  $\varepsilon_s^W$  – статичні діелектричні проникності суспензій ліпосом і води, відповідно,  $C$  – молярна концентрація ліпідів,  $M$  – молярна маса води [18]. Ця формула не враховує ані форми розчиненої речовини, ані її діелектричної проникності, тому її використовують у разі ідеального розчину. Для суспензій з метою розрахунку ступеня гідратації суспендованої речовини більш доцільним є використання формули, отриманої на основі теорії діелектричної проникності дисперсних систем:

$$h = \frac{\frac{100}{Cr}(\varepsilon_s^W - \varepsilon_s^l) - (\varepsilon_s^W - \varepsilon_\infty^l)\nu}{(\varepsilon_s^W - \varepsilon_\infty^W)}, \quad (2.14)$$

де  $\varepsilon_\infty^l=2$  та  $\varepsilon_\infty^W=5,6$  – діелектричні проникності ліпідів і води в інфрачервоному діапазоні частот, відповідно,  $r=1,5$  – коефіцієнт форми розчиненої речовини,  $C$  – концентрація ліпідів у мас. %,  $\nu$  – питомий об'єм розчиненої речовини (ліпідів) [19].

Концентраційні залежності діелектричних параметрів для буферних водних розчинів ДПФХ-ліпосом виявилися лінійними (рис. 2.1–2.3) у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій до  $4,6 \times 10^{13}$  везикул на 1 мл.

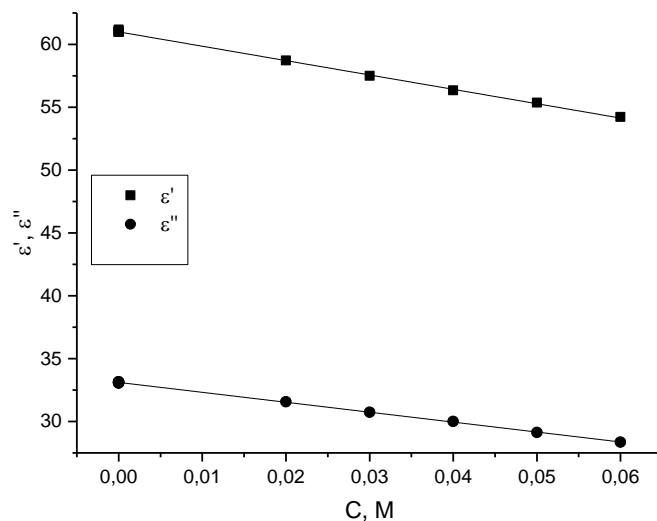


Рис. 2.1 Дійсна  $\epsilon'$  та уявна  $\epsilon''$  частини комплексної діелектричної проникності водних суспензій ДПФХ ліпосом.

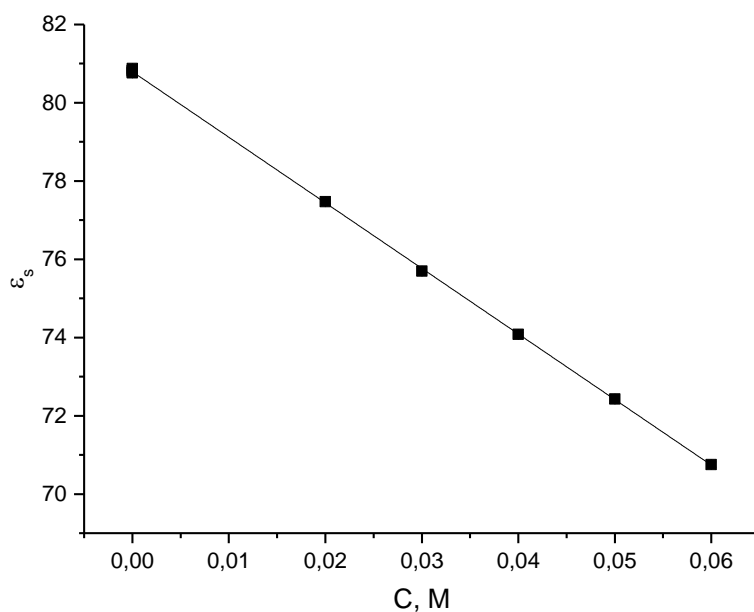


Рис. 2.2 Статична діелектрична проникність водних суспензій ДПФХ ліпосом.

Цей факт свідчить про стійкість суспензій та відсутність агрегації везикул в наших експериментальних умовах. Частота діелектричної релаксації молекул об'ємної води в суспензії ліпосом ДПФХ зростає зі

збільшенням концентрації ліпосом, що вказує на структурування молекул вільної води. Водночас, цей ефект, імовірно, регулюється обмеженням обертального руху молекул води всередині ліпосом.

Розрахунки ступеня гідратації ліпідів в ліпосомах за формулою (2.13) показали, що в досліджуваному діапазоні концентрацій гідратація везикул незалежить від концентрації ліпідів. Цей висновок дозволяє нам очікувати, що зміна гідратації при зв'язуванні/вивільненні лікарських засобів, що взаємодіють з ліпосомами, буде пов'язана лише з взаємодією малих лігандів з ліпідними мембранами ліпосом, а не з ліпосомами між собою.

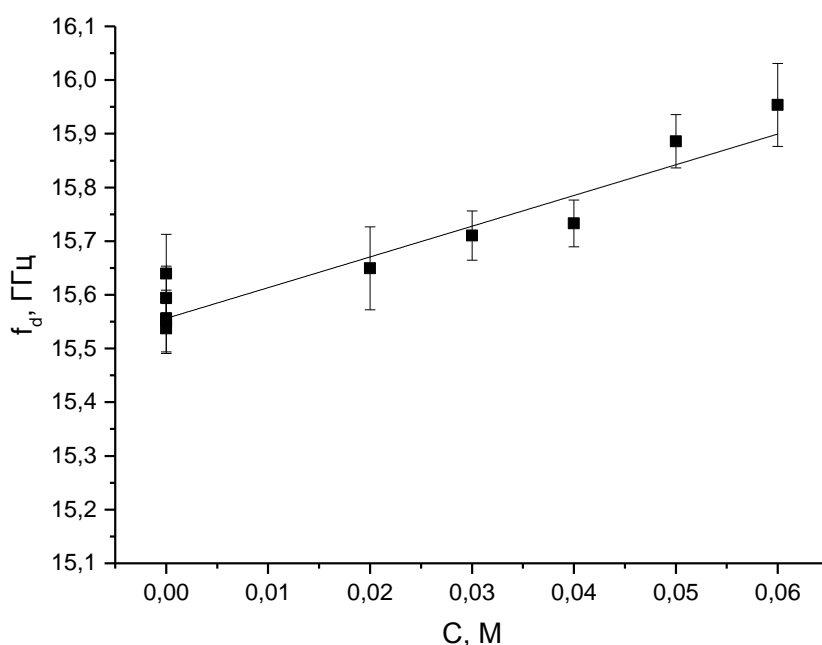


Рис. 2.3 Частота діелектричної релаксації молекул води у водних суспензіях ДПФХ ліпосом.

Розраховане значення ступеня гідратації ліпосом становило приблизно 40 моль  $H_2O$  на моль ліпідів, що менше, ніж гідратація, наприклад, плазматичних мембран еритроцитів і, водночас, більше за кількість води в гідратних оболонках цвіттеріонних додецилфосфохолінових (ДФХ) міцел у водних розчинах, розрахованих за діелектричними параметрами розчинів ДФХ у широкому діапазоні частот

від 50 МГц до 1,12 ТГц, яка становить  $950 \pm 45$  молекул води на міцелу, що складає 60 молекул на молекулу ДФХ. Цей факт можна пояснити наявністю білків та інших типів ліпідів у природних мембранах. Одночасно розраховані значення частоти діелектричної релаксації молекул води в суспензії ліпосом вказують на те, що вільна вода стає більш структурованою в суспензії. Цікаво, що ступінь гідратації ліпосом перебуває посередині між гідратацією природних клітинних мембран та ліпідних міцел. Результати, отримані в [112], показують, що GS при концентраціях до 10 мол.% збільшує здатність ліпосом, виготовлених з ДПФХ, до адіабатичного стиснення. Здатність до стиснення мембрани тісно пов'язана з її упорядкуванням і змінами в гідратації ліпідного бішару. Автори припускають, що зміни гідратації не мали істотного впливу на мембранну термодинаміку порівняно з дією пептиду на структурні властивості ліпідного бішару, однак, дослідники не надавали інформації про напрям, а також про ступінь зміни гідратації. Наші результати показують, що гідратація зменшується немонотонно при зв'язуванні із GS, що може бути наслідком порушення структури ліпідного бішару та зміни структури мембрани навколо молекул GS. Зміна гідратації при взаємодії невеликих речовин, таких як молекули, у нашому випадку – циклічного антимікробного пептиду GS зі сферичними везикулами, оточеними молекулами води, є непрямим показником їх зв'язування з ліпосомами. Адсорбція на поверхні та подальше вбудовування молекули амфіфільного депептиду в ліпідний бішар ліпосоми змінюють багато відстежуваних параметрів цієї системи, серед них – щільність поверхневого заряду, площа, зайнята молекулою ліпіда у водно-ліпідному шарі. Це також змінює доступну поверхню для води та профіль гідрофобності. Сама ж молекула GS являє собою жорстку структуру, яка не змінюється при перерозподілі між полярним розчинником і неполярним ліпідним двошаром, тому для контролю за його зв'язуванням необхідно використовувати спеціальні мітки, чутливі до змін у навколишньому

середовищі GS, водночас можна спиратися на метод, що не потребує міток і додаткових впливів на систему. Мікрохвильова діелектрометрія у вузькому частотному діапазоні шляхом визначення зміни кількості об'ємної води у трьохкомпонентній системі забезпечує непряме спостереження за взаємодією компонентів шляхом відстеження точного перерозподілу молекул води між вільними та зв'язаними станами.

При вивченні температурної залежності часу релаксації води в 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:

$$k = \frac{k_B T}{\hbar} \exp\left(\frac{\Delta S}{k_B} - \frac{\Delta H}{k_B T}\right) \quad (2.14)$$

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

Вважаючи, що час релаксації  $\tau \sim 1/k$ , рівняння Ейрінга (2.14) 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.

## **2.5 Оптичні методи дослідження агрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів**

Оптичні характеристики клітинних суспензій досліджують за допомогою фотометричних пристроїв. Суспензії клітин, бактерій або клітинних органел є оптично неоднорідними середовищами, що містять порівняно великі частинки. На відміну від розчинів молекул, частинки в суспензії в цьому разі більше розсіюють, ніж поглинають. Усе це накладає певні обмеження на застосовність оптичних законів розсіювання й поглинання світла.

Для клітинних суспензій при низьких концентраціях залежність передачі світла (оптичної щільності) від концентрації клітин підпорядковується закону Бера:

$$D = kCl, \quad (2.15)$$

де  $k$  – константа, що залежить від довжини хвилі світла й оптичних властивостей середовища,

$C$  – концентрація клітин,

$l$  – товщина шару середовища, уздовж напрямку променя світла.

Рівняння (2.10) справедливе для клітинних суспензій, коли  $D < 1$  [5, 9]. Для однорідних частинок можна застосовувати закон Бугера-Ламберта-Бера, що пов'язує інтенсивність падаючого ( $I_0$ ) й ( $I$ ) світла, що пройшло:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon Cl}, \quad (2.16)$$

де  $\varepsilon$  – коефіцієнт екстинкції. Тоді оптична щільність

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon Cl \quad (2.17)$$

Однак у випадку з клітинними суспензіями через високу здатність розсіювання зміна оптичної щільності буде уявною, і можна говорити про деякий еквівалент – ефективну оптичну щільність середовища. Вираз (2.17) можна замінити аналогічним:

$$D = \ln \frac{I_0}{I} = SlC, \quad (2.18)$$

де  $S$  – ефективний перетин частинок, на якому відбувається поглинання й розсіювання світла.

При агрегації тромбоцитів концентрація клітин у пробі не змінюється, але відбувається поступове збільшення частинок у плазмі за рахунок склеювання клітин одна з одною, що призводить до збільшення передачі світла за рахунок зменшення поверхні поглинання й розсіювання.

Для покращення умов взаємодії клітин одна з одною й запобігання їх осіданню, суспензію перемішують за допомогою спеціальної мішалки.

Характер агрегаційної кривої залежить від концентрації тромбоцитів

у плазмі, швидкості перемішування плазми та концентрації доданого індуктора агрегації. Швидкість і ступінь агрегації тромбоцитів збільшуються зі збільшенням концентрації клітин в плазмі, а також швидкості обертання мішалки.

У спектрофотометрах і фотоелектроколориметрах використовують щільні діафрагми, тому кювету із суспензією клітин освітлює досить широкий пучок світла. Згідно з теорією розсіювання світла, ослаблення світла відбувається за рахунок розсіювання на всіх частинках, однак спрямована вперед хвиля зазнає когерентного впливу з боку частинок. За умови, що приймач світла досить віддалений, у криву загасання робить внесок світло, розсіяне під невеликими кутами.

При використанні СФ-ів та ФЕК-ів, адаптованих до вивчення світлопередачі суспензії тромбоцитів при агрегації, реєструємо ослаблене світло й світло, розсіяне під малими кутами [141].

Швидкість та ступінь агрегації визначали за зміною оптичної щільності суспензії тромбоцитів протягом 10 хв, яку записували за допомогою агрегометра «Solar AP2110». Математичний аналіз отриманих кривих агрегації проводили з використанням спеціалізованого пакета програм постачальника обладнання «Solar» (Білорусь). Також для вивчення агрегації тромбоцитів було використано фотоелектроколориметр ФЕК-М із зеленим світлофільтром (максимум світлопропускання  $\lambda=540$  нм). Сигнал з ФЕК-М реєстрували за допомогою самописця ЕПП-09М, а зміну світлопропускання фіксували відносно контрольного зразка, яким була вода або безтромбоцитарна плазма крові. В обох випадках використовували плоскі скляні кювети з робочою шириною 3 мм. Зразок плазми рівномірно перемішували [5].

Фотоелектроколориметр ФЕК-М має скляну оптику, прозору тільки для променів видимої ділянки спектру. Як джерело світла використовували вольфрамову лампу розжарювання. Селенові фотоелементи служать детектором променевої енергії. Пристрій придатний для вимірювань в

інтервалі довжин хвиль 400–700 нм. Є набір кювет з об'ємом 1–2 мл.

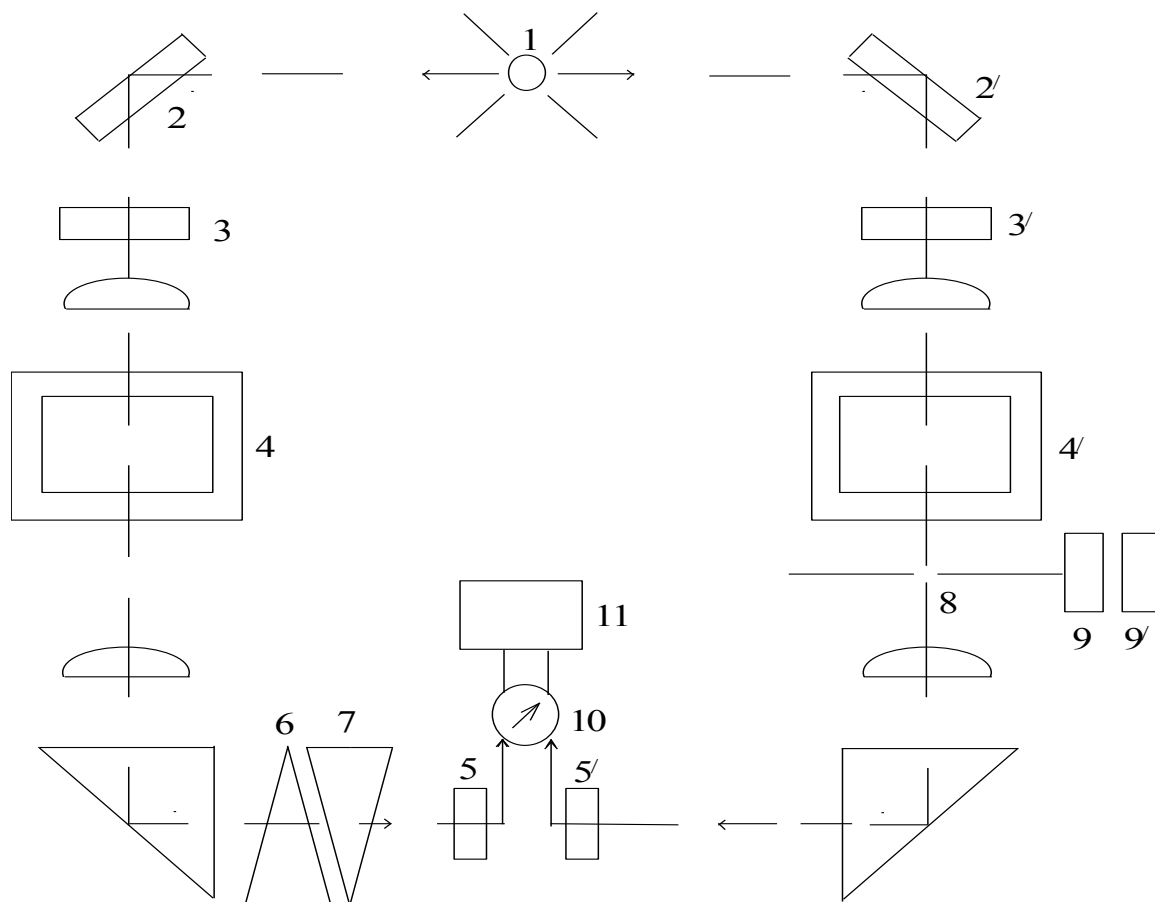


Рис. 2.4 Оптична схема фотоелектроколориметра ФЕК-М

Принцип роботи приладу полягає в управлінні інтенсивностями двох світлових потоків за допомогою щілинної діафрагми. Від джерела світла 1 (рис. 2.4) світлові промені відбиваються два дзеркала 2, 2', вони проходять через світлофільтри 3, 3', кювети 4, 4' з розчинами й потрапляють на селенові фотоелементи 5, 5', увімкнені за диференційною схемою таким чином, що за умови рівності потоків променів стрілка гальванометра стоїть на нулі. На шляху лівого пучка світла, що падає на фотоелемент 5, розміщено нейтральні клини 6 і 7, на шляху правого пучка світла, що падає на фотоелемент 5' – щілинна діафрагма 8, пов'язана з двома порохованими барабанами 9, 9'. Барабани мають дві шкали: червону – оптичну щільність й чорну – процент пропускання. Вимірювання проводимо на довжині хвилі 495–570 нм.



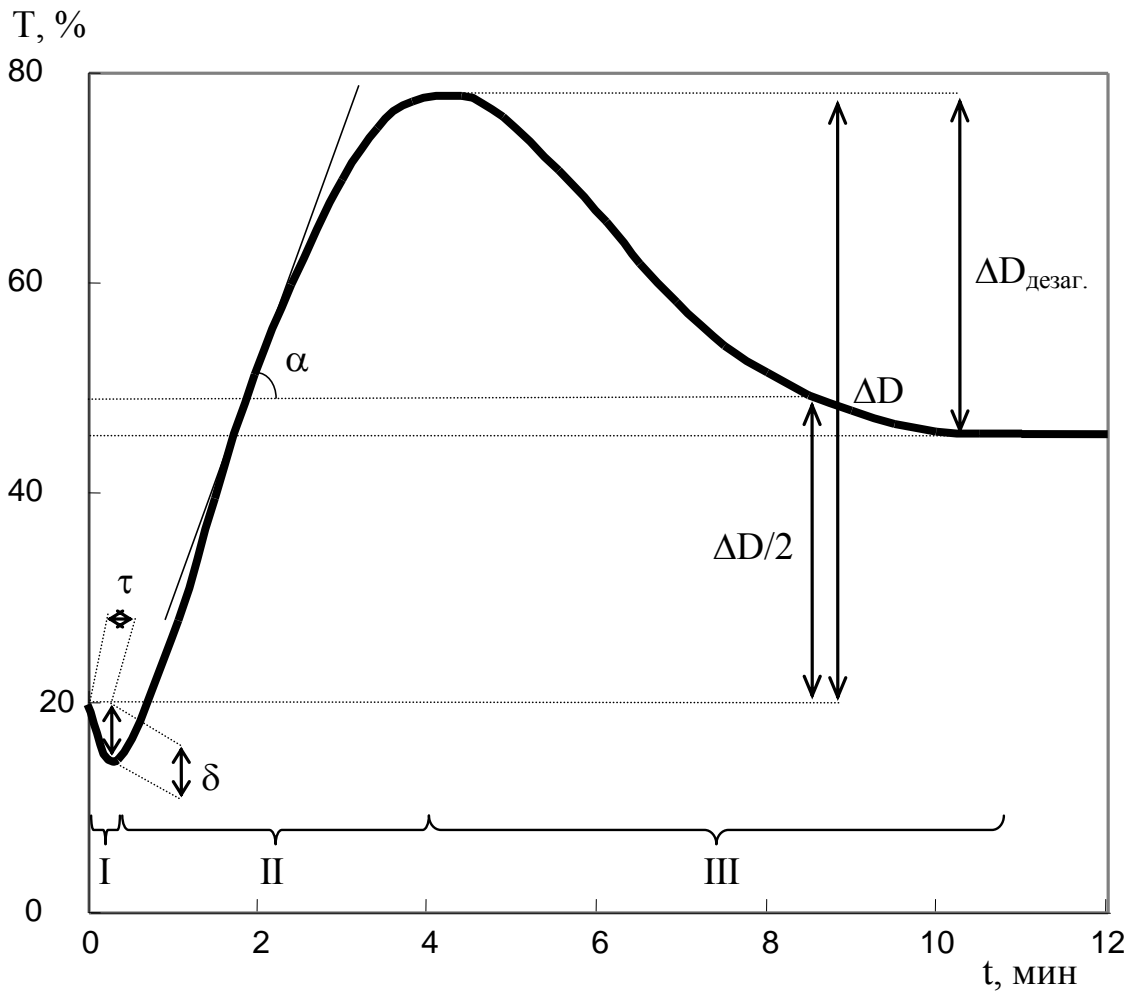


Рис. 2.5 Зміна світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми після додавання індуктора агрегації.

Індуктор додано до ЗТП у момент часу  $t = 0$ . Фігурними стрілками позначено фази агрегації: I – зміна форми й активація тромбоцитів, II – агрегація тромбоцитів, III – дезагрегація тромбоцитів (решта позначень – у тексті).

Агрегацію тромбоцитів спостерігали методом турбідиметрії, реєструючи кінетику змін світлопропускання ЗТП під час агрегації. За кривими зміни світлопропускання визначали ступінь агрегації ( $\Delta D$ ) як максимальну величину зміни світлопропускання при агрегації й швидкість агрегації ( $V$ ) за тангенсом кута нахилу дотичної до кривої на напіввисоті (рис. 2.5) [20, 21].

Вимірювання проводили в інтервалі температур 4–44°C у спеціально розробленій термостабілізованій кюветі (рис. 2.6) [5, 20, 21]. Температуру досліджуваного зразка вимірювали термопарою мідь-константан з точністю  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  [5].

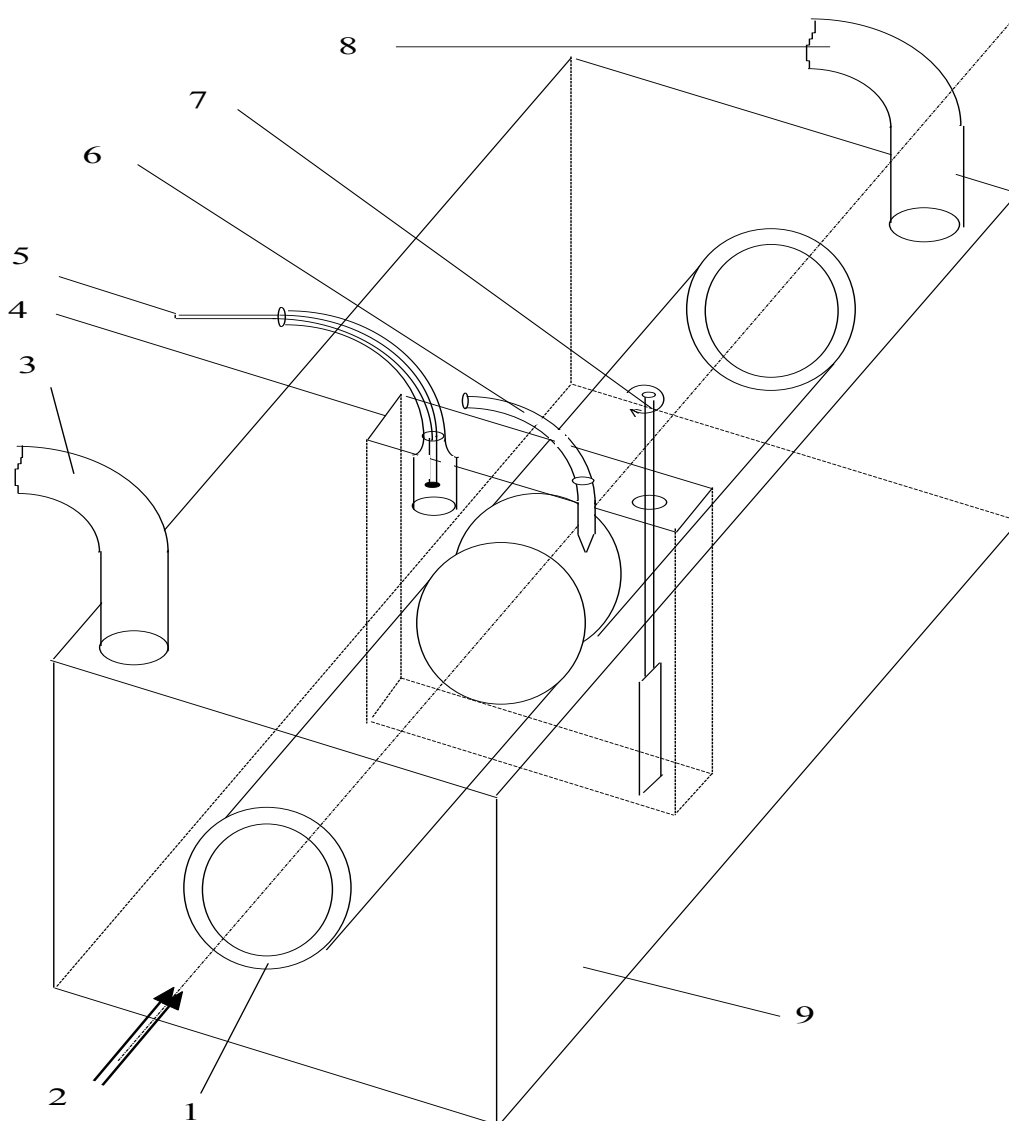


Рис. 2.6 Ескіз термостабілізованої кювети [5].

1 – мідні трубки; 2 – напрямок освітлення кювети; 3,8 – патрубки для термостабілізаційної рідини; 4 – стандартна кварцова кювета для ФЕК-М (3 мм); 5 – термопара; 6 – інжектор для додавання індуктора; 7 – мішалка; 9 – корпус із оргскла

Численні спостереження різних авторів за початковими стадіями

агрегації тромбоцитів показали, що при дії АДФ після додавання індуктора, відбувається незначне збільшення оптичної щільності (фаза I), а потім зазвичай – її наростання (фаза II) [67, 75]. Початкове нетривале зменшення світлопропускання суспензії тромбоцитів, індуковане агрегантами, зумовлене структурно-морфологічними змінами клітин, унаслідок яких тромбоцити набувають неправильної форми з псевдоподіями [37, 40, 52].

Зміна форми тромбоцитів й утворення псевдоподій відбувається за участі мікрофіламентів і скорочувальних білків. Ціла низка структурних змін у тромбоцитах: полімеризація цитоскелетних елементів, зв'язування поверхневих білків із цитоскелетом, утворення мікротрубочок, збільшення кількості мікрофіламентів, перехід G-актину у F-актин – буде впливати на величину показника заломлення тромбоцитів і оптичної щільності суспензії [63, 151–153], і при цьому на кривій зміни світлопропускання чітко спостерігаємо стадію структурно-морфологічних трансформацій клітин, що передує процесу агрегації [141, 151, 152, 153].

Після активації та зміни форми настає стадія агрегації тромбоцитів, що виражається на агрегатограмі у збільшенні світлопропускання ЗТП (фаза II на рис. 2.5). При агрегації окремі тромбоцити злипаються один з одним, утворюючи агрегат округлої форми – таку форму зумовлено найбільшою гідродинамічною стабільністю сфероїду у зсувних потоках великої інтенсивності, що виникають у кюветі при постійному перемішуванні суспензії клітин при спостереженні агрегації *in vitro*. З розвитком у часі процесу агрегації зменшується число одиночних тромбоцитів і утворюється декілька великих сфероподібних агрегатів, що містять до 100–120 клітин. При незворотній агрегації (у разі високих концентрацій індукторів агрегації) через 2–3 хвилини після додавання індуктора світлопропускання ЗТП досягає максимального значення, виходить на плато й надалі не змінюється. На мікрофотографіях бачимо великі агрегати й поодинокі окремі тромбоцити. За малих концентрацій

фізіологічних індукторів агрегації після завершення процесу агрегації на агрегатограмах спостерігаємо зменшення світлопропускання суспензії тромбоцитів, зумовлене дезагрегацією тромбоцитів (фаза III на рис. 2.5) [1,5,9,21,141,152]. При дезагрегації руйнуються фібриногенні «місточки» між тромбоцитами в агрегаті й тромбоцити відділяються від агрегатів зсувовими силами в потоці. Агрегати розпадаються, світлопропускання суспензії повертається практично до вихідного рівня. Дезагрегація тромбоцитів у відповідь на дію низьких концентрацій фізіологічних індукторів агрегації є складовою нормальної гемостатичної відповіді кров'яних пластинок [143,146], крім того, дезагрегацію тромбоцитів можуть спричинити деякі хімічні речовини, ліки [143].

## **2.6 Приготування зразків, вивчення впливу GS на мембрани тромбоцитів й еритроцитів**

### **2.6.1 Виділення тромбоцитів і вимірювання набухання, зміни форми, агрегації й дезагрегації**

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 гліюглицером 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, для фарбування тромбоцитів використовували метиленовий синій.

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) – препарати виробництва фірми "Реанал" (Угорщина); адреналін (2–4 од/мол) ("Simko", Україна), пероксид водню ( $7,1 \cdot 10^{-3}$  М) марки х.ч.

Вплив антибіотика GS на тромбоцити досліджено оптичним методом [73]. Розчин граміцидину S в об'ємному співвідношенні ЗТП:GS=11:1 або 11:2 додавали до ЗТП через 10 хвилин після початку агрегації тромбоцитів щоб викликати дезагрегацію тромбоцитів.

Далі під концентрацією індуктора агрегації чи розчину GS маємо на увазі їх кінцеву концентрацію в кюветі. Ступінь агрегації й дезагрегації тромбоцитів розраховували як максимальну зміну світлопропускання ЗТП після додавання відповідно індуктора агрегації чи граміцидину S; швидкість агрегації й дезагрегації визначаємо за тангенсом кута нахилу дотичної до кінетичної кривої зміни світлопропускання ЗТП у процесі агрегації чи розпаду агрегатів тромбоцитів відповідно. Дотичну будували на напіввисоті кінетичної кривої [5,141]. Зникнення агрегатів у кюветі після дезагрегації перевіряли за допомогою світлопольної мікроскопії з  $\times 40$  збільшенням.

У роботі використано медичний препарат граміцидину S («Renewal» та «Фармахім»). Початковий 2% спиртовий розчин граміцидину S розбавляли в 30–50 разів 0,15 М NaCl (рН 7,4). Для виключення впливу розчинника було проведено контрольні вимірювання, що показали: розчин етанолу в концентрації до 1 % не впливає на агрегацію тромбоцитів.

У роботі також використано такі хімічні реактиви: аденозиндифосфорна кислота динатрієва соль й адреналін («Reanal», Угорщина), папаверин і нікотинова кислота («Фармахім») і CaCl<sub>2</sub> марки х.ч.

Для індукування гіпотонічного шоку тромбоцитів ми використали додавання деіонізованої води до ЗТП у співвідношенні ЗТП : (деіонізована

вода+БТП) = 1:1 для того, щоб концентрація тромбоцитів зберігалася постійною в усіх експериментах. При цьому об'ємна частка деіонізованої води варіювалася від 0 до 0,5 (частка БТП, відповідно, – від 0,5 до 0).

### 2.6.2 Оптичний метод дослідження гемолітичної стійкості мембран еритроцитів

Використано венозну кров здорових донорів обох статей, стабілізовану глюгіциром, а також еритромасу, виділену з венозної крові донорів. Еритроцити було виділено шляхом подвійного відмивання центрифугуванням у фізіологічному розчині («Фармахім», 0,15 М NaCl, рН 7,4) протягом 10 хвилин при 146 g і протягом 10 хвилин при 168 g.

Суспензію еритроцитів для оптичних вимірювань підготовлювали шляхом розведення 0,01–0,02 мл еритромаси в 3–4 мл фізіологічного розчину, при цьому середня концентрація еритроцитів становила  $\sim 10^6$  кл/мл, а початкова оптична щільність суспензії еритроцитів – в інтервалі 0,8–0,9 оптичних одиниць. Усі вимірювання проведено не пізніше, ніж через 48 годин з моменту забору крові.

Гемоліз еритроцитів фіксували за зміною мутності суспензії еритроцитів на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі  $\lambda = 670$  нм. Криві гемолізу записували з безперервним щадним перемішуванням суспензії еритроцитів для забезпечення рівномірний доступ до GS й уникнення осідання еритроцитів [7]. Для вимірювань використовували спеціальну термостатовану кювету, температуру в кюветі вимірювали термопарою мідь-константан з точністю до 0,1 °С.

Для кількісної характеристики гемолізу використовували такі величини:  $h$  – ступінь гемолізу ( $h = D_{\text{поч}} - D_{\text{кін}}$ , де  $D_{\text{поч}}$  та  $D_{\text{кін}}$  – оптична щільність суспензії еритроцитів до й після гемолізу, відповідно),  $V$  – швидкість гемолізу,  $t$  – час повного гемолізу [2,3,7].

### 2.6.3 Стійкість еритроцитів до гемолізу

Відомо, що GS спричиняє гемоліз еритроцитів. Взаємодія пептиду з мембраною спочатку призводить до незначного її пошкодження, що спричиняє вихід гемоглобіну з клітини. Зі збільшенням концентрації антибіотика ступінь пошкодження зростає, і за певної концентрації GS втрачаємо структурну цілісність ліпідного бішару [2,3,7,8].

Фотометрична крива, що відображає процес гемолізу, відповідає розподілу еритроцитів за стійкістю (рис. 2.4). Зміна екстинкції з моменту істинного початку гемолізу до його повного завершення пропорційна числу всіх еритроцитів, що беруть участь у процесі [154,155]. Це припущення підтверджує дослідження оптичних властивостей суспензії еритроцитів, що лежить в основі фотометричного методу визначення кислотної стійкості їх мембран [7,8,154,155].

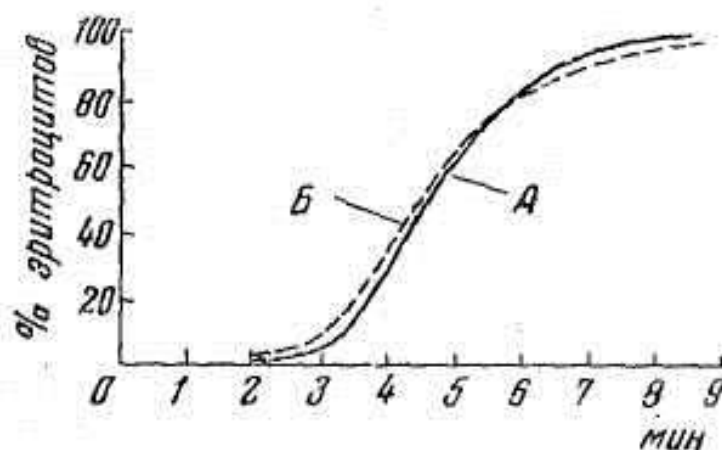


Рис. 2.7 Кінетика кислотного гемолізу еритроцитів під дією 0,002 N HCl.

А – крива, розрахована за даними мікроскопії, Б – фотометрична реєстрація кінетики гемолізу [155].

Процентний розподіл еритроцитів за стійкістю зручно зображувати графічно диференційними чи інтегральними кривими гемолізу, що відповідають розподілу еритроцитів в популяції за швидкістю гемолізу та зміні кількості гемолізованих еритроцитів з часом (рис. 2.8 та рис. 2.9) [7].

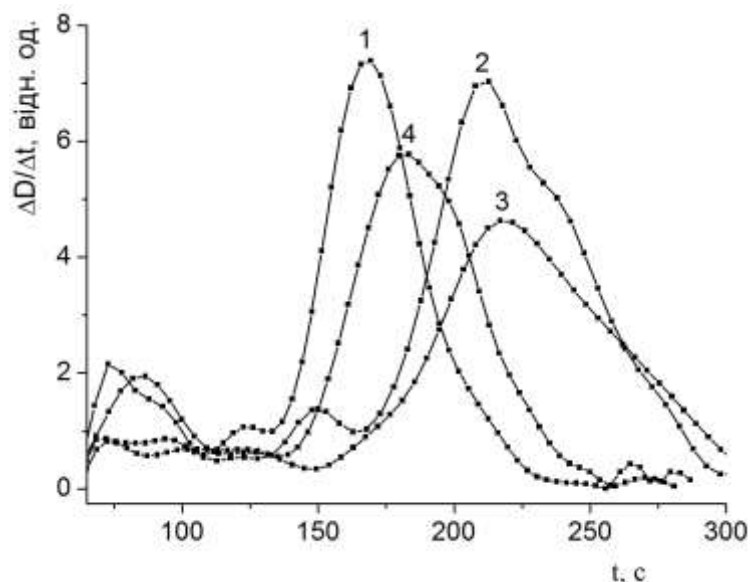


Рис. 2.8 Диференційна еритрограма [7]

Використовується для аналізу розподілу еритроцитів за стійкістю їх плазматичних мембран до кислотного гемолізу: 1 – контрольна група; 2–4 – хворі на ІХС.

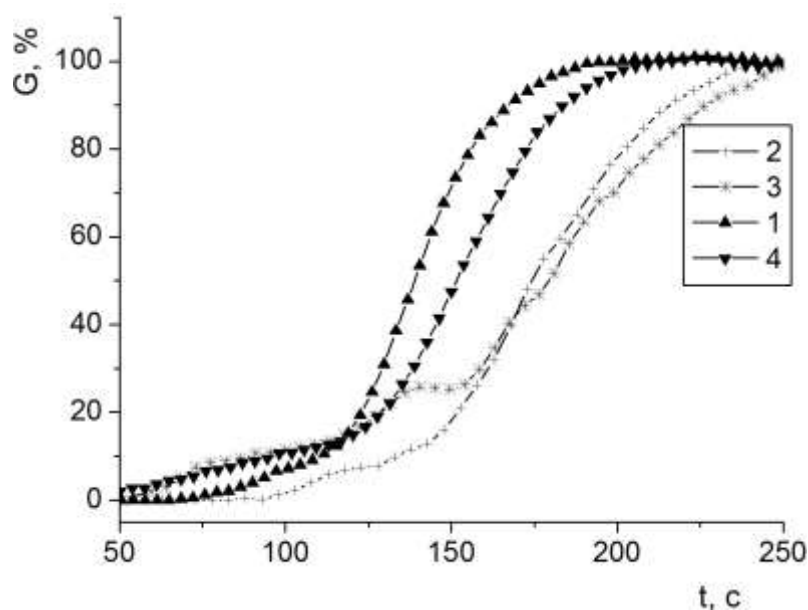


Рис. 2.9 Інтегральна еритрограма – залежність відсотка гемолізованих клітин від часу: 1 – контрольна група; 2–4 – хворі на ІХС [7].

Аналіз еритрограм здорових людей показав, що розподіл еритроцитів за стійкістю у здорового донора досить постійний. При дотриманні зазначених умов гемолізу максимум настає через 3,5 хвилини, початок



гемолізу – на 1,5–2 хвилині, закінчення гемолізу – на 7–7,5 хвилині. Крива розподілу асиметрична (рис. 2.8).

При порушеннях рівноваги в системі крові виникають відхилення від норми в розподілі еритроцитів за стійкістю. Приклади таких патологічних відхилень наведено на рис. 2.8 та 2.9. Якщо диференційна еритрограма зміщується вправо – збільшується кількість еритроцитів, що належать до груп підвищеної стійкості; навпаки, коли диференційна еритрограма зміщується вліво – переважають еритроцити зниженої стійкості.

За кінетичними кривими зміни оптичної густини суспензії еритроцитів будували диференціальну і інтегральну криві гемолізу [2,3,7] та визначали стандартний набір параметрів кислотної резистентності еритроцитів. Розрахунок частки еритроцитів ( $G$ , %), що розпалися за проміжок часу  $t$ , проводили за формулою:

$$G = \frac{D_i - D_{i-1}}{D_0 - D_\infty} \cdot 100\% \quad (2.19)$$

де  $D$  – оптична густина,  $D_0$  і  $D_\infty$  – її початкові й кінцеві значення,  $i$  – порядковий номер вимірювання.

Звичайний аналіз кислотних еритрограм проводився за такими показниками: тривалість гемолізу, пік гемолізу, ширина інтервалу гемолізу домінуючої групи еритроцитів у популяції. Для отримання більш детальної інформації щодо розподілу еритроцитів за стійкістю до гемолітичної дії HCl ту частину диференційної еритрограми, яка відповідає власне гемолізу клітин, представляли у вигляді суми трьох гауссових кривих, підбираючи параметри нормальних розподілів так, щоб збігалися площі під експериментальною та апроксимуючою кривою (рис. 2.10). Положення максимумів гауссових кривих використовували для визначення часу досягнення максимальної швидкості гемолізу в різних груп стійкості еритроцитів, площа під кривою дозволяла знаходити кількість еритроцитів

у кожній групі стійкості.

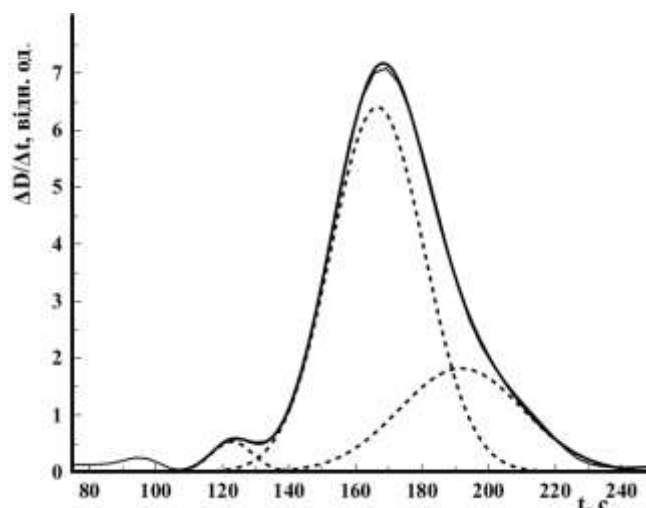


Рис. 2.10 Деконволюція типової диференційної еритрограми.

Суцільна лінія – експериментальні дані, пунктир – апроксимація для виділення популяцій різних груп стійкості еритроцитів [7].

#### 2.6.4 Вплив антимікробного пептиду граміцидину S на морфологічні та електрофізичні характеристики еритроцитів

Вимірювання потенціалу пробою мембран еритроцитів та розподілу клітин за об'ємом проводили на проточному електроцитоаналізаторі ЕЦА-02, модель К («Еко-тест», Харків, Україна) методом спектроскопії імпульсів опору, заснованим на вимірюванні зміни величини електричного струму, що протікає між двома платиновими електродами, який виникає при проходженні клітини через отвір датчика, що розділяє електроди.

Прилад реалізує програмний аналіз форми та кількості імпульсів опору суспензії клітин, які за допомогою принципу гідравлічного фокусування проходять в один ряд крізь отвір резистивного датчика діаметром від 50 до 150 мкм залежно від типу аналізованих клітин. Принцип дії устаткування відповідає проточній цитометрії з використанням приладів Культера. Система мікрофлюїдики, електронна

частина (ЦАП та АЦП), комп'ютерне програмне забезпечення приладу ЕЦА-02 пройшли метрологічну атестацію та випробування й дозволені до використання в наукових дослідженнях. Калібровку каналів приладу для визначення об'єму еритроцитів виконано за допомогою пластикових мікросфер діаметром (1–15) мкм (The Invitrogen Flow Cytometry Size Calibration Kit), за протоколом виробника – ThermoFisher Scientific, США (рис. 2.11)

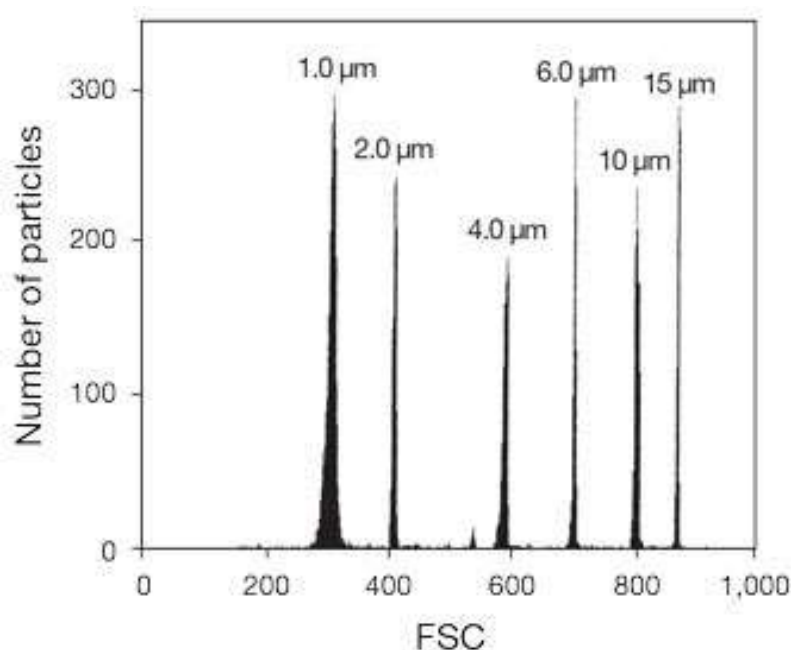


Рис. 2.11 Аналіз гістограми інтенсивності розсіювання вперед (FSC) від шести зразків полістирольних мікросфер, що надаються в комплекті для калібрування розміру проточної цитометрії Invitrogen Flow Cytometry Size Calibration Kit. Вісь абсцис – логарифм значень каналу.

Співвідношення між об'ємом клітини й зміною електричного струму при проходженні клітини крізь отвір датчика має вигляд:

$$\frac{\Delta I}{I} = -\gamma \frac{V_{кл}}{kV_{д} - V_{кл}} \quad (2.20),$$

де  $V_{кл}$  – об'єм клітини;  $V_{д}$  – ефективний об'єм датчика;  $I$  – сила струму, що проходить крізь датчик;  $\Delta I$  – амплітуда зміни струму при проходженні клітини через датчик;  $\gamma$  – фактор форми ( $\gamma=1,5$  для сфери,  $\gamma=1,2$  для

дискоцитів), параметр  $k$  є функцією від  $\omega$  – відношення питомого електричного опору суспендованих частинок до питомого електричного опору середовища, яке розраховується за формулою:

$$k = 1 + \frac{\gamma}{\varpi - 1} \quad (2.21)$$

для не провідних частинок ( $\omega \gg 1$ ),  $k$  сягає 1 [8].

Реєструючи силу струму, що проходить крізь датчик, можливо вимірювати об'єм клітин, а також їх кількість, яка буде дорівнювати сумі імпульсів струму за фіксований проміжок часу.

Цитоаналізатор ЕЦА-02 складається з електричної та гідравлічної системи мікрофлюїдики, осцилографа для контролю за станом датчика та зразка, ЕОМ – для зберігання та обробки результатів. Гідравлічна система мікрофлюїдики необхідна для утворення та підтримки потоку зразка крізь датчик (рис. 2.12).

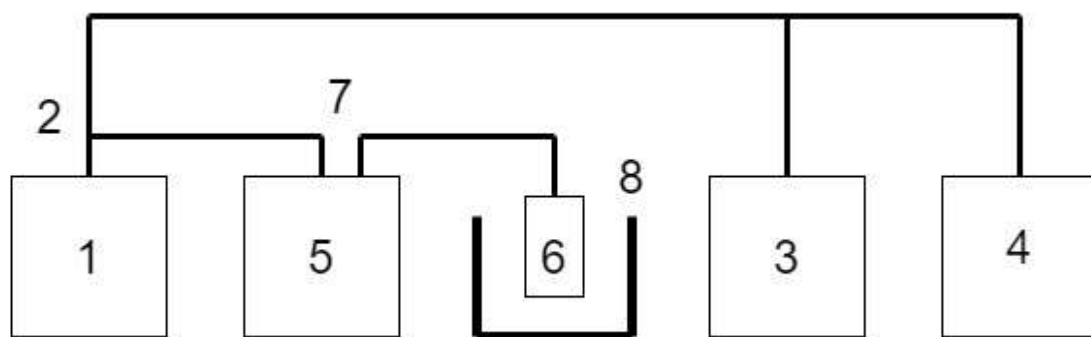


Рис. 2.12 Схематичне зображення системи мікрофлюїдики цитоаналізатора ЕЦА-02

До складу гідросистеми мікрофлюїдики (рис. 2.12) входять: 1–шприц, служить для створення розрядження в гідросистемі, унаслідок чого виникає потік рідини із кювети (8) із суспензією клітин що проходить крізь датчик (6) та по трубці (7) потрапляє до відстійника (5); через трійник (2) шприц (1) поєднується з манометром (3) та щупцером для скидання тиску

(4). Манометр показує розрідженість або надлишок тиску в системі й дозволяє, маніпулюючи шприцом, підтримувати однорідність току рідини. Штуцер служить для зв'язку гідросистеми з атмосферою, що необхідно для повернення шприца до початкового стану без зміни напрямку току рідини.

Однією з головних умов проведення достовірних вимірів є підтримка належного стану датчика. Під час проведення вимірів можливе засмічення отвору датчика або налипання на його стінках еритроцитів чи фрагментів їх мембран. Для усунення такого роду ускладнень можна на короткий термін змінювати струм та напрям руху рідини за допомогою шприца. Після проведення вимірів частину гідросистеми, що вступала в контакт з досліджуваною суспензією слід промити у великій кількості дистильованої води та просушити стисненим повітрям, це необхідно для запобігання забруднення датчика та трубок, а також для виключення хибних результатів.

Електрична схема цитоаналізатора ЕЦА-02 складається з вимірювального аналогового блока, вимірювального цифрового блока та стабілізатора напруги (рис. 2.13).

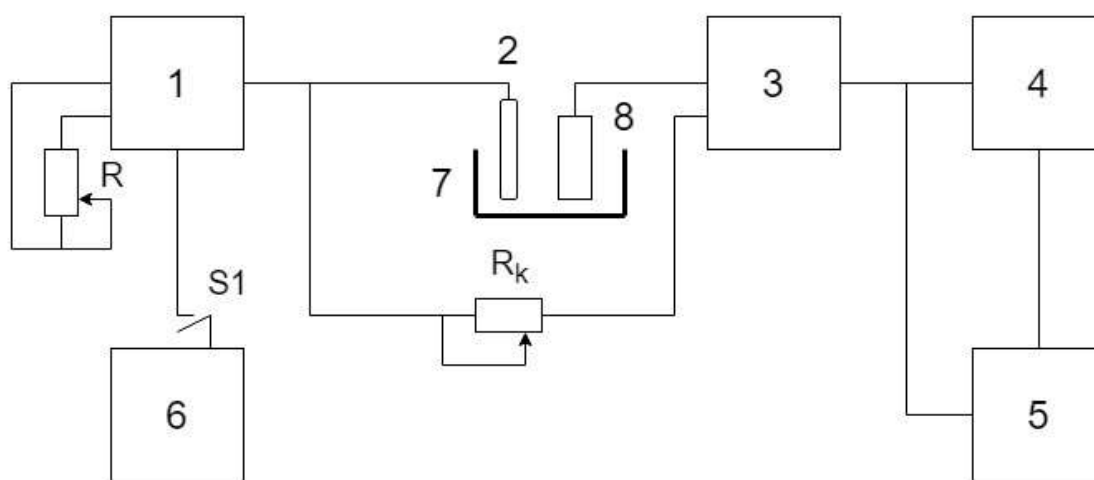


Рис. 2.13 Блок-схема вимірювального аналогового блока цитоаналізатора ЕЦА-02

Основу цитоаналізатора ЕЦА-2 складає вимірювальний аналоговий блок, саме він реєструє наявність клітин та проводить виміри. Він складається (рисунок 2.13) з регульованого джерела постійної напруги (1), електродів (2) та (8), підсилювального блоку 3, компаратора та схеми керування (4), пікового детектора (5) та генератора синусових коливань (6), компенсаційного резистора  $R_k$  та установчого резистора  $R$ . Регульоване джерело постійної напруги, служить для подачі постійної напруги в діапазоні від 0 В до +60 В на електрод, розміщений з одного боку вимірювального отвору. Керування джерелом постійної напруги здійснюється за допомогою резистора, який встановлює струм у ланцюзі між електродами та. Діапазон струмів перебуває в межах від 0 до 1 мА (1000 мкА) і залежить від характеристик датчика й використовуваного електроліту.

За допомогою перемикача  $S1$  до джерела постійної напруги підключається генератор синусоїдальних коливань з частотою 2 кГц, унаслідок чого на електрод подається як постійна, так і змінна напруга. Вихідна напруга – джерело постійної напруги – крім електрода, подається також на компенсаційний резистор  $R_k$  що служить для вирівнювання опору  $R_k$  й опору кола між електродами. Підсилювальний блок, на який подаються сигнали з ланцюга електродів і з ланцюга компенсації, служить для компенсації постійної складової струму, виділення змінної складової та її посилення. Після посилення імпульси струму подаються на схему прив'язки рівня, яка встановлює початкові рівні імпульсів поблизу нульового рівня. Крім того, схема виробляє також сигнали  $V3$  і  $V4$ , які обробляються вимірювальним цифровим блоком і служать для розрахунку та індикації струму ланцюга датчика. Посилені імпульси струму з блоку надходять на компаратор. Який служать для управління скиданням пікового детектора, і синхронізацією циклів вимірювання. На кожен імпульс струму компаратор виробляє прямокутний імпульс по передньому

й задньому фронту імпульсу струму. Задній фронт імпульсу компаратора служить для синхронізації роботи вимірювального цифрового блоку й формування імпульсу скидання пікового детектора після зчитування сигналу пікового детектора аналогово-цифровим перетворювачем.

#### 2.6.5 Визначення потенціалу пробною мембрани

Послідовність сигналів, отриманих від вимірювального аналогового блоку, потрапляє на ЕОМ із встановленим вимірювальним цифровим блоком і відповідною програмою. На комп'ютері відображається струм виміру та значення потенціалів на електродах. Програма, отримуючи імпульси від цитоаналізатора, фіксує їх амплітуду та час, будує гістограму розподілення клітин за об'ємом. Оскільки електричний струм викликає зміни в мембранах еритроцитів, то й об'ємний розподіл клітин залежить від нього, для того щоб результати вимірів можна було порівнювати, значення струму завжди були однаковими. За замовчуванням програма автоматично розраховувала середнє, модове, та медіанне значення об'єму еритроцитів, а також їх концентрацію, ширину розподілу та час проходження клітин через датчик. Для отримання величини струму пробною знімалась залежність об'ємного розподілення еритроцитів від струму між електродами. За поступового збільшення струму зростали значення об'єму еритроцитів, причому залежність мала лінійний характер як до, так і після пробною, але при його досягненні відносна зміна об'єму від збільшення току не була суттєвою, тому струм пробною визначали за зламом залежності об'ємів від струму між електродами.

Стабільність мембран в електричному полі зазвичай характеризують напругою пробною. Відомо, що напруга пробною бішарових ліпідних мембран (БЛМ) залежить від природи мембрани, складу й концентрації електроліту. Відзначаємо також, що стабільність БЛМ залежить від тривалості впливу електричного поля.

Для більш детального дослідження впливу граміцидину S на

еритроцити також проводилося дослідження кривих гемолізу після інкубації. Виміри проводилися на фотоелектроколориметричному приладі ФА-01 розробленому та виготовленому у ІПКіК НАН України.

Принцип методу фотоелектроколориметричного дослідження фізичних властивостей клітин крові полягає в динамічній реєстрації зміни оптичної щільності суспензії відмитих еритроцитів. Обраний діапазон довжин хвиль (920 нм) для фотоелектроколориметричних досліджень повністю виключає ефекти поглинання світла суспензією досліджуваних клітин, вимірювання базуються тільки на здатності клітин розсіювати світло на їх сферичних поверхнях. Зміна оптичних властивостей досліджуваної суспензії еритроцитів в процесі гемолізу відбувається за рахунок зменшення загальної розсіювальної площі поверхні клітин, унаслідок руйнування плазматичних мембран клітин. Оптичне пропускання зразка в обраному діапазоні довжин хвиль прямо пропорційне концентрації клітин, а швидкість зменшення величини оптичного пропускання, яка вимірюється в експерименті, пропорційна швидкості гемолізу еритроцитів. У заданому діапазоні довжин хвиль величина оптичного пропускання суспензії еритроцитів, які повністю прогеомолізували, дорівнює нулю. Швидкість гемолізу еритроцитів визначається як тангенс кута нахилу залежності величини оптичного пропускання від часу [3, 7, 14, 48].

Двоканальний формометер-агрегометер (рисунок 2.14) передбачає можливість здійснення вимірювань на довжинах хвиль 920 нм (оцінка ефекту світлорозсіювання клітинною поверхнею) та 540 нм (поглинання світла макромолекулами гемоглобіну, які потрапляють в розчин із клітин в результаті гемолізу). Здійснення вимірювань інтенсивності світлопропускання суспензії досліджуваних клітин на довжині хвилі 920 нм дає можливість розрахувати величину швидкості гемолітичного процесу та флуктуації інтенсивності світлового потоку, що пройшов крізь досліджуваний зразок. Амплітуда флуктуацій інтенсивності світлового



поток дає інформацію про форму клітин. Вимірювання інтенсивності поглинання суспензії досліджуваних клітин на довжині хвилі 540 нм дає характеристику гемолітичного процесу, який супроводжується збільшенням концентрації макромолекул вільного гемоглобіну, що потрапляють в розчин з еритроцитів у результаті руйнування плазматичної мембрани клітин.

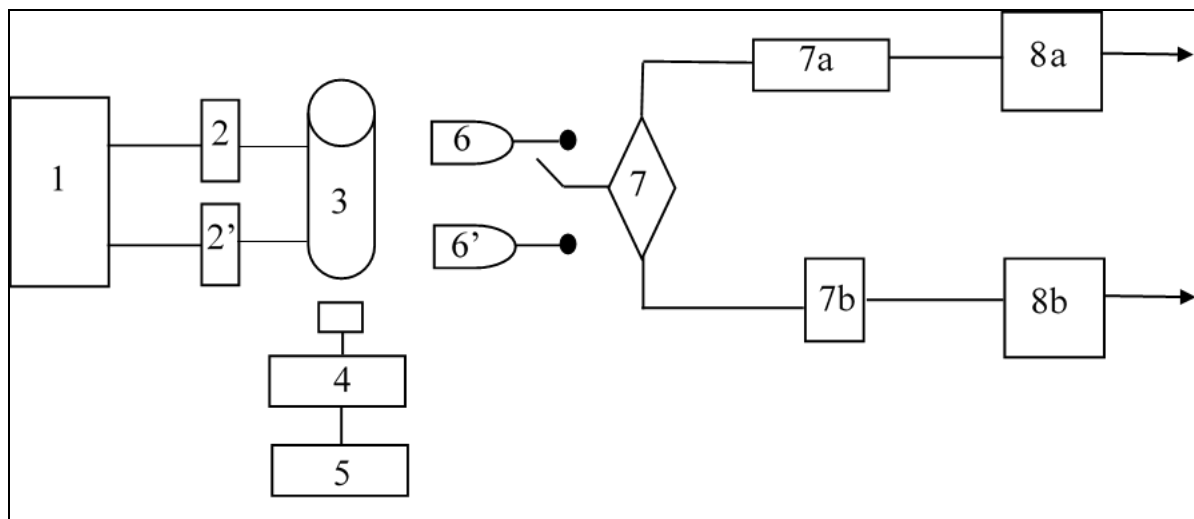


Рисунок 2.14 Блок-схема агрегометра-формометра. Елементи блок-схеми: 1 – блок живлення (стабілізатор струму); 2, 2' – світлодіоди з довжинами хвиль 720 нм та 540 нм; 3 – кюветотримач, 4 – магнітна мішалка, що підтримує гомогенність суспензії клітин; 5 – блок керування частотою перемішування; 6, 6' – фотодіоди; 7 – попередній підсилювач сигналу; а – перший канал (передає сигнал, що визначає зміну оптичної щільності на ЕОМ): 7а – фільтр низьких частот; 8а – масштабний підсилювач першого каналу; б – другий канал (передає сигнал флуктуацій [індекс форми] на ЕОМ): 7б – фільтр верхніх частот; 8б – масштабний підсилювач другого каналу.

У приладі джерелом випромінювання є світлодіоди (2, 2') з довжиною хвилі 920 нм та 540 нм, відповідно. Від джерел випромінювання через кювету, яка містить досліджуваний зразок, світло потрапляє на фотодіоди з великою площею оптичної поверхні, що значно підвищує

точність вимірювань оптичного сигналу. Через систему підсилювачів сигнал від фотодіода по двох каналах потрапляє на інтегрований АЦП мікроконтролера. Мікроконтролер обробляє отримані дані у відповідності до програмного алгоритму. У режимі реального часу будуються графіки залежності оптичного пропускання від часу. Після завершення гемолізу на екран монітора виводиться готова графічна залежність оптичного пропускання від часу й основні параметри гемолітичного процесу.

Для кожного променя окремо, з довжиною хвилі 920 нм чи 540 нм, сигнал з фотодіода підсилюється системою послідовних підсилювачів, які забезпечують високу якість та, відповідно, інформативність сигналу вимірювання. Обробка сигналу здійснюється з виділенням основного оптичного сигналу та перемінної складової – флуктуації основного оптичного сигналу. Величина сигналу і з каналу 1, і з каналу 2 на аналоговому виході пропорційна інтенсивності пучка світла, який пройшов через кювету. Дані з аналогового виходу отримуємо неперервно, з інтервалом часу (10–20) мс.

Кювета для вимірювань термостатована. Підтримку температурного режиму об'єму суспензії забезпечує нагрів спіралі розжарювання. Спіраль розжарювання з величиною опору  $R=5$  Ом заживлено до джерела, роль якого виконує потужний транзистор. Регулювання температури здійснюється за допомогою основного джерела напруги та системи послідовно з'єднаних діодів. Величина напруги на діодах постійно контролюється порівнянням з величиною напруги основного джерела через підсилювач УД20, якщо напруга на діодах порівнянна з величиною напруги основного джерела, то система перебуває в стані спокою й підтримує необхідне значення температури. Якщо напруга на діодах більша за значення напруги основного джерела, то відбувається розмикання електричного ланцюга, струм не тече в ланцюзі й не потрапляє на спіраль розжарювання від джерела. Якщо напруга на діодах менша за значення напруги основного джерела, то відбувається замикання

електричного ланцюга, струм у ланцюзі потрапляє на спіраль розжарювання від джерела. У такий спосіб регулюють роботу системи термостатування.

У середину кюветного відділення інтегровано спеціально розроблений для цього приладу пристрій (перемішувач) для перемішування суспензії клітин у досліджуваному зразку. Перемішувач забезпечує рівномірний розподіл клітин крові та гемолітика у фізіологічному розчині, прискорення нагріву чи охолодження (термостатування) зразка й рівномірний розподіл температур в усьому об'ємі досліджуваного розчину. Вимірювання здійснюються в умовах перемішування клітин до та після додавання гемолітика [154].

Унаслідок вимірів отримали швидкість та максимум гемолізу еритроцитів, дані щодо форм клітин, що також є характеристикою впливу антибіотика на еритроцити.

Для встановлення динаміки впливу грамїцидину еритроцити інкубували з різними концентраціями GS упродовж заданих у таблиці 2.1 періодів часу.

Як можливий спосіб зменшення гемолітичного ефекту грамїцидину було розглянуто використання ліпосом, зв'язаних із ним. Використовували щойно виготовлені ліпосоми з діаметром 200  $\mu\text{m}$ . До них додавали розчин грамїцидину S та інкубували декілька хвилин, за які грамїцидин починав з'єднуватися з ліпідами ліпосом. Далі розчин ліпосом з грамїцидином використовували і як чистий розчин грамїцидину, і для інкубування еритроцитів.

Таблиця 2.1

Залежність часу інкубування від концентрацій грамїцидину

Концентрація грамїцидину S, $\mu\text{M}$ /л	5			10			20			40		
Час, хв	15	30	60	15	30	60	5	10	15	5	10	15

Отриманні в результаті дослідів результати пройшли статистичну обробку. Відмінність між групами контролю та групами з граміцидином було проаналізовано за допомогою t-критерія Стьюдента,  $p < 0.05$ .

Аліквоти еритромаси кожного донора інкубували з розчинами GS різної концентрації (5, 10, 20, 40 мкг/мл) протягом 15 хв при постійному обережному перемішуванні. 5 мкл зразка додавали в кювету приладу з 5 мл фізіологічного розчину, опустивши датчик в кювету, проводили забір рідини, при постійному тиску 280 атм, покроково змінюючи силу струму на 50 мкА для накопичення гістограм. Для вимірювання електричної точки пробою мембрани еритроцитів силу струму змінювали в діапазоні від 100 мкА до 950 мкА. Для накопичення даних при кожному із встановлених значень сили струму реєстрували спектри імпульсів опору 8 192 клітин.

#### 2.6.6 Мембранотропна активність циклічного олігопептиду граміцидину S щодо тромбоцитів й еритроцитів

Зв'язування GS з мембранами клітин крові оцінювали опосередковано, на підставі аналізу світлопропускання при дезагрегації та лізисі клітин. Зміна світлопропускання суспензії клітин при агрегації й дезагрегації тромбоцитів і гемолізі еритроцитів під дією граміцидину S зумовлена розсіюванням світла й залежить від коефіцієнта заломлення розсіювальних часток, форми й розміру клітин, агрегації або дезагрегації останніх. Усі розчини й речовини, використані в роботі, не мають смуг поглинання в діапазоні довжин хвиль, у якому проводився вимір світлопропускання.

Для модифікації поверхні еритроцитарної мембрани клітини попередньо інкубували в присутності нейрамінідази або трипсину. Лінійну швидкість клітин у електричному полі визначали в мікроелектрофоретичній камері за допомогою світлового мікроскопа «MicroMed XS-3330» з цифровою камерою «DCM-900 9.0 Mpixels». Електрофоретичну швидкість та дзета-потенціал еритроцитів

розраховували за формулою Смолуховського [34].

Для індукування гіпотонічного шоку тромбоцитів ми використовували додавання деіонізованої води до ЗТП у співвідношенні ЗТП : (деіонізована вода+БТП) = 1:1 для того, щоб концентрація тромбоцитів зберігалася постійною в усіх експериментах. При цьому частка деіонізованої води варіювалася від 0 до 0,5.

Для модифікації в'язкості ліпідного бішару використовували  $\alpha$ -токоферол (розчин у гексані (50 мкг/мл), який додавали 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 кислоти й 12 мкМ солі Мора, те саме відбувалося при активації неферментативного ПОЛ у мембранах еритроцитів [16, 17]. Вміст білка в суспензіях клітин визначали біуретовим методом. Активність процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у мембрані тромбоцитів визначали за рівнем базального й індукованого малонового діальдегіду (МДА) спектрофотометричним методом. Вміст в еритроцитах вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ТБК-активних продуктів) аналізували за реакцією з тіобарбітуровою кислотою.

Вміст холестерину та ліпідний склад мембран еритроцитів здорових донорів та хворих на серцево-судинні патології вивчали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі з використанням пластин "Silufol-UV 254" (Чеська республіка). Ліпіди екстрагували в суміші хлороформ–метанол у співвідношенні 1:2, розділяли на класи в системі розчинників: n-гексан – діетиловий ефір – крижана оцтова кислота у співвідношенні (80:20:2), фосфоліпіди, – відповідно, у системі хлороформ – метанол – бідистильована вода у співвідношенні 65:24:4. Пластини фарбували парами йоду та фосфорномолібденовою кислотою; сканували у відбитому світлі шляхом денситометрії на денситометрі «БІАН – 170». Ідентифікацію якісного складу фракцій нейтральних ліпідів і фосфоліпідів проводили за допомогою стандартів («Sigma», США) [16]. Визначали

фракції холестерину (ХС), неетерифікованих жирних кислот (НЕЖК), тригліцеридів (ТГ), ефірів ХС (ЕХС); а також фосфоліпідів – лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), сфінгомієліну (СМ), фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилетаноламіну (ФЕ).

Енергії активації процесів дезагрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів під дією GS розраховували з рівняння Ареніуса, вивчаючи температурну залежність швидкостей відповідних реакцій.

Зразки ЗТП у скляних контейнерах опромінювали (у дозах 10 Гр, 20 Гр, 50 Гр, 100 Гр, 250 Гр) на гамма-гарматі закритого типу "Исследователь". Потужність випроміненої дози гамма-променів  $^{60}\text{Co}$  в активній зоні становила 500 Р/хв. [17, 18, 19].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням стандартних пакетів прикладних програм Microsoft Excel, Microcal Origin. Розраховували середні значення варіант у групі з 4–7 індивідів та середньоквадратичні відхилення. Для представлення результатів використовували  $M$  – середнє значення ознаки,  $s$  – середньоквадратичне відхилення, характеристику вибірки представляли в форматі  $M \pm s$ . Для аналізу виду розподілу даних використовували критерій Шапіро-Уїлка. Перевірку статистичних гіпотез у групах проводили залежно від виду розподілу з використанням параметричних ( $t$  – критерій Стьюдента,  $F$  – критерій Фішера) та непараметричних ( $U$  – критерій Манна-Уїтні) критеріїв. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## Висновки до розділу 2

Для визначення біофізичних характеристик взаємодії мембраноактивних пептидів з модельними та природними мембранами використано низку експериментальних підходів, зокрема флуоресцентну спектроскопію, НВЧ-дієлетрометрію, турбідиметрію, мікрофлюїдику, гель-електрофорез, реєстрацію струмів поодиноких іонних каналів, вбудованих у бішарові ліпідні мембрани. Зазначені

експериментальні методи є неінвазивними та не впливають неконтрольовано на досліджувані взаємодії пептидів з мембранами.

Метод мікрохвильової діелектрометрії використано для вимірювання діелектричних параметрів водних суспензій ліпосом. На підставі вимірювань комплексної діелектричної проникності на частоті 9,2 ГГц (у діапазоні дисперсії об'ємної води) можна оцінити гідратацію ліпідних везикул. Показано, що величину гідратації, розраховану з декременту статичної діелектричної проникності, може бути використано для моніторингу взаємодії ліпосом з антимікробним пептидом та відстеження вивільнення лікарського засобу з наноносіїв. Перерозподіл вільної та зв'язаної води в суспензії ліпосом при зв'язуванні та дисоціації малих молекул з ліпідними мембранами нанорозмірних сферичних частинок можна відстежувати за змінами діелектричних параметрів у діапазоні НВЧ. Ці показники також може бути використано в технологіях цілеспрямованої доставки ліків для контролю якості та моніторингу зв'язування та вивільнення лікарського засобу.

Описані методи дозволяють охарактеризувати молекулярні механізми взаємодії природних пептидів з мембранними структурами та проаналізувати структурно-функціональні зміни клітин крові та мітохондрій мозку внаслідок дії пептидів.

Наведено методики приготування модельних мембран, синтезу пептидів, виділення природних пептидів із дріжджових клітин, методик виділення тромбоцитів та еритроцитів, а також модифікації структурно-динамічних характеристик природних мембран зовнішніми фізичними чинниками – гамма-опроміненням, температурою, та факторами, що контролюють окислювальний стан ліпідів.

Відзначено способи модифікації щільності пакування ліпідів, поверхневого заряду та кривизни модельних мембран шляхом допування холестеролом, зміною ліпідного складу, утворенням сферичних ліпосом чи

мультишарів для виявлення можливості керування мембранотропними ефектами досліджуваних пептидів.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [4], [5], [6], [7], [8], [10], [12], [13], [16], [17], [18], [19], [20], [21], [23], [31], [34], [41].



## РОЗДІЛ 3

### ДОСЛІДЖЕННЯ БІОФІЗИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА НАСЛІДКІВ МОДИФІКАЦІЇ МЕМБАРНОАКТИВНИХ ПЕПТИДІВ, ЗДАТНИХ УТВОРЮВАТИ ІОННІ КАНАЛИ В ПРИРОДНИХ ТА МОДЕЛЬНИХ МЕМБРАНАХ

#### 3.1 Вплив ковалентної модифікації та колокалізації з мембранним білком на функціональну активність рекомбінантного поліпептиду Gef1

Хлоридні канали широко представлені в прокаріотичних та еукаріотичних клітинах і належать до кількох сімейств білків. Вони відіграють ключову роль в основних функціях клітини та тканин, таких як регулювання клітинного об'єму та збудливості, підкислення внутрішньоклітинних органел та трансепітеліальний транспорт [11, 12, 156–158].

Більшість досліджень проведено на потенціал залежних Cl<sup>-</sup> каналах ссавців. Виявлено дев'ять генів сімейства CLC ссавців. Мутації деяких з них пов'язані з генетичними захворюваннями (наприклад, міотонія для ClC-1, хвороба Дента для ClC-5, остеопетроз для ClC-7) [156, 157, 159, 160]. Експресія генів, що кодують ці канали, є тканиноспецифічною (ClC-1, ClC-5) або дуже широкою (ClC-2). На клітинному рівні CLC-канали наявні в плазматичній мембрані (ClC-1), у внутрішньоклітинних органелах (наприклад, ClC-5, ClC-7) [157] або мають понад одну локалізацію (наприклад, ClC-2) [161]. Функції деяких каналів CLC дуже добре охарактеризовано, але біологічна роль багатьох інших залишається невідомою [157, 162].

У дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* єдиний передбачуваний гомолог хлоридного каналу ClC кодується геном GEF1 [163]. Білок Gef1, імовірно, локалізований у медіальному відділенні апарату Гольджі, і його

роль до кінця не вивчено [164]. Літературні дані свідчать про те, що він відіграє роль у гомеостазі везикулярних катіонів. Мутанти дріжджів *gef1* демонструють дефект метаболізму заліза: вони ростуть дуже повільно на середовищах з низьким вмістом заліза. Передбачається, що *Gef1p* бере участь у підкисленні апарату Гольджі, але зв'язок між транспортом аніонів та катіонним гомеостазом залишається незрозумілим [163–165]. Виведено амінокислотну послідовність *Gef1p*, найтісніше пов'язану з підсімейством внутрішньоклітинних ClC-каналів (ClC -3, -4 та -5) [157, 162], що узгоджується з його локалізацією у апараті Гольджі. Усі вищевказані канали були віднесені до сімейства CLC лише на основі їх амінокислотної послідовності без експериментальних доказів щодо функції хлоридного каналу. Деякі дефекти росту, виявлені у нокаутів *gef1*, компенсуються каналом ClC-0 з *Torpedo marmorata* [165]. Наведені вище результати свідчать про те, що білок дріжджів *Gef1p* може бути хлоридним каналом, але до цього часу не проводилися прямі електрофізіологічні вимірювання його здатності до формування іонних каналів у мембранах.

У дисертації з'ясовано, що *Gef1p* є хлоридним каналом. Ми використовували спосіб включення збагачених *Gef1p* мікросом до модельного плаского ліпідного бішару (БЛМ). У мікросомальних фракціях штаму з підвищеним (у порівнянні з диким типом) рівнем *Gef1p* ми зареєстрували електричну активність, характерну для поодиноких аніоноселективних Cl<sup>-</sup> мембранних каналів. У штама, позбавленого *Gef1p* ( $\Delta$ *gef1*), така активність не була зареєстрована.

### 3.1.1 Внутрішньоклітинна локалізація химерного білка *Gef1* та його біофізичні характеристики

Для визначення локалізації поліпептидного *Gef1p* використовували клітинне фракціонування та імуноблот аналіз. Клітини дріжджів сферулізовали та гомогенізували [166, 167]. Мікросомальну фракцію для БЛМ експерименту, було отримано після осадження фракції органел

центрифугуванням при 35000 g протягом 20 хвилин та подальшого поділу цитозольної та мікросомальної фракцій шляхом ультрацентрифугування при 105,000 g протягом 1 години. До всіх буферів додавали інгібітор протеази Coctail Complete (Рош) та 0,1 mM PMSF (фенілметилсульфонілфторид), і всю процедуру проводили при 0–4 °C. Мікросоми було отримано з трьох незалежних культур. Для візуалізації химерних білків, мічених GFP та мус, для вестерн-блоту зразки білків розділяли гелі-електрофорезом (SDS–PAGE) з подальшим промоканням на Hybond-C extra та зондували поліклональними анти-GFP антитілами (Living Colors, Clontech) або анти-мус моноклональними антитілами (Інвітроген). Антиферохелатазні антитіла були від Дж.-М. Камадро, Інститут Дж. Моно, Університет Парижа VII.

Було показано, що ковалентна модифікація досліджуваного поліпептиду його С-кінцевим злиттям із зеленим флуоресцентним білком - Gef1-GFP не веде до зміни функції білка, кон'югат є фізіологічно настільки ж ефективним, як і нативний білок Gef1, він повністю відновлює дефекти росту штамів дріжджів з делецією  $\Delta$ gef1. Для підвищення рівня Gef1p у клітині ми замінили вихідний промотор GEF1 на регуляторний MET25. Отримана плазмідна рKF19, що кодує С-кінцевий кон'югат GEF1-GFP під промотором MET25, також відновлювала дефекти росту штаму  $\Delta$ gef1.

Розрахована за генетичним кодом молекулярна маса химерного білка Gef1–GFP становить 115 000 кДа, але він мігрує у 7% SDS–PAGE (рис. 3.1) у вигляді двох смуг: більшої з рухливістю, що відповідає приблизно 80 000 кДа, та меншої, що відповідає ~115 000 кДа. Оскільки підготовка мікросом проводилася в присутності інгібіторів протеаз (див. Розд. 2), ми відносимо цю нерегулярну міграцію на рахунок специфічного протеолізу невідомої природи. Більш того, окремі препарати давали таку саму картину, навіть коли ми вводили ту саму плазмідну до дріжджового штаму без протеаз VJ2168 [168] (не показано).

На рис. 3.1 показано порівняння кількості білка Gef1-GFP, отриманого від різних промоторів GEF1 та MET25 з використанням гелелектрофорезу імуноблотингу та виконуючи кількісне визначення інтенсивності смуги. Беручи до уваги кількість копій плазміди, ми оцінюємо, що кількість білка Gef1, виробленого в клітинах, що несуть плазмиду рKF19, приблизно у 200 разів перевищує кількість, вироблену в клітинах дикого типу.

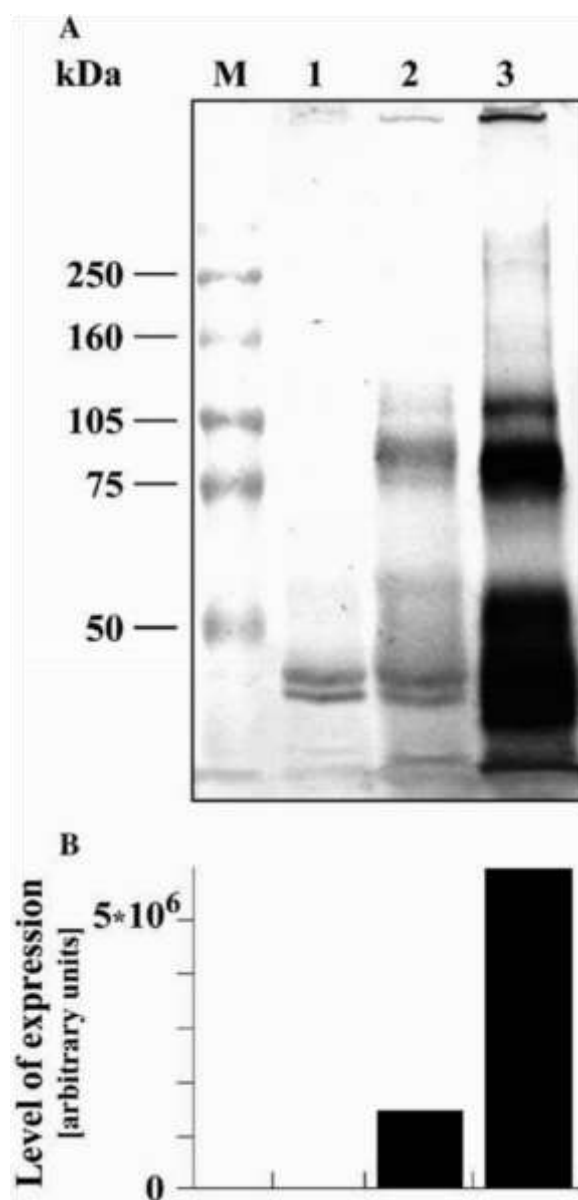


Рис. 3.1 Визначення кількості та молекулярної маси білка Gef1-GFP, отриманого з різними промоторами за результатами гелелектрофорезу:

(A) Лізати цілих клітин аналізували за допомогою 7% SDS–PAGE, переносили на Hybond-C extra і фарбували антитілами проти GFP; аналізували однакову кількість клітин. Смужка 1: контрольний штам RGY84, позбавлений гена GEF1; смужка 2: той самий штам, трансформований за допомогою багатокопійної плазміди pRG151, що несе кон'югат GEF1–GFP від промотора GEF1; смужка 3: той самий штам, трансформований центромерною плазмідною pKF19, що несе поліпептидний кон'югат GEF1–GFP від промотора MET25.

(B) Порівняння кількості злитого білка Gef1–GFP у зразках, проаналізованих на смужках 2 та 3, оцінене за допомогою блот-сканування та кількісного визначення інтенсивності смуг із програмним забезпеченням для аналізу денситометрії ImageQuant версії 5.0.

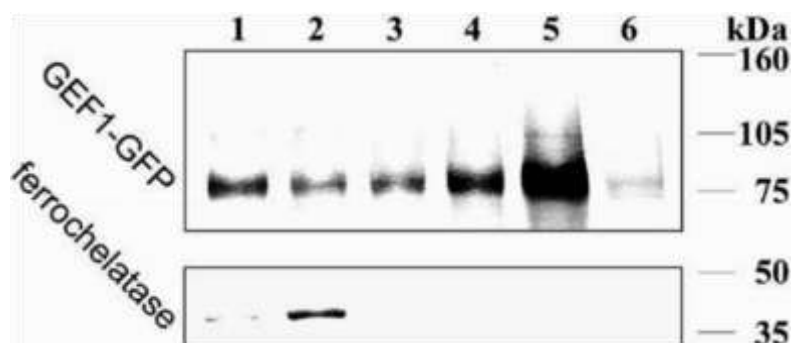


Рис. 3.2 Визначення внутрішньоклітинної локалізації білка Gef1–GFP за допомогою імуноблотингу.

Клітинні фракції штаму KFY19 аналізували гель-електрофорезом (SDS–PAGE): Верхня панель: 7% гель, доріжки 1–5 представляють клітинні фракції, що осідають при центрифугуванні з 4000 g, 12 000 g, 20 000 g, 40 000 g та 105 000 g відповідно, доріжка 6 є фракцією цитозолу (надосадовою рідиною 105 000 g). Завантажували однакові кількості білка кожної фракції. Нижня панель: 10% гель, ті ж зразки досліджували з антитілом до ферохелатази *S. cerevisiae*.

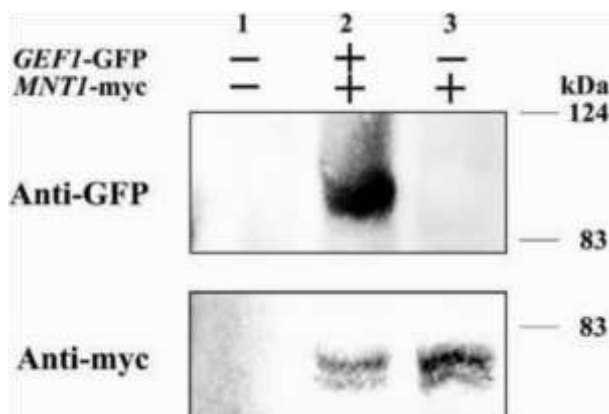


Рис. 3.3 Вплив колокалізації *Gef1p* з маркерним білком апарату Гольджі.

Мікросомальні фракції, що осідають між 35000 g та 105000 g, відокремлювали SDS-PAGE з 4–12% градієнтом та мітили анти-GFP та анти-мус антитілами. Доріжка 1: RGY84, доріжка 2: RGY84, трансформована рKF19 та рSMM-414, доріжка 3: RGY84, трансформована рSMM-414.

Для подальших досліджень ми вивчали розподіл ковалентно модифікованого білка в різних клітинних фракціях. Ми виявили імуномаркований химерний білок *Gef1-GFP* у фракціях гранул, отриманих шляхом диференційного центрифугування клітинного гомогенату при 4000 g, 12,000 g, 20,000 g, 40,000 g, 105,000 g та в цитозолі (рис. 3.2). Цей аналіз показує, що *Gef1p* здебільшого присутній у мікросомах «вагою» 105,000 g, але значна частина цього білка також може бути виявлена в осаді гранул між 20,000 і 40,000 g. Це так звана «важка мікросомальна фракція», позбавлена органел. Нижня панель на рис. 3.2 демонструє ті ж зразки, які піддавали вестерн-блот-аналізу та досліджували антидріжджовими ферохелатазними антитілами.

Ферохелатаза – білок, асоційований з внутрішньою мембраною мітохондрій, [169]. В нашому експерименті він був виявлений у осаді

гранул при 12,000 g, що відповідає мітохондріям; брак ферохелатази у мікросомальних фракціях свідчив про те, що вони не були забруднені мітохондріальним дебрисом [10,11,23]. У подальших дослідженнях субклітинні фракції, що осідають до 35,000 g, видаляли, а решту везикул збирали шляхом ультрацентрифугування при 105,000 g. Ця ж процедура була застосована до двох штамів: KFY19 (перевиробництво Gef1p) та RGY84 (позбавлене Gef1p). Для перевірки якості мікросомальних фракцій ми ввели в ці штами химерний білок Mnt1<sub>mys</sub>. Mnt1p є маркерним білком апарату Гольджі *S. cerevisiae* [170] і раніше було показано, що він колокалізується з Gef1p [164]. На рис. 3.3 видно, що білок Mnt1-<sub>mys</sub> присутній в однаковій кількості в мікросомальних фракціях 35,000–105,000 g обох штамів.

3.1.2. Поліпептид Gef1 утворює Cl<sup>-</sup>-селективні іонні канали в модельних пласких бішарових ліпідних мембранах.

Мікросоми, збагачені білком Gef1, були реконституйовані в БЛМ (див. Розділ 2), і в цих зразках ми спостерігали струми, характерні для аніоноселективного каналу (рис. 3.4). У контрольних зразках, отриманих із штаму  $\Delta$ gef1 RGY84, таких струмів не виявлено. Часову залежність струму записували у градієнті TEA–Cl 150/600 mM (цис/транс) (25 успішних експериментів) та в симетричних 600/600 mM TEACl (4 експерименти). TEACl був використаний для покращення вимірювань активності аніонних каналів, оскільки він блокує калієві канали.

На рис. 3.4А наведено кінетику струмів у БЛМ у градієнті TEA–Cl 150/600 mM при 0 мВ, для везикул, збагачених Gef1p. На рис. 3.4В показаний приклад коливань струму поодинокого каналу при п'яти додатніх і п'яти від'ємних напругах, а на рис. 3.4В наведено ВАХ для поодиноких каналів в тому ж градієнті та в симетричному розчині TEA–Cl 600/600 mM. Потенціал реверсії, виміряний для 11 експериментів, становив

від  $-20$  до  $-29$  мВ ( $24 \pm 4,7$  мВ) для градієнта TEA–Cl  $150/600$  мМ. Такий зсув свідчить, що досліджуваний канал є аніон-селективним. У симетричному розчині TEA–Cl  $600/600$  мМ канал має провідність  $42 \pm 4$  пСм ( $n=4$ ), що відповідає приблизно  $10$  пСм у симетричному  $150$  мМ розчині KCl. З гістограми на рис. 3.4D ми робимо висновок, що досліджуваний канал залишається переважно у відкритому стані.

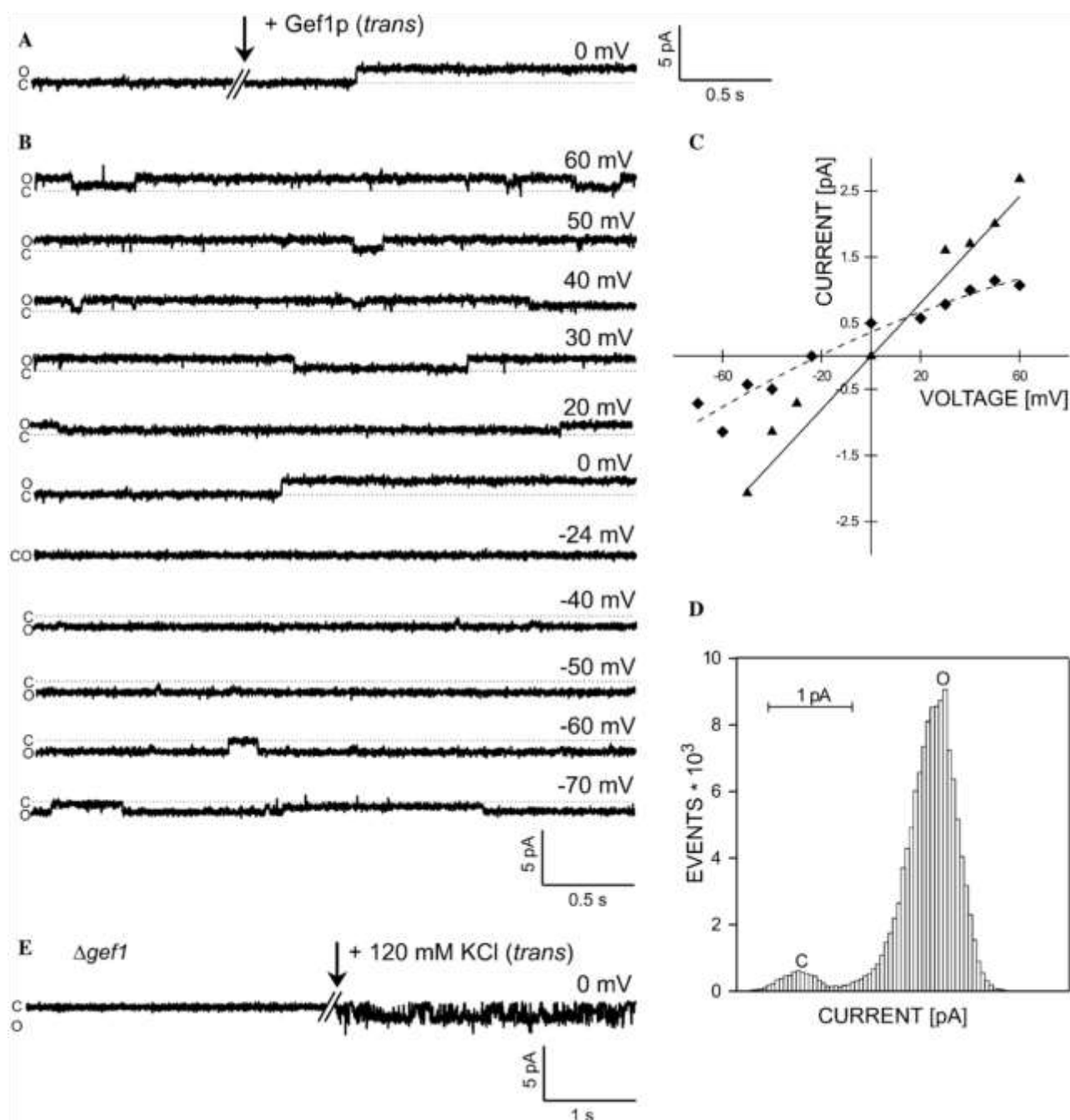


Рис. 3.4 Вивчення поодиноких іонних  $\text{Cl}^-$  каналів, утворених Gef1 в БЛМ.



(A) Записи в градієнті TEA–Cl 150/600 мМ (цис/транс) до і після додавання (стрілка) мікросом з Gef1p, при 0 мВ. (B) Записи струмів одного вбудованого пептиду при різних напругах. (C) Вольт амперні характеристики каналу у градієнті TEA–Cl 150/600 мМ (▲, пунктирн) та в симетричному розчині TEA–Cl 600/600 мМ (◆, суцільна). (D) Струмова залежність розподілу перебування каналу у закритому та відкритому стані у градієнті TEA–Cl 150/600 мМ при 0 мВ. (E) Кінетика струмів контрольного штаму Rgy84 у градієнті TEA–Cl 150/600 мМ при 0 мВ. Спочатку струм реєстрували протягом 15 хв, потім (позначено стрілкою) до транс-камери додавали 120 мМ KCl. Від’ємний напрямок уздовж вісі струму вказує на катіонний струм при 0 мВ. «С» та «О» вказують на стан закритого та відкритого каналів відповідно.

Рис. 3.4Е представляє контрольний експеримент зі зразком мікросом, виділених із штаму RGY84 з делецією гена GEF1 і, таким чином, позбавленого білка Gef1. У таких зразках не виявлено аніонселективних каналів (використано дев’ять різних мікросомальних зразків  $\Delta$ gef1). Щоб перевірити можливість вбудовування цих мікросомальних препаратів у БЛМ, додавали KCl у кінцевій концентрації 120 мМ до транс-відсіку при 0 мВ. У шести з дев’яти експериментів було спостережено відкривання катіон-селективного каналу. Ці експерименти підтвердили, що мембранні везикули, позбавлені білка Gef1, можуть успішно вбудовуватись в БЛМ, проте не спричиняють утворення аніонних струмів.

Залежність ймовірності перебування каналу у відкритому стані від мембранного потенціалу (рис. 3.5) доводить, що досліджуваний канал є потенціал-залежним і закривається при високих від’ємних трансмембранних потенціалах [12].

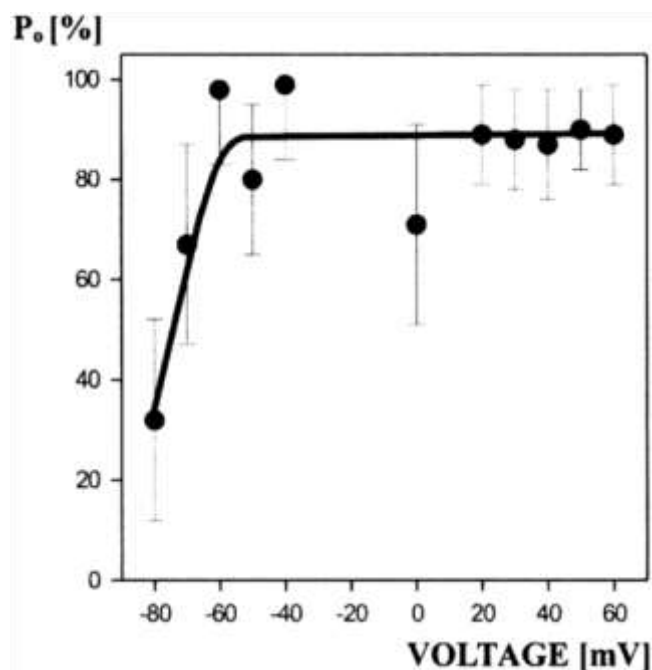


Рис. 3.5. Залежність ймовірності перебування каналу у відкритому стані ( $P_o$ ) від мембранного потенціалу.

Точками позначено середнє значення з 4–8 записів, вертикальними відрізками – стандартне відхилення

До цього часу віднесення білка Gef1 до сімейства хлоридних каналів ґрунтувалося на непрямих доказах. Ми вперше показуємо наявність Cl<sup>-</sup> каналів у збагачених Gef1 $\mu$  мікросомах. Аніонні канали були виявлені після вбудовування в БЛМ мікросом, отриманих із штаму, що містить високий рівень білка Gef1 (KFY19), струми не реєстрували в дріжджах, у яких відсутній ген GEF1 (RGY84).

Злиття мікросом з ліпідним бішаром БЛМ зазвичай спостерігалось протягом 5–20 хвилин після додавання везикул до транс-компартменту. Хоча загально визнано, що включенню везикул у бішар сприяють високі концентрації Ca<sup>2+</sup> [171], мікросоми з пептидом у нашому випадку легко вбудовуються в БЛМ без додавання Ca<sup>2+</sup> [12]. Однак часто реєстрація струмів поодиноких каналів була нетривалою, ймовірно, через велику кількість інкорпорованих пептидів, а також через наявність катіонних каналів, що дестабілізували бішар. Варто відзначити, що ми ніколи не

виявляли аніонний канал з провідністю, що відповідає мітохондріальному порину VDAC (провідність приблизно 2–4 нСм [10], що майже в 100 разів вище, ніж у нашому дослідженні). У сукупності це спостереження та брак ферохелатази у мікосомальних фракціях свідчать про те, що мікосоми не були забруднені мітохондріями [10, 11].

Коли намагалися включити везикули в розчинах KCl у цис/транс компартментах, реєстрували катіоноселективні канали з мікосомами, отриманими як із штамів KFY19, так і RGY84 (дані не показані). Наявність великих струмів катіонів заважала нам досліджувати аніонні канали в розчинах, що містять KCl [23]. Щоб мінімізувати струм  $K^+$ , ми замінили  $K^+$  на  $TEA^+$ , щоб інгібувати калієві канали, чутливі до  $TEA^+$ , і в таких умовах експерименту нам вдалося виявити та проаналізувати аніонні канали. Усі представлені експерименти проводились у розчинах, що містять іони  $TEA^+$ .

Іонну селективність вбудованого поліпептидного каналу з дріжджів до аніонів визначали за значенням потенціалу реверсії  $-24$  мВ (рис. 3.4В), близьким до зворотного потенціалу для  $Cl^-$  ( $E_{Cl^-}$ ) ( $-35$  мВ в наших умовах експерименту), що вказує на те, що канал є аніонселективним.

Було висунуто припущення, що за своєю амінокислотною послідовністю Gef1p подібний до добре вивченого потенціалзалежного хлоридного каналу ClC-0 *Torpedo marmorata* та до ClC-2 щура [163]. Аналіз ВАХ та імовірності перебування каналу у відкритому стані дає деяку інформацію про властивості досліджуваного дріжджового  $Cl^-$  каналу. У наших експериментах відкрита ймовірність зменшується для від'ємних напруг, що вказує на те, що канал активується позитивними напругами. Однак порівняння ускладнене, оскільки наш протокол підготовки везикул не дозволяє нам визначити, чи це мікосоми з природною топологією каналу в мембрані чи навиворіт. Це має особливе значення для каналів, які мають вхідне випрямлення вольт-амперної характеристики. Якби ми використовували мікосоми переважно з

нативною топологією які являли собою внутрішньоклітинні везикули, можна було б припустити, що мембрана в транс-компаратменті відповідає внутрішньоклітинному компартменту, а цис-сторона – внутрішньовезикулярному. Таким чином, досліджуваний канал поводить ся як подібно до потенціалзалежних ClC-0 або ClC-2, простежмо характер залежності функціонування каналу від трансмембранного потенціалу.

ClC-0 повністю відкривається для потенціалів вищих за  $-50$  мВ і наполовину закривається при приблизно  $-100$  мВ [172, 173], тоді як за результатами на рис. 3.5 можемо оцінити, що канал утворений Gef1 був повністю відкритий від  $-60$  до  $+60$  мВ та наполовину закритий при  $-75$  мВ. З іншого боку, гальмування струмів мікромольною концентрацією  $Zn^{2+}$  (дані не наведені) нагадує чутливість ClC-2 до  $Zn^{2+}$ .

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. Ковалентна модифікація досліджуваного пептиду шляхом його злиттям з зеленим флуоресцентним білком 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  $\Delta$ gef1.

### **3.2 Модифікація первинної послідовності пептиду з метою посилення агрегаційної спроможності**

Пріони спричиняють смертельні нейродегенеративні розлади як у тварин, так і в людей. Ці розлади, які називаються трансмісивними губчастими енцефалопатіями, є високоінфекційними. Інфекція може передаватися через видовий бар'єр. У людей такі захворювання включають хворобу Крейтцфельда-Якоба, хворобу Герстмана-Штройслера-

Шейнкера, фатальне сімейне безсоння та куру. У тварин найбільш поширеним захворюванням є губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби (коров'ячий сказ) [174, 175].

Вважається, що хвороба зумовлена перетворенням у патологічну форму ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) мембранного глікопротеїну пріонного білка  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . 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, які нерозчинні та стійкі до дії протеаз [174, 175]. Фізіологічна роль  $\text{PrP}$  до кінця не вивчена, припускають, що він виконує функцію підтримки гомеостазу іонів та окислювально-відновної рівноваги всередині клітини [175]. Актуальною задачею є встановлення, чи  $\text{PrP}$  бере участь у трансмембранному транспорті іонів. Каналоутворююча роль була постульована для  $\text{PrP}$  [176]. Фактично виявлено, що пептид, що містить послідовність  $\text{PrP}$  106–126, утворює катіонні канали в БЛМ [177].

Дослідженню конформаційного переходу від  $\text{PrP}^{\text{C}}$  до  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  часто заважають нерозчинність у воді та заразність 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  $\text{PrP}$  у підтримці гомеостазу іонів у клітині. Для цього необхідно провести дослідження властивостей пептидних фрагментів  $\text{PrP}$  та їх природних мутантів стосовно утворення іонних каналів та впливу на іонний гомеостаз у внутрішньоклітинних мембранах.

Ми дослідили утворення каналів у БЛМ пептидами, отриманими з послідовності людського  $\text{PrP}$ :  ${}_{169}\text{YSNQNNF}_{175}$  та  ${}_{170}\text{SSQNNF}_{175}$  (171N-S). Для оцінки можливих патологічних функцій пептидів також вивчався їх вплив на мембранний потенціал та частоту дихання мітохондрій гіпокампа.

### 3.2.1 Вплив первинної структури на схильність пріонних пептидів до агрегації.

Для пояснення пріон-індукованих нейродегенеративних захворювань запропоновано кілька механізмів, включаючи вплив PrP на внутрішньоклітинний гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  [178, 179]. Індукована пріонами модифікація  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу може бути результатом утворення катіонних каналів білком PrP [177]. Важливо знати, чи бере PrP участь у транспорті іонів через мембрани. Каналоутворювальну роль було виявлено для пептиду, що містить послідовність PrP 106–126. Він формує катіонні канали в бішарових ліпідних мембранах, що вказує на роль цієї частини молекули PrP у підтримці гомеостазу іонів у клітині. Кілька пептидів, отриманих з послідовності PrP між залишками 90 і 140 виявили амілоїдогенні властивості.

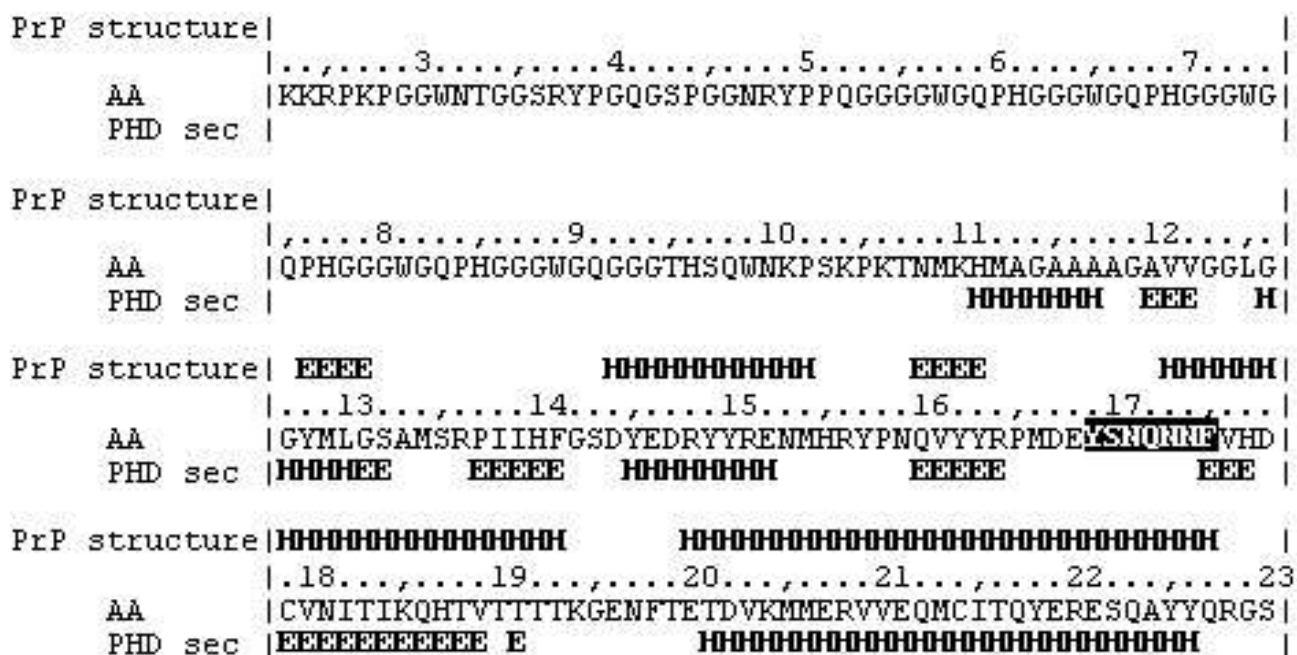


Рис. 3.6 Приклад прогнозування вторинної структури PrP методом PHD з використанням машинного навчання.

Первинну структуру наведено без сигнальних послідовностей на N- і C-кінцях. Верхній рядок – елементи вторинної структури людського

рекомбінантного PrP [180], розшифровані методом ЯМР. Нижній рядок – передбачувана структура. Досліджуваний пептид позначено чорним тлом. Н – спіраль; Е – бета-структура.

Ми вирішили перевірити властивості іншого фрагмента PrP, що містить амінокислоти 169–175 разом з пептидом, який несе природну мутацію 171N → S. Такий вибір зумовлений такими 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 двоприменезаломлення при фарбуванні Congo Red (дані не наведено).

Виконане передбачення вторинної структури за допомогою десяти різних методів вказують, що ця область молекули PrP фланкована областями з найбільшим потенціалом формування бета-структури (Рис. 3.6), що вказує на те, що цей фрагмент молекули PrP може легко трансформуватися зі спіралі до бета-структури.

Виконане передбачення вторинної структури та подвійне променезаломлення кристалів обох пептидів з Конго Червоним свідчать про утворення ними амілоїдних агрегатів, багатих бета-структурою. Оскільки інший амілоїдогенний пептид 106–126 утворює іонні канали, ми вивчили взаємодію пептидів з ліпідним бішаром за допомогою техніки БЛМ, щоб з'ясувати, чи може цей фрагмент молекули PrP впливати на гомеостаз іонів в клітині.

3.2.2 Утворення іонних каналів унаслідок агрегації пептидів у ліпідній мембрані.

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. 3.7) [13,22].

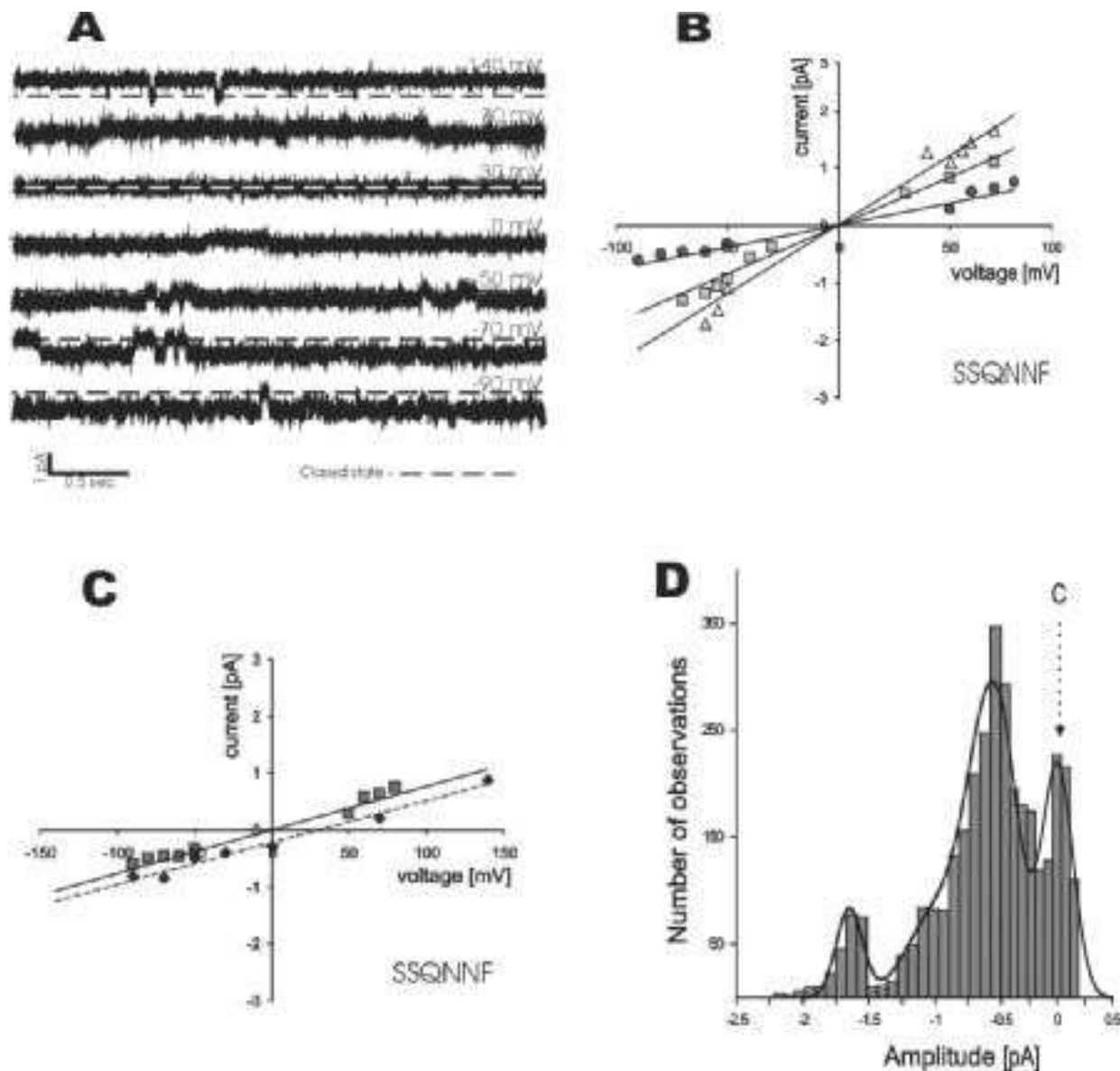


Рис. 3.7. Утворення мутантним пріонним пептидом  ${}_{170}\text{SSQNNF}_{175}$  іонних каналів в модельних ліпідних мембранах.

**A:** Кінетика струму через канал, утворений пептидом SSQNNF у БЛМ (асиметричний КСІ (100 мМ/500 мМ цис/транс) плюс 10 мМ HEPES, рН 7,0); цифри над записами струму – прикладений мембранний потенціал.



**В:** ВАХ каналів, утворених пріонним пептидом SSQNNF (симетричний розчин 500 мМ КСl, 10 мМ НЕРЕС, рН 7,0). Суцільні лінії – лінійна апроксимація даних для розрахунку провідностей поодиноких каналів: 7,6 пС (заповнені кола), 16,8 пС (квадрати), 26,1 пС (трикутники).

**С:** ВАХ каналів, утворених SSQNNF. Суцільна лінія – симетричний КСl (500 мМ цис/транс), пунктирна – градієнт КСl (100 мМ/500 мМ цис/транс) плюс 10 мМ НЕРЕС, рН 7,0.

**Д:** Амплітудна гістограма каналу, утвореного пріонним пептидом SSQNNF (симетричний розчин 500 мМ КСl, 10 мМ НЕРЕС, рН 7,0). Трансmemбранний потенціал дорівнював -70 мВ. С – вказує на базовий рівень. Суцільна лінія є сумою чотирьох функцій Гауса і була розрахована за допомогою програмного забезпечення рCLAMP 8.

Концентрація азолектину 40 мг/мл, пептиду – 4 мкг/мл.

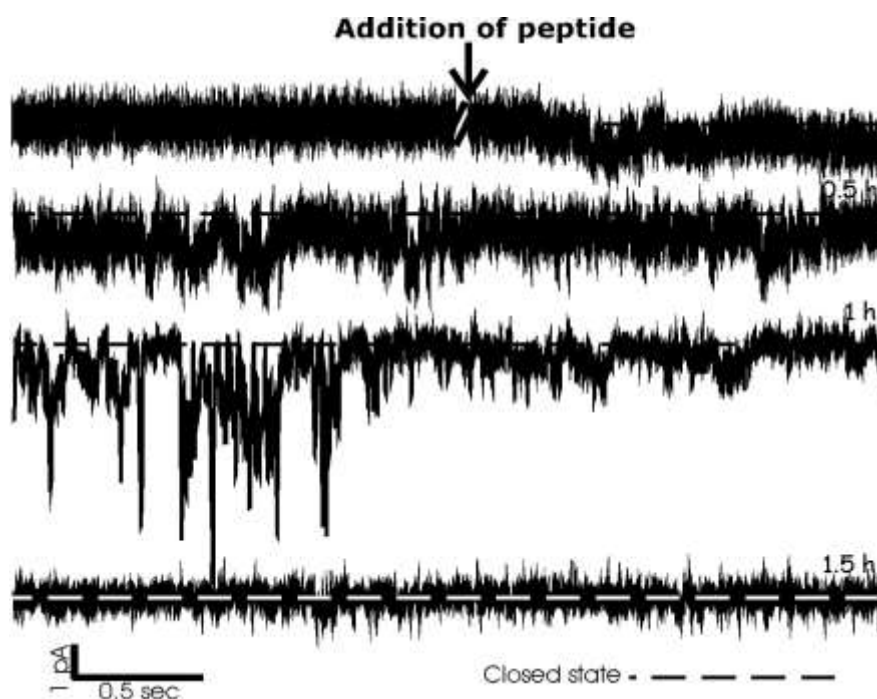


Рис. 3.8 Нативний пріонний YSNQNNF пептид не формує дискретні іонні канали в БЛМ

Кінетика струмів в БЛМ з азолектину одразу після додавання YSNQNNF та через 0.5, 1, 1.5 години. Потенціал трансmemбранний -50 мВ. Концентрація азолектину 40 мг/мл, концентрація пептиду 4 мкг/мл.

Асиметричний KCl (100 мМ/500 мМ KCl цис/транс) плюс 10 мМ HEPES, рН 7,0. Фільтрування при 100 Гц.

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 KCl цис/транс) дозволяють простежити катіонну вибірковість каналів, утворених PrP [170–175] N171S з потенціалом реверсії 30 мВ. Це близько до потенціалу реверсії для K<sup>+</sup>-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 спостерігаються для PrP [170–175] N171S (рис. 3.8).

3.2.3. Наслідки агрегації пріонних пептидів у мембранах для іонного гомеостазу клітини.

Дані літератури свідчать, що пріонні пептиди здатні індукувати апоптоз у клітинних ліній нейробластоми людини SH–SY5Y. Найпершою апоптотичною подією, що була виявлена, була деполяризація мітохондріальної мембрани, що настала одразу після обробки клітин пептидами PrP (106–126) [181].

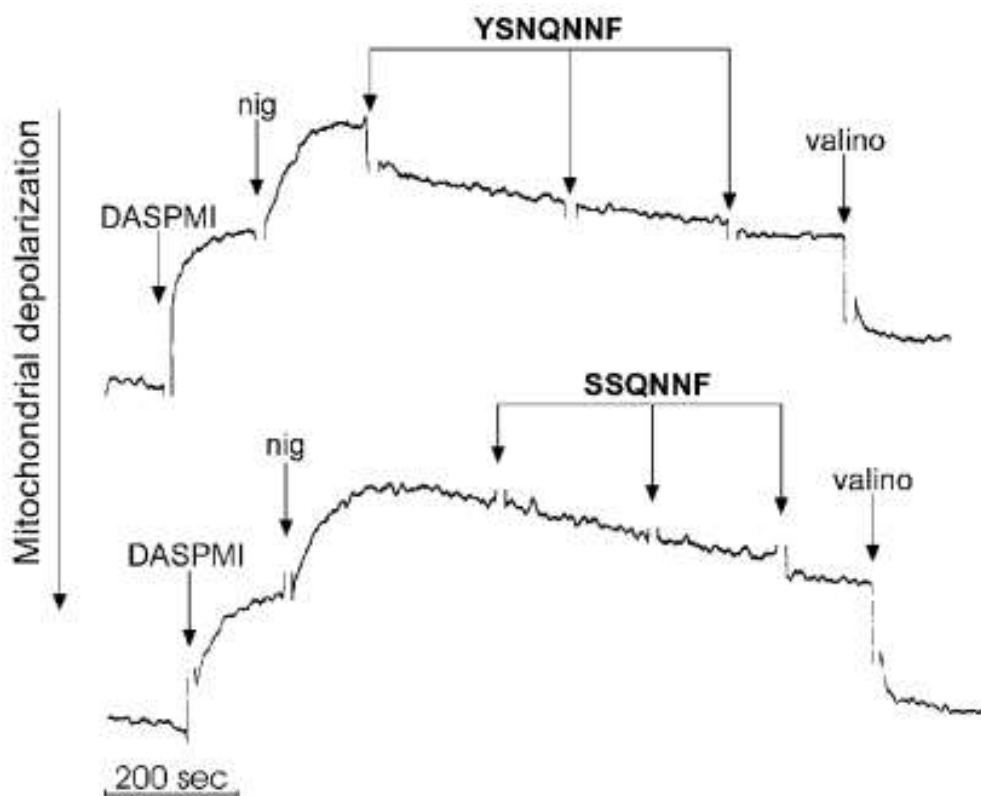


Рис. 3.9. Вплив пріонних пептидів на мембранний потенціал мітохондрій гіпокампа щурів.

Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій гіпокампа проводили з використанням флуоресцентного зонда DASPMI. Деполяризація мітохондрій супроводжується зниженням флуоресценції DASPMI (у відносних одиницях). Для того, щоб максимізувати потенціал мітохондріальної мембрани, додавали 0,5 мг/мл нігеріцину (nig) з подальшим додаванням 4 мг/мл пептиду YSNQNNF (верхній) або SSQNNF (нижній) та 2 мкг/мл валіноміцину (valino). Вимірювання проводили при кімнатній температурі.

Ми провели вимірювання мітохондріального потенціалу в ізольованих мітохондріях гіпокампа щурів після застосування PrP [170–175] N171S та PrP [169–175] (рис. 3.9). Жоден із досліджених пептидів суттєво не змінив мембранний потенціал або швидкість дихання мітохондрій (дані не наведено). 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 деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій з її високим трансмембранним потенціалом та існуючими механізмами підтримки потенціалу в мітохондріях [35].

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 нативного пептиду, може бути причиною відповідного нервового розладу.

Після утворення в плазматичній мембрані калієвої пори з агрегованих пептидів, проникність мембрани для іонів  $K^+$  підвищується. Фізично це призводить до гіперполяризації мембрани або, принаймні, до стабілізації мембранного потенціалу на рівні спокою, і створює електричну рушійну силу для припливу іонів  $Ca^{2+}$  через кальцієві канали.

Було показано, що в пласких ліпідних бішарах PrP [170–175] N171S утворює катіоноселективні канали з провідністю в діапазоні від 8 до 26 пС. Нативний прионовий пептид PrP [169–175] лише локально збільшує провідність пласкої модельної бішарової азолектинової мембрани без формування дискретних пор. Утворення в БЛМ каналів з різною провідністю пріонним пептидом PrP [170–175] N171S з точковою мутацією і заміною незарядженого аспарагіну серином зумовлено агрегацією пептидів в неполярному ліпідному оточенні та різною топологією утворюваних агрегатів. Обидва пептиди не змінюють трансмембранний потенціал мітохондріальної мембрани та швидкість дихання мітохондрій гіпокампа щурів. Спостережувані іонні канали, ймовірно, можуть змінювати іонні рівноваги всередині клітини й тим самим опосередковувати дисфункції нейронів.

### Висновки до розділу 3

Поліпептид Gef1 дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (Gef1p) має амінокислотну гомологічність до сімейства хлоридних потенціалозалежних каналів CLC. Він забезпечує компенсаційне транспортування аніонів Cl<sup>-</sup> до апарату Гольджі, регулюючи цим рН цього компартменту. За допомогою методології БЛМ визначено, що Gef1p забезпечують формування хлоридних каналів в модельних бішарових мембранах. Цей аніон-селективний канал має провідність поодинокого каналу 42 пС при вимірюванні в симетричних розчинах TEA–Cl 600/600 мМ, його активність залежить від напруги, канал закривається при високих від'ємних трансмембранних різницях потенціалів.

Патогенні властивості пріонів викликані його впливом на гомеостаз клітинних іонів. За допомогою техніки БЛМ було охарактеризовано вплив пептидів, отриманих з послідовності людського пріонного білка: YSNQNNF (PrP [169–175]) і SSQNNF (PrP [170–175]), що несе природну мутацію в положенні 171 [N → S], пов'язану з шизоафективними захворюваннями у людей, на провідність модельних ліпідних бішарових мембран. Для оцінки фізіологічного значення та можливих патологічних функцій пептидів також вивчено вплив пептидів на мембранний потенціал та частоту дихання мітохондрій гіпокампа. Встановлено, що PrP [170–175] N171S збільшує провідність плоских ліпідних мембран, у симетричних розчинах 500/500 мМ KCl (цис/транс), ми виявили іонні канали з провідністю від 8 до 26 пС. Нативний пріонний пептид PrP [169–175] не утворює іонних каналів у ліпідному бішарі. Жоден із пептидів істотно не змінює трансмембранний потенціал та швидкість дихання ізольованих мітохондрій гіпокампа щурів. Зроблено висновок, про можливий механізм утворення каналів шляхом агрегації мутованого пріонного пептиду.

Встановлено кореляцію між структурою пріонних пептидів та дезінтеграцією ліпідного бішару плоских 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 зумовлено різним агрегаційним потенціалом пептидів.

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.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [10], [11], [12], [13], [22], [23], [35].

## РОЗДІЛ 4

### СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНИЙ СТАН ЛІПІДІВ МЕМБРАН ВИЗНАЧАЄ ХАРАКТЕР ВЗАЄМОДІЇ ЦИКЛІЧНОГО ОЛІГОПЕПТИДУ GS З ТРОМБОЦИТАМИ

#### 4.1 Зміна форми тромбоцитів під дією граміцидину S

Оскільки GS взаємодіє неспецифічно з ліпідним бішаром мембран будь-яких клітин, він може порушувати структуру мембран як еритроцитів, так і інших клітин крові й спричиняти зміну їх функціональної активності. У зв'язку із цим, цікавим є вивчення впливу граміцидину S на клітини крові, зокрема на тромбоцити людини та на їх функціональну активність.

Характер впливу антибіотика на тромбоцити граміцидину S залежить від концентрації GS. При додаванні GS у концентрації  $4,15 \times 10^{-6}$  моль/л до ЗТП спостерігалось збільшення світлопропускання зразка (рис. 4.1). Теоретичні розрахунки показують, що набухання клітин веде до збільшення світлопропускання та зменшення оптичної щільності зразка [5, 141, 151–153]. Відомо, що GS спричиняє набухання різних клітин (наприклад, мітохондрій) [42]. Оскільки GS взаємодіє тільки з фосфоліпідами мембран, то його дія на клітини неспецифічна, а отже, збільшення світлопропускання зразка ЗТП, що спостерігається, імовірно, пов'язане з набуханням тромбоцитів, індукованим GS.

При збільшенні концентрації GS ( $7,47 \times 10^{-6}$  моль/л) збільшення світлопропускання змінюється на його зменшення, що настає через 20–60 с (рис. 4.1). GS у вищій концентрації ( $8,3 \times 10^{-6}$  –  $16,6 \times 10^{-6}$  моль/л) спричиняє лише зменшення світлопропускання зразка. Таке зменшення світлопропускання характерне для початкової фази агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ, і пояснюється зміною форми клітин від дископодібної

до сферичної [138, 151-153]. Відомо, що зменшення світлопропускання ОТП, індуковане агрегантами, зумовлене структурно-морфологічними змінами, унаслідок яких тромбоцити набувають неправильної форми з псевдоподіями [151]. Така зміна форми тромбоцитів відбувається за їх активації. Таким чином, можна припустити, що за певної концентрації GS активує тромбоцити.

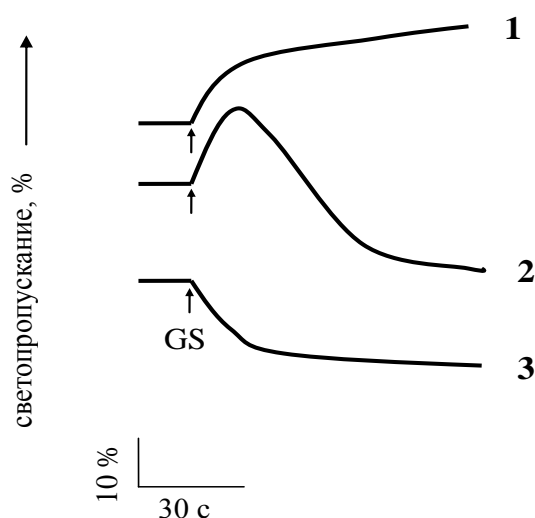


Рис. 4.1. Набухання та активація тромбоцитів під дією грамїцидину S. Наведено типові залежності зміни світлопропускання суспензії тромбоцитів під дією GS з плином часу. Концентрація GS: (1) –  $4,15 \times 10^{-6}$  моль/л; (2) –  $8,3 \times 10^{-6}$  моль/л; (3) –  $16,6 \times 10^{-6}$  моль/л.

З рисунка 4.2 видно, що тромбоцити, які зазнали впливу GS, не втрачають здатності до агрегації при подальшому додаванні індуктора агрегації (АДФ). Аналогічний вигляд мали агрегатограми для адреналіну,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  та тромбіну. Таким чином, зв'язування GS з мембранами (в інтервалі концентрацій GS, досліджених у роботі) не призводить до пошкодження мембранних рецепторів та до рефрактерності тромбоцитів. Для порівняння: тромбоцити, які за наявності низьких концентрацій АДФ змінюють форму та утворюють псевдоподії (не переходячи до агрегації),



стають рефрактерними [141].

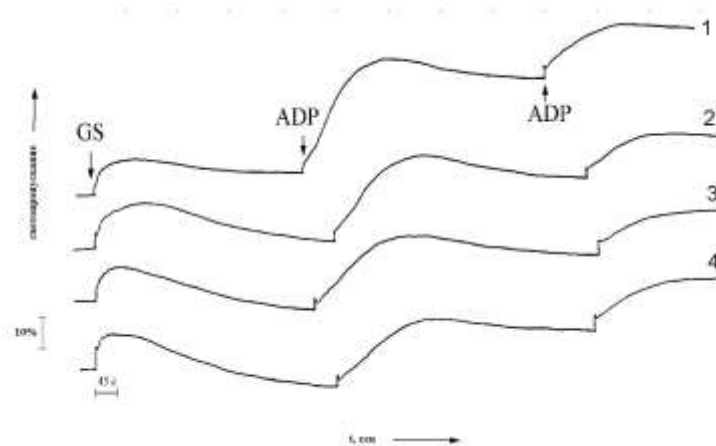


Рис. 4.2. Зміна оптичної щільності зразків ЗТП з плином часу під дією GS та АДФ для різних концентрацій GS. Концентрація GS, мкмоль/л: 5,4 (1); 6,2 (2); 7,8 (3); 9,1 (4); концентрація АДФ 0,18 мг/мл.

Залежність ступеня набухання та активації (зміни форми) тромбоцитів під дією GS від концентрації поліпептиду наведено на рис. 4.3. Як бачимо, при концентрації GS понад 7,5 мкмоль/л набухання тромбоцитів змінюється їх активацією.

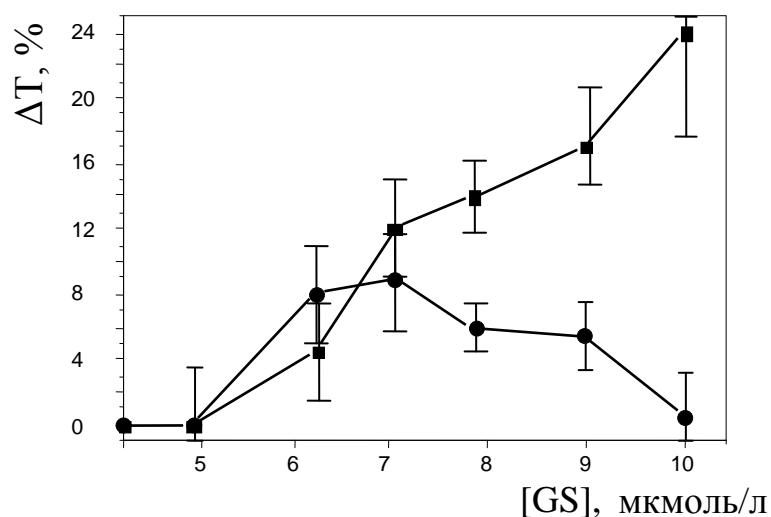


Рис. 4.3. Залежність ступеня набухання (-●-) та активації (-■-) тромбоцитів під дією GS від концентрації поліпептидного антибіотику в розчині.

GS у концентрації, що не спричиняє набухання або активації інтактних тромбоцитів, може спричиняти зміну форми тромбоцитів, уміщених у гіпотонічне середовище. Ми використовували додавання деіонізованої води до ЗТП для індукування гіпотонічного шоку (рис. 4.4). Концентрація клітин у всіх вимірах зберігалася незмінною. Цілісність мембран тромбоцитів контролювали за ступенем агрегації тромбоцитів, уміщених у гіпотонічне середовище, під дією АДФ. Авторами [141] було показано, що при додаванні дистильованої води до ЗТП відбувається швидке збільшення світлопропускання за рахунок набухання клітин. У присутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  швидке зростання світлопропускання змінюється повільним падінням (так званий зворотний хід). За відсутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігаємо лише швидке збільшення світлопропускання зразка [141]. Слід зазначити, що при набуханні клітин внутрішньоклітинний  $\text{Ca}^{2+}$  не вивільняється [141, 154]. Авторами [182] також було показано, що в гіпотонічному розчині об'єм тромбоцита збільшується протягом приблизно 20 секунд, а потім поступово зменшується (як гіпотонічний було використано 0,8 або 0,4% розчин NaCl у 5 мМ фосфатному буфері).

Як видно із рис. 4.4, уміщення тромбоцитів в гіпотонічне середовище спричиняє швидке зменшення оптичної щільності за рахунок набухання клітин, при цьому відсутність зворотного ходу свідчить про те, що при набуханні тромбоцитів в умовах цього експерименту внутрішньоклітинний  $\text{Ca}^{2+}$  не вивільняється. Подальше додавання GS до тромбоцитів (у концентрації, значно меншій, ніж необхідна для набухання або активації інтактних тромбоцитів), спричиняє збільшення оптичної щільності, аналогічне зворотному ходу в присутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким чином, активація тромбоцитів під дією GS, імовірно, здійснюється за допомогою іонів кальцію (вивільнення мембранного  $\text{Ca}^{2+}$  або збільшення проникності мембран для іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ). Іони  $\text{Ca}^{2+}$ , у свою чергу, можуть спричиняти активацію тромбоцитів [143].

Зі збільшенням об'ємного вмісту деіоніз води у зразку (до 0,3) ступінь і швидкість активації тромбоцитів збільшуються (рис. 4.5). При подальшому збільшенні вмісту води до 0,5 спостерігаємо падіння величин  $\Delta T$  і  $V$ , імовірно, за рахунок значного зменшення кількості неушкоджених тромбоцитів у суспензії. Зростання числа пошкоджених тромбоцитів зі збільшенням гіпотонічності середовища підтверджується тим, що ступінь агрегації тромбоцитів під дією АДФ різко знижується при об'ємному вмісті води у зразку 0,4–0,5 (рис. 4.6).

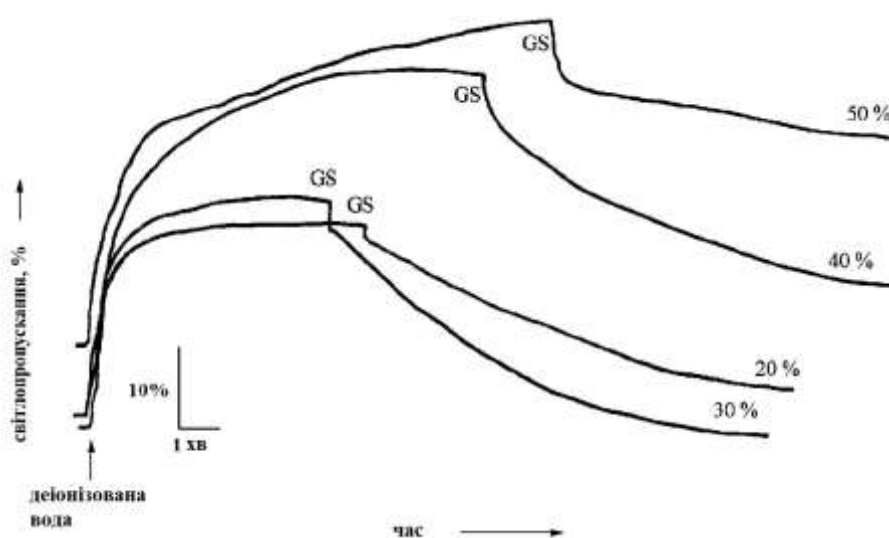


Рис. 4.4 Кінетика зміни оптичної щільності зразків ЗТП при додаванні деіонізованої води та GS. Кінцеву об'ємну частку деіонізованої води у зразку вказано на кривій. Концентрація GS = 34 мкмоль/л.

Відомо, що при гіпотонічному шоку форма тромбоцитів змінюється від дископодібної до сферичної, зникають псевдоподії [141]. Гіпотонічний шок супроводжується також появою пружного натягу в мембранах. Таким чином, наші результати показують, що пружний натяг, який виникає в мембрані, полегшує вбудовування в неї граміцидину. GS у концентрації, недостатній для активації або набухання інтактних тромбоцитів, здатний

спричиняти активацію тромбоцитів, що набрякли в гіпотонічному середовищі.

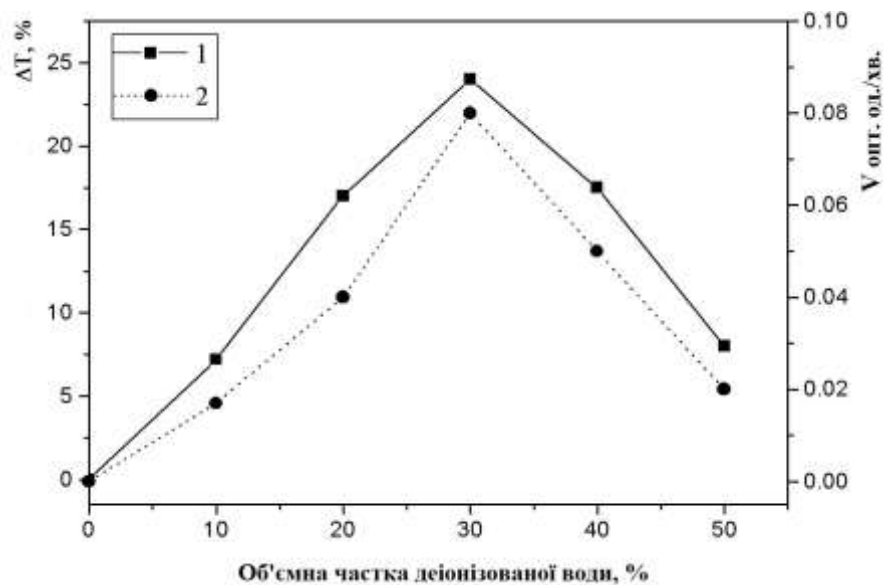


Рис. 4.5. Залежності ступеня (1) та швидкості (2) активації тромбоцитів, уміщених у гіпотонічне середовище, під дією GS від об'ємної частки деіонізованої води у зразку.

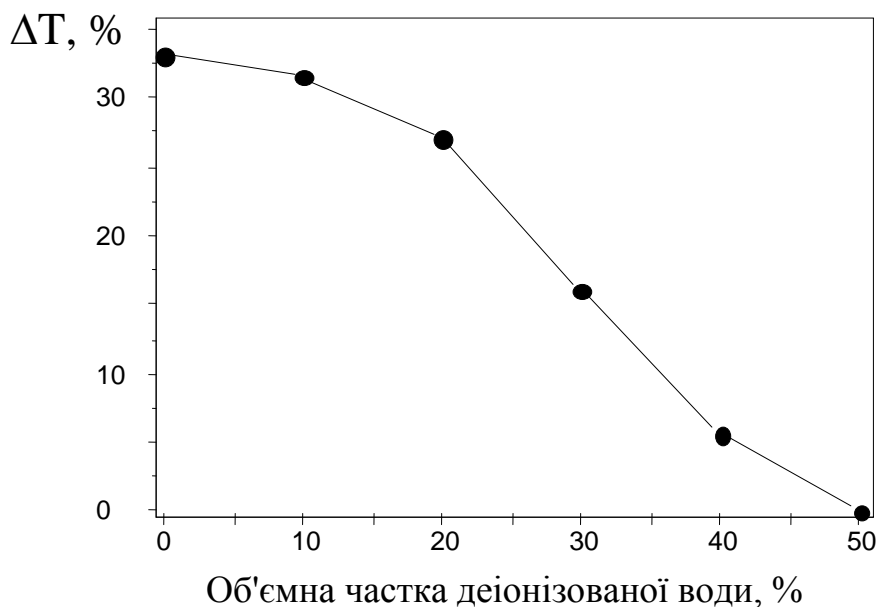


Рис. 4.6. Залежність ступеня агрегації тромбоцитів, уміщених у гіпотонічне середовище, під дією АДФ від об'ємної частки деіонізованої води у зразку.

Таким чином, можна припустити, що механізм дії GS на тромбоцити

(механізм активації тромбоцитів грамїцидином) опосередкований іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Можливо, механізм активації тромбоцитів грамїцидином S пов'язаний або зі збільшенням проникності мембрани для іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , або з вивільненням  $\text{Ca}_2$  з примембранних депо унаслідок вбудовування GS у мембрану. Участь іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у механізмі GS-індукованої активації тромбоцитів підтверджують наші експерименти, результати яких наведено на рис. 4.7. Як видно з рисунка, у присутності EDTA в розчині ступінь активації тромбоцитів під дією GS різко зменшується, й при певній концентрації EDTA додавання GS не спричиняє збільшення оптичної щільності зразка ЗТП. При цьому зменшення оптичної щільності за рахунок набухання тромбоцитів зберігається в присутності EDTA (рис. 4.7). Таким чином, можна зробити висновок, що набухання тромбоцитів під дією GS, яке призводить до зменшення оптичної щільності ЗТП, є неспецифічним процесом, тоді як активація тромбоцитів, яка характеризується зміною форми клітин і призводить до зростання оптичної густини, – специфічним для тромбоцитів і опосередкованим іонами  $\text{Ca}^{2+}$ .

Виходячи з припущення, що GS активує тромбоцити, можна пояснити залежність ефекту GS на тромбоцити від концентрації антибіотика. Додавання GS до суспензії клітин індукує два процеси, що по-різному впливають на оптичну щільність зразка: набухання тромбоцитів та їх активацію. Як видно з рисунка 4.2, для того, щоб процес активації тромбоцитів грамїцидином став домінуючим, необхідна певна концентрація GS, за нашими розрахунками вона дорівнюватиме 7,5 мкмоль/л. Що вона більша, то сильніше збільшення оптичної щільності при додаванні GS за рахунок активації тромбоцитів. Однак така активація тромбоцитів, що полягає в зміні форми клітин та збільшенні концентрації вільного кальцію, не призводить до агрегації тромбоцитів. Для ініціювання агрегації, імовірно, необхідні вищі концентрації кофакторів агрегації. Можливо, при активації тромбоцитів грамїцидином S не створюється необхідного рівня вільного  $\text{Ca}^{2+}$ , який зумовлює процес агрегації

тромбоцитів.

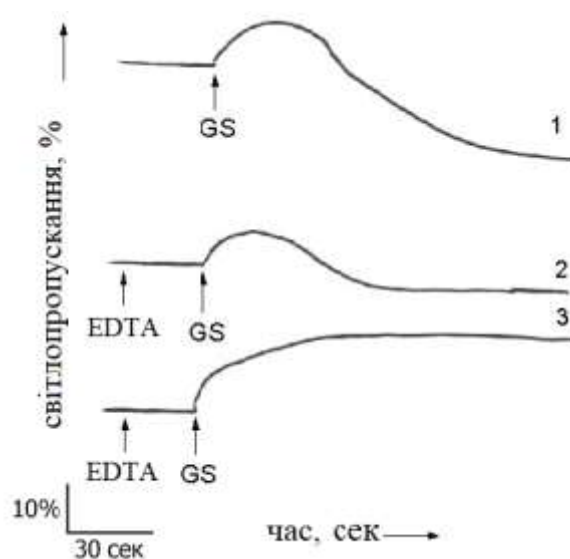


Рис. 4.7. Зміна оптичної густини зразків ЗТП з часом під дією GS.

Пепид додавали або безпосередньо до ЗТП (1), або після EDTA (2, 3). Концентрація EDTA 0,05 ммоль/л – (2), 1,2 ммоль/л – (3).

Цікаво відзначити, що визначена нами концентрація GS, яка спричиняє набухання тромбоцитів, виявилася дещо нижчою від його гемолітичної активності, навіть виміряної при вищій (37°C) температурі й більш тривалій (4 години) експозиції еритроцитів до GS [183]. Очевидно, як і в разі із зовнішньою оболонкою бактерій, глікокалікс тромбоцитів не є серйозною перешкодою для проникнення молекул GS до мембрани клітин. Іншим поясненням цього факту може бути різне співвідношення ліпід-пептид в експериментах з тромбоцитами та еритроцитами, спричинене різною концентрацією клітин у дослідах.

Після дії GS на тромбоцити останні не втрачають здатності до агрегації при подальшому додаванні індуктора – АДФ, адреналіну або  $H_2O_2$  (дані не представлено).

Зміна форми та набухання тромбоцитів під дією GS не залежать від процесу агрегації. При блокуванні агрегації тромбоцитів папаверином (папаверин, інгібуючи фосфодіестеразу, запобігає переходу цАМФ  $\rightarrow$  5'-

АМФ, тим самим, збільшуючи в клітині рівень інгібітору агрегації – цАМФ), збільшення оптичної щільності при додаванні грамїцидину S до зразка ЗТП зберігалось. Оскільки в цьому разі папаверин блокував основну функцію тромбоцитів, можна стверджувати, що вплив GS на тромбоцити має неспецифічний характер і ефект GS на тромбоцити не залежить від механізмів агрегації.

Цікавим є той факт, що тривалентні катіони лантану в мілімолярних концентраціях спричиняють навіть агрегацію тромбоцитів за рахунок збільшення в'язкості ліпідного бішару мембран тромбоцитів, навіть ефект лантану обертається додаванням хелаторів кальцію – EDTA. Автори використовували спінові зонди 5-, 12- і 16-нітроксидстеаринову кислоту для вимірювання в'язкості ліпідного оточення зонда в мембрані відмитих тромбоцитів і встановили, що ефекти кальцію й лантану на функціональну активність тромбоцитів опосередковано зменшенням текучості мембрани тромбоцитів [184]. Ті самі дослідники встановили, що текучість мембран тромбоцитів збільшувалася в разі підвищення температури від 17 до 37°C. Мілімолярні добавки як кальцію, так і лантану до інтактних клітин збільшували жорсткість мембран тромбоцитів при 37°C та зменшували текучість ліпідів ізольованих тромбоцитарних мембран. Також цікавим є і той факт, що автори, як і ми у своїй роботі, виявили зворотність ефектів катіонів на функцію тромбоцитів при додаванні хелатора двовалентних іонів EGTA [184].

Ми вивчили вплив інших катіонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  на зміну форми та активацію тромбоцитів під дією грамїцидину. Встановлено, що ступінь та швидкість активації тромбоцитів під дією грамїцидину S у присутності зазначених катіонів визначаються здебільшого осмотичними ефектами, кінетичні залежності активації тромбоцитів у присутності іонів практично не залежать від специфічної дії позитивних іонів [20].

## 4.2 Дезагрегація тромбоцитів під дією граміцидину S

Додавання граміцидину S до тромбоцитів, що проагрегували під дією індуктора, спричиняє зменшення світлопропускання зразка. Типові агрегатограми, що ілюструють характер зміни світлопропускання, наведено на рис. 4.8. Для всіх використаних індукторів агрегації – АДФ, адреналіну,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – загальний вигляд залежностей світлопропускання зразка від часу був однаковий. Таке зменшення світлопропускання може бути пов'язане із розпадом агрегатів тромбоцитів. Зникнення агрегатів у зразку після додавання GS спостерігали за допомогою світлового мікроскопа. Ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів пропорційний концентрації розчину GS.

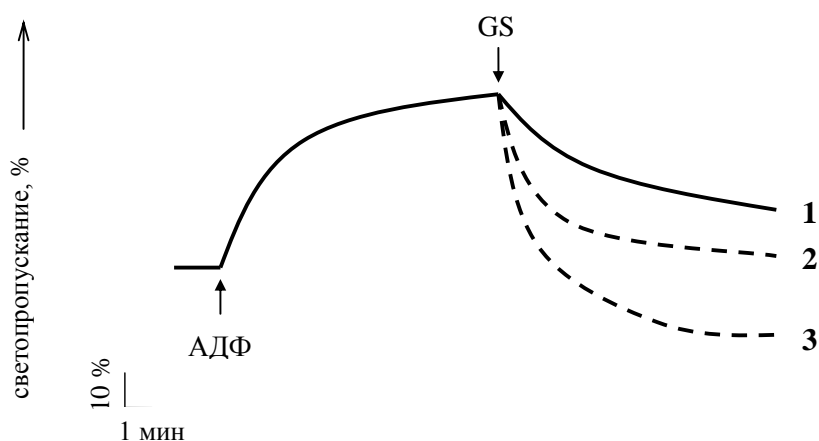


Рис. 4.8. Розпад агрегатів тромбоцитів під впливом граміцидину S.

Показано типові кінетичні криві світлопропускання суспензії тромбоцитів при додаванні GS до ЗТП через 10 хвилин після початку АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів. Концентрації: АДФ – 0,18 мг/мл; GS –  $4,15 \times 10^{-6}$  (1);  $8,3 \times 10^{-6}$  (2),  $16,6 \times 10^{-6}$  моль/л (3).

Дезагрегацію тромбоцитів під дією граміцидину S можна пояснити



таким чином: молекула GS, вбудовуючись у мембрану, порушує ліпід-ліпідні та ліпід-білкові взаємодії [182, 185] і, імовірно, спричиняє пружну напругу в мембрані. Міцність білкових містків, що з'єднують тромбоцити в агрегаті, набагато менша за міцність мембрани (оскільки в мембрані діють сильні гідрофобні сили [186]), тому напруга, спричинена вбудовуванням молекули GS у мембрану, може зніматися за рахунок розривів саме білкових (фібриногенових) містків. При розриві цих зв'язків агрегати будуть розпадатися, при цьому кількість центрів, що розсіюють, буде збільшуватися, що має призвести до зниження світлопропускання [152, 153].

У разі, якби мембрани тромбоцитів, що входять в агрегат, не зберігали свою цілісність, убудовування молекул граміцидину в мембрану не спричинило б напруги в мембрані. Отже, можна зробити висновок, що мембрани тромбоцитів, які утворюють агрегати, зберігають свою цілісність навіть у разі незворотної агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ.

*Таблиця 4.1.*

Залежність ступеня  $\Delta D$  та швидкості  $V$  розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS від інтервалу часу між додаванням індуктора агрегації (АДФ) та GS до ЗТП.

<i>інтервал, сек</i> <i>деагрегація</i>	<b>45</b>	<b>135</b>	<b>300</b>	<b>510</b>	<b>600</b>
<b><math>\Delta D</math>, в.о.</b>	0,11±0,02	0,36±0,03	0,48±0,06	0,55±0,06	0,56±0,07
<b><math>V</math>, в.о./хв</b>	0,07±0,02	0,26±0,05	0,32±0,05	0,34±0,06	0,35±0,05

Концентрація АДФ – 0,18 мг/мл, граміцидину S –  $16,6 \times 10^{-6}$  моль/л. Наведено середні значення та СКВ, усереднення проводили для групи з 5–7 донорів.

Ступінь та швидкість розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS залежать від інтервалу часу між додаванням індуктора агрегації та граміцидину S до зразка ЗТП (табл. 4.1). Що довше йде агрегація, і що більше число тромбоцитів встигло включитися в процес агрегації, то більші агрегати й тим більший ступінь їх розпаду під впливом GS.

При додаванні GS незабаром після індуктора агрегації розпад агрегатів починається тоді, коли ще триває активне об'єднання клітин в агрегати, тому ступінь і швидкість розпаду агрегатів – дезагрегації – невеликі при малих інтервалах часу між додаваннями індуктора агрегації та GS (табл. 4.1). При додаванні GS до тромбоцитів через 9–10 хвилин після початку агрегації, коли формування агрегатів закінчується та оптична щільність ЗТП практично перестає змінюватися, параметри дезагрегації, спричиненої GS, також виходять на певний стаціонарний рівень. Тому, як правило, при вивченні дезагрегації тромбоцитів під дією GS, останній додавався до ЗТП через 10 хв після індуктора агрегації.

Зв'язування граміцидину з мембраною клітини – динамічний процес, що складається з кількох стадій і включає електростатичну та гідрофобну взаємодії. Ефективність та швидкість вбудовування GS у мембрану буде залежати від рухливості ліпідів мембрани, від мікрров'язкості ліпідного бішару.

На рис. 4.9 наведено фрагменти кривих розпаду агрегатів, що ілюструють початкову стадію зміни світлопропускання зразка ЗТП при додаванні GS за різних температур. Як видно з рисунка 4.9, при низьких температурах (4–8°C) додавання GS до ЗТП через 9 хвилин після початку АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів спричиняє незначне збільшення світлопропускання зразка; через 45–90 с світлопропускання починає спонтанно зменшуватися. Таке збільшення світлопропускання можна пояснити набуханням тромбоцитів або їх агрегацією під впливом GS при низьких температурах. При 4–8°C ступінь агрегації тромбоцитів невеликий [187], проте після додавання індуктора багато тромбоцитів зберігають

потенційну здатність до агрегації. Взаємодіючи з фосфатними групами фосфоліпідів, GS утворює ліпід-граміцидиновий комплекс, здатний вбудовуватися в гідрофобну ділянку мембрани, що спричиняє фазове («видове») відокремлення фосфоліпідів та утворення «рідкої» зони нейтральних ліпідів [185, 188]. Оскільки гідрофобна взаємодія послаблюється зі зменшенням температури, процес фазового відокремлення мембранних ліпідів може прискорюватися при охолодженні мембрани. У роботі [188] показано, що при зменшенні температури від 37° до 4°С адсорбція GS мембранами бактерій зменшується на 10–15%. Тобто навіть за 4°С достатня кількість молекул граміцидину зв'язується з ліпідами мембран. Після вбудовування ліпід-граміцидинового комплексу відбувається «заморожування» одних ділянок ліпідного бішару та «розрідження» інших, що саме і є, за даними [189], необхідною умовою для готовності мембран до агрегації. Крім того, відома загальнобіологічна роль кластеризації білків та ліпідних рафтів у плазматичній мембрані різних клітин [190, 191]. Можливо, що в цьому разі GS виступає в ролі «активатора» мембрани, що переводить останню до необхідного для агрегації стану. Крім того, зменшення текучості мембрани та дифузії ліпідів є загальною особливістю при активації різних типів клітин [192].

При температурах 10–18°С додавання GS не спричиняє збільшення світлопропускання зразка, але з'являється лаг-період – проміжок часу (20–60 с) між додаванням GS та початком розпаду агрегатів, протягом якого світлопропускання зразка не змінюється.

Автори [194] вивчили вплив GS на протопласти за різних температур, проте ні в згаданій роботі, ні в низці інших досліджень, присвячених GS, не йдеться про відмінність механізмів взаємодії молекули GS з ліпідами мембран при низьких і високих температурах.

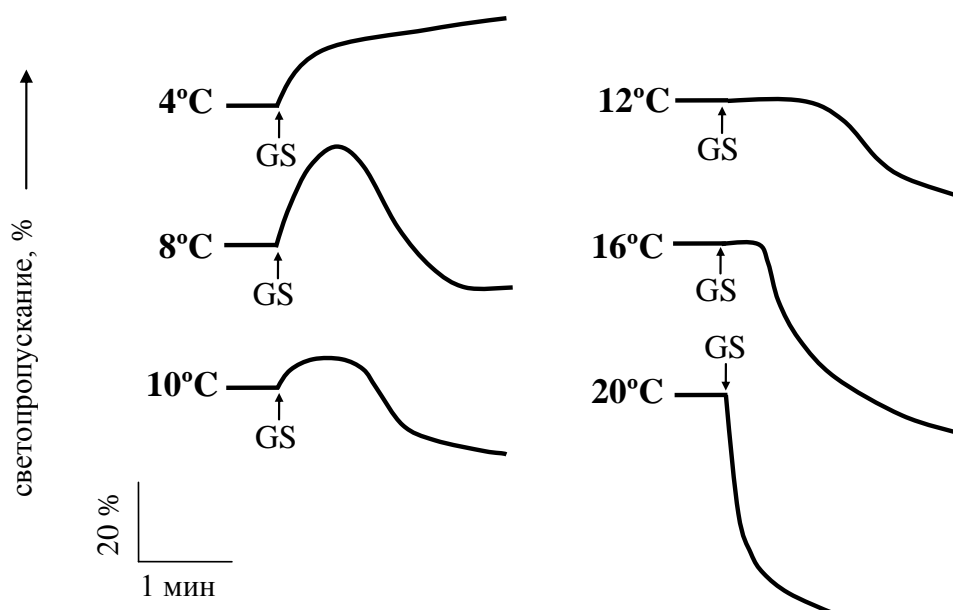


Рис. 4.9. Вплив рухливості ліпідів мембрани тромбоцитів на зв'язування GS з тромбоцитами.

Наведено типові криві зміни світлопропускання ЗТП при додаванні GS після завершення агрегації тромбоцитів (показано початкові ділянки кінетичних кривих дезагрегації тромбоцитів). Стрілками позначено моменти додавання GS, числа у кривих – температура, при якій проводилися вимірювання. Концентрація GS –  $8,3 \times 10^{-6}$  моль/л. Агрегацію тромбоцитів, що передувала додаванню GS, викликала АДФ концентрації 0,18 мг/мл.

Також у літературі бракує даних щодо залежності конформації самої молекули граміцидину S від температури (у фізіологічному інтервалі температур). Мабуть, виявлений лаг-період пов'язаний саме з різною швидкістю взаємодії молекули GS з мембраною, яка визначається різною рухливістю ліпідів за різних температур, а за наявності та величиною лаг-періоду можна побічно судити про рухливість ліпідів у мембранах тромбоцитів.

Оскільки кожен тромбоцит в агрегаті пов'язаний із сусідніми клітинами декількома молекулами фібриногену [195], то для повного відриву тромбоциту від агрегату необхідно розірвати якнайбільше число

фібриногенових зв'язків (у граничному випадку – усі). Ступінь дезагрегації тромбоцитів визначається як ступінь розпаду агрегатів при дії GS: що вищий ступінь дезагрегації, то більше одиночних тромбоцитів відірвалося від агрегату. Пояснимо: у наших експериментальних умовах (постійне перемішування в потоці зсуву  $10 \text{ c}^{-1}$ ) руйнування агрегату відбувається переважно за рахунок від'єднання окремих тромбоцитів від поверхні великого агрегату [9, 187]. Граміцидин S, що додається після того, як агрегати сформувалися і в середовищі перебувають великі агрегати, проникає всередину клітинних агрегатів поступово шляхом дифузії і, таким чином, спочатку вбудовується в мембрани клітин, розташованих на поверхні агрегату. Отже, ступінь дезагрегації тромбоцитів під дією GS пропорційна кількості молекул GS, що вбудувалися в плазматичну мембрану тромбоциту. Як уже зазначалося, це вбудовування відбувається у два етапи – електростатична взаємодія заряджених  $\text{NH}_3^+$ -груп з негативно зарядженими фосфоліпідами і потім – гідрофобна взаємодія, вбудовування в ліпідний бішар і поділ полярних та неполярних ліпідів у мембрані. Електростатичні та гідрофобні взаємодії по-різному залежать від температури – електростатичні слабшають, а гідрофобні посилюються в разі підвищення температури.

Слід зауважити, що GS перед вбудовуванням в мембрану клітини маж подолати шар примембранного глікокалікса й лімітуючи фактором є дифузія в ліпідах [17]. Для опису процесу можна використовувати як модель багат шарової адсорбції Брунауэра-Еммета-Теллера так і модель 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:

$$c = c_H + c_L = k_D p + \frac{c'_H b p}{1 + b p} \quad (4.1)$$

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:

$$I = I_H + I_L = -D_H \frac{dc_H}{dx} - D_L \frac{dc_L}{dx} \quad (4.2)$$

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.

У таблиці 4.2 представлено залежності ступеня та швидкості розпаду агрегатів тромбоцитів під впливом граміцидину S від температури. З наведених даних видно, що за низьких температур (4–8°C) додавання GS до тромбоцитів, що проагрегували під дією індуктора, спричиняє слабку агрегацію останніх. Зі зростанням температури ступінь та швидкість розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS збільшуються. У ділянці температур 33–37°C ступінь розпаду агрегатів майже однаковий і практично не залежить від температури. Оскільки ступінь і швидкість розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS залежать від взаємодії молекул GS з ліпідним компонентом мембрани, то таке уповільнення зростання  $\Delta D$  може бути пов'язаним з досягненням граничної (максимальної) рухливості ліпідів у мембрані при 33°C. У цьому разі різке зростання ступеня розпаду

агрегатів при температурах, вищих за 38–40°C може пояснюватися відсутністю зшиваючої дії мембранних білків. Проте найімовірнішим видається припущення, що агрегати тромбоцитів, утворені за цих температур, більш міцні. За температур, вищих за 37–38°C ступінь розпаду агрегатів з температурою зростає швидше.

Таблиця 4.2

Температурні залежності ступеня  $\Delta D$  і швидкості  $V$  дезагрегації тромбоцитів, спричиненої GS у різних концентраціях.

[GS], мкМ T, °C	ступінь дезагрегації			швидкість дезагрегації	
	16,6	8,3	4,7	16,6	8,3
4	-0,06±0,01	-0,01±0,003	-0,05±0,01	0,02±0,01	0,00±0,003
8	0,04±0,01	0,03±0,01	-0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,004
12	0,14±0,03	0,08±0,02	0,01±0,003	0,02±0,01	0,03±0,006
17	0,21±0,04	0,15±0,02	0,02±0,004	0,03±0,01	0,02±0,004
20	0,35±0,06	0,19±0,03	0,03±0,01	0,12±0,02	0,02±0,004
24	0,40±0,07	0,29±0,05	0,03±0,01	0,18±0,03	0,04±0,007
28	0,43±0,07	0,31±0,05	0,04±0,01	0,19±0,03	0,07±0,01
32	0,52±0,08	0,30±0,05	0,04±0,01	0,30±0,05	0,09±0,02
36	0,56±0,07	0,26±0,04	0,05±0,01	0,35±0,05	0,11±0,02
40	0,53±0,08	0,28±0,05	0,11±0,02	0,41±0,08	0,15±0,03
44	0,61±0,12	0,49±0,08	0,35±0,07	0,42±0,08	0,17±0,04
48	0,92±0,18	0,76±0,15	0,75±0,14	0,51±0,11	0,19±0,04

Концентрацію GS у мкмоль/л вказано в другому рядку таблиці. Агрегацію

тромбоцитів, що передує додаванню GS, спричиняла АДФ у концентрації 0,18 мг/мл. Наведено середні значення та СКВ, усереднення проводили для групи з 5–7 донорів.

Використання GS як індикатора змін ліпідів мембрани має перевагу завдяки своїй широкій застосовності. Білки мембран клітин крові здебільшого специфічні для кожного виду клітин. Ліпіди ж, зокрема фосфоліпіди, універсальні та (у різній кількості) входять до складу мембран усіх клітин крові. Тому на підставі отриманих результатів ми припускаємо, що GS може використовуватися для визначення стану ліпідного бішару мембран різних клітин.

### **4.3 Математична модель дезагрегації тромбоцитів**

Для з'ясування механізму дезагрегації тромбоцитів під впливом пептиду GS ми розробили математичну модель кінетики оборотної агрегації тромбоцитів, в якій особливу увагу приділено стадії дезагрегації клітин.

АДФ в низьких концентраціях викликає оборотну агрегацію. У цьому разі не відбувається реакція вивільнення, але має місце зміна форми тромбоцитів, підвищення адгезії та утворення агрегатів. Але через декілька хвилин починається розпад утворених агрегатів. Якщо це відбувається у кровотоці, то еритроцити відтісняють легкі та нечисленні тромбоцити до стінок судини, де тромбоцити внаслідок оборотної агрегації можуть прикріплюватися. Частина з них відривається від стінок судин і зноситься потоком крові. Після цього тромбоцити повертаються до початкового стану, натомість агрегати повністю руйнуються до окремих тромбоцитів. Така агрегація не здійснює зупинки кровотечі навіть з дрібних судин, але впливає на реологічні властивості крові, а проведення її досліджень може бути корисним при проведенні медичної діагностики.



Модель адаптовано до аналізу результатів дослідження агрегації методом світлорозсіювання. На відміну від використаних нами підходів числових симуляцій осмотичної поведінки ізольованих клітин [6,28,29], коли ефекти зовнішніх чинників необхідно постулювати й екстраполювати на гетерогенну популяцію природних клітин, математичне моделювання забезпечує холістичний підхід до аналізу агрегації клітин та її залежності від модифікуючих впливів.

Для кривих зміни світлопропускання суспензії тромбоцитів, отриманих при необоротній агрегації, характерні дві стадії: стадія зменшення світлопропускання є передагрегаційною, за нею йде стадія агрегації. При дослідженнях оборотної агрегації також виокремлюємо третю стадію (рис. 4.10) [141].

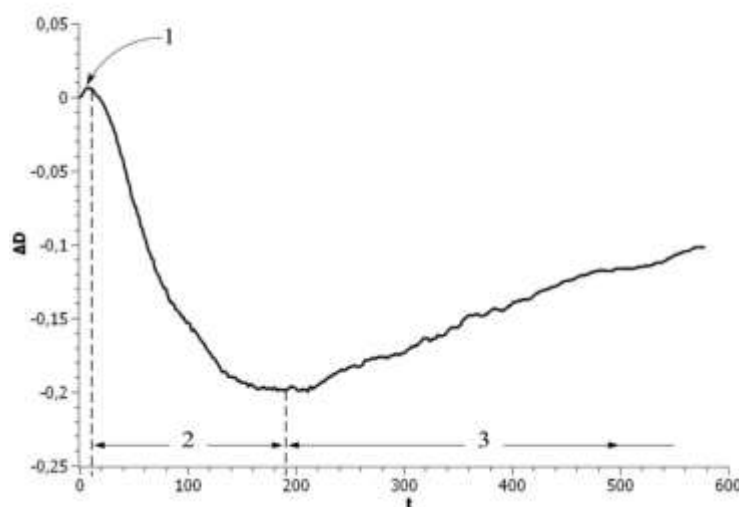


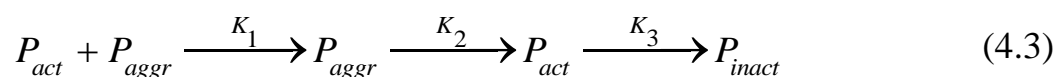
Рис. 4.10 Зміна оптичної щільності суспензії тромбоцитів в процесі індукованої агрегації (оборотна агрегація).

Позначено ділянки кривої що відповідають активації (1), агрегації (2) та дезагрезації (3) тромбоцитів.

Визначення параметрів агрегації тромбоцитів на основі кривих агрегації, отриманих за допомогою світлорозсіювання, дозволяє досліджувати залежності кінетики агрегації від умов проведення досліджу.

За допомогою математичного моделювання можна описати оборотну агрегацію тромбоцитів і зробити певні припущення щодо її механізмів. Так, наприклад, припускається, що дезагрегація насамперед пов'язана з нестабільністю великих агрегатів. Правдивість цього висновку було підтверджено цитометрією та аналізом розподілу розмірів агрегатів за розсіюванням світла [146, 197].

Раніше нами [196] було запропоновано таку схему перетворень:



де  $P_{act}$ ,  $P_{inact}$ ,  $P_{aggr}$  – концентрації або кількості активованих, інактивованих тромбоцитів та тромбоцитів, які перебувають у агрегатах. Для зручності  $K_1$ ,  $K_2$  і  $K_3$  визначимо безпосередньо як швидкості утворення агрегатів, їх розпаду й швидкості інактивації тромбоцитів відповідно.

За наведеною схемою (4.3) динаміка змін описується такою системою рівнянь:

$$\begin{cases} \frac{dP_{aggr}}{dt} = K_1 - K_2 \\ \frac{dP_{act}}{dt} = -K_1 + K_2 - K_3 \\ \frac{dP_{inact}}{dt} = K_3 \end{cases} \quad (4.4)$$

Кількості тромбоцитів відповідають їх вихідній кількості в зразку  $P_0$ :

$$P_{act} + P_{aggr} + P_{inact} = P_0 \quad (4.5)$$

Для подальшого розгляду даної моделі вводиться низка спрощень:

- форма агрегатів приймається сферичною. З огляду на це, кількість тромбоцитів в агрегаті можна вважати пропорційною його радіусу в третьому степені;
- вважається, що тільки тромбоцити поверхневого шару можуть залишати агрегати. Отже, відповідний доданок в рівняннях втрати

агрегатами тромбоцитів і збільшення кількості вільних тромбоцитів буде пропорційним другому степеню радіуса агрегату;

- можливе вивільнення агрегованих тромбоцитів внаслідок зіткнень агрегатів;
- кількість тромбоцитів в поверхневому шарі агрегату (вона визначає швидкість втрати агрегатами тромбоцитів) пропорційна загальній кількості тромбоцитів агрегату в степені  $2/3$ ;
- розміри всіх агрегатів в заданий момент часу вважаємо однаковими (відповідають середнім значенням реальних величин);
- із залежності видалено початкову ділянку короткочасного збільшення оптичної щільності суспензії.

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

$$K_1 = k_1 \sigma_{PA} P_{act} A \quad (4.6)$$

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).

При побудові нашої моделі відкидаємо припущення, що константи розпаду агрегатів унаслідок вивільнення тромбоцитів поверхневого шару й унаслідок зіткнень агрегатів є однаковими. Після активної дезагрегації усереднена кількість тромбоцитів в агрегаті прямує до певного значення ( $N_{end}$ ). Можливо, це пов'язано з формуванням певних стабільних агрегатів, для яких не відбувається подальше руйнування в масштабах часу проведення експерименту. Для врахування цієї особливості використаємо за опорну точку для розпаду агрегатів значення, яке легко отримати за останніми точками експериментальної залежності для конкретного

випадку.

Таким чином, вираз для  $K_2$  матиме вигляд:

$$K_2 = \begin{cases} k_{2.1} 4\pi R_{pl}^2 (N - N_{end})^{2/3} + k_{2.2} \pi R_{aggr}^2 A^2, & N - N_{end} > 0 \\ 0, & N - N_{end} \leq 0 \end{cases} \quad (4.7)$$

де  $R_{pl}$  та  $R_{aggr}$  – радіуси тромбоцита та агрегату відповідно;  $N$  – кількість тромбоцитів в агрегаті. Внеском другого доданка на початку досліджу, коли  $N - N_{end} \leq 0$ , можна знехтувати, адже ймовірність зіткнень агрегатів значно залежить від їх розміру (квадратично) і, крім того, малі агрегати менш схильні до поверхневих руйнувань унаслідок зіткнень, що не було враховано окремо.

Для розгляду оборотної агрегації врахування інактивації тромбоцитів є обов'язковим. Механізми дезагрегації не є остаточно вивченими. Але, базуючись на твердженні про те, що вона настає через певний час для тромбоцитів, які не зазнали взаємодії з великими концентраціями індуктора, або на припущенні про вплив різних біологічно активних речовин, концентрації яких змінюються за рахунок вибіркової секреції з самих клітин, можна зробити висновок, що константа реакції, яка відповідає інактивації, збільшується з часом від початку досліджу. 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  $P_{act}$ .

Було обрано та розглянуто декілька варіантів залежності для швидкості перетворення  $K_3$ . Вони мали забезпечувати зростання константи швидкості реакції, проте обмежувати її одиницею для утримання швидкості перетворення у фізично обґрунтованих межах. Однак на піку агрегації кількість активованих тромбоцитів  $P_{act}$  знижується до значень, близьких до 0, і потім тримається таких значень до кінця

досліді. Обмежувальну роль для інактивації відіграє швидкість дезагрегації. Тобто майже всі тромбоцити, що дезагрегуються, за будь якого варіанту часової залежності  $K_3$  інактивуються миттєво. Унаслідок цього значних відмінностей між різними варіантами залежності  $K_3$  від часу немає (рис. 4.11), і тому було обрано найпростіший із розрахунків.

$$K_3 = \begin{cases} P_{act}(t/\tau), & t/\tau < 1 \\ P_{act}, & t/\tau \geq 1 \end{cases} \quad (4.8)$$

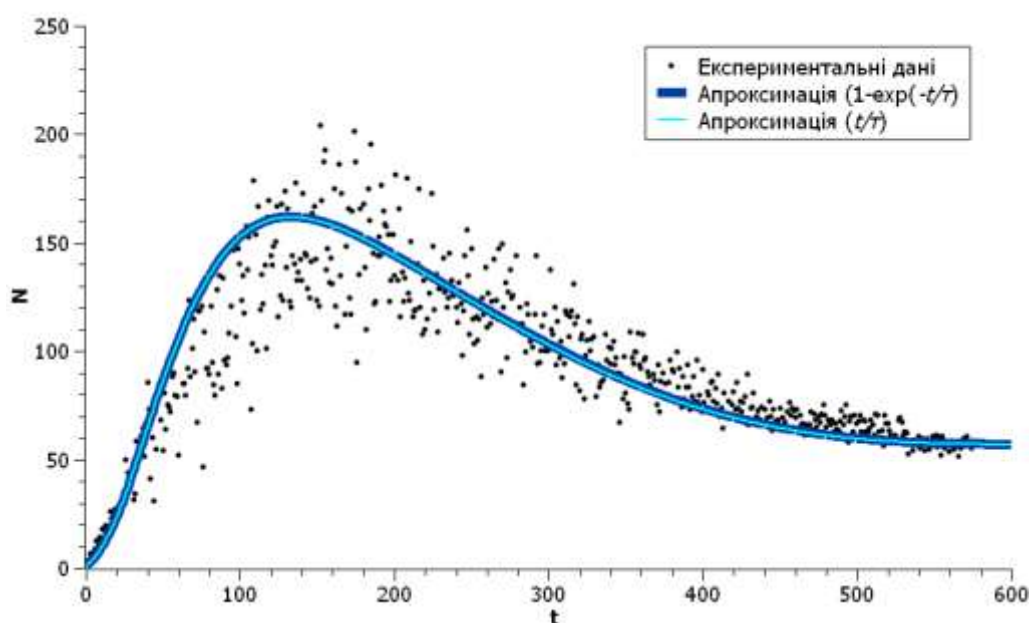


Рис. 4.11. Зміна усередненої кількості тромбоцитів в агрегаті з часом.

Експериментальні дані позначено точками, суцільні лінії – для наближення експериментальної кривої за допомогою моделі з двома варіантами часової залежності  $K_3$ .

З експериментальних даних усереднену кількість тромбоцитів в агрегаті визначали за таким рівнянням:

$$\Delta D = v\pi R_{pl}^2 I P_0 \left( \frac{N - N^{2/3}}{N_{\max}} \right) \quad (4.9)$$

Для спрощення аналізу результатів уведемо параметр  $k_2$ , який

залежить від статичних параметрів досліду та кінетичних констант руйнування агрегатів унаслідок відривання тромбоцитів від поверхні агрегату  $k_{2.1}$  та зіткнень агрегатів між собою  $k_{2.2}$ :

$$k_2 = 4k_{2.1} + \frac{P_0}{N_{\max}} k_{2.2} \quad (4.10)$$

Параметр  $k_2$  можна використовувати для порівняння кривих, які було отримано за близьких умов досліду. Або можна зафіксувати коефіцієнт для впливу зіткнень агрегатів  $k_{2.2}$  і спостерігати за змінами  $k_{2.1}$ .

Нарешті, з урахуванням усіх вищезазначених особливостей, швидкості перетворень  $K_1$ ,  $K_2$  і  $K_3$  матимуть вигляд:

$$\left\{ \begin{array}{l} K_1 = k_1 \pi R_{pl}^2 \left( \frac{1 + N^{1/3}}{2} \right)^2 P_{act} A \\ K_2 = \begin{cases} k_2 \pi R_{pl}^2 (N - N_{end})^{2/3} \frac{P_0}{N_{\max}}, & N - N_{end} > 0 \\ 0, & N - N_{end} \leq 0 \end{cases} \\ K_3 = P_{act} (t / \tau), \quad \tau \geq t_{end} \end{array} \right. \quad (4.11)$$

На рис. 4.12 наведено залежності від часу усередненої кількості тромбоцитів в агрегаті  $N(t)$  та оптичної щільності  $D(t)$ , а також зображено експериментальні ряди точок, до яких наближаються вказані теоретичні криві. Відповідні значення шуканих параметрів  $k_1$ ,  $k_2$  і  $\tau$  та умови проведення досліду (температура  $T$ ) зазначено в Табл. 4.3. За температури  $T$  збагачену тромбоцитами плазму було витримано 10 хвилин перед початком досліду, до всіх зразків додавали як індуктор розчин АДФ концентрацією 5мкМ.

Умови досліду та параметри, розраховані за рівняннями (4.9)-(4.11) моделі для експериментальних даних, наведених на рис. 4.12.

	$T, ^\circ\text{C}$	$k_1, \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кл}^{-1}$	$k_2, \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кл}^{-1/3}$	$\tau, \text{с}$
Ряд 1	20	200	$3,5 \cdot 10^9$	$10 \cdot 10^3$
Ряд 2	37	740	$4,2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^3$
Ряд 3	29	1000	$5,0 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^3$

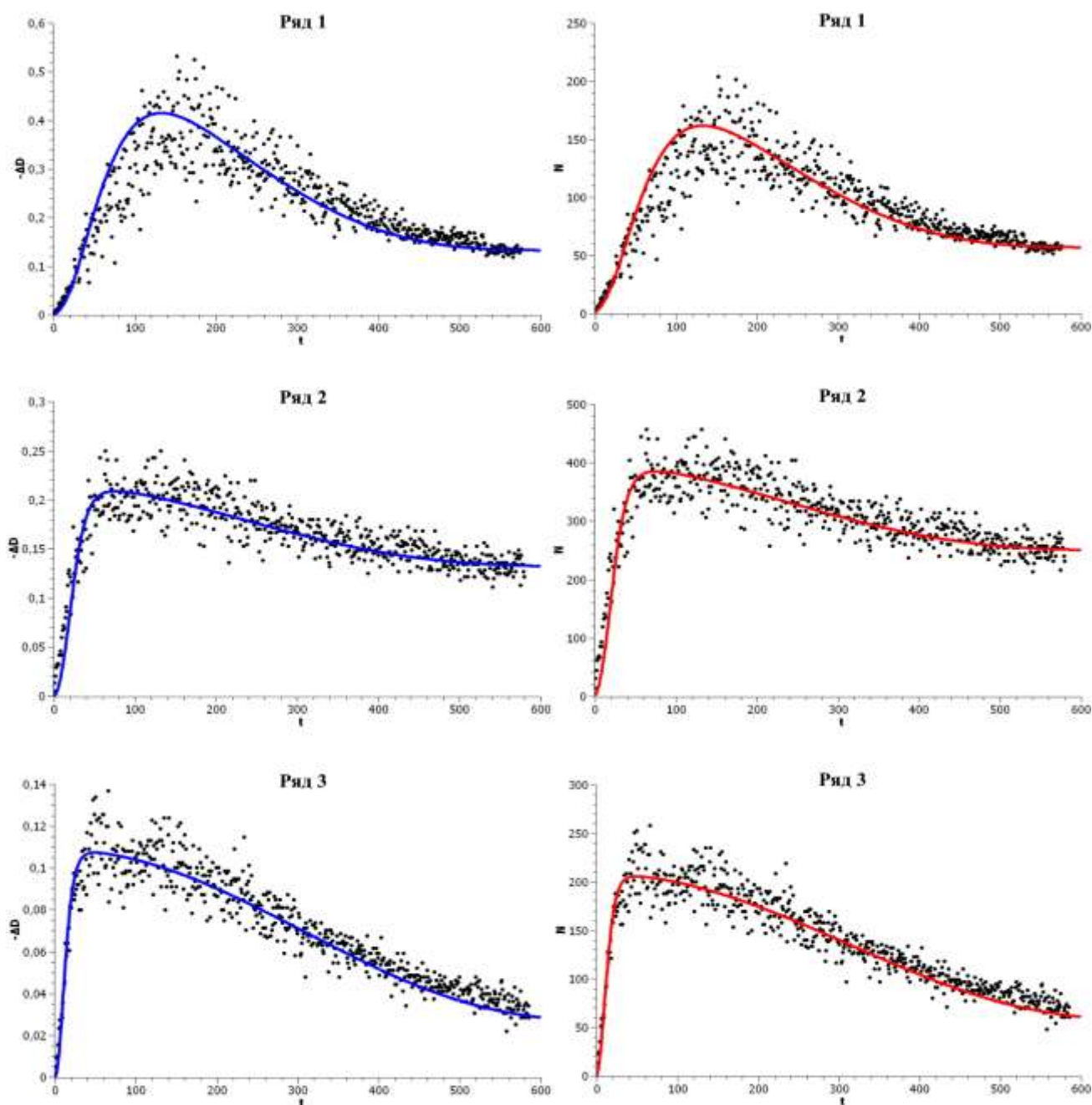


Рис. 4.12 Кінетичні залежності оптичної густини та кількості

тромбоцитів в агрегаті.

Експериментальні дані – точки, суцільні лінії – теоретичні криві, отримані оптимізацією параметрів моделі

Слід зазначити, що для різних кривих відбулася зміна  $k_1$  на один порядок, а  $k_2$  не більше, ніж на 60%. Тому через не дуже високу чутливість у разі необхідності виявлення невеликих ефектів бажано попередньо провести фільтрацію експериментальних даних.

Пропонована модель задовільно описує експериментальні залежності від часу величини агрегатів, отримані за допомогою світлової агрегометрії, і є придатною для дослідження оборотної агрегації тромбоцитів і особливо – фази дезагрегації клітин. Отримані залежності кінетичних констант дозволяють припустити, що у випадку розпаду агрегатів тромбоцитів, викликаного GS, механізм дезагрегації пояснюється інактивацією клітин при відриві з поверхні агрегату внаслідок розриву білкових з'єднань між клітинами при вбудовування GS в мембрани тромбоцитів.

#### **4.4 Морфологічна оцінка методом флуоресцентної мікроскопії адгезивної активності тромбоцитів при дії GS**

Оцінку адгезивної активності тромбоцитів проводили після забарвлення клітин сумішшю вітальних флуорохромних барвників - акридинового помаранчевого ( $\lambda_{ex}=460$  нм,  $\lambda_{em}=650$  нм) та трипафлавіну ( $\lambda_{ex}=460$  нм,  $\lambda_{em}=500$  нм). В пластикову пробірку додавали 100 мкл ЗТП, 50 мкл 5 мкМ розчину акридинового помаранчевого та 50 мкл 5 мкМ розчину трипафлавіну і поміщали на 10-15 хв у термостат при 37°C. Аліквоту забарвлених тромбоцитів переносили на предметне скло та накривали покривним склом. Мікроскопічні дослідження проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопу MicroMed XS-8530 (об'єктив  $\times 100$ , числова



апертура 1.25,  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ нм} - 490 \text{ нм}$ ), який було оснащено цифровою камерою DCM-900 9.0 Mpixels.

Характер та інтенсивність світіння прижиттєво забарвлених тромбоцитів можна спостерігати протягом тривалого часу (24-48 годин). Інтенсивність світіння тромбоцитів залежить від кількості в них секреторних  $\alpha$ -гранул та істотно вище інтенсивності світіння клітин без гранул. Тромбоцити з гранулами містять від 3 до 15 візуально помітних везикул діаметром 300 нм - 600 нм, які розподілені по всьому об'єму клітини та інтенсивно забарвлюються акридиновим помаранчевим (рис. 4.13). Тромбоцити без гранул не містять везикул або містять 1-2 менших розмірів гранули, які завжди пов'язані з клітинною оболонкою. Тромбоцити, прижиттєво пофарбовані трипафлавіном і акридиновим помаранчевим, зберігають свою адгезивну та агрегаційну здатність, яка залежить від кількості тромбоцитів, багатих на секреторні гранули.

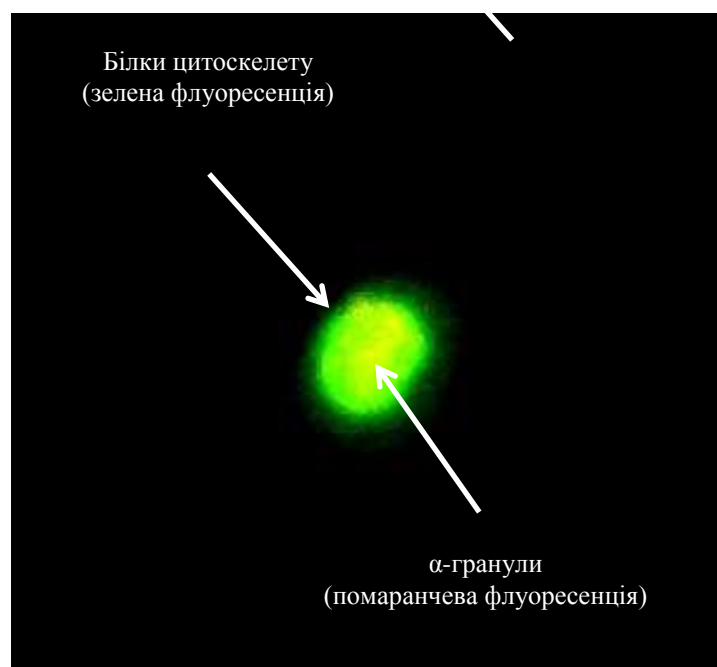


Рис. 4.13 Тромбоцит, забарвлений сумішшю акридинового помаранчевого та трипафлавіну ( $\times 10000$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 450-490 \text{ нм}$ ).

Встановлено, що короткотривала преінкубація (протягом 15 хвилин)

збагаченої тромбоцитами плазми у присутності граміцидину S призводить до зміни форми кривих АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів в залежності від концентрації антибіотика (рис. 4.14).

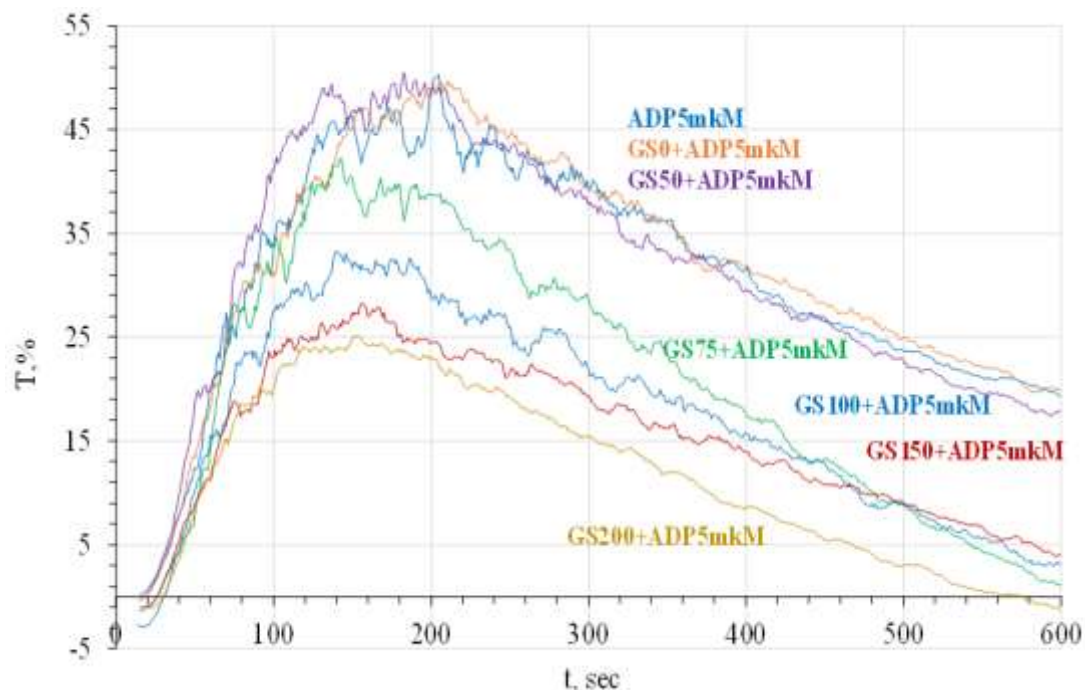


Рис. 4.14 Кінетика АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у інтактній ЗТП та після преінкубації з GS у діапазоні концентрацій від 0 до 200 мкг/мл.

Аналіз кривих АДФ-індукованої агрегації виявив, що граміцидин S у діапазоні концентрацій від 0 мкг/л до 50 мкг/л не впливає на ступінь агрегації тромбоцитів як у порівнянні з інтактними клітинами, так і у порівнянні з клітинами, які інкубували з розчинником (GS0). В той же час, у діапазоні концентрацій від 50 мкг/мл до 200 мкг/мл граміцидин S знижував ступінь агрегації тромбоцитів дозозалежним чином (рис. 4.15).

Залежність ступеня агрегації тромбоцитів T % від концентрації граміцидину S описується рівнянням лінійної регресії ( [GS] = 50 - 200 мкг/мл; коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r = 0,93$ ;  $p = 0,007$ ) ):

$$T, \% = -0,1717 \times [GS] + 58,304 .$$

Вплив граміцидину S на швидкість агрегації тромбоцитів залежно

від концентрації мав двофазний характер. В концентрації від 0 мкг/мл до 50 мкг/мл грамїцидин S збільшував швидкість агрегації у порівнянні з інтактними тромбоцитами (Контроль) та клітинами, які інкубували з розчинником (GS0). При застосуванні грамїцидину S в діапазоні концентрацій від 50 мкг/мл до 200 мкг/мл, навпаки, спостерігали дозозалежне зниження швидкості АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів (рис. 4.16).

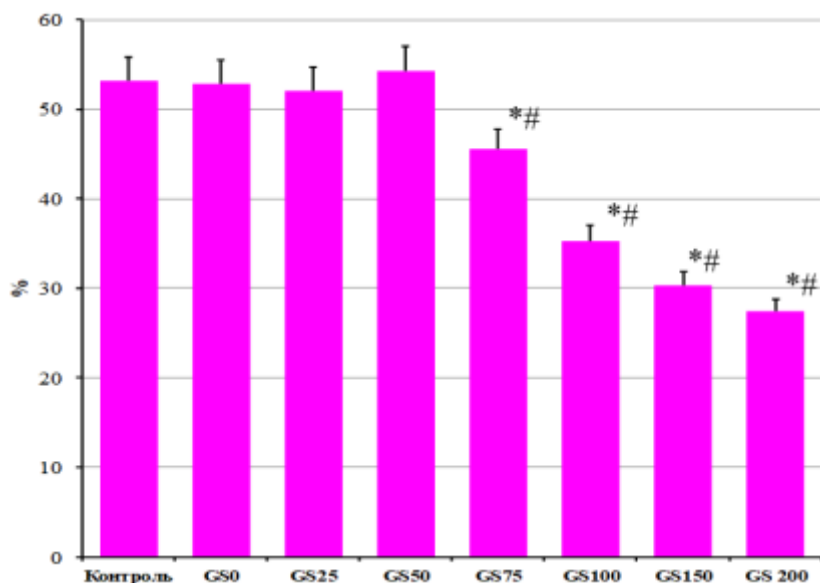


Рис. 4.15 - Вплив грамїцидину S у діапазоні концентрацій від 0 до 200 мкг/мл на ступінь АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

\* - статистично значущі відмінності у порівнянні з інтактним контролем;

# - статистично значущі відмінності у порівнянні з розчинником (GS0)

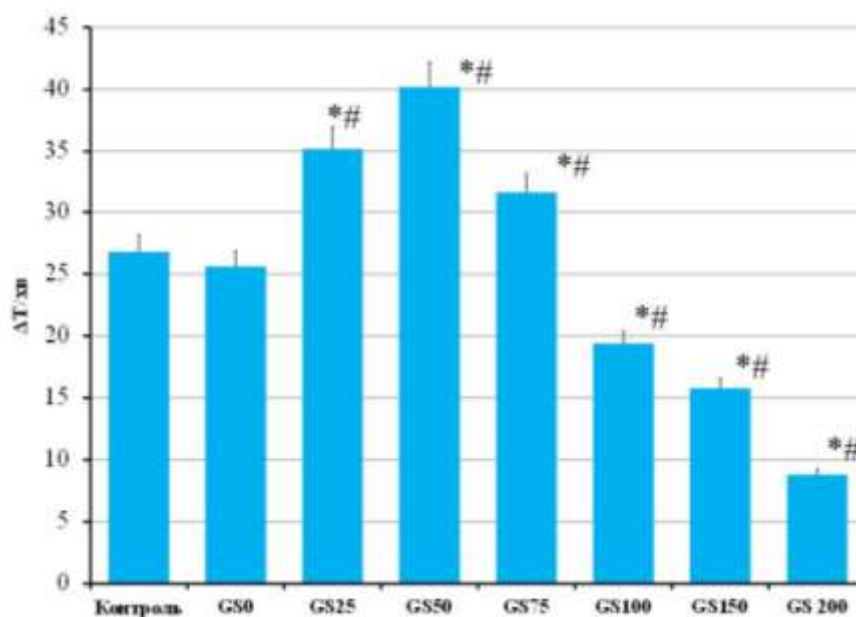


Рис. 4.16 Вплив граміцидину S у діапазоні концентрацій від 0 до 200 мкг/мл на швидкість АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

\* - статистично значущі відмінності у порівнянні з інтактним контролем;

# - статистично значущі відмінності у порівнянні з розчинником (GS0)

Залежність швидкості агрегації тромбоцитів від концентрації граміцидину S описується рівнянням лінійної регресії:

$$\text{Швидкість агрегації } (\Delta T/\text{хв}) = -0,1977[\text{GS}] + 45,898;$$

[GS] = 50 - 200 мкг/мл. Коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r = 0,94$ ;  $p=0,01$ ).

Встановлено, що граміцидин S не впливає на час агрегації (інтервал часу між додаванням АДФ та досягненням максимального значення світлопропускання) в жодній з досліджених концентрацій (рис. 4.17).

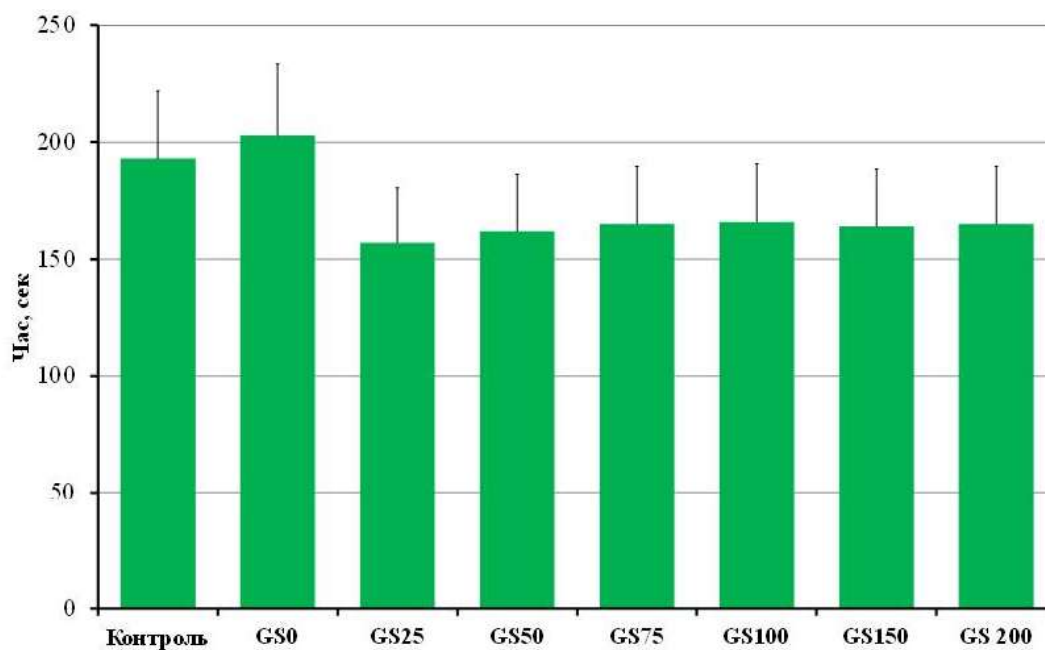


Рис. 4.17 - Вплив граміцидину S у діапазоні концентрацій від 0 мкг/мл до 200 мкг/мл на час АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

\* - статистично значущі відмінності у порівнянні з інтактним контролем;

# - статистично значущі відмінності у порівнянні з розчинником (GS0)

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено, що преінкубація збагаченої тромбоцитами плазми з граміцидином S в концентрації від 50 мкг/мл до 200 мкг/мл зменшує як ступінь, так і швидкість АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів. В той же час, граміцидин S в концентраціях до 50 мкг/мл збільшував швидкість агрегації, не впливаючи на її ступінь. Всі вивчені концентрації граміцидину S не впливали на час АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

Результати мікроскопічних досліджень адгезивної здатності тромбоцитів виявили, що інтактні тромбоцити, які попередньо були забарвлені вітальними флуоресцентними барвниками, після контакту з поверхню скла швидко, протягом 1-2 хвилин, змінюють свою морфологію. При цьому спостерігається реорганізація цитоскелету, утворення псевдоподій та вивільнення секреторних гранул (рис. 4.18, а).

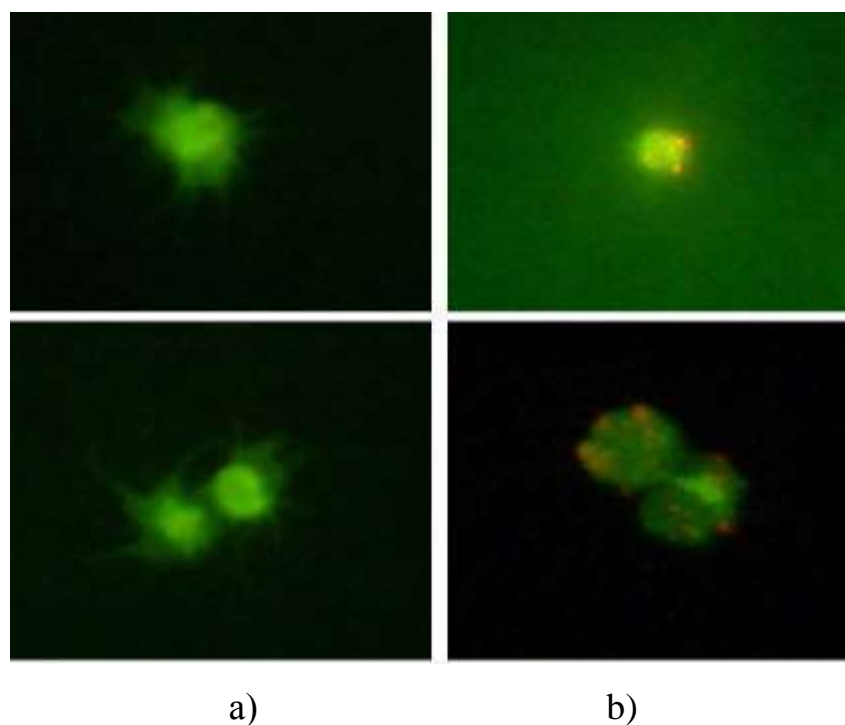


Рис. 4.18 Вплив граміцидину S на морфологічні зміни тромбоцитів під час адгезії на поверхні скла. Збільшення  $\times 10000$ .

a) – інтактні тромбоцити; b) – тромбоцити, які інкубували протягом 15 хв у присутності 100 мкг/мл граміцидину S при  $18^{\circ}\text{C}$

Інкубація тромбоцитів у присутності граміцидину S в концентрації 100 мкг/мл протягом 15 хвилин при  $18^{\circ}\text{C}$  призводило до значного порушення процесів адгезії. Оброблені тромбоцити більш тривалий час, до 10 хвилин, залишаються у стані суспензії. Змінюється нативна дископодібна форма тромбоцитів, але морфологічно виражених псевдоподій, які утворюють міцні контакти з поверхню скла, не формується. Секреторні гранули мігрують до внутрішньої поверхні плазматичної мембрани клітин, але їх секреція дуже сповільнена (Рис 4.18, b).

#### **4.5 Вплив динамічного стану мембранних ліпідів на взаємодію GS з тромбоцитами**

##### **4.5.1 Вплив перекисного окиснення ліпідів мембран**

тромбоцитів на взаємодію з ними грамїцидину S

У підрозділах 4.1, 4.2, 4.4 було досліджено вплив пептиду грамїцидину S на тромбоцити людини. Показано, що вплив грамїцидину S на тромбоцити залежить від концентрації GS. Додавання GS до тромбоцитів індукує два процеси: набухання тромбоцитів, а зі збільшенням концентрації GS – активацію тромбоцитів. Механізм активації тромбоцитів грамїцидином опосередковано іонами  $Ca^{2+}$ . Однак така активація тромбоцитів не призводить до агрегації тромбоцитів. Після дії GS на тромбоцити останні не втрачають здатності до агрегації. Дія GS на клітини має неспецифічний характер.

Додавання грамїцидину S до тромбоцитів, що проагрегували, спричиняє розпад агрегатів тромбоцитів. Ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів пропорційна концентрації розчину GS і залежить від температури. Останнє пояснюється різною швидкістю взаємодії молекули GS з мембраною, що визначається різною рухливістю ліпідів за різних температур. Зокрема, було показано, що за наявності й тривалістю «лаг-періоду» після додавання GS до тромбоцитів, що проагрегували, можна непрямо говорити про рухливість ліпідів у мембранах тромбоцитів. Звичайно, при зміні стану ліпідного бішару буде змінюватися і взаємодія з ним молекули GS.

У цьому підрозділі ми здійснюємо спробу встановити, як взаємодія GS з тромбоцитами залежить від стану ліпідів мембрани, що модифікувався перекисним окисленням та гамма-опроміненням. Такі дані дозволяють краще зрозуміти механізм впливу GS на тромбоцити, який досі не обговорювався в літературі. З іншого боку, вивчення взаємодії GS з тромбоцитами та факторів, що впливають на цю взаємодію, дозволить, в принципі, вирішувати інше завдання – визначати стан ліпідів мембран тромбоцитів на підставі аналізу взаємодії GS з тромбоцитами та його

впливу на дезагрегацію тромбоцитів. Такі дослідження зручно проводити разом із вивченням агрегації тромбоцитів.

Відомо, що процес ПОЛ значно впливає на стан ліпідного компонента мембран. Зокрема, прооксиданти розпушують ліпідний бішар, підвищуючи швидкість реакцій, які залежать від дифузії молекул у ліпідний бішар. Антиоксиданти, навпаки, зміцнюють ліпідний бішар, знижуючи швидкість таких реакцій [198-200]. Для того, щоб перевірити, чи буде взаємодія GS з мембранами тромбоцитів залежати від процесу ПОЛ у мембранах, ми дослідили вплив преінкубації тромбоцитів з про- (аскорбат та іони  $Fe^{2+}$  [198]) та антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферол [199]) на ступінь і швидкість розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS (попередню агрегацію спричиняло додавання основних фізіологічних індукторів агрегації тромбоцитів – АДФ чи адреналіну до зразка ЗТП).

Виходячи з даних, наведених на рис. 4.19, ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів, преінкубованих з аскорбатом та іонами  $Fe^{2+}$ , збільшується порівняно з контролем; швидкість розпаду агрегатів у при цьому також підвищувалася. Прооксиданти розпушують бішар, полегшуючи вбудовування граміцидину S в мембрану.

У роботі [187] показано, що попередня інкубація тромбоцитів у плазмі протягом 15 хвилин з 20 мМ аскорбіновою кислотою і 480 мМ сіллю Мора призводить до збільшення швидкості та ступеня АДФ-індукованої агрегації порівняно з агрегацією інтактних тромбоцитів, а преінкубація ЗТП протягом 15 хвилин з  $\alpha$ -токоферолом (кінцева концентрація 1 мкг/мл) призводить до зниження цих показників. Інкубація з аскорбіновою кислотою та сіллю Мора спричиняє зміщення максимуму ступеня агрегації в ділянку більш високих температур та його розширення; інкубація з  $\alpha$ -токоферолом – до звуження максимуму й зміщення його в нижчу ділянку порівняно з контролем (АДФ-індукована агрегація інтактних тромбоцитів) температур. Аналогічні зміни в положеннях максимумів відзначено для швидкостей агрегації. Розмір (інтенсивність) максимуму ступеня агрегації



після інкубації з  $\alpha$ -токоферолом падає, а після інкубації з аскорбатом та сіллю Мора – зростає. Аналогічно й для швидкості – інтенсивність максимуму швидкості зростає при індукції перекисного окислення ліпідів і зменшується при інкубації з  $\alpha$ -токоферолом.

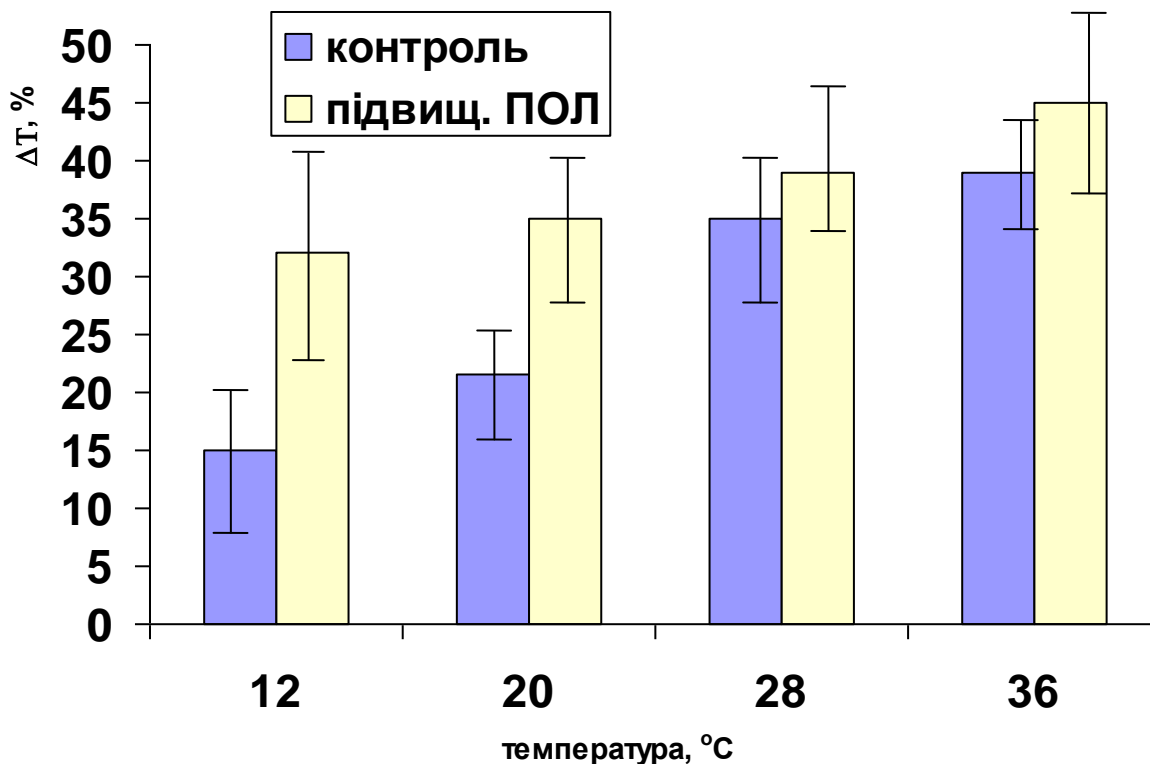


Рис. 4.19 Залежність ступеня ( $\Delta T$ ) розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS від температури для нативних тромбоцитів і тромбоцитів, преінкубованих протягом 15 хвилин з прооксидантом (аскорбат +  $\text{Fe}^{2+}$ )\*\*. Агрегацію тромбоцитів, що передувала додаванню GS, спричиняла АДФ ([АДФ]=0,18 мг/мл; [GS]=8,3 мкмоль/л).

Базальний рівень МДА в тромбоцитах становив  $1,38 \pm 0,05$ , індукований –  $4,15 \pm 0,78$  нмоль/10<sup>9</sup> тромбоцитів. \*\*Достовірно відрізнялися від контролю ступеня розпаду агрегатів при 12 і 20°C ( $p < 0,05$ )

Вплив попередньої інкубації ОТП з  $\alpha$ -токоферолом (ТФ) на ступінь розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS має більш складний характер, ніж у разі преінкубації ОТП з прооксидантами (рис. 4.20). До  $\sim 20^\circ\text{C}$

преінкубація ЗТП з ТФ веде до збільшення ступеня розпаду агрегатів тромбоцитів порівняно з контрольними тромбоцитами. Після 20°C ступінь розпаду агрегатів, утворених тромбоцитами, преінкубованими з ТФ, стає меншим за ступінь розпаду агрегатів, утворених нативними (контрольними) тромбоцитами, тобто ТФ по-різному впливає на ліпиди при  $T > T_{кр}$  і  $T < T_{кр}$ .

Аналогічний вплив на ліпідний бішар мембран має холестерин. Вбудовування холестерину у фосфоліпідний бішар спричиняє як порушення квазикристалічної упаковки жирнокислотних ланцюгів за нормальної температури, нижчої за  $T_{кр}$ , і зменшення рухливості (зростання впорядкованості) ланцюгів за нормальної температури, вищої за  $T_{кр}$ .

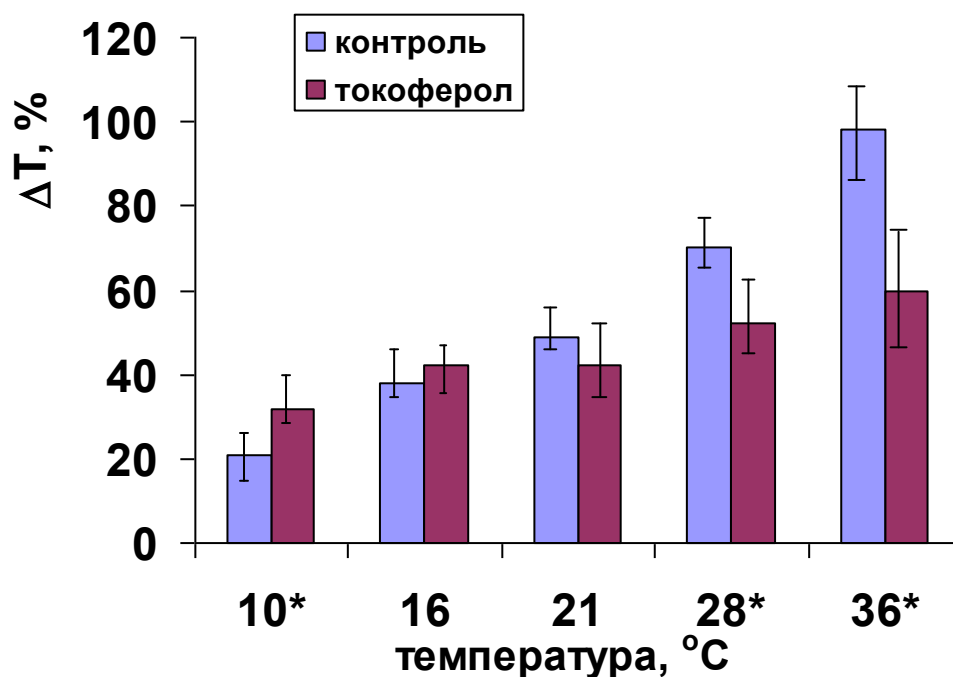


Рис. 4.20 Залежність ступеня ( $\Delta T$ ) розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS від температури для нативних тромбоцитів і тромбоцитів, преінкубованих протягом 15 хвилин з  $\alpha$ -токоферолом.

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

\*Достовірно відрізнялися від контролю ступеня розпаду агрегатів при 10, 28 і 36°C ( $p < 0,05$ ).

Показано, що при температурі 37°C додавання холестерину зменшує еластичність мембрани тромбоциту, а також знижує концентрації спінового зонда, що додається до мембрани, при якій спостерігаються міжмолекулярні взаємодії спінових зондів у мембрані тромбоциту. Автори роблять висновок, що ділянки, збагачені холестерином та збіднені на нього, існують у мембранах тромбоцитів за фізіологічних температур [89].

Ступінь і швидкість дезагрегації викликаної GS, вищі для агрегатів, утворених тромбоцитами, попередньо інкубованими з прооксидантами. Більш високі показники дезагрегації тромбоцитів, попередньо інкубованих з прооксидантами, вказують на те, що GS може легко вбудовуватись в мембрани тромбоцитів. Це добре узгоджується з теорією: перекисне окислення ліпідів призводить до підвищення плинності мембрани і до утворення дефектів упаковки в ліпідному бішарі; збільшується швидкість дифузійних процесів у мембранах, що полегшує включення GS в мембрану.

#### 4.5.2 Гамма-опромінення тромбоцитів *in vitro* під впливом вбудовування GS у мембрани кров'яних пластинок

Ще одним фізичним фактором, що впливає на рухливість та щільність упаковки ліпідів мембран, є іонізуюче випромінювання. Відомо, що агрегаційна здатність тромбоцитів значно змінюється залежно від дози опромінення. При цьому ступінь агрегації тромбоцитів, опромінених у дозах, менших за 200 Гр вищий, ніж у неопромінених, а при більш високих дозах – нижчий. Максимальну агрегацію тромбоцитів спостерігаємо при опроміненні в дозах 30–50 Гр і вищих, ніж у контролю в 1,2–1,5 раза [48,201]. При дії іонізуючого випромінювання в дозах до 50 Гр відбуваються зміни в структурі мембран тромбоцитів, які полегшують взаємодію молекул індуктора з мембранними рецепторами та

прискорюють активацію тромбоцитів. Зниження ступеня агрегації тромбоцитів в інтервалі доз опромінення 50–250 Гр пов'язують із поступовою дезактивацією рецепторів тромбоцитів. При більших дозах іонізуючого опромінення зменшується ступінь агрегації тромбоцитів, їх концентрація та кількість фібриногену в плазмі [201].

Схожі зміни функціональної активності тромбоцитів було відзначено при гамма-опроміненні, крім того автори відзначають, що серед інших клітин крові тромбоцити найбільш чутливі до впливу гамма-опромінення при опроміненні дозами 0,25–5 Гр, функціональна стимуляція тромбоцитів спостерігалася при опроміненні в дозах від 2 Гр та вищих [204].

Відзначено зменшення в'язкості мембран лімфоцитів на 37% та зменшення впорядкованості мембрани порівняно з контролем за даними флуоресценції зонда ДФГТ при опроміненні клітин малими дозами нейтронного опромінення  $^{252}\text{Cf}$  *in vitro*. Коефіцієнти латеральної дифузії ліпідів у плазматичних мембранах нативних тромбоцитів та еритроцитів людини становили при цьому  $4,5 \times 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/с та  $8,2 \times 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/с відповідно [202]. Автори [203] відзначають хімічну деградацію фосfolіпідів мембран при гамма-опроміненні. Гамма-опромінення  $^{60}\text{Co}$  дозами 4–8 Гр і потужністю дози 0,1–1 Гр / хв біологічних мембран призводило до зміни мембранних білків, окислення ненасичених ліпідів і порушення полярності ліпідного бішару [205]. Автори за допомогою флуоресцентних зондів виявили флюїдизацію мембран опромінених клітин унаслідок переокислення мембранних ліпідів, розрідження мембрани зберігалася протягом години після опромінення. Автори також відзначили розупорядкування ліпідів мембран при опроміненні клітин унаслідок переокисного окислення [206].

У роботі [207] показано за допомогою флуоресцентних зондів, що гамма-опромінення клітин крові людини призводить до радіаційно-індукованих змін мембран клітин. Відзначено збільшення текучості ліпофільної фази мембрани з одночасним посиленням жорсткості ліпід-

білкової поверхні мембрани. Зміни мікродоменної організації мембран пов'язують не тільки з проникненням води в товщу бішару при окисленні, спричиненому опроміненням, але й зі зміною складу та перерозподілом компонентів мембрани. Такі зміни запропоновано використовувати для ранньої діагностики радіаційних ушкоджень клітинних мембран.

Ми використали гамма-опромінення ЗТП дозами від 1 до 25 кР для модифікації мембран клітин та вивчили дезагрегацію тромбоцитів під дією граміцидину S за різних температур у ділянці 4–40°C. Було встановлено, що агрегати, утворені опроміненими тромбоцитами, менш міцні. Справа не тільки в прискоренні вбудовування GS в опромінені тромбоцити, а саме в ослабленні міцності агрегатів, навіть ступінь розпаду агрегатів для нативних тромбоцитів значно менший.

На рис. 4.21 наведено залежність оптичної щільності ЗТП від плинучого часу для розпаду агрегатів під дією граміцидину S. Агрегати було утворено нативними тромбоцитами або тромбоцитами, що зазнали опромінення. На кінетичних кривих оптичної густини нативної ЗТП при дезагрегації спостерігався лаг-період, тобто затримка між додаванням GS до ЗТП та початком розпаду агрегатів. З підвищенням температури тривалість лаг-періоду зменшувалася. Для опромінених тромбоцитів (як 3, так і 5 кР) лаг-періоду не було навіть при температурі 8°C. Отже, вбудовування GS у мембрани опромінених тромбоцитів відбувається швидше, ніж у мембрани неопромінених. Таким чином, гамма-опромінення ЗТП призводить до розпушення мембран тромбоцитів (за рахунок утворення дефектів упаковки при утворенні продуктів ПОЛ). Відмінності у взаємодії граміцидину S з опроміненими та неопроміненими тромбоцитами більш помітні при температурах, вищих за 15–20°C.

На рис. 4.22 наведено деякі залежності ступеня (і швидкості) розпаду агрегатів під дією GS для інтактних тромбоцитів та тромбоцитів, опромінених у дозах 1, 3, 5 та 25 кР. Як видно із рис. 4.21 і 4.22, швидкість розпаду агрегатів тромбоцитів, утворених опроміненими тромбоцитами,

набагато вища, ніж швидкість розпаду агрегатів тромбоцитів, утворених інтактними клітинами. Для всіх доз різниця між опроміненими та неопроміненими тромбоцитами ставала помітнішою при підвищенні температури.

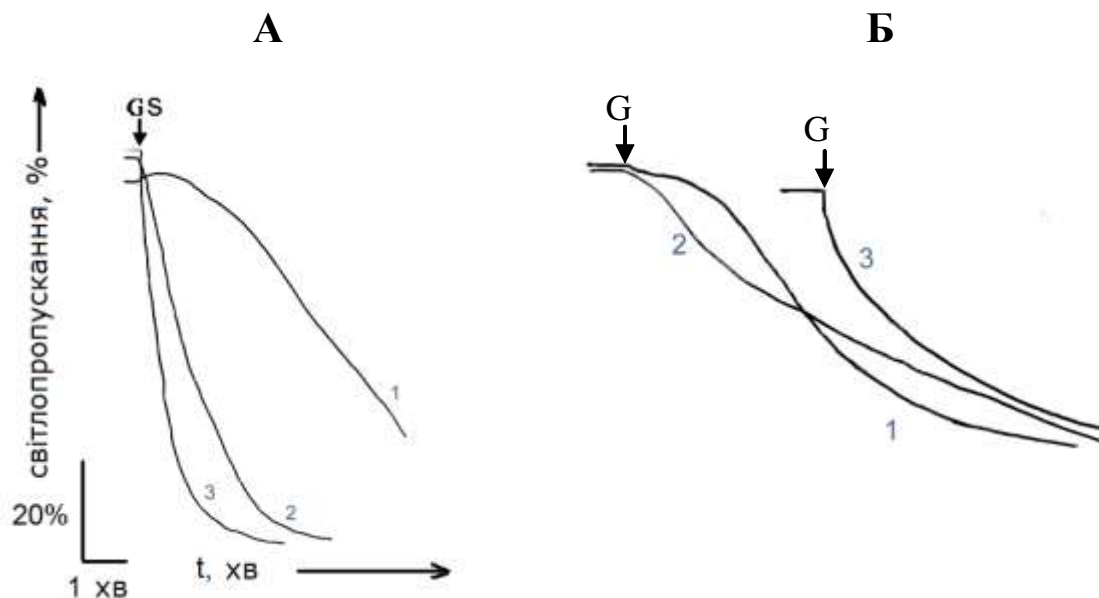


Рис. 4.21. Зміна світлопропускання зразка ЗТП під дією GS з плином часу для інтактних тромбоцитів (1, 1a) та тромбоцитів, опромінених *in vitro* у дозах 3 (2), 5 (3), 2 (4) та 20 (5) кР.

GS додавали до ЗТП через 9 хвилин після початку АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів. Концентрація GS –  $4,15 \times 10^{-6} \div 16,6 \times 10^{-6}$  моль/л, АДФ – 0,18 мг/мл. Агрегація та GS-індукований розпад агрегатів відбувалися при температурі 8° (криві 1, 2, 3) і 16°С (криві 1a, 4, 5). Криві 1, 2, 3 та 1a, 4, 5 отримано для двох різних зразків ЗТП.

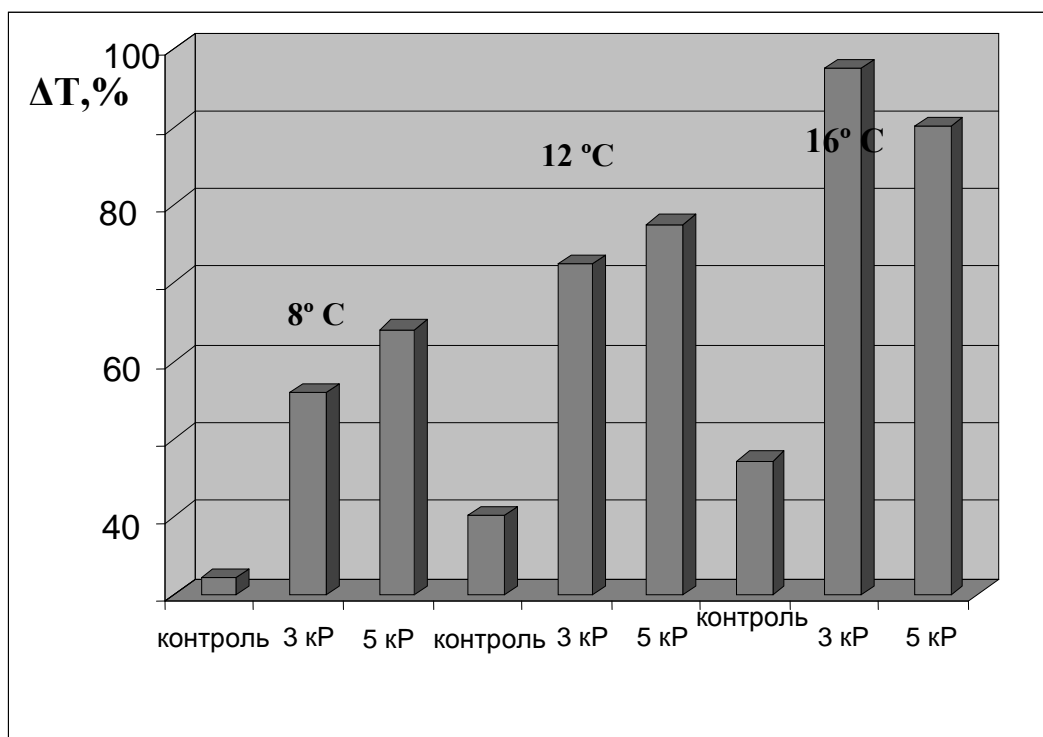
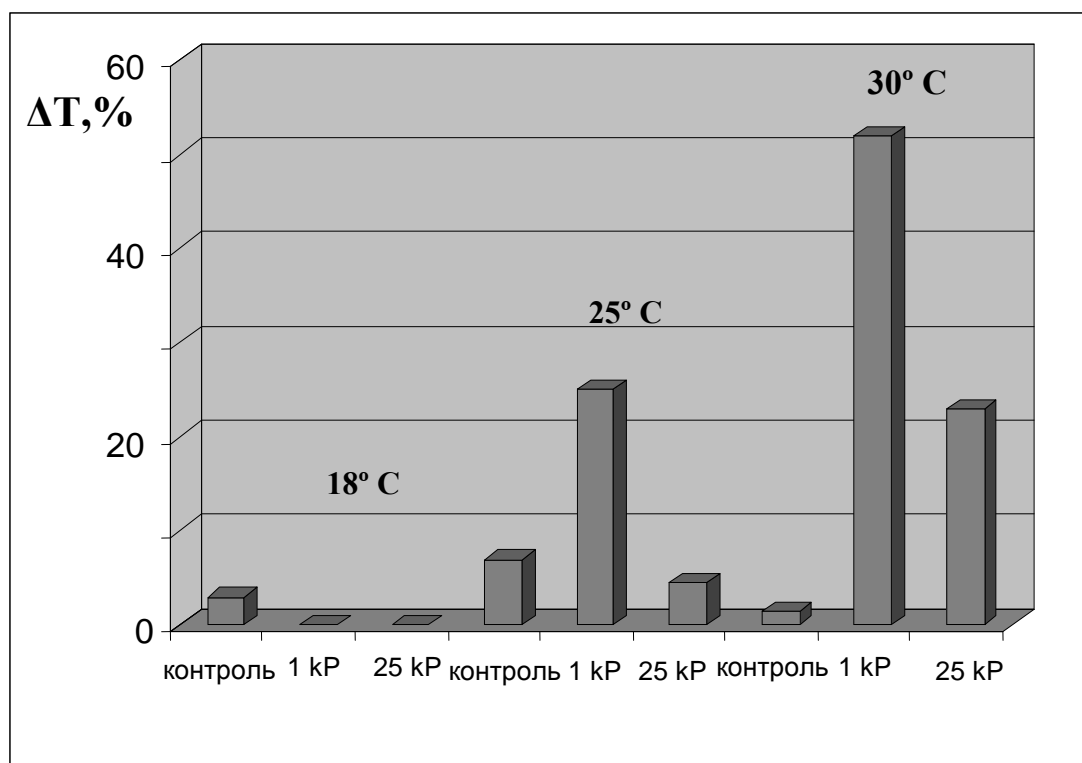


Рис. 4.22 Вплив температури на дезагрегацію тромбоцитів під дією GS для нативних та опромінених тромбоцитів у дозі 3 та 5  $\mu\text{g}$ .  $[\text{GS}] = 8,3 \times 10^{-6}$  моль/л.



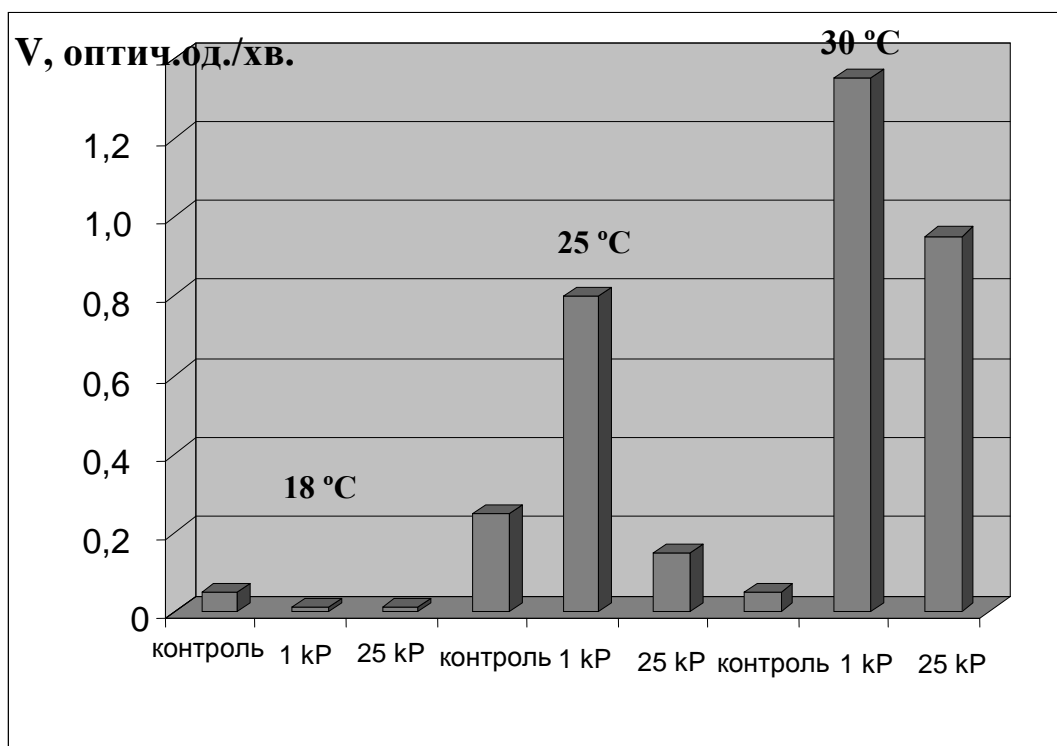


Рис. 4.23 Залежності ступеня ( $\Delta T$ , вгорі) та швидкості ( $V$ , внизу) розпаду агрегатів тромбоцитів під дією GS від температури для нативних тромбоцитів та тромбоцитів, опромінених у дозі 1 та 25 кР. (Умови опромінення та реєстрації як і на рис. 4.22).

На рис. 4.24 наведено сумарну залежність ступеня граміцидин-індукованого розпаду агрегатів тромбоцитів від дози опромінення суспензії клітин. Залежності було отримано за кількох температур. Щоб можна було порівнювати результати, отримані в різних серіях дослідів з різними зразками ЗТП і різними концентраціями GS (концентрації GS варіювалися для різних зразків ЗТП, але різниця в концентраціях була не більшою за 10%), усі величини ступенів розпаду агрегатів нормалізувалися. Як показник ступеня розпаду агрегатів ми брали відношення ступеня розпаду агрегатів, утворених опроміненими тромбоцитами, до ступеня розпаду агрегатів, утворених інтактними тромбоцитами (при однаковій температурі, концентрації агрегації індуктора і GS). Контроль кількості клітин у зразку проводили вимірюванням світлопропускання суспензії тромбоцитів. Як видно із



рис. 4.24, середні дози (2÷5 кР) мають найбільш сильну невпорядковану дію на ліпіди, високі дози радіації в деяких випадках навіть зміцнюють ліпіди

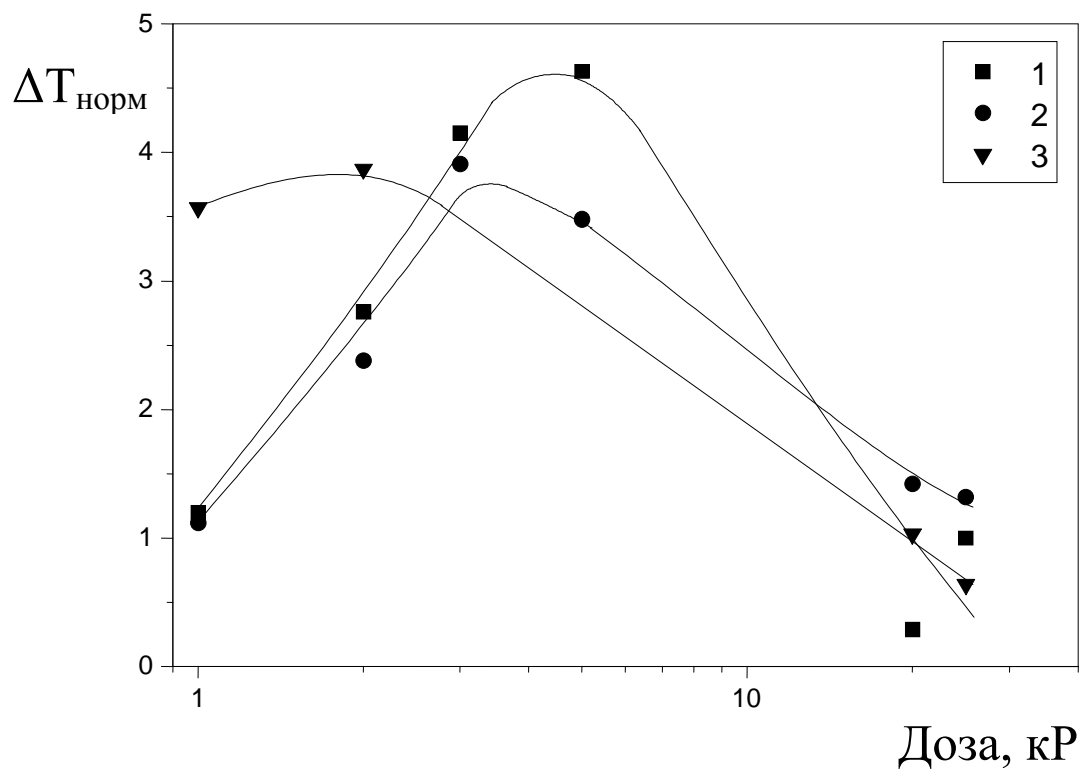


Рис. 4.24. Залежності нормалізованого ступеня розпаду агрегатів ( $\Delta T_{\text{норм}}$ ) тромбоцитів під дією GS від дози опромінення.

Агрегацію тромбоцитів, що передувала додаванню GS, спричинила АДФ ( $[АДФ]=0,18$  мг/мл,  $[GS]=8,3 \times 10^{-6}$  моль/л).  $\Delta T_{\text{норм}}$  визначали як відношення ступеня розпаду агрегатів, утворених опроміненими тромбоцитами, до ступеня розпаду агрегатів, утворених інтактними тромбоцитами (при однаковій температурі, концентрації індуктора агрегації та GS), тобто:  $\Delta T_{\text{норм}} = \Delta T_{\text{irrad}}(t_i) / \Delta T_{\text{intact}}(t_i)$ , де  $\Delta T_{\text{irrad}}(t_i)$  – ступінь розпаду агрегатів, утворених при даній температурі  $t$  опроміненими тромбоцитами,  $\Delta T_{\text{intact}}(t_i)$  – ступінь розпаду агрегатів, утворених за цієї ж температури  $t$  інтактними тромбоцитами того самого донора.

Аналогічні результати було отримано раніше іншими методами [201]. З підвищенням температури максимум розпаду агрегатів зміщується до більш низьких доз, тобто при підвищенні температури більш низькі дози опромінення спричиняють значне розупорядкування ліпідного бішару, що полегшує вбудовування молекул GS. Імовірно, у цьому разі спостерігається синергізм впливу температури та іонізуючого випромінювання на стабільність ліпідного бішару мембран тромбоцитів.

#### **Висновки до розділу 4**

Детальний аналіз впливу пептидного антибіотика GS на тромбоцитарну ланку згортуючої системи крові свідчить, що граміцидин S викликає наступні зміни структурно-функціональних характеристик тромбоцитів людини – зміну форми інтактних тромбоцитів: набухання клітин, а у концентраціях вищих за 7,5 мкмоль/л – сферуляцію тромбоцитів. Припущено, що механізм дії опосередкований іонами  $Ca^{2+}$ . Зміна форми тромбоцитів під впливом GS не залежить від процесу агрегації.

Граміцидин S в концентрації від 50 мкг/мл до 200 мкг/мл зменшує як ступінь, так і швидкість АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів дозозалежним чином. Тоді як, в концентраціях від 25 мкг/мл до 50 мкг/мл граміцидин S збільшує швидкість агрегації не впливаючи на її ступінь. Граміцидин S у всіх досліджених концентраціях не впливав на час АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів. Інкубація тромбоцитів у присутності граміцидину S в концентрації 100 мкг/мл призводить до зниження їх адгезивної здатності, яке виражається у гальмуванні вивільнення секреторних гранул, порушеннях у реорганізації цитоскелету та формуванні псевдоподій при контакті з поверхнею скла.

Встановлено, що GS спричиняє розпад агрегатів тромбоцитів.

Швидкість взаємодії грамїцидину S з мембраною клітин залежить від температури та визначається рухливістю ліпідів мембрани. Показано можливість визначення фазових переходів ліпідів мембран клітин оптичним методом за допомогою грамїцидину S. Запропоновано метод вивчення стану ліпідного бішару клітинних мембран з використанням антибіотика грамїцидину S.

Для вивчення механізму взаємодії циклічного поліпептидного антибіотика грамїцидину S з клітинними мембранами з використанням методу турбідиметрії було проведено дослідження впливу модифікації ліпідного бішару мембран тромбоцитів на параметри зв'язування грамїцидину S з кров'яними пластинками. У роботі розглянуто процес дезагрегації нативних та гамма-опромінених дозами 10–250 Гр тромбоцитів при дії грамїцидину S, також вивчено вплив перекисного окислення ліпідів мембран та антиоксидантів на характер розпаду агрегатів тромбоцитів під дією антибіотика за різних температур в ділянці 8–37°C. Показано, що розпушення ліпідного бішару мембран тромбоцитів продуктами перекисного окислення призводить до полегшення вбудовування грамїцидину,  $\alpha$ -токоферол має як розупорядковуючу, так і конденсуючу дію на мембрану клітин залежно від температури середовища. Гамма-опромінення тромбоцитів *in vitro* дозами 3–5 Гр призводить до найбільшого розпушування мембран клітин, що оцінюється за ступенем і швидкістю дезагрегації, спричиненої грамїцидином S. Зроблено висновок про провідну роль механізму зв'язування грамїцидину S з мембраною щільності упаковки ліпідів у бішарі. Результати цієї роботи дозволяють використовувати пептидний антибіотик грамїцидин S як індикатор, чутливий до фазового стану ліпідів у біологічних мембранах. Можливість проводити такі дослідження паралельно із дослідженням агрегації тромбоцитів може бути додатковою перевагою цього методу.

Для задовільного опису оборотної агрегації тромбоцитів було

використано корегування доданку дезагрегації та уведено додатковий параметр, що відповідає інактивації. Цей параметр, як і спосіб задання доданку інактивації має значно менший вплив на залежності, ніж кінетичні константи, тому можна не враховувати його часову залежність.

Кількісне відображення перебігу агрегації визначається величиною кінетичної константи  $k_1$  та значенням параметра  $k_2$ , який є збірною характеристикою інактивації внаслідок спонтанного відривання тромбоцитів з поверхні агрегатів та їх руйнування через зіткнення.

Наші результати показують, що GS активний не тільки проти еритроцитів, але й проти інших клітин крові (тромбоцитів). Розрахункову кількість молекул GS на  $1 \text{ мм}^2$  клітини крові (еритроцитів і тромбоцитів крові), необхідних для індукування гемолізу та дезагрегації, можливо порівняти. Ці результати необхідно враховувати при розробці нових антимікробних аналогів GS зі зниженими гемолітичними властивостями.

Охарактеризовано особливості впливу грамїцидину S на функціонування тромбоцитарної ланки системи гемостазу. Встановлено, що GS викликає сферуляцію та активацію тромбоцитів, опосередковану іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Грамїцидин S порушує роботу згортаючої системи крові зменшуючи дозозалежним чином як ступінь, так і швидкість агрегації тромбоцитів, призводить до зниження їх адгезивної здатності, реорганізації цитоскелета 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.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [1], [5], [6], [9], [17], [18], [19], [20], [25], [27], [28], [29].

## РОЗДІЛ 5

### МОДУЛЯЦІЯ ВЗАЄМОДІЇ ЦИКЛОПЕПТИДУ GS З ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ

#### 5.1 Гемоліз еритроцитів під дією граміцидину S

Системне використання GS як антибактеріального препарату ускладнено через високу гемолітичну активність пептидного антибіотика. Антибактеріальну дію можуть мати також комплекси GS з полімерним переносником декстраном і з деякими пептидами – наприклад, амфотерицином В (цікаво, що в цьому разі комплекс двох пептидів не спричиняв лізису клітин ссавців).

Відомо, що GS зумовлює гемоліз еритроцитів. Взаємодія пептиду з мембраною спочатку призводить до невеликого пошкодження, що призводить до виходу гемоглобіну з клітини. Зі зростанням концентрації антибіотика ступінь ушкодження збільшується, і за певної концентрації GS порушується структурна цілісність ліпідного бішару.

При розробці нових лікарських препаратів, які є похідними GS, тест на гемолітичну активність є необхідною складовою разом із перевіркою їхньої антибактеріальної активності.

При цьому відмінності в гемолітичній та антибактеріальній активності GS та його похідних дозволяють зрозуміти роль конформації та амінокислотної послідовності молекули GS у його антибактеріальній дії та виробити стратегію синтезу антимікробних препаратів із заданими властивостями. Зокрема, у роботі [103] було показано, що при заміні Orn на Lys антимікробна та гемолітична активність похідних GS повністю зникає. Не мають антимікробної та гемолітичної дії також і лінійні аналоги GS [104]. У низці циклічних аналогів GS їх активність залежала від довжини поліпептидного ланцюга: пептиди, що містять до 10 АК залишків, не мали гемолітичної та антимікробної дії; пептиди, що містять

12 і 14 АК залишків, разом зі збільшенням антимікробної активності мали й підвищену літичну дію. 12-АК аналоги GS мали оптимальне співвідношення високої антимікробної активності та низької гемолітичної [118]. Автори [109] також показали, що для молекул – аналогів грамїцидину існує кореляція між їх антимікробними та гемолітичними властивостями. Крім того, серед досліджених аналогів GS, що містять 4–14 амінокислотних залишків, тільки декапептиди були активні як щодо грам-позитивних, так і грам-негативних бактерій, що свідчить про те, що специфічна структура  $\beta$ -складчастого листа важлива для взаємодії GS з мембранами.

Однак, незважаючи на широкий інтерес до використання антибіотика GS та його аналогів як антимікробних препаратів, безпосередньо гемоліз еритроцитів під дією GS та його залежність від різних факторів вивчено недостатньо. Проводилося лише якісне порівняння гемолітичної активності GS та його похідних. З іншого боку, у низці робіт, присвячених взаємодії GS з модельними і біологічними мембранами, використовували досить високі концентрації GS – набагато вищі, ніж концентрації, що спричиняють гемоліз еритроцитів [113], тому метою цієї роботи є насамперед вивчення гемолізу еритроцитів під впливом GS і чинників, що можуть впливати на гемолітичну активність GS.

Структурно-функціональний стан мембран еритроцитів здорових донорів та донорів з різними патологіями оцінювали за результатами дослідження їхньої ліпідної фракції, що включало визначення складу жирних кислот фосфоліпідів та вмісту вільного холестерину [14]. Вміст в еритроцитах вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) аналізували за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) [200].

Додавання розчину GS до суспензії еритроцитів спричиняє ушкодження мембран клітин, що призводить до гемолізу еритроцитів. Типові криві гемолізу еритроцитів під дією GS, як і в разі

кислотного гемолізу, мають S-подібну форму. Зі збільшенням концентрації GS зростає швидкість гемолізу еритроцитів та зменшується час повного гемолізу (рис. 5.1). У дослідженому інтервалі концентрацій GS залежності швидкості та часу гемолізу еритроцитів від концентрації гемолітика (GS) мають практично лінійний характер як за кімнатної (20 °C), так і за високої (37 °C) температури. При надлишку гемолітика час повного гемолізу  $\rightarrow 0$ , при цьому швидкість  $\rightarrow \infty$ , тому ми підбирали концентрації антибіотика, що дозволяють кількісно досліджувати кінетику процесу гемолізу.

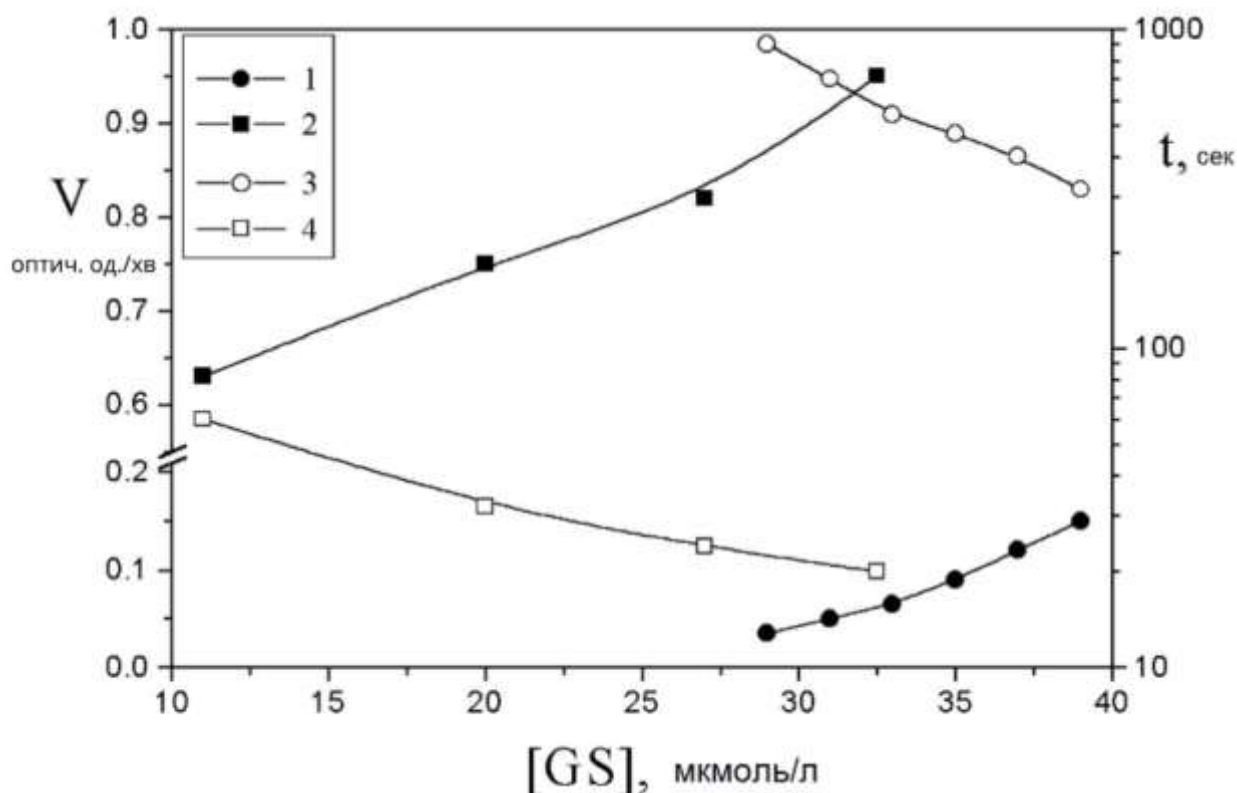


Рис. 5.1. Залежність швидкості  $V$  (1, 2) і часу  $t$  (3, 4) гемолізу еритроцитів під дією GS від концентрації GS в розчині. Температура 20 °C (1, 3) та 37 °C (2, 4).

На рис 5.2 (А, В) наведено інтегральні та диференційні криві гемолізу еритроцитів під дією GS, отримані за різних температур. Як видно із рис. 5.2, при низькій температурі в суспензії наявні 2 основні фракції еритроцитів, що розрізняються за стійкістю до гемолітика (GS) і гемолізують в різний час (через  $\sim 40$  та  $\sim 70$  с після початку гемолізу). Зі зростанням температури змінюється диференційна крива гемолізу, що

свідчить про зміну розподілу еритроцитів за стійкістю до гемолізу. При цьому популяція еритроцитів стає більш однорідною й значно збільшується % еритроцитів, що гемолізували протягом перших 20–25 секунд.

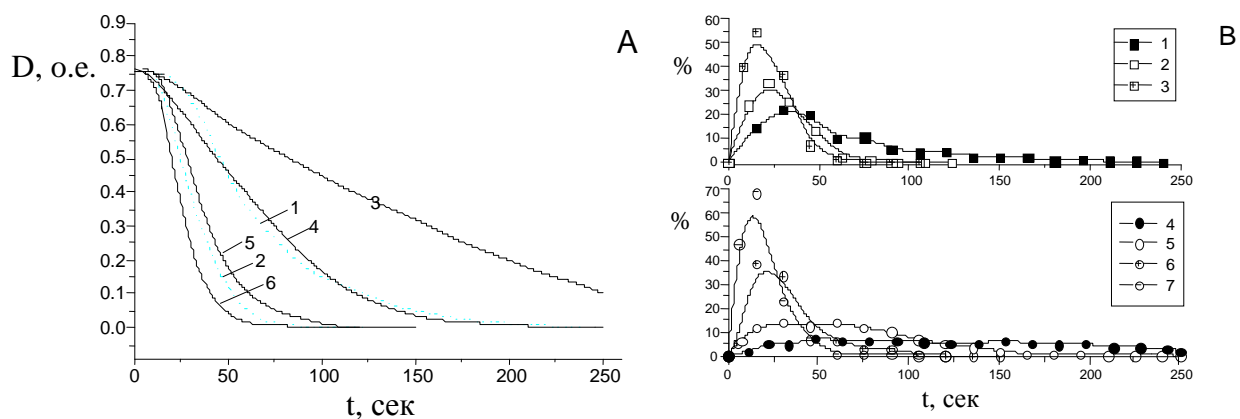


Рис. 5.2. Інтегральні (А) та диференційні (В) криві гемолізу еритроцитів під дією GS, отримані за різних температур: 1 – 10 °С, 2 – 18 °С, 3 – 22.5 °С, 4 – 22.5 °С, 5 – 31.5 °С, 6 – 43.5 °С, 7 – 50 °С.

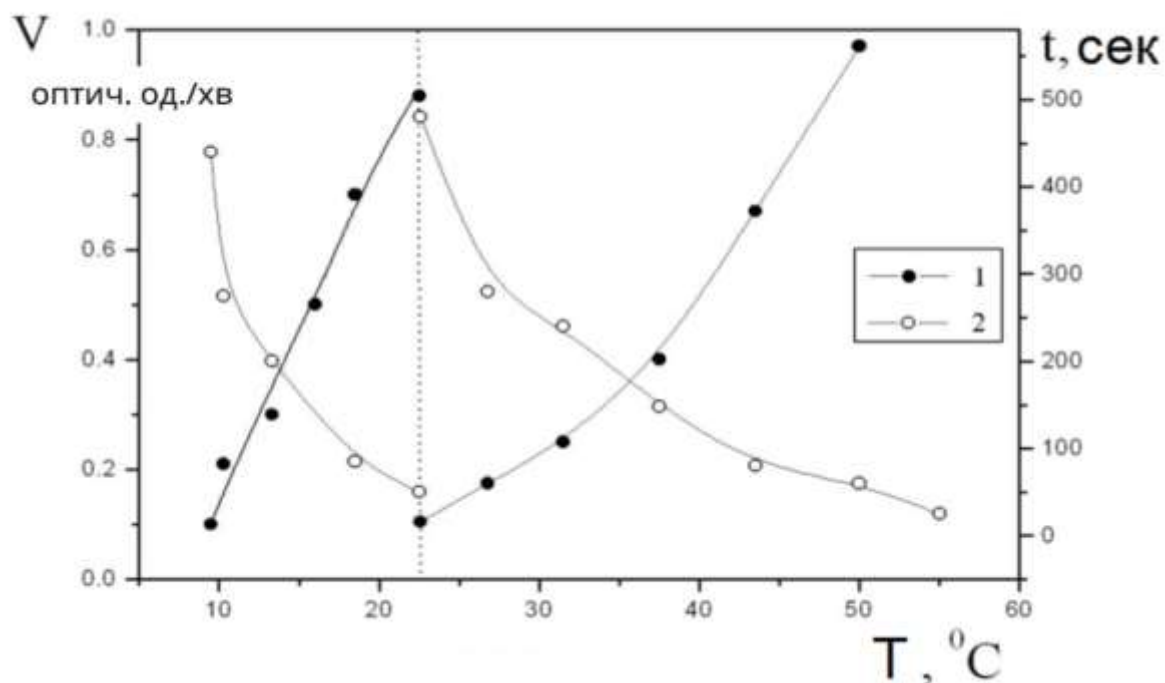


Рис. 5.3. Залежність швидкості  $V$  (1) і часу  $t$  (2) повного гемолізу еритроцитів під дією GS від температури.



Зі збільшенням температури швидкість гемолізу еритроцитів збільшується, а час зменшується (рис. 5.3). Обидві залежності мають монотонний характер. Імовірно, збільшення швидкості гемолізу зі зростанням температури пояснюється розрідженням ліпідного компонента мембран за збільшення температури, що полегшує вбудовування молекул GS у мембрану.

Слід зазначити, що додавання GS у концентрації, достатній для гемолізу еритроцитів, не призводило до істотної зміни рН суспензії еритроцитів: рН  $7,4 \pm 0,1$ . Це може бути однією з переваг GS-індукованого гемолізу еритроцитів порівняно з кислотним гемолізом для вивчення стану та стабільності мембран еритроцитів.

Щоб охарактеризувати міцність зв'язування GS із мембраною після закінчення гемолізу основних еритроцитів, ми додавали ще 0,5 мл суспензії еритроцитів (додаткових). У цьому разі концентрацію GS робили досить низькою, щоб наприкінці гемолізу залишалося якнайменше молекул GS, що не зв'язалися з мембранами (тобто щоб мембрани були надлишкові порівняно з кількістю молекул GS). Ступінь гемолізу додаткових еритроцитів ми позначали як  $h_{0,5}$ . Залежність  $h_{0,5}$  від концентрації GS наведено на рис. 5.4. Як видно з рисунка, при досить низькій концентрації GS повторне додавання еритроцитів до гемолізованих клітин не призводить до гемолізу нових «доданих» еритроцитів. У разі підвищення концентрації гемолітика спостерігається гемоліз додаткових еритроцитів, імовірно, за рахунок надлишку GS (рис. 5.4).

Для мембран протопластів автори [188, 194] також показали, що додавання надлишку фосфоліпідних везикул призводить до зняття GS з мембран.

Отримані результати (рис. 5.4) можна пояснити тим, що зв'язування GS з мембранами досить міцне, або в результаті зв'язування з мембраною молекула GS змінює конформацію і втрачає літичну активність.

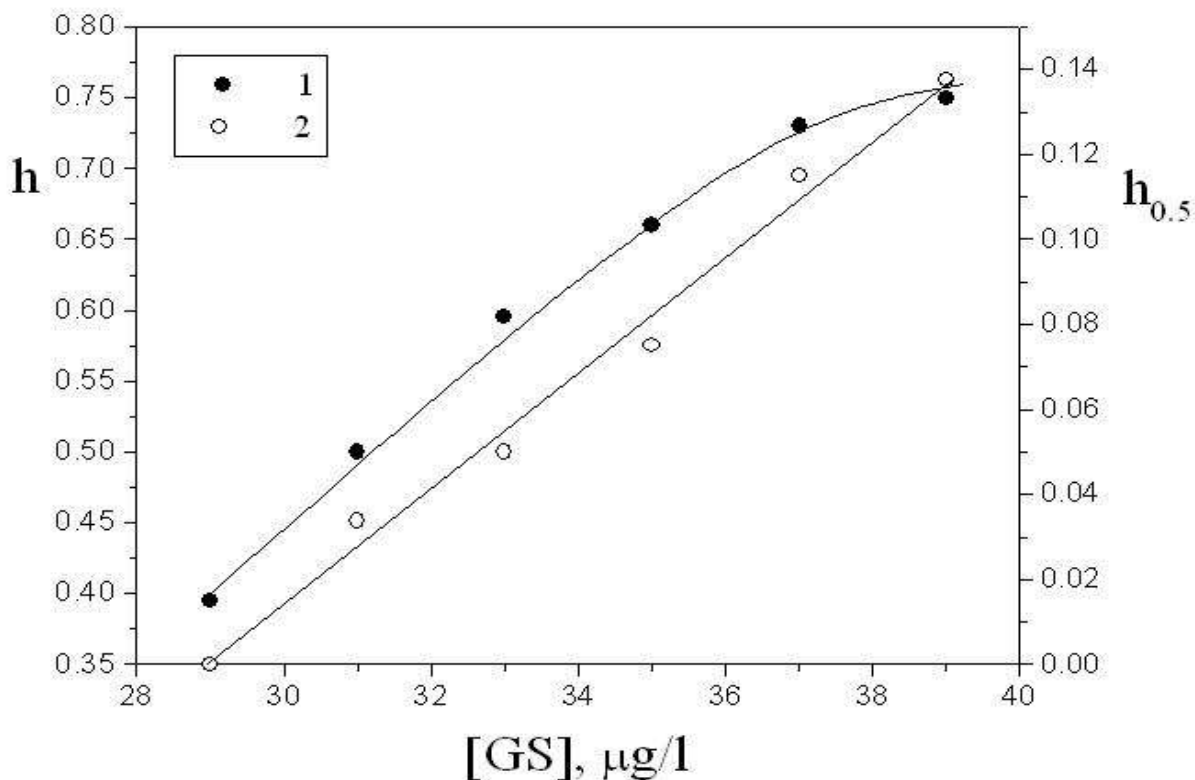


Рис. 5.4. Залежність ступеня гемолізу основних ( $h$ , 1) та доданих еритроцитів ( $h_{0.5}$ , 2) від концентрації граміцидину в розчині.

Температура  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Гемоліз «основних» еритроцитів було зареєстровано протягом 10 хв, гемоліз «доданих» еритроцитів – протягом 5 хв.

Щоб з'ясувати, яке пояснення є більш імовірним, було проведено такий експеримент: після гемолізу «основних» еритроцитів (при цьому концентрація GS обиралася досить низькою, щоб мембрани еритроцитів були в надлишку) до кювети додавали ще 0,5 мл «доданих» еритроцитів. Це призводило до негайного різкого підвищення оптичної щільності через збільшення кількості клітин (центрів розсіювання), проте потім оптична щільність залишалася постійною. Початкова концентрація GS підбиралася таким чином, щоб швидкість гемолізу «основних» еритроцитів була низькою і був цілком відсутній гемоліз «доданих» еритроцитів. Через 5–10 хвилин ми починали поступово збільшувати температуру в кюветі, при цьому оптична щільність суспензії еритроцитів починала знижуватися, що

відбувається в результаті гемолізу еритроцитів. Результати, наведені на рис. 5.3, свідчать про те, що зі збільшенням температури ступінь і швидкість гемолізу зростають. Таким чином, концентрації GS, недостатні для індукування гемолізу додаткових еритроцитів при кімнатній температурі, стають достатніми для індукування гемолізу при підвищенні температури. Якби молекула GS унаслідок взаємодії з мембранами «основних» еритроцитів змінювала конформацію та втрачала свою гемолітичну активність, гемоліз «доданих» еритроцитів за підвищеної температури не спостерігався б. Таким чином, результати наведені на рис. 5.4 можна пояснити, імовірно, тим, що молекули GS досить міцно пов'язані з мембранами клітин.

Розмір  $h_{0.5}$  також може служити додатковою характеристикою стану ліпідного бішару. Ілюстрацією цього може бути порівняння гемолізу «основних» та «доданих» еритроцитів під дією GS та HCl (рис. 5.5). Як видно на рис. 5.5, преінкубація еритроцитів з низкою лікарських препаратів (папаверином, адреналіном і новокаїном) та альфа-токоферолом практично не впливала на швидкість гемолізу, зумовленого GS (слід зазначити, що додавання цих речовин до суспензії еритроцитів також не спричиняло змін оптичної густини). У той же час величина  $h_{0.5}$  значно зменшувалася у разі преінкубації еритроцитів з папаверином, адреналіном та новокаїном та значно зростала в разі преінкубації з альфа-токоферолом. Таким чином, можна припустити, що преінкубація еритроцитів з досліджуваними речовинами призводить до того, що молекули GS міцніше пов'язані з мембраною, що свідчить про зміни в мембранах еритроцитів (передусім – ліпідному бішарі чи заряді мембрани). Водночас ступінь і швидкість кислотного гемолізу еритроцитів залежали від преінкубації еритроцитів з дослідженими речовинами (рис. 5.5). Отже, дані рис. 5.5 показують, що GS-індукований гемоліз еритроцитів може бути більш чутливим до стану мембран еритроцитів. Слід зазначити, що в цій роботі ми не ставили за мету

дослідити вплив лікарських препаратів на мембрани еритроцитів, це питання досить докладно висвітлено в літературі. Дані рисунка дозволяють нам порівняти чутливість кислотного гемолізу та GS-індукованого гемолізу до модифікації мембран еритроцитів.

Щоб унеможливити вплив досліджених в експерименті (рис. 5.5) речовин на структуру молекули GS, що спричинило б втрату її гемолітичної активності, ми провели серію контрольних експериментів, у яких преінкубували GS з папаверином, адреналіном або новокаїном протягом 5–10 хв перед додаванням GS до суспензії еритроцитів (самі еритроцити не преінкубувалися із дослідженими речовинами). При цьому ступінь і швидкість гемолізу «основних» і «доданих» еритроцитів під дією GS, преінкубованого з досліджуваними речовинами, практично не відрізнялися від аналогічних величин для еритроцитів гемолізу під дією стандартно приготованого розчину GS.

Оскільки гемоліз еритроцитів під дією GS визначається взаємодією GS з ліпідами мембран, цікаво вивчити вплив факторів, що змінюють стан ліпідного бішару, на GS-індукований гемоліз еритроцитів. Серед факторів, що змінюють стан ліпідного бішару насамперед можна виділити температуру та процеси ПОЛ. Далі ми наводимо результати дослідження цих факторів на гемоліз еритроцитів під дією GS.

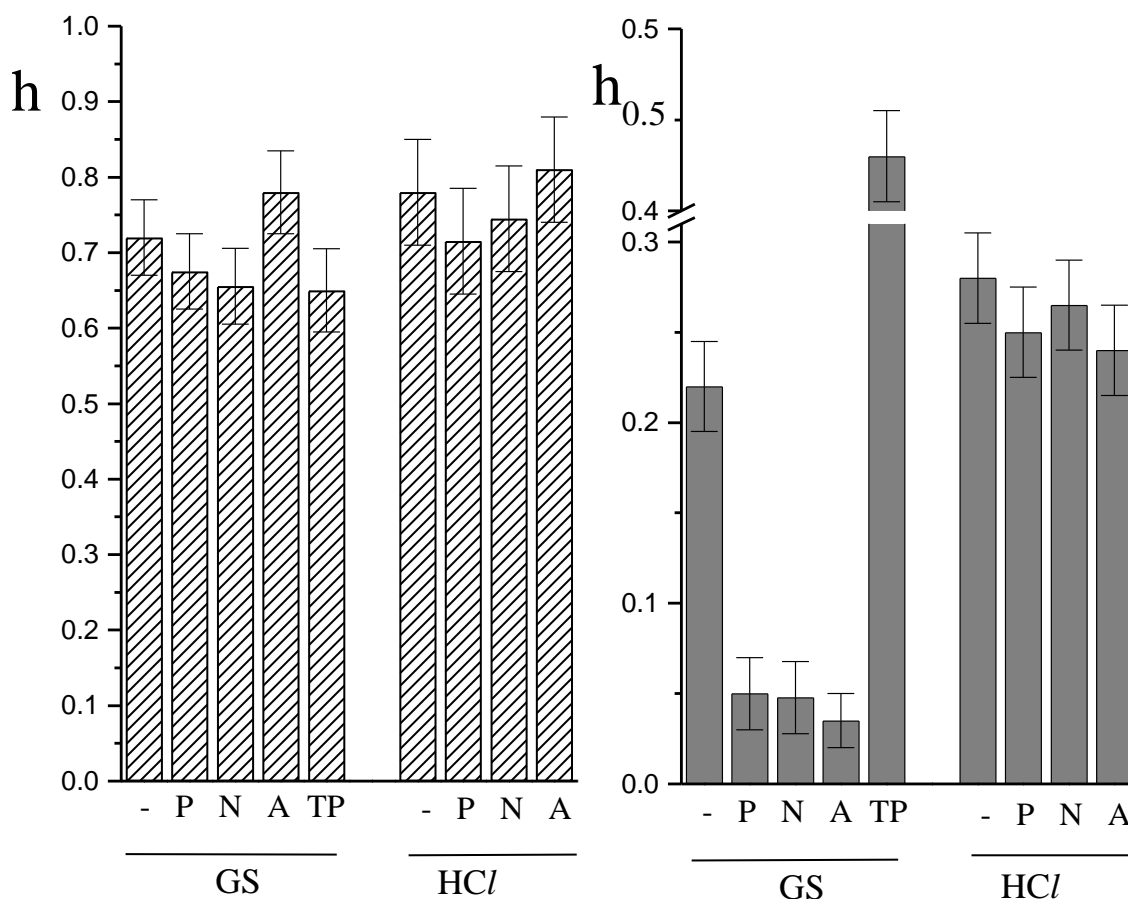


Рис. 5.5. Вплив біологічно активних речовин на гемоліз еритроцитів.

Ліворуч: ступені гемолізу інтактних еритроцитів (позначені «-») та еритроцитів, преінкубованих протягом 5 хв при кімнатній температурі з папаверіном (позначені P), новокаїном (позначені N), адреналіном (позначені A) та альфа-токоферолом (позначені TP) при постійному перемішуванні. Як гемолітик використовували GS або 0.004% розчин HCl. Гемоліз «основних» еритроцитів реєстрували протягом 7 хв, його ступінь позначено як  $h$  (ліворуч). Через 7 хвилин після початку гемолізу додавали до кювети ще 0,5 мл суспензії еритроцитів. Гемоліз доданих еритроцитів реєстрували протягом 5 хв, його ступінь позначений  $h_{0,5}$  (праворуч). У разі преінкубації еритроцитів із TP використовували кров пацієнтів із кардіозахворюваннями.

## 5.2 Вплив біофізичних характеристик мембран еритроцитів на зв'язування циклопептидного GS

На рис 5.6 (крива 1) наведено залежність зміни оптичної густини суспензії еритроцитів від температури за присутності GS. Ступінь гемолізу, який визначається як  $h \equiv \Delta D = D_{beg} - D_{end}$ , збільшується. Таким чином, як зазначено під час обговорення рис. 5.3, з підвищенням температури концентрація GS, необхідна для гемолізу еритроцитів, знижується, тобто GS у концентрації, яка не спричиняє гемолізу еритроцитів при кімнатній температурі, може індукувати гемоліз при підвищенні температури.

Відомо, що підвищення температури призводить до переходу ліпідів мембран з гелеподібного в рідкий стан і до розпушення ліпідного бішару. При цьому, як зазначено в розділі 1, збільшується площа, що припадає на молекулу ліпиду в бішарі й зростає рухливість ацильних ланцюгів жирнокислотних залишків ліпідів в ділянці гідрофобної мембрани. Оскільки вбудовування GS у ліпідний бішар – кінетичний процес, що супроводжується переорієнтацією ліпідних молекул та їхньою кластеризацією, при підвищенні температури та збільшенні рухливості ліпідів взаємодія GS з мембранами має посилюватись. При цьому необхідна для гемолізу еритроцитів концентрація GS буде знижуватися, що й спостерігаємо в експерименті.

З рис. 5.6 також виходить, що преінкубація еритроцитів з прооксидантами ( $Fe^{2+}$  + аскорбат) збільшує ступінь гемолізу еритроцитів під дією GS (крива 3), тоді як преінкубація з антиоксидантами (альфа\_ТФ) – зменшує (крива 2). Слід зазначити, що преінкубація еритроцитів не спричиняла зміни оптичної щільності суспензії еритроцитів в досліджуваному інтервалі температур, тобто не призводила до гемолізу еритроцитів. У разі преінкубації еритроцитів з альфа-токоферолом (рис.

5.6, крива 2) залежність ступеня гемолізу від температури має злам при температурі  $\sim 37$  °C. До  $37$  °C ступінь гемолізу еритроцитів, преінкубованих з альфа-токоферолом, зі збільшенням температури зростає досить слабо порівняно зі ступенем гемолізу інтактних еритроцитів. Після  $37$  °C ступінь гемолізу преінкубованих з альфа-токоферолом еритроцитів починає різко зростати. Було показано, що в ділянці  $\sim 35$ – $37$  °C відбуваються структурні перебудови мембранних білків. Можливо, що структурні переходи, які відбуваються в білках, полегшують вбудовування GS у мембрану. В ділянці температур, вищій за фазовий перехід ліпідів у мембрані, альфа-токоферол зумовлює «заморожування» ліпідного бішару, зменшуючи латеральну рухливість ліпідів. Іони  $\text{Fe}^{2+}$  спричиняють утворення дефектів. Таким чином, отримані результати цілком збігаються з даними щодо впливу преінкубації тромбоцитів з про- та антиоксидантами на взаємодію GS з мембранами тромбоцитів, отриманими у розділі 4.

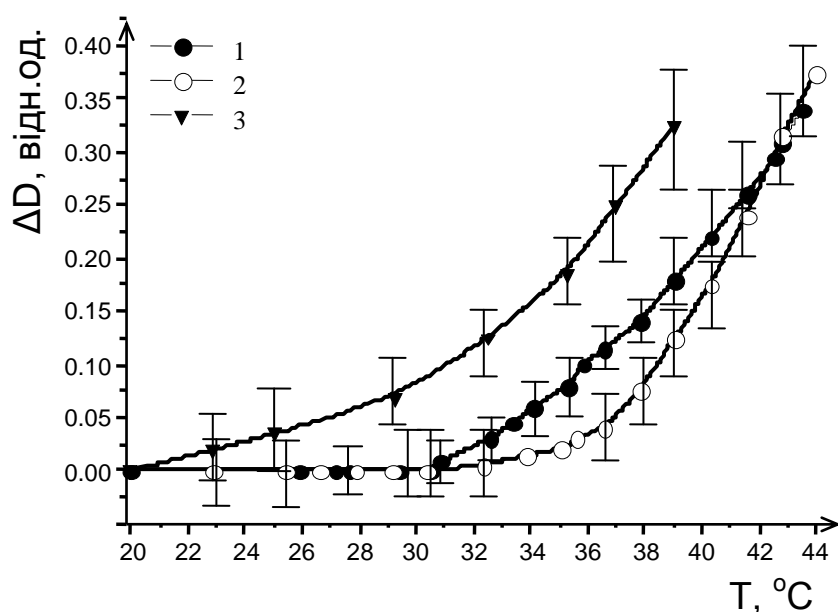


Рис. 5.6. Залежність ступеня гемолізу від температури для нативних еритроцитів (1) та еритроцитів, преінкубованих протягом 10 хвилин з альфа-токоферолом (крива 2) та іонами  $\text{Fe}^{2+}$  + аскорбат (крива 3) ( $\Delta D = D_{\text{beg}} - D_{\text{end}}$ , де  $D_{\text{beg}}$  та  $D_{\text{end}}$  — початкова та кінцева оптичні щільності суспензії

еритроцитів відповідно). Концентрація МДА у контролі  $4,1 \pm 0,53$  нмоль/л, у клітинах з підвищеним рівнем ПОЛ  $7,25 \pm 0,74$  нмоль/л.

Преінкубація еритроцитів з альфа-токоферолом або  $\text{Fe}^{2+}$  аскорбат не впливала на форму кривих кислотного гемолізу еритроцитів. Імовірно, це пов'язано з різницею механізмів кислотного гемолізу еритроцитів та гемолізу під дією GS. Це ще раз показує, що GS індукований гемоліз еритроцитів є більш чутливим до стану ліпідного бішару мембран, що дозволяє використовувати GS для виявлення змін у ліпідному компоненті мембран.

Аналіз температурних залежностей швидкостей процесів дезагрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів дозволив розрахувати з рівняння Арреніуса величини енергій активації відповідних процесів (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Енергії активації процесів розпаду агрегатів тромбоцитів та гемолізу еритроцитів людини під дією граміцидину S

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

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



Отримані значення енергії активації є ефективними величинами. Руйнування агрегату тромбоциту потребує подолання вищого ніж лізис еритроцитів енергетичного бар'єра. Імовірно, це зумовлено відмінністю в будові мембран двох типів клітин, меншою доступністю ліпідів у мембрані тромбоцита, прикритих глікокаліксом; великим вмістом білків у мембрані тромбоцитів або необхідністю, крім вбудовування в мембрану молекул граміцидину, розривати фібриногенові зв'язки між тромбоцитами в агрегаті для ініціації дезагрегації. Отримані енергії активації виявилися нижчими за величини енергії активації термогемолізу еритроцитів – 298,3 або 290 кДж/моль, що потребує глибшого руйнування ліпідного бішару еритроцитів [154].

### **5.3 Вплив відмінності морфології та складу плазматичних мембран клітин крові на активність GS щодо тромбоцитів та еритроцитів**

Оскільки GS має не тільки антибактеріальну, але й гемолітичну активність, його терапевтичне застосування дуже обмежене. За останні два десятиліття було розроблено низку аналогів GS з потенційно нижчою гемолітичною активністю. Для всіх нових похідних GS антимікробний тест завжди супроводжується аналізом гемолітичної активності. Водночас аналогів GS на тромбоцити не тестували. Наші результати показують, що GS може бути активним не тільки проти еритроцитів (спричиняючи гемоліз еритроцитів), але також проти тромбоцитів і агрегатів тромбоцитів (спричиняючи набряк/зміну форми тромбоцитів і дезагрегацію агрегатів). GS (у відповідній концентрації) не руйнує тромбоцитів, оскільки вони не втрачають здатності до агрегації; однак GS-індукована дезагрегація може мати потенційний вплив на здоров'я пацієнта, спричиняючи надмірну кровотечу.

Щоб порівняти активність GS щодо еритроцитів і тромбоцитів, ми оцінили кількість молекул GS на клітину крові (еритроцити або тромбоцити), необхідних для індукції гемолізу еритроцитів або дезагрегації.

У наших експериментах концентрація тромбоцитів у ЗТП становила близько  $2,5 \cdot 10^8$  клітин/мм<sup>3</sup>, а концентрація еритроцитів –  $10^6$  мм<sup>3</sup>. Для індукування гемолізу еритроцитів приблизно  $35 \cdot 10^9$  молекул GS зв'язувалося на еритроцит, тоді як для індукції дезагрегації було потрібно приблизно  $22 \cdot 10^7$  молекул GS на клітину тромбоцитів. Для порівняння, MIC GS для росту було встановлено приблизно 1,0–1,5 мг/мл для GS-чутливих бактерій *Bacillus subtilis* і *Staphylococcus aureus* і 5–10 мг/мл для GS-резистентних *E. coli* (приблизно  $1,3 \cdot 10^6$  молекул GS на бактеріальну клітину [15, 26, 118]).

Однією з причин, чому для гемолізу еритроцитів потрібно більше молекул GS на одну клітину, ніж для набухання/деагрегації тромбоцитів, є різниця в розмірах клітин. Тромбоцити менші за еритроцити – діаметр тромбоцитів становить 2–4 мкм, площа їхньої поверхні – близько 20–30 мкм<sup>2</sup>, а діаметр еритроцитів – 6–8 мкм, площа поверхні – 136–142 мкм<sup>2</sup>. Враховуючи, що в 1 мл крові міститься  $(4-6) \cdot 10^6$  еритроцитів і лише  $(1,5-4) \cdot 10^5$  тромбоцитів, загальна площа поверхні еритроцитів в 1 мл крові майже в 100 разів більша. Більша площа поверхні еритроцитарної мембрани може зменшити ефект GS.

Різниця в ліпідному складі мембран тромбоцитів і еритроцитів також може сприяти різниці в кількості молекул GS на клітину крові. І склад ліпідів, і асиметричний розподіл ліпідів схожі для мембран еритроцитів і тромбоцитів; однак зовнішній моношар еритроцитарної мембрани містить більше сфінгомієліну, але не містить фосфатидилсерину.

Фосфатидилсерин, як аніонний фосfolіпід, має сильнішу взаємодію з позитивно зарядженими молекулами GS. Мембрани еритроцитів також містять більше холестерину, ніж мембрани тромбоцитів: холестерин

становить 25–26 % усіх мембранних ліпідів у плазматичній мембрані еритроцитів, тоді як мембрана тромбоцитів містить лише 18 % холестерину; було виявлено, що молярне співвідношення холестерину та фосфоліпідів для мембран тромбоцитів становить 0,53, що значно менше, ніж в еритроцитів (близько 1,0) [130, 137]. Підвищений рівень холестерину в мембрані може значно знизити активність GS щодо клітин крові [116]. Крім того, активність GS потенційно може бути змінено деякими мембранними молекулами (наприклад, товстою ниткоподібною плазматичною мембраною, покритою глікокаліксом).

Наші результати показують, що GS активний не тільки проти еритроцитів, але й проти інших клітин крові (тромбоцитів). Розрахункову кількість молекул GS на 1 мм<sup>2</sup> клітини крові (еритроцитів і тромбоцитів крові), необхідних для індукування гемолізу та дезагрегації, можна порівняти. Ці результати необхідно враховувати при розробці нових антимікробних аналогів GS зі зниженими гемолітичними властивостями.

#### **5.4. Вплив рухливості та гідратації ліпідів мембран еритроцитів на ступінь гемолітичної дії GS**

Ми також використовували преінкубацію суспензії еритроцитів з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для ініціації ПОЛ. Як видно з малюнка 5.7, преінкубація суспензії еритроцитів з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> призводить до зменшення часу між додаванням GS до суспензії еритроцитів і початком гемолізу (у цих експериментах ми використовували досить низькі концентрації GS для того, щоб реєструвати досить детально початкову стадію гемолізу, через що час повного гемолізу збільшувався до 20–30 хвилин). Таким чином, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, індукуючи ПОЛ в мембранах еритроцитів, імовірно, полегшує вбудовування молекул GS у мембрану, оскільки взаємодія молекули GS з мембраною – кінетичний процес, що залежить від стану й рухливості ліпідів в мембрані.

Залежність ступеня гемолізу еритроцитів (неповний гемоліз реєстрували протягом 7 хвилин після додавання гемолітика) від концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  для еритроцитів, виділених з крові здорових донорів та донорів з різними патологіями серцево-судинної системи, представлено на рис 5.8 (А). Суспензію еритроцитів було інкубовано з  $\text{H}_2\text{O}_2$  при постійному перемішуванні протягом 5 хвилин перед додаванням GS і початком гемолізу.

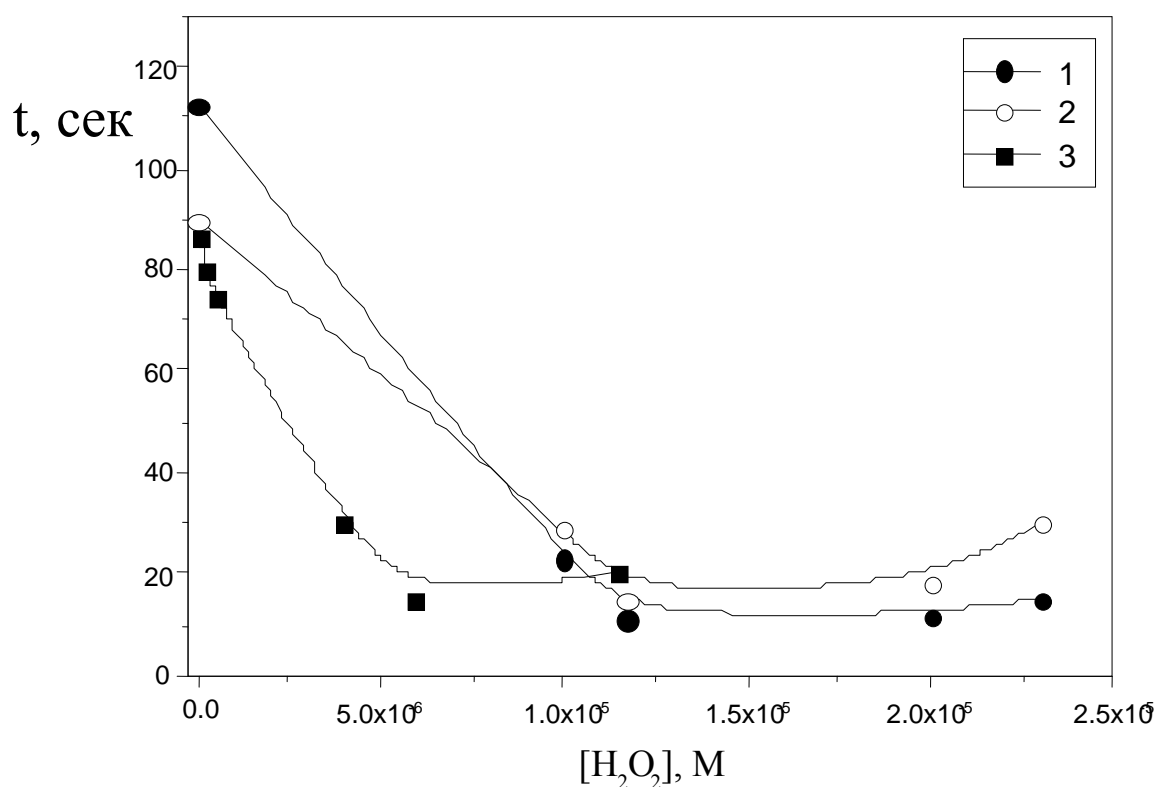


Рис. 5.7. Залежність часу (t) між додаванням GS до суспензії еритроцитів і початком гемолізу від концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  в розчині для GS-індукованого гемолізу еритроцитів різних донорів (1, 2, 3). Еритроцити преінкубовано протягом 5–10 хвилин з  $\text{H}_2\text{O}_2$  при кімнатній температурі.

Як показано на рис. 5.8, залежності різняться для зразків крові різних донорів, однак можна вказати загальні закономірності впливу преінкубації еритроцитів з  $\text{H}_2\text{O}_2$  на GS індукований гемоліз еритроцитів. Середні

концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$ , використані у роботі ( $10^{-3} \div 10^{-2} \%$ ), спричиняють зниження швидкості гемолізу. Для деяких зразків це зниження гемолітичної активності було незначним, тоді як для інших за певних концентрацій  $\text{H}_2\text{O}_2$ , GS повністю втрачав свою гемолітичну активність. Зокрема, у разі гемолізу еритроцитів із підвищеним вмістом холестерину, виділених з крові хворих на атеросклероз, їх преінкубація з  $\text{H}_2\text{O}_2$  у концентрації  $\sim 10^{-3}\%$  призводила до повної відсутності гемолізу при додаванні GS до суспензії еритроцитів. При подальшому підвищенні концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  ступінь гемолізу зростав, проте високі концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  (вищі за 1%) ми не вивчали. Дія низьких концентрацій  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-5} \div 10^{-4} \%$ ) була більш неоднозначною: для одних зразків преінкубація еритроцитів з  $\text{H}_2\text{O}_2$  посилювала гемоліз, для інших – не впливала або незначно послаблювала (не більше ніж на 10% від гемолізу інтактних еритроцитів, що незначно перевищувало похибку виміру).

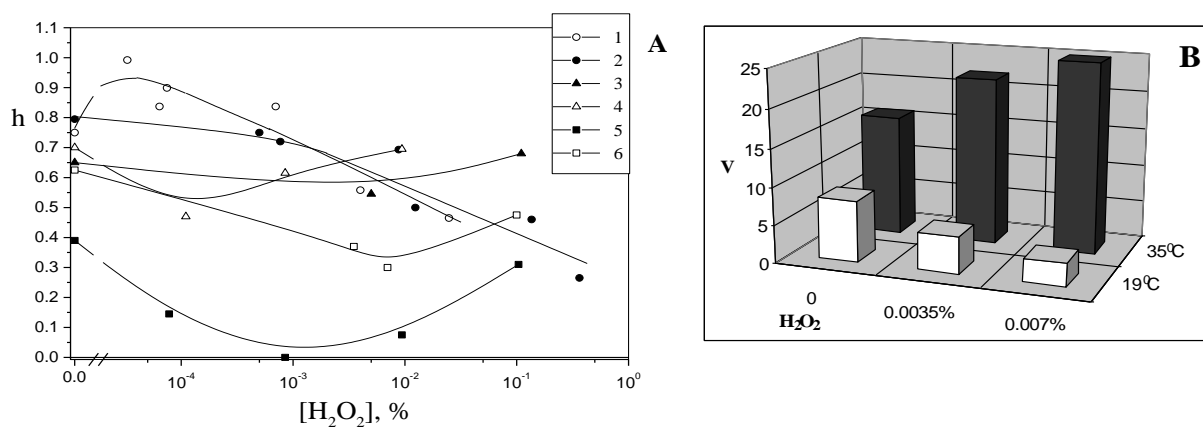


Рис. 5.8. Вплив преінкубації еритроцитів з  $\text{H}_2\text{O}_2$  на GS-індукований гемоліз.

А. Залежність ступеня гемолізу еритроцитів (за 7 хв. гемолізу) від концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  у розчині для GS-індукованого гемолізу еритроцитів, преінкубованих протягом 5 хвилин з  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Еритроцити було виділено з крові здорових донорів (1, 2 – зразки крові різних донорів) та донорів із захворюваннями: 3 – посттромбофлебічний синдром, 4 – синдром Леріша,

5, 6 – атеросклероз (зразки крові різних донорів).

В. Залежність швидкості (V) повного GS-індукованого гемолізу нативних еритроцитів та еритроцитів, преінкубованих протягом 5 хвилин з  $\text{H}_2\text{O}_2$ , від концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  в розчині, отримано за 19 і 35 °С.

У концентраціях  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10^{-3} \div 10^{-2}$  % швидкість гемолізу знижується з підвищенням концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 5.8). Однак при вищій температурі ця залежність матиме інший характер. Як видно із рис. 5.8 (В), на якому наведено швидкості гемолізу еритроцитів, преінкубованих з  $\text{H}_2\text{O}_2$ , за двох температур (19 та 35 °С), за 19 °С зі зростанням концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  швидкість гемолізу еритроцитів знижується, тоді як за 35°С швидкість значно зростає у разі преінкубації еритроцитів з  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Таким чином, спостерігаємо синергізм впливу ПОЛ та температури, відзначений і авторами [101].

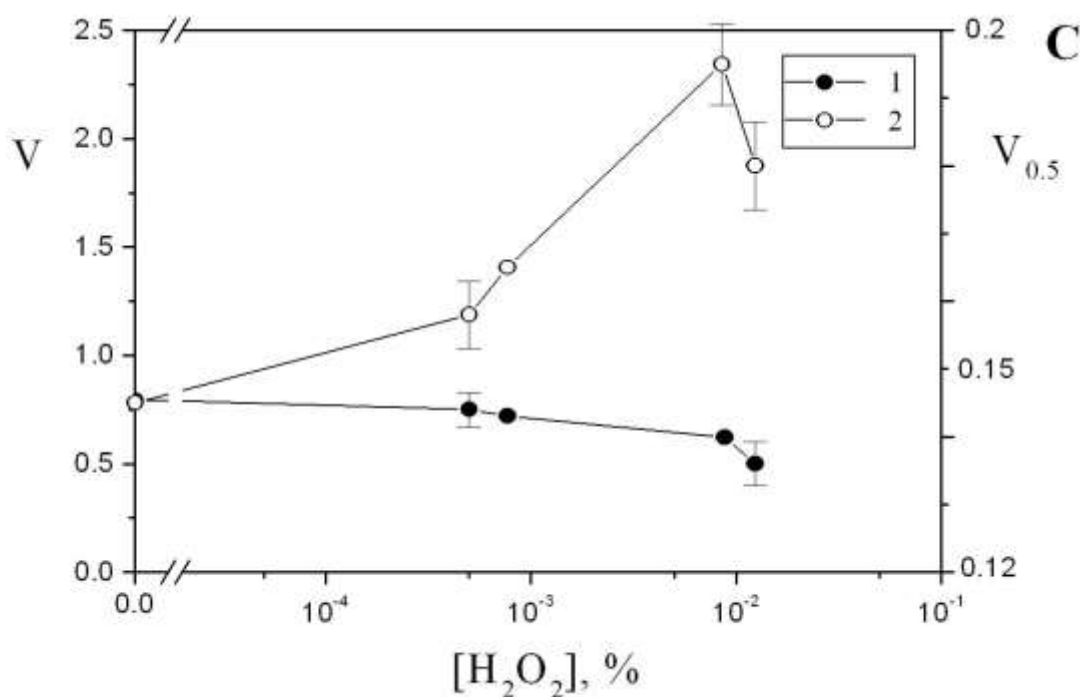


Рис. 5.9. Вплив преінкубації еритроцитів з  $\text{H}_2\text{O}_2$  на GS-індукований гемоліз основних та доданих еритроцитів.

Залежності швидкості гемолізу «основних» (1, ліва шкала) і «доданих» (2, права шкала) еритроцитів від концентрації  $H_2O_2$  в розчині для GS-індукованого гемолізу нативних еритроцитів та еритроцитів, преінкубованих протягом 5 хвилин з  $H_2O_2$ .

Окремо варто зупинитися на залежностях, наведених на рис. 5.9. Крива (1) відноситься до гемолізу основних еритроцитів під дією GS, залежність (2) – до гемолізу додаткових еритроцитів. У цьому експерименті ми обирали концентрацію GS так, щоб у разі інтактних еритроцитів (тобто еритроцитів, не преінкубованих з  $H_2O_2$ ) повністю був відсутній гемоліз «доданих» еритроцитів (тобто швидкість гемолізу додаткових еритроцитів дорівнювала нулю). Як видно з порівняння залежностей 1 і 2, зі збільшенням концентрації  $H_2O_2$ , при якій преінкубувалися еритроцити, швидкість гемолізу основних еритроцитів трохи зменшується, як було зазначено вище. У той самий час швидкість гемолізу доданих еритроцитів збільшується (рис. 5.9). Таким чином, преінкубація еритроцитів з  $H_2O_2$  у концентрації  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  % мала протилежний вплив на гемоліз основних та доданих еритроцитів. Порівняння результатів, наведених на рис. 5.6 і 5.8 дозволяє припустити, що  $H_2O_2$ , індукуючи ПОЛ в мембранах еритроцитів, полегшує вбудовування молекул GS у мембрану і водночас полегшує від'єднання молекул, що вже зв'язалися з мембраною GS, тобто робить зв'язування GS з мембранами менш міцним.

У цій роботі основну увагу ми приділили вивченню тих концентрацій  $H_2O_2$ , які призводять до зниження ступеня та швидкості гемолізу еритроцитів під впливом GS, оскільки основний інтерес з точки зору розробки антимікробних препаратів на основі GS становлять саме ті умови, у яких гемолітична активність GS, що перешкоджає широкому застосуванню, знижується. Таким чином, показані в роботі експериментальні умови, при яких GS-індукований гемоліз еритроцитів

значно послаблювався, можуть становити особливий інтерес для подальшого більш докладного вивчення.

### **5.5 Модулювання взаємодії GS з мембранами клітин крові під дією холестеролу**

Крім зовнішніх впливів, взаємодія GS з мембранами має залежати від структурного стану власне мембран. Одним із важливих структурних компонентів біологічних мембран є холестерин, який визначає такі властивості мембран, як в'язкість та проникність [126, 137].

Молекула холестерину легко вбудовується до бішару, особливо в зоні дефектів бішару. Специфіка структури холестерину забезпечує можливість взаємодії його гідроксильної групи з карбонільним киснем ацильних ланцюгів фосфоліпідів, а також великий гідрофобний контакт між жирнокислотними ланцюгами й стероїдним кільцем молекули холестерину. Саме ця частина молекули відповідає за структуруючий ефект стероїду. Метиленовий хвіст молекули не значно впливає на щільність упаковки бішару. Відомо, що в організмі людини на частку внутрішньоклітинного холестерину припадає >90% всього холестерину. У здорових клітинах підтримується суворий гомеостаз холестерину завдяки тому, що клітини в усіх можливих випадках «надають перевагу» використанню готового холестерину, вимикаючи синтез холестерину в разі наявності ендogenous. При блокуванні внутрішньоклітинного утворення оксипохідних холестерину (оскільки в клітині холестерин наявний у вигляді продуктів його метаболізму) додавання холестерину ззовні не блокує його внутрішньоклітинного синтезу, таким чином призводячи до накопичення холестерину та виникнення ліпідної інфільтрації печінки.

Вбудовування холестерину у фосфоліпідний бішар зумовлює як порушення квазікристалічного пакування жирнокислотних ланцюгів за нормальної температури нижче за  $T_{кр}$ , і зменшення рухливості (зростання



впорядкованості) ланцюгів за нормальної температури вище за  $T_{кр}$ . Ці ефекти холестерину називають відповідно «розріджувальним» і «конденсувальним» [123, 245] відзначають, що основна структурна роль холестерину в мембранах полягає у стабілізації гідрофобної частини бішару завдяки зменшенню рухливості вуглеводневих ланцюгів за високих температур і збільшенню рухливості за низьких температур. Надлишок холестерину збільшує мікрров'язкість бішару й знижує швидкість реакцій, що мають дифузійно-залежні лімітуючі стадії.

Для того щоб показати вплив холестерину на GS-індукований гемоліз еритроцитів, ми досліджували гемоліз еритроцитів, виділених із крові здорових донорів та донорів з різними захворюваннями серцево-судинної системи, у тому числі – хворих на атеросклероз.

На рис. 5.10 наведено типові криві гемолізу еритроцитів під дією GS. Еритроцити було виділено з крові здорових донорів та хворих на атеросклероз. Як видно із рис. 5.10, при атеросклерозі значно змінюється вигляд кривих гемолізу: різко знижуються ступінь і швидкість гемолізу, відбувається перерозподіл еритроцитів за міцністю, гемоліз більшості еритроцитів відбувається пізніше, ніж гемоліз здорових еритроцитів. Співвідношення між швидкостями гемолізу еритроцитів здорових донорів і донорів, хворих на атеросклероз, було однаковим для різних концентрацій GS. Порівняння величин швидкості гемолізу еритроцитів з концентраціями холестерину (рис. 5.11) дозволяє зробити висновок про те, що підвищення рівня холестерину в мембранах клітин при атеросклерозі призводить до значного зниження ступеня та швидкості GS-індукованого гемолізу еритроцитів.

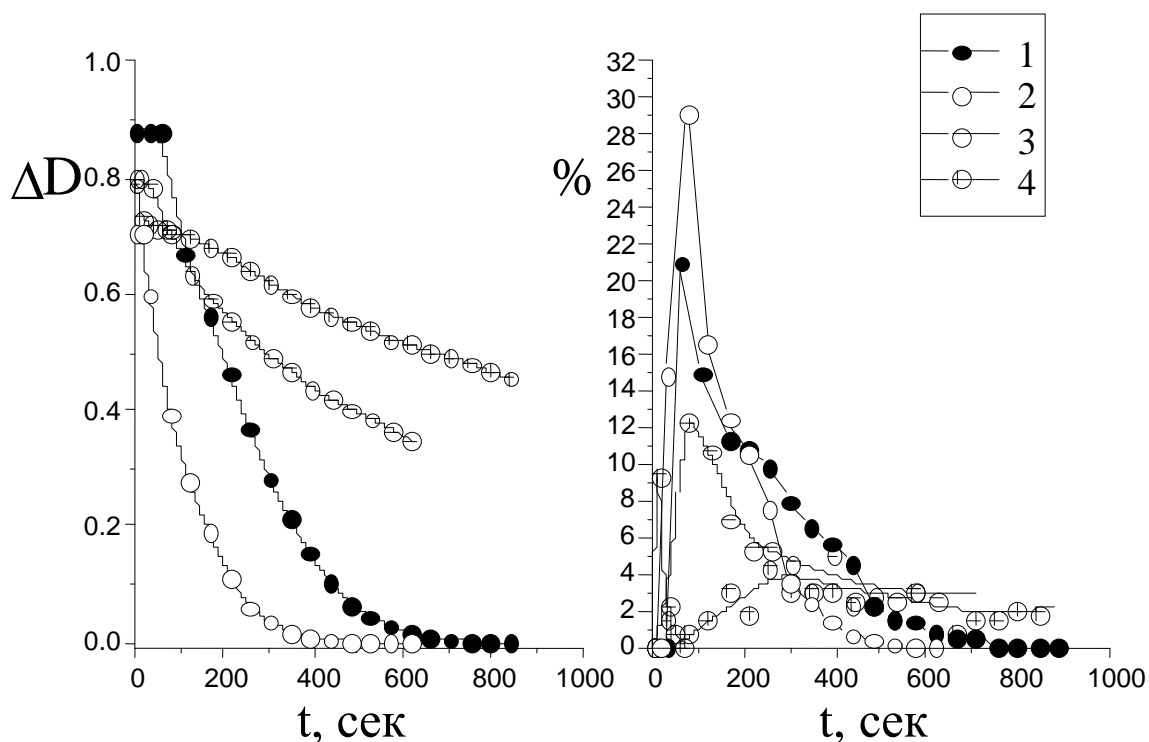


Рис. 5.10. Типові кінетичні (ліворуч) та диференціальні (праворуч) криві GS індукованого гемолізу еритроцитів, виділених із крові здорових донорів (1, 2) та донорів, хворих на атеросклероз (3, 4). Концентрація GS у всіх експериментах однакова; температура – 36°C.

У разі використання HCl як гемолітика ми не спостерігали значної різниці між гемолізом еритроцитів, виділених з крові здорових донорів та донорів, хворих на атеросклероз.

Відомо, що зміна ліпідного складу мембрани при атеросклерозі може бути однією з основних причин порушення еластичних властивостей клітин крові, а саме зниження їх здатності деформуватися [264]. Останнє може пояснювати той факт, що GS-індукований гемоліз еритроцитів при атеросклерозі ускладнений та потребує набагато більших концентрацій гемолітика, ніж гемоліз інтактних еритроцитів (рис. 5.10) [135].

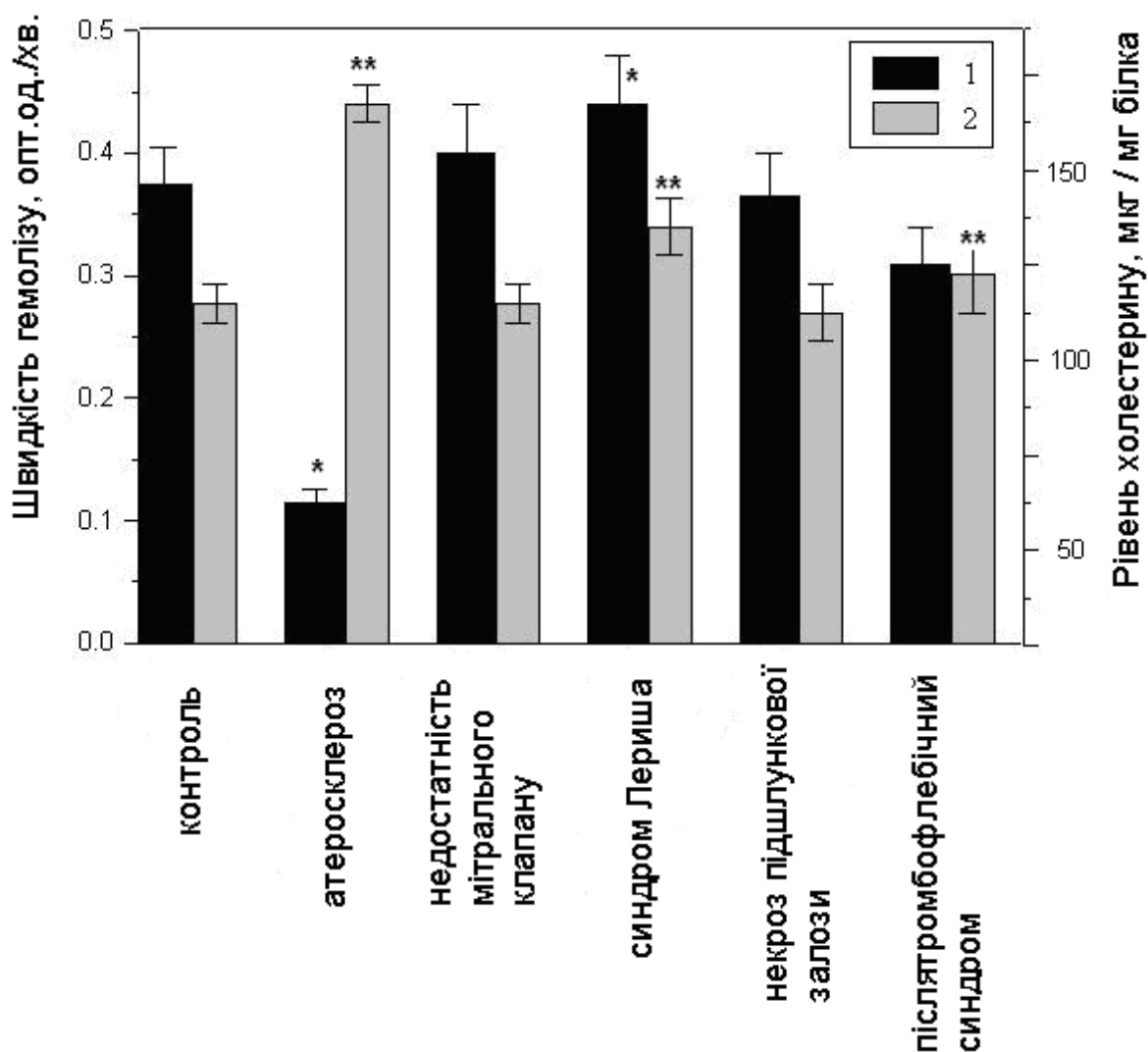


Рис. 5.11 Мембранний холестерол знижує гемолітичну активність граміцидину.

Ліва шкала: швидкість гемолізу  $V(1)$  для GS-індукованого гемолізу еритроцитів, виділених з крові здорових донорів (контроль) та донорів з різними патологіями. Концентрація GS у всіх експериментах була однаковою; температура – 22 °С. Права шкала: рівень холестерину крові донорів (2). Температура 37 °С. Примітка: \* та \*\* – швидкості гемолізу та вміст холестерину відрізняються від контрольних величин з довірчою ймовірністю  $p < 0,05$ .

Таким чином, збільшення в'язкості мембран через підвищення вмісту холестерину в них знижує швидкість GS-індукованого гемолізу еритроцитів. Відбувається це, імовірно, як через уповільнення

вбудовування молекул GS у мембрану, так і через зниження здатності до деформації самих клітин.

Додавання холестерину до модельних мембран також зменшувало взаємодію GS з бішаровими ліпідними мембранами [116], проте для клітин крові ефект ослаблення взаємодії GS з мембранами ми показали вперше.

Крім збільшення відношення холестерин/ФЛ, атеросклероз може призводити до збільшення вмісту сфінгомієліну (СМ) та зниження вмісту ФХ та ФІ в мембранах еритроцитів [135]. Оскільки СМ має негативний заряд, це може посилювати зв'язування GS з мембранами еритроцитів. Помітне зменшення ступеня гемолізу говорить про те, що панівним ефектом є збільшення вмісту холестерину в мембранах і, як результат, підвищення мікров'язкості мембран.

Порівняльний гемоліз здорових еритроцитів та еритроцитів, виділених з крові хворих на атеросклероз, проведений нами, показує, що підвищення концентрації холестерину в клітинах істотно послаблює гемолітичний вплив GS на еритроцити. У роботі [116], автори якої вивчили вплив холестерину на взаємодію GS з модельними фосфоліпідними мембранами, також було показано, що присутність холестерину в мембранах послаблює взаємодію GS з фосфоліпідним бішаром. Отримані результати становлять особливий інтерес, тому що одна з основних відмінностей у ліпідному складі мембран бактерій та клітин вищих тварин – наявність холестерину в останніх. Таким чином, при розробці антимікробних препаратів на основі GS необхідно брати до уваги вплив холестерину на взаємодію GS із мембранами клітин.

Отримані результати дозволяють припустити, що деякі продукти перекисного окислення ліпідів разом із високою концентрацією холестерину або перешкоджають гемолізу еритроцитів, або знижують гемолітичну активність GS. Сам по собі високий рівень холестерину не може запобігти окисленню мембран, оскільки повідомлялося, що еритроцити пацієнтів з коронарним атеросклерозом більш сприйнятливі до

окислення й мають знижену антиоксидантну здатність і підвищений вміст холестерину (гіперхолестеринемія) в еритроцитах, тромбоцитах, а лейкоцити навіть спричиняли посилене виробництво вільних радикалів кисню. Водночас швидкість та продукти окислення холестерину можуть залежати від співвідношення фосфоліпідів і холестерину в мембранах. Механізм ослаблення гемолітичної активності GS у присутності  $H_2O_2$  та підвищення рівня холестерину в мембранах еритроцитів очікує на подальше вивчення. Відповідь на це питання може допомогти в раціональній розробці аналогів GS зі зниженою гемолітичною активністю.

Варто зазначити, що зазвичай дія антибактеріальних пептидів, синтезованих вищими організмами, пригнічується в присутності холестерину, щоб мінімізувати шкідливу дію цих пептидів на клітини господаря. Навпаки, дія літичних агентів, що виділяються бактеріями, зазвичай не тільки не пригнічується в присутності холестерину, а навіть може виконувати функцію мішені для пошкоджень завдяки цьому [103, 44, 114]. Отримані в цій роботі дані можуть бути підтвердженням гіпотези, висловленої авторами [116] про те, що антимікробний поліпептид GS, синтезований бактеріями, міг відігравати роль у конкурентній боротьбі між різними видами бактерій у природному оточенні.

## **5.6 Вплив поверхневого потенціалу та структури глікокаліксу клітини на сорбцію граміцидину S на мембрану еритроциту**

### **5.6.1 Визначення електрокінетичних властивостей еритроцитів**

Використовували 9-ти місячних самців щурів лінії Wistar, отриманих з розпліднику ДУ «ІПЕП ім. В.Я. Данилевського НАМН України». Кров, в об'ємі 1 мл, відбирали з хвостової вени щура у вакуумну пробірку «Vacutest», яка містила цитрат натрію як антикоагулянт. Еритроцити з

цільної крові отримували шляхом центрифугування протягом 15 хв при 200 g та 20°C. Осад еритроцитів ресуспендували в 1 мл фосфатно-сольового буферу (1,7 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 мМ  $\text{NaCl}$ , рН 7,5) та центрифугували протягом 5 хв при 2000 g та 20 °С. Процедуру відмивки еритроцитів повторювали тричі. Осад відмитих еритроцитів ресуспендували у 1 мл фосфатно-сольового буферу та зберігали до початку дослідження при 4°C не більше ніж 3 години. Підрахунок концентрації еритроцитів проводили за допомогою камери Горяєва.

Суспензію еритроцитів ( $10^{10}$  клітин/мл) інкубували у фосфатно-сольовому буфері який містив граміцидин S у концентрації 0, 5, 10, 20 мкг/мл протягом 20 хвилин при 37°C. Безпосередньо перед проведенням дослідження аліквоту суспензії еритроцитів розводили забуференим розчином цукрози (10 мМ HEPES, 240 мМ цукроза, рН 7,0) до кінцевої концентрації клітин за гематокритом 0,1%.

Суспензію відмитих еритроцитів у фосфатно-сольовому буфері інкубували 30 хв при 37 °С у присутності 16 рU/мл трипсином (Sigma St.Louis, MO). Еритроцити центрифугували при 1500 g протягом 5 хв. Осад ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері. Процедуру відмивки повторювали тричі.

Суспензію відмитих еритроцитів у фосфатно-сольовому буфері інкубували 1 годину при 37°C у присутності 135 мU/мл нейрамінідази (тип V, Sigma St. Louis, MO). Еритроцити центрифугували при 1500 g протягом 5 хв. Осад ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері. Процедуру відмивки повторювали тричі.

Принцип дії експериментальної установки заснований на вимірюванні лінійної швидкості руху клітин під впливом електричного поля за допомогою мікроскопа, оснащеного цифровою камерою (рис. 5.12).

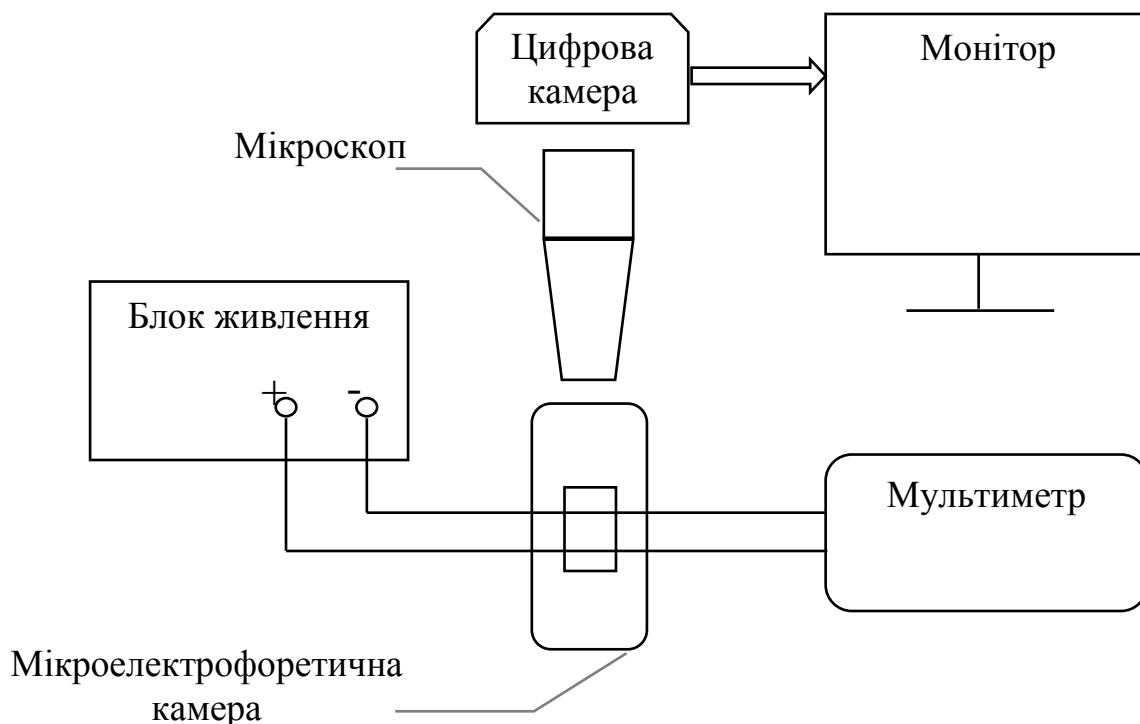


Рисунок 5.12 Схема установки для мікроелектрофорезу.

Збирали установку для електрофорезу (рис. 5.12) та фокусували зображення на координатній сітці камери Горяєва. За допомогою мультиметра встановлювали вихідну напругу блока живлення – 10 В. Вносили 1 мл суспензії еритроцитів в мікроелектрофоретичну камеру та замикали електричний ланцюг, одночасно починаючи запис зображення з цифрової камери. Для запису та подальшого аналізу відеозображення використовували програму ScoreImage 9.0.

Поверхня еритроцитів має негативний заряд, який зумовлено сіаловими кислотами у складі мембранних глікопротеїнів, тому нативні клітини завжди рухаються в напрямку катода. Для більш точного визначення середньої лінійної швидкості еритроцитів електрофорез проводили у двох напрямках, змінюючи полярність електродів мікроелектрофоретичної камери (30 секунд в одному напрямку та 30 секунд в зворотному).

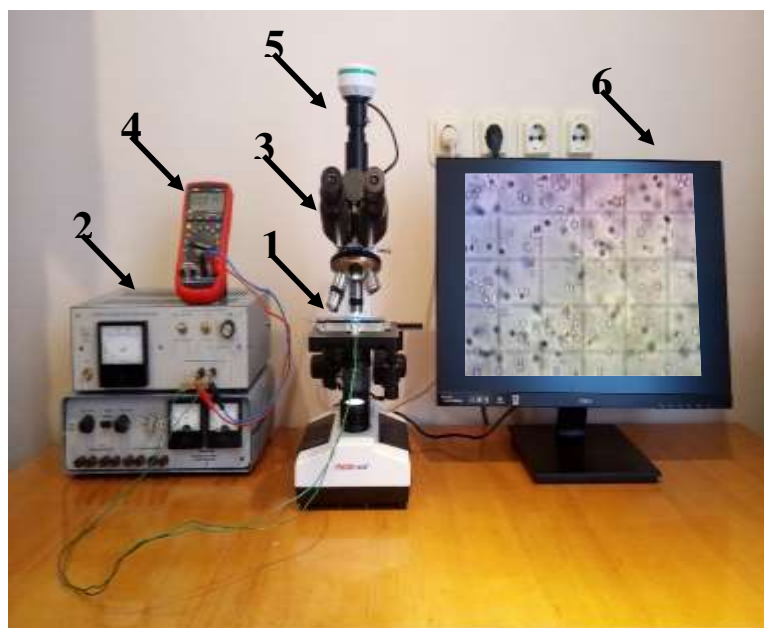


Рисунок 5.13 Загальний вигляд установки для мікроелектрофорезу.

1 – мікроелектрофоретична камера, 2 – блок живлення лабораторний зі стабілізованою напругою від 0 до 30 В, 3 – тринокулярний мікроскоп «MicroMed XS-3330», 4 – мультиметр UT61E, 5 – цифрова камера DCM-900 9.0 Mpixels, 6 – монітор IIYAMA ProLite XU2492HSU, 24'

Відеозапис зберігали у форматі \*.avi та використовували для подальшого аналізу.

Для визначення лінійної швидкості еритроцитів у електричному полі за допомогою секундоміра вимірювали час, за який одиночний еритроцит перетинає великий квадрат координатної сітки (200 мкм). Лінійну швидкість розраховували за формулою

$$V = \frac{S}{t}. \quad (5.1)$$

де  $V$  – лінійна швидкість, м/с;

$S$  – відстань, яку пройшов еритроцит, м;

$t$  – час, за який еритроцит пройшов відстань  $S$ , с.

Розрахунок електрофоретичної швидкості проводили з урахуванням напруги та відстані між електродами за формулою



$$u = \frac{V * l}{U}, \quad (5.2)$$

де  $u$  – електрофоретична швидкість, м<sup>2</sup>/В·с;

$V$  – лінійна швидкість, м/с;

$l$  – відстань між електродами, м;

$U$  – напруга, В.

Для визначення електрокінетичного потенціалу ( $\zeta$ -потенціалу) клітин використовували рівняння Смолуховського

$$\zeta = \frac{4\pi\eta u}{\varepsilon}, \quad (5.3)$$

де  $\zeta$  – електрокінетичний потенціал, В;

$\eta$  – в'язкість розчину, Па·с;

$u$  – електрофоретична швидкість, м<sup>2</sup>/В·с;

$\varepsilon$  – діелектрична проникність розчину.

Для розрахунку  $\zeta$ -потенціалу використовували значення  $\eta$  та  $\varepsilon$  для дистильованої води.

Для статистичного аналізу використовували пакет програм Statistica 6.0. Визначення виду розподілу даних у вибірці проводили з використанням критерію Шапіро–Уїлка. Для множинних порівнянь даних з нормальним розподілом проводили параметричний однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та застосовували критерій Ньюмена–Кейлса або Даннета (порівняння всіх груп з групою «Інтактний контроль» або «GS0»). Дані представлено у вигляді середньої (M) та стандартної похибки середньої (SEM). Розходження вважали статистично значущим при ( $P < 0,05$ ). Залежність між концентрацією граміцидину S в інкубаційному середовищі та значеннями параметрів агрегації визначали за допомогою регресійного аналізу та розрахунку коефіцієнта кореляції Пірсона.

### 5.6.2 Вплив модифікації поверхні клітин на взаємодію

з GS, визначення локалізації GS у мембранах еритроцитів

У результаті проведених досліджень встановлено, що електрофоретична швидкість еритроцитів крові щурів складає  $139,85 \times 10^{-10} \pm 4,74 \times 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/В·с, а  $\zeta$ -потенціал  $-19,51 \pm 0,6$  мВ. Отримані дані добре узгоджуються з результатами інших авторів, які визначали ці показники в еритроцитах різних видів тварин та людини [78].

Інкубація еритроцитів з грамїцидином S у діапазоні концентрацій від 5 до 10 мкг/мл призводила до зниження електрофоретичної швидкості та  $\zeta$ -потенціалу дозозалежним чином (рис. 5.14, 5.15).

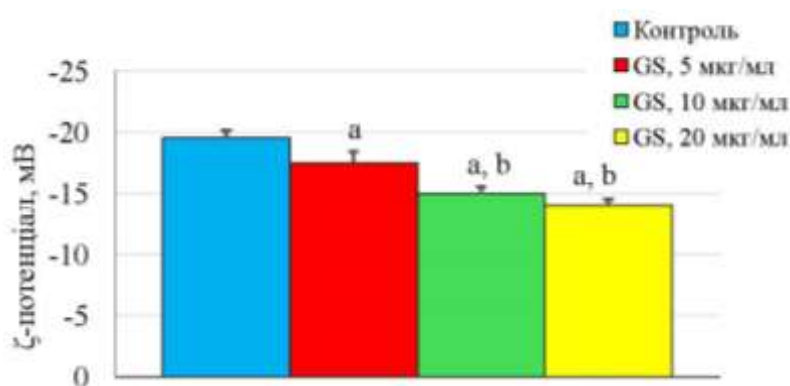


Рисунок 5.14  $\zeta$ -потенціал інтактних еритроцитів щурів після інкубації з грамїцидином S *in vitro* ( $M \pm SEM$ ,  $n=4$ ).

a – статистично значущі відмінності порівняно з даними для групи «Контроль»,  $p \leq 0,05$ ;

b – статистично значущі відмінності порівняно з даними для групи «GS, 5 мкг/мл»,  $p \leq 0,05$

Водночас підвищення концентрації грамїцидину S до 20 мкг/мл не призводило до статистично значущих змін електрофоретичної швидкості та  $\zeta$ -потенціалу порівняно з показниками, що були отримані для концентрації 10 мкг/мл.

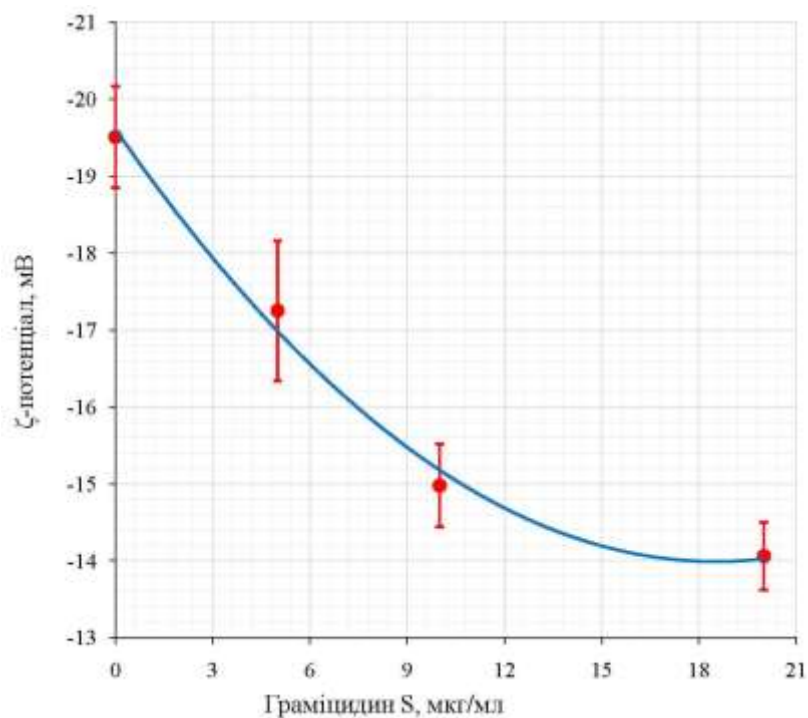


Рисунок 5.15 – Залежність  $\zeta$ -потенціалу інтактних еритроцитів від концентрації грамїцидину S у середовищі інкубації ( $M \pm SEM$ ,  $n=4$ ).

Оскільки поверхневий заряд еритроцитів головним чином визначається негативнозарядженими карбоксильними групами сіалових кислот, що входять до складу вуглеводного компоненту інтегральних глікопротеїнів, адсорбція грамїцидину S, який має позитивнозаряджені аміногрупи залишків орнітину, на поверхні мембрани еритроцитів, імовірно, призводить до часткової нейтралізації загального негативного заряду клітин. Відсутність подальшого зниження електрокінетичних показників при підвищенні концентрації грамїцидину S у інкубаційному середовищі більш ніж 10 мкг/мл може свідчити про те, що зв'язування цього циклічного декапептиду з еритроцитарною мембраною має певний поріг насиченості.

Крім того, грамїцидин S у концентрації 20 мкг/мл спричиняв частковий гемоліз та порушення нормальної морфології більшості еритроцитів, що могло призводити до значних змін їх гідродинамічних

характеристик та електрофоретичної швидкості за відсутності значного впливу на поверхневий заряд (рис. 5.16).



1 – нормальні дискоцити, 2 – ехіноцити, 3 – стоматоцити, 4 – сфероцити

Рисунок 5.16 – Морфологічні зміни еритроцитів після 20 хв інкубації з грамїцидином S у концентрації 20 мкг/мл ( $\times 400$  раз).

Для визначення ролі сіалових кислот у формуванні загального заряду поверхні еритроцитів та впливу грамїцидину S на електрокінетичні показники було проведено визначення електрофоретичної швидкості та  $\zeta$ -потенціалу еритроцитів після ензиматичної модифікації поверхні мембрани трипсином та нейрамінідазою.

Обробка трипсином призводить до розщеплення пептидних зав'язків утворених карбоксильною групою лізину та аргініну. Оскільки трипсин не здатний проникати крізь плазматичну мембрану, протеолізу доступні лише

екстрацелюлярні домени деяких глікопротеїнів, чутливі до цієї протеази. Таким чином, після обробки трипсином поверхня мембрана еритроцитів втрачає частину сіалових кислот, які відщеплюються разом з екстрацелюлярними поліпептидними ланцюгами деяких інтегральних білків.

Було показано, що після обробки трипсином  $\zeta$ -потенціал еритроцитів знижується майже на 40 % порівняно з інтактними клітинами та складає  $-12,33 \pm 0,61$  мВ (рис. 5.17).

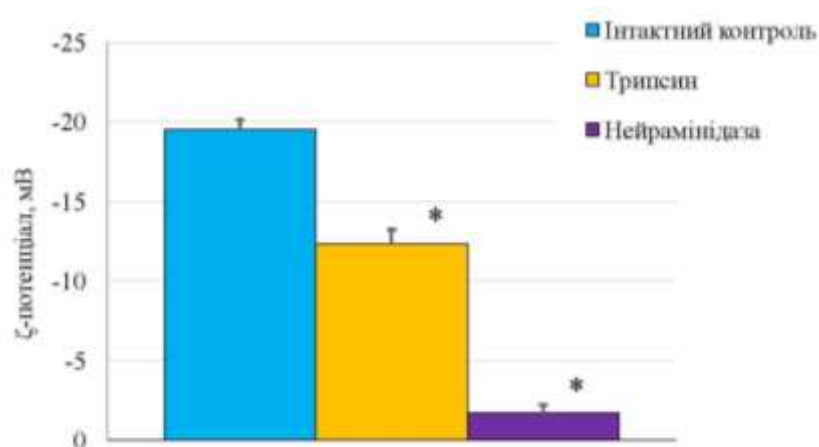


Рисунок 5.17 –  $\zeta$ -потенціал інтактних та ензиматично-модифікованих еритроцитів щурів ( $M \pm SEM$ ,  $n=4$ ).

\* – статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Контроль»,  $p \leq 0,05$

Інкубація модифікованих трипсином еритроцитів з граміцидином S призводила до подальшого зниження  $\zeta$ -потенціалу не залежно від концентрації в діапазоні від 5 до 20 мкг/мл (рис. 5.18). Останнє може свідчити про те, що за умов втрати частини сіалових кислот та зниження загального негативного заряду поверхні еритроцитів знижується й кількість адсорбованих молекул граміцидину S, необхідних для його нейтралізації.

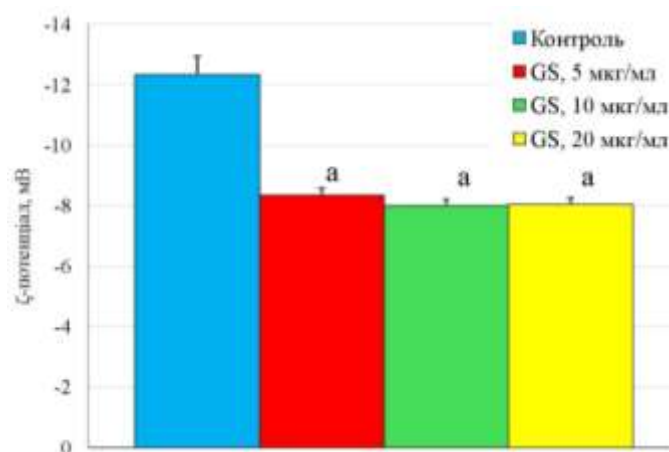


Рисунок 5.18 – ζ-потенціал оброблених трипсином еритроцитів щурів після інкубації з граміцидином *S in vitro* ( $M \pm SEM$ ,  $n=4$ ).

a – статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Контроль»,  $p \leq 0,05$ ,

b – статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «GS, 5 мкг/мл»,  $p \leq 0,05$

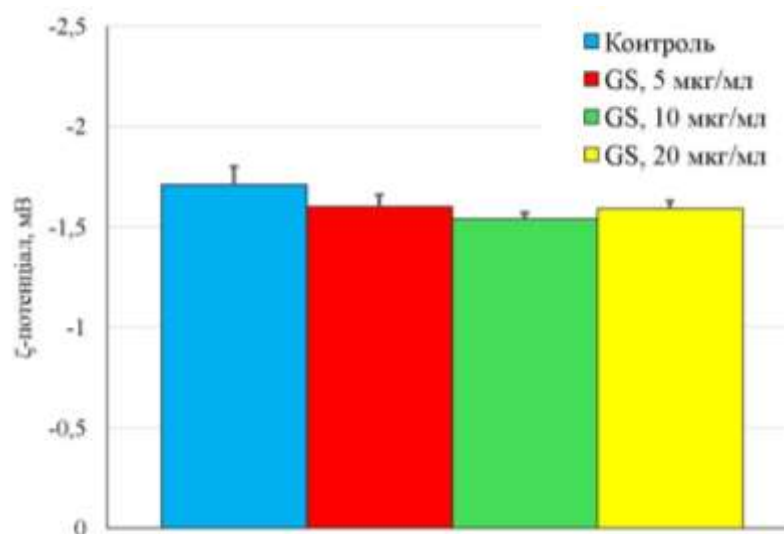


Рисунок 5.19 ζ – потенціал оброблених нейрамінідазою еритроцитів щурів після інкубації з граміцидином *S in vitro* ( $M \pm SEM$ ,  $n=4$ ).

a – статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Контроль»,  $p \leq 0,05$ ,

b – статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «GS, 5 мкг/мл»,  $p \leq 0,05$

Нейрамінідаза – глікозил-гідролаза, яка гідролізує  $\alpha 2 \rightarrow 3$  та  $\alpha 2 \rightarrow 6$  кетозидні зв'язки кінцевих залишків N-ацетилнейрамінової (сілової) кислоти в олігосахаридах, глікопротеїнах та гліколіпідах. Обробка еритроцитів нейрамінідазою призводить до втрати більшої частини негативнозаряджених сілових кислот у складі глікопротеїнів плазматичної мембрани та посилює спонтанну та індуковану аглютинацію еритроцитів.

Встановлено, що обробка еритроцитів нейрамінідазою призводить до суттєвого зниження  $\zeta$ -потенціалу, більш ніж на 95 %, у порівнянні з інтактними клітинами (рис. 5.17). В той же час, інкубація з грамїцидином S у всіх досліджених концентраціях не впливала на  $\zeta$ -потенціал еритроцитів, попередньо оброблених нейрамінідазою (рис. 5.19).

Таким чином, унаслідок проведених досліджень було показано, що негативний  $\zeta$ -потенціал еритроцитів перш за все обумовлений наявністю карбоксильних груп сілових кислот, які входять до складу вуглеводної частини глікопротеїнів та гліколіпідів. Грамїцидин S, який містить позитивно заряджені аміногрупи залишків орнітину, адсорбуючись на мембрані, знижує  $\zeta$ -потенціал еритроцитів за рахунок часткової нейтралізації негативного поверхневого заряду. Водночас, грамїцидин S у досліджуваному діапазоні концентрацій не впливав на  $\zeta$ -потенціал ензиматично-модифікованих клітин, які втратили більшу частину сілових кислот внаслідок обробки нейрамінідазою.

### 5.7. Вплив інкапсуляції пептидів у сферичні нанорозмірні ліпосоми на кінетику накопичення пептиду GS в плазматичних мембранах еритроцитів

Досліджено вплив GS вбудованого у 100 нм ліпосоми з ДПФХ на розподіл еритроцитів за об'ємом та на стійкість мембрани до електричного пробою й кислотного гемолізу. Інкубація еритромаси з водним розчином GS призводить до появи клітин різного об'єму (рис. 5.20). Співвідношення субпопуляцій еритроцитів в пулі клітин того самого донора при різних концентраціях GS розрізнялися як між собою, так і з контролем.

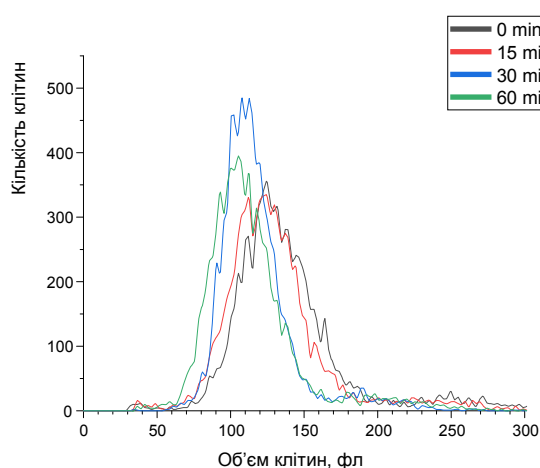


Рис. 5.20. Об'ємний розподіл еритроцитів, інкубованих з GS протягом різного часу. (Кольорові лінії відповідають різним інтервалам попередньої інкубації еритроцитів з GS: 0 хв – інтактні клітини. Концентрація GS 5 мкМ).

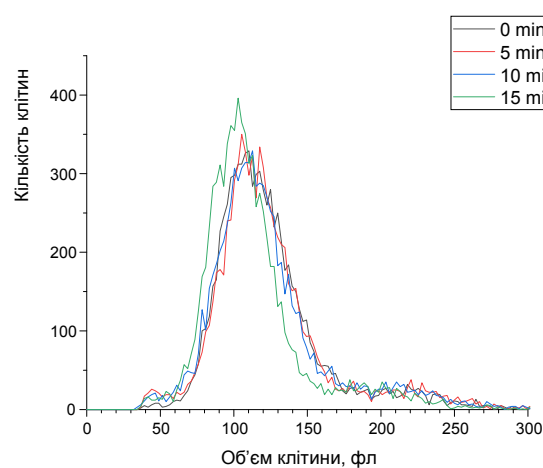


Рис. 5.21. Об'ємний розподіл еритроцитів, інкубованих з ліпосомальним GS. (Кольорові лінії відповідають різним інтервалам попередньої інкубації еритроцитів з ліпосомою+GS: 0 хв – інтактні клітини. Кінцева концентрація GS становить 20 мкМ)

Формуються групи еритроцитів, які за розмірами відрізняються від клітин переважаючого 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 й практично зникає при інкубації еритромаси з грамїцидином 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 зумовлене або збільшенням площі зовнішнього ліпідного моношару мембрани при вбудовуванні в неї молекул пептиду, або феноменом мікровезикуляції еритроцитів [77], коли амфіфільний GS або розподіляється між ліпідними рафтами та основною мембраною, або перерозподіляється між моношарами мембрани. При збільшенні концентрації GS до 10 мкМ, зберігається зменшення, однак при цій концентрації після перших 15 хв. інкубації не виявлено значних 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 у мембрану.

Імовірна мікровезикуляція еритроцитів може бути опосередкована вбудовуванням GS у зовнішній моношар мембрани еритроцита, формуванням обернених або кубічних ліпідних фаз та провокуванням «відшнуровування» фрагментів мембран. Цей ефект, імовірно, не залежить від роботи ліпід-траслокуючих ферментів та цитоскелета. Вищі концентрації GS, використані в нашій роботі, спричиняють 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 спричиненою GS зміною проникності мембран еритроцитів до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , активацією моторних нанодоменів цитоскелета, транслоказ та скрамблаз. Подібну кальцій-залежну активацію ми спостерігали для тромбоцитів [1, 25].

При дослідженні впливу ліпосомальних форм GS на структурно-функціональних властивостей 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. 5.21), зменшення об'єму в 5 разів менше порівняно з дією самого GS. Таке зменшення зморщування еритроцитів, зумовленого 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 проборою 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 значних 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 диференційну 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 часу від додавання кислоти до початку гемолізу (лаг-період) 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, спричинене GS, зумовлене ефективним розподілом GS у мембрану клітин, зміною білок-ліпідних взаємодій і свідчить про те, що навіть впродовж

годин після пред'явлення дифузія та перерозподіл GS у плазматичній мембрані еритроцитів не завершилися, нового стаціонарного стану мембранного матриксу не досягнуто.

### **5.8 Вплив ліпосомальних форм GS на гемолітичну стійкість 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. Водночас 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 повільніше, вбудований пептид стабілізує мембрану, запобігаючи їй кислотному гемолізу.

Однак ліпосоми, завантажені більшими концентраціями GS (до 40 мкМ), зменшують лаг-період. Також спостерігаємо 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.

На рисунку 5.20 наведено типовий розподіл за об'ємом інкубованих з грамїцидином S у концентрації 5  $\mu\text{M}$  еритроцитів здорових донорів.

Зміни в об'ємі еритроцитів для кожної з серій вимірів відторюються, що свідчить про стабільність виникнення ефекту. Форма розподілу достовірно змінюється з часом інкубації (таблиця 5.2). Середній об'єм клітини зменшується.

Таблиця 5.2

Вплив часу інкубації з GS на зменшення об'єму еритроцита

Об'єм еритроциту, $\times 10^{-15}$ л	Час інкубації, хв		
	15	30	60
Середній	117.8 $\pm$ 1,6*	115.7 $\pm$ 1,7*	114.9 $\pm$ 1,7*
Модовий	106.7 $\pm$ 1,2*	105.3 $\pm$ 1,1*	103.8 $\pm$ 1,3*
Медіанний	111.5 $\pm$ 1,6*	110.25 $\pm$ 1,4*	107.8 $\pm$ 1,6*

Примітка. \* – зміни, достовірні відносно контролю  
\*\* концентрація GS 5  $\mu\text{M}$

Відмінності, характерні для всіх проміжків часу, що свідчить про сталу у часі швидкість взаємодії грамїцидину з мембранами еритроцитів. Крім того, не досягнення стаціонарного рівня нових значень об'єму клітин

свідчить про продовження перебудов мембран еритроцитів під дією GS навіть через годину після початку процесу.

Крім того, деформацію розподілення еритроцитів за об'ємом може бути спричинено віковими відмінностями клітин, які циркулюють в судинах 120 діб.

У старих еритроцитів більша площа поверхні, це збільшує імовірність взаємодії з граміцидином. Вони мають менш стабільну мембрану, ніж у молодих еритроцитів, тому незначні порушення мембрани спричиняють її руйнування. Цитоаналізатор, можливо, не реєструє ці клітини, продовжує накопичення даних інших еритроцитів. Можливим поясненням спостережуваного ефекту може бути руйнування більш старих еритроцитів з більшим об'ємом.

Підвищення концентрації пептиду до 10 мкМ спричиняє схоже зменшення середнього об'єму еритроцитів, інкубованих упродовж години з GS. Проте достовірні відмінності від контролю спостерігалися лише через 30 хвилин інкубації з пептидом (табл. 5.3)

Спостережувані ефекти зумовлено великою кількістю молекул GS у водній фазі, агрегацією молекул пептиду та конкурентним інгібуванням зв'язування пептиду з мембранами еритроцитів.

Таблиця 5.3

## Вплив часу інкубації з GS на зменшення об'єму еритроцита

Об'єм еритроциту, $\times 10^{-15}$ л	Час інкубації, хв		
	15	30	60
Середній	136 $\pm$ 2,7	127,2 $\pm$ 2,8*	117,9 $\pm$ 2,7*
Модовий	124,9 $\pm$ 2,5	115,2 $\pm$ 2,6	107,8 $\pm$ 2,6*
Медіанний	129,8 $\pm$ 2,6	120 $\pm$ 2,5*	112,7 $\pm$ 2,9*

Примітка. \* – зміни, достовірні відносно контролю  
\*\* концентрація GS 10  $\mu$ M

Однаково позитивно заряджені мономерні GS можуть відштовхуватися від уже вбудованих мономерів пептидів, уповільнюючи подальшу сорбцію. З часом перерозподіл усе більшої кількості молекул GS у бішар та агрегація в бішарі призводять до зростання швидкості сорбції решти молекул GS із водної фази на мембрану клітин.

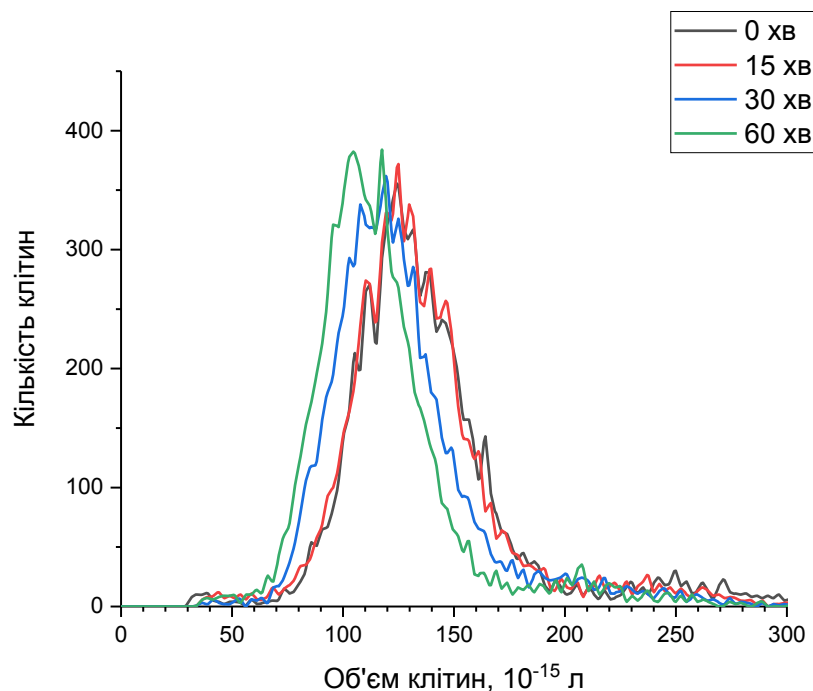


Рисунок 5.22 Залежність об'ємного розподілення еритроцитів від часу інкубування з грамїцидином S у концентрації 10 мкМ

Для більших концентрацій було вивчено менші періоди часу інкубування, оскільки за цих концентрацій грамїцидин може спричинити гемоліз еритроцитів, що буде впливати на відтворюваність результатів.

Подальше підвищення концентрації пептиду в середовищі інкубації до 20 мкМ супроводжується зменшенням об'єму еритроцитів одразу в перші хвилини інкубації (табл. 5.4 та рис. 5.21). Імовірно, це відображає переважання сорбції димерів та олігомерів GS, які утворюються в полярному розчиннику. Наші результати свідчать, що олігомери вбудовуються в мембрану еритроцитів швидше за мономерні пептиди.

Таблиця 5.4

Вплив часу інкубації з GS на зменшення об'єму еритроцита

Об'єм еритроциту, $\times 10^{-15}$ л	Час інкубації, хв		
	5	10	15
Середній	128,9 $\pm$ 0,9*	121,7 $\pm$ 1,4*	116,3 $\pm$ 1,3*
Модовий	112,6 $\pm$ 1,2*	110,9 $\pm$ 1,6*	106,8 $\pm$ 1,2*
Медіанний	117,6 $\pm$ 1,4*	112,7 $\pm$ 1,1*	110,2 $\pm$ 1,2*

Примітка. \* – зміни, достовірні відносно контролю

\*\* концентрація GS 20  $\mu$ M

Розподілення еритроцитів за об'ємом інкубованих з пептидом GS у концентрації 40  $\mu$ M свідчать про те, що при подальшому збільшенні концентрацій знову не спостерігається значний ефект від дії GS в перші хвилини після початку інкубації (рис. 5.23).

При цьому при збільшенні часу інкубації еритроцитів із пептидом GS, деформації об'ємного розподілу залишаються достовірними (таблиця 5.5), це може свідчити про те, що існує максимальна швидкість сорбції пептиду в мембрану навіть для олігомерів GS, які вбудовуються більш швидко. Імовірно, відбувається конкуренція за місця зв'язування в природній мембрані, якими можуть бути межі ліпідних кластерів, зони анулярних ліпідів. Можлива наявність кооперативної взаємодії пептиду з природними гетерогенними мембранами.

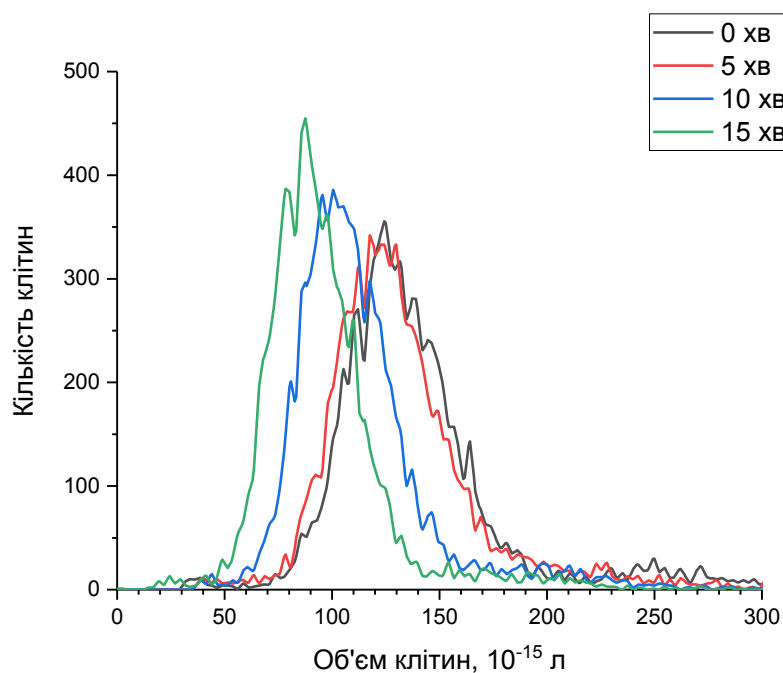


Рисунок 5.23 Залежність об'ємного розподілу еритроцитів від часу інкубування з граміцидином S у концентрації 40  $\mu\text{M}$

Таблиця 5.5

Вплив часу інкубації з GS на зменшення об'єму еритроцита

Об'єм еритроциту, $\times 10^{-15}$ л	Час інкубації, хв		
	5	10	15
Середній	132,5 $\pm$ 1,7	118 $\pm$ 1,7*	115,4 $\pm$ 1,9*
Модовий	122 $\pm$ 1,9	111,4 $\pm$ 1,6*	107,3 $\pm$ 1,8*
Медіанний	127,4 $\pm$ 2	117,6 $\pm$ 1,8*	110,2 $\pm$ 1,6*

Примітка. \* – зміни, достовірні відносно контролю

\*\* концентрація GS 40  $\mu\text{M}$

При дослідженні впливу ліпосомальних форм GS на структурно-функціональні властивості еритроцитів встановлено, що при інкубуванні



еритроцитів з грамїцидином S, зв'язаним з ліпосомами, ефект зменшення середнього об'єму еритроцитів є менш вираженим.

Так, при інкубуванні еритроцитів з ліпосомами, які містили 20  $\mu\text{M}$  GS (рис. 5.24), зменшення об'єму є у 5 разів меншим порівняно із дією GS із водної фази.

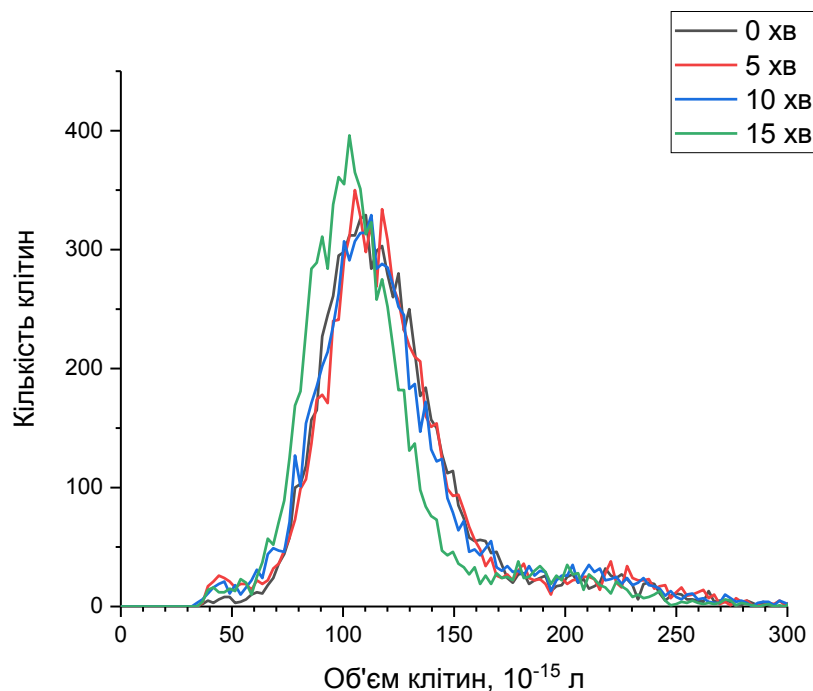


Рисунок 5.24 Вплив ліпосомальних форм грамїцидину S на розподіл еритроцитів за об'ємом.

Час інкубування еритроцитів із ліпосомами позначено кольором. Концентрація грамїцидину S в середовищі інкубування – до 20  $\mu\text{M}$ .

Достовірні зміни відбуваються (таблиця 5.6) наприкінці часу спостереження, це може свідчити про те що GS досить міцно утримується в ліпосомах і перерозподіл в клітинні мембрани з ліпідного середовища потребує більше часу та подолання вищого активаційного бар'єру.

Таблиця 5.6

Залежність об'єму еритроцитів від часу інкубування з грамїцидином S\*\* зв'язаним з ліпосомами

Об'єм еритроциту, $\times 10^{-15}$ л	Час інкубації, хв		
	5	10	15
Середній	122,9 $\pm$ 1,7	120,9 $\pm$ 1,8	115,43 $\pm$ 1,8*
Модовий	114,2 $\pm$ 1,6*	112,5 $\pm$ 1,6*	104,6 $\pm$ 2,1*
Медіанний	118,8 $\pm$ 1,9	119,6 $\pm$ 1,8	107,2 $\pm$ 1,9*

Примітка. \* – зміни, достовірні відносно контролю

\*\* концентрація GS 20  $\mu$ M

Аналогічний ефект спостерігаємо й при інкубуванні еритроцитів з грамїцидином S, зв'язаним з ліпосомами в концентрації 40  $\mu$ M (рис. 5.25).

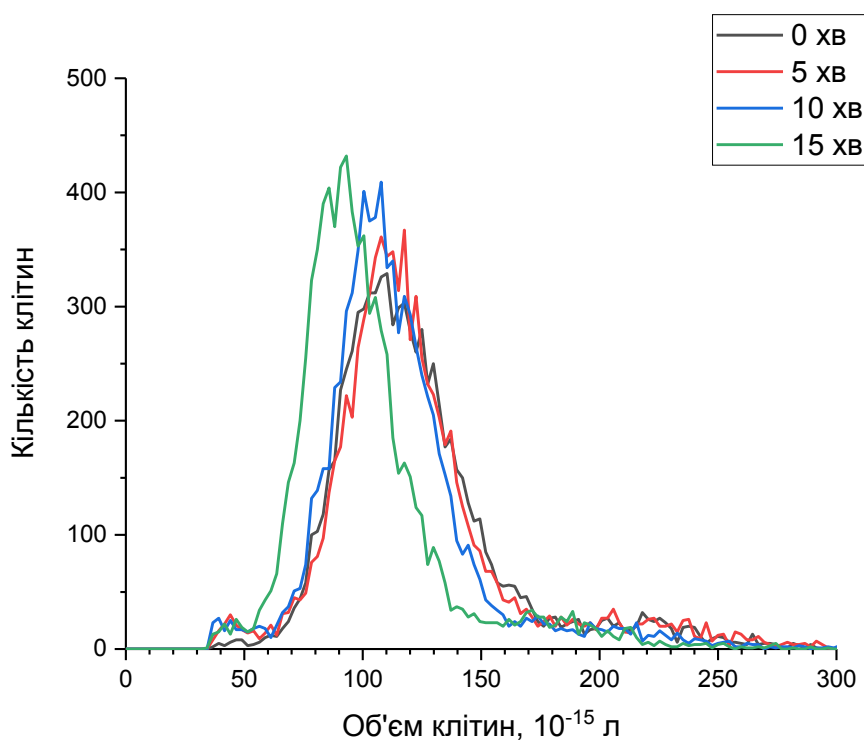


Рисунок 5.25 Вплив ліпосомальних форм грамїцидину S на розподіл еритроцитів за об'ємом.

Час інкубування еритроцитів із ліпосомами позначено кольором. Концентрація грамїцидину S у середовищі інкубування – до 40  $\mu$ M.

Достовірні зміни об'єму (табл. 5.7) також фіксуємо лише наприкінці терміну спостереження, вони є більш вираженими. Це зумовлено значно більшим вмістом грамїцидину в ліпосомах: зменшенням відстані між молекулами пептиду або його агрегатів у поверхневому шарі ліпосом, посиленням електростатичного відштовхування молекул GS та зменшенням енергетичного бар'єру для переходу молекул пептиду зі сферичних ліпосом до двоякоопуклих еритроцитів.

Більша кривизна (100 нм) ліпосом, порівняно з мембраною еритроцита, при високому (40 мкМ) вмісті GS також може сприяти полегшенню перерозподілу пептиду з везикул до дисків.

Таблиця 5.7

Залежність об'єму еритроцитів від часу інкубування з грамїцидином S<sup>\*\*</sup> зв'язаним з ліпосомами

Об'єм еритроциту, $\times 10^{-15}$ л	Час інкубації, хв		
	5	10	15
Середній	123,9 $\pm$ 2,1	115,3 $\pm$ 2,3	105,1 $\pm$ 2,2*
Модовий	109,8 $\pm$ 2,1*	104,8 $\pm$ 2,2*	92,4 $\pm$ 1,9*
Медіанний	115,7 $\pm$ 1,9	109 $\pm$ 1,8*	98 $\pm$ 2,1*

Примітка. \* – зміни достовірні відносно контролю  
\*\* концентрація GS 40  $\mu$ M

Порівняння кривих кислотного гемолізу еритроцитів, інкубованих із GS (рис. 5.26) гемолізу за різних концентрацій грамїцидину S, вказує на зменшення часу від додання кислоти до початку гемолізу – лаг-періоду – при відносній консервативності швидкості, що дозволяє зробити висновок про зниження стабільності мембрани.

Зменшення стійкості мембран еритроцитів до кислотного гемолізу має залежність від концентрації грамїцидину: що вона вища, то більший ефект.

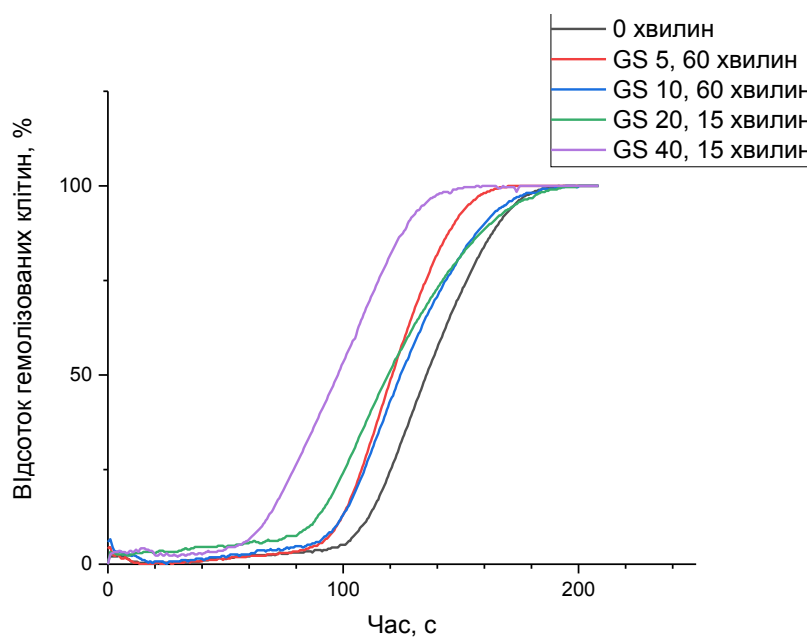


Рисунок 5.26 Типові інтегральні криві кислотного гемолізу еритроцитів інкубованих з граміцидином S

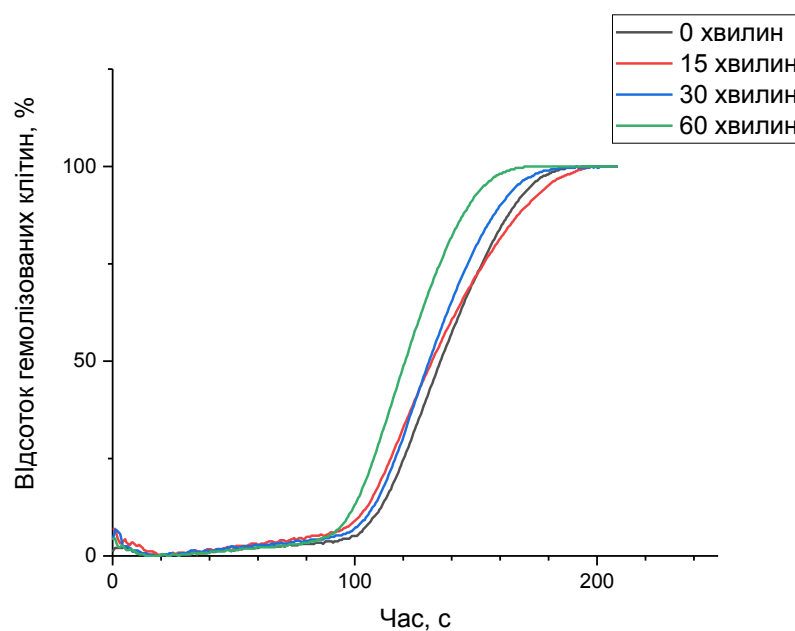


Рисунок 5.27 Інтегральні криві кислотного гемолізу еритроцитів інкубованих з граміцидином S у концентрації 5  $\mu\text{M}$  впродовж різного часу

Однак послаблення мембрани не має чіткої часової залежності (рис. 5.27, рис. 5.28) і більшою мірою залежить від концентрації. Притому сталість швидкості гемолізу, свідчить про відсутність спільних взаємодій

кислот з грамїцидином. Також з цього факту можливо припустити що в дефекти, утворені грамїцидином S, кислота не проникає, що може свідчити про заряд цих дефектів або наявність інших факторів що протидіють проникненню молекул кислоти до еритроциту.

Сорбція GS на мембрані еритроцита при попередній інкубації з пептидом змінює: заряд поверхні, роблячи його більш позитивним; гідратацію голівок ліпідів; вочевидь, зміщує константи рівноваги протонування, окислення-відновлення дисоційованих груп мембранних білків та ліпідів і знижує шкідливу дію HCl щодо еритроцитів.

Аналізуючи криві кислотного гемолізу еритроцитів інкубованих з грамїцидином S зв'язаним з ліпосомами, можливо відмітити збільшення часу необхідного для початку гемолізу для концентрації 20  $\mu\text{M}$  (рис. 5.29).

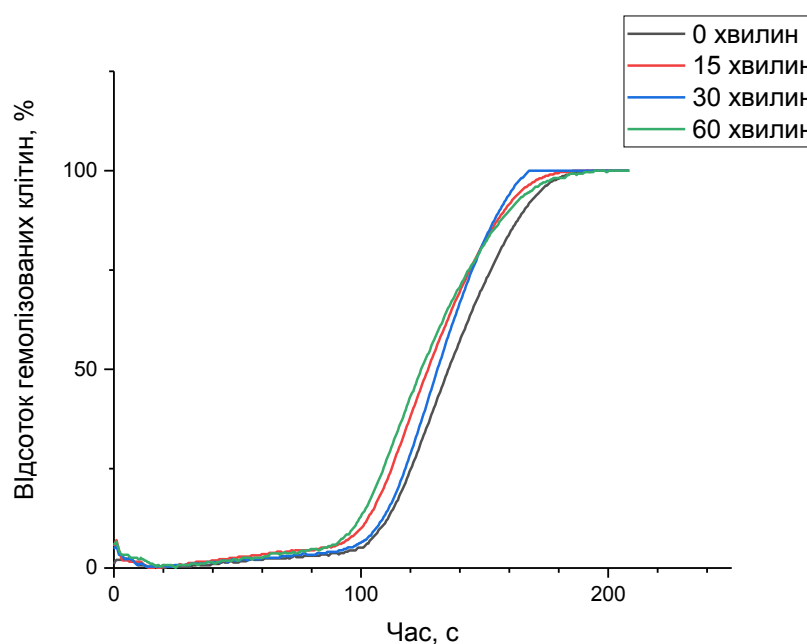


Рисунок 5.28 – Інтегральні криві кислотного гемолізу еритроцитів інкубованих з грамїцидином S у концентрації 10  $\mu\text{M}$  впродовж різного часу

Такий ефект можливо обумовити тим що частина кислоти взаємодіє з ліпосомами, однак навіть кислотна дія не розриває зв'язку грамїцидину з

бішаром, про що свідчить відсутність ефектів, які спостерігалися раніше при дії водних розчинів GS.

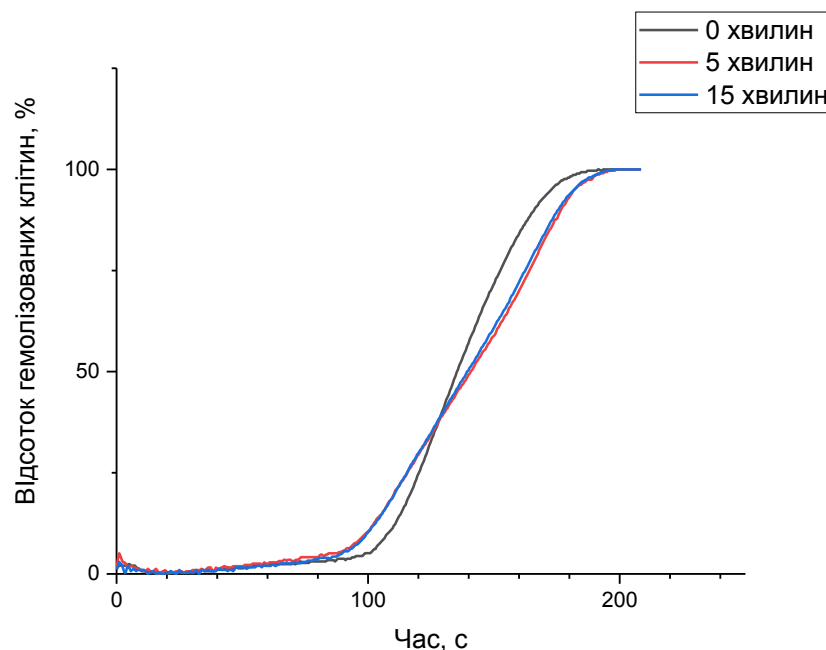


Рисунок 5.29 – Інтегральні криві кислотного гемолізу еритроцитів інкубованих з грамїцидином S зв'язаним з ліпосомами у концентрації 20  $\mu\text{M}$  впродовж різного часу

Однак при збільшенні концентрації пептиду S, зв'язаного з ліпосомами до 40  $\mu\text{M}$  спостерігаємо зменшення лаг-періоду (рис. 5.30). Також спостерігається залежність від часу інкубації.

Скорочення лаг-періоду при збільшенні часу пре інкубації свідчить про: по-перше, більш ефективний перерозподіл GS із ліпосом з його більшим завантаженням, по-друге, про екранування заряду поверхні мембран ліпосом і еритроцитів  $\text{H}^+$ , послаблення електростатичних взаємодій у поверхневому шарі та полегшення вивільнення GS із нанопереносника. Таким чином, рН середовища може бути одним із технологічних параметрів, що контролюють кінетику вивільнення АМП з ліпосомальних нанопереносників.

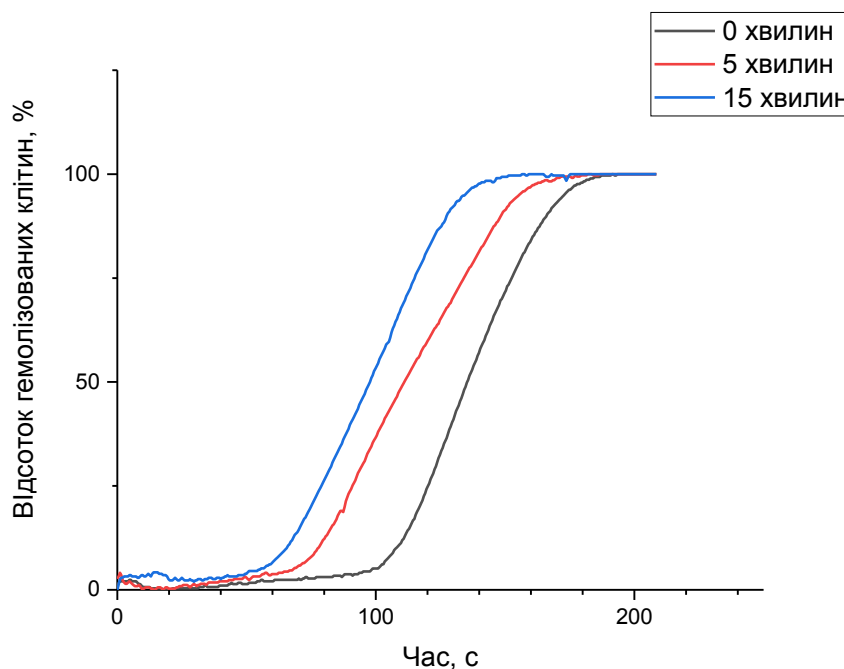


Рисунок 5.30 – Інтегральні криві кислотного гемолізу еритроцитів, інкубованих з грамїцидином S, зв'язаним з ліпосомами в концентрації 40  $\mu\text{M}$  упродовж різного часу

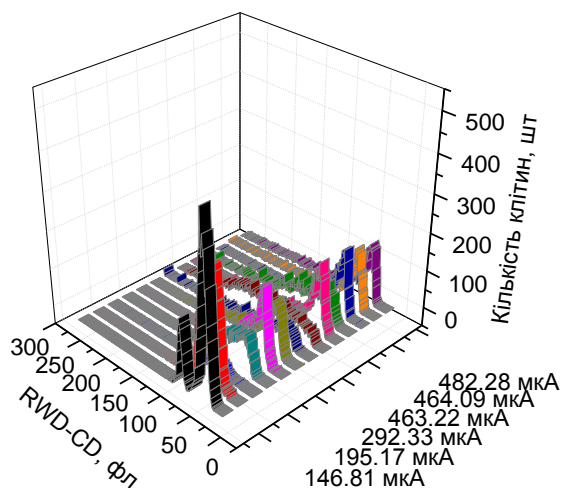
Грамїцидин S у сублітичних концентраціях спричиняє зменшення на 15% середнього об'єму еритроцитів людини. Спостережене зморщування еритроцитів під час інкубації з грамїцидином S в ізотонічному водному розчині, імовірно, не пов'язане із активацією  $\text{Cl}^-$  транспорту,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмінника,  $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  ко-транспортера, чи значним підвищенням осмотичного коефіцієнта внутрішньоклітинного вмісту клітини, як у випадку гіпертонічного зменшення об'єму еритроцита, проте пов'язане з віковими особливостями еритроцитів.

Використання комплексу грамїцидину S з ліпосомами зменшує гемолітичний ефект грамїцидину S та призводить до збільшення концентрації GS, потрібної для зморщування еритроцитів. Зв'язування грамїцидину S з еритроцитарною мембраною зменшує кислотну резистентність еритроцитів, проте не впливає на швидкість протікання гемолізу.

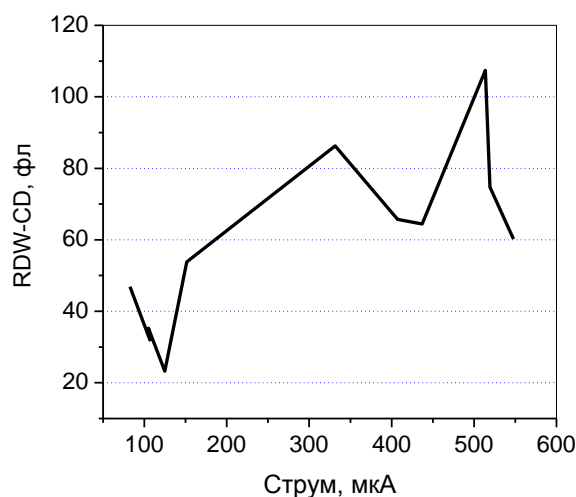
Результати цієї роботи може бути використано при підборі параметрів ліпосом та способу навантаження ліпосом грамїцидином S для спрямованої доставки грамїцидину S до організму пацієнтів із мінімальними побічними ефектами.

Було вивчено електромеханічну стабільність мембран еритроцитів під впливом грамїцидину S.

Еритроцитарний пул у досліджуваних контрольних зразках крові був неоднорідний: поряд з клітинами нормальної референтної величини [8] в аналізованій аліквоті еритромаси траплялися малі й великі еритроцити у приблизній пропорції 2,2 : 1,5 : 1,0 в порядку зростання розмірів клітини (рис. 5.31a)



(a)



(b)

Рис. 5.31. Розподіл еритроцитів за об'ємом (RWD-CD) (a) та стійкістю мембрани до електричного пробою (b) в контрольних зразках.

Клітини субпопуляції малих еритроцитів пошкоджуються при значеннях сили струму близько 82 мкА, середніх – отримують пробій при струмі трохи більшому за 330 мкА, великі – понад 513 мкА (рис. 5.31 b).



Інкубація еритромаси з розчином граміцидину S різних концентрацій призводить до появи клітин різного об'єму (рис. 5.32 а-с). Співвідношення субпопуляцій еритроцитів в пулі клітин того самого донора при різних концентраціях граміцидину S відрізнялися як між собою, так і від контролю.

У всіх випадках показано наявність переважної групи клітин з об'ємом, який є близьким до референтних показників (еритроцити середнього розміру). Друга субпопуляція еритроцитів, яка значною мірою представлена в контрольному зразку – еритроцити більших, порівняно з основною масою клітин в загальному пулі, розмірів. Ця субпопуляція зберігається й після інкубації з антибіотиком, але в дещо зниженій кількості порівняно із контролем. Разом із тим, спостерігається як зменшення, так і збільшення об'єму низки клітин, тобто в загальній масі формуються групи еритроцитів, які за розмірами відрізняються від клітин переважаючого пулу. Так, чітко виділяється група невеликих за розмірами еритроцитів, яка з'являється при інкубації з GS у концентрації 5 мкг/мл, стає значимо представленою при 10 мкг/мл, зменшується при 20 мкг/мл і практично зникає при інкубації еритромаси з граміцидином S у концентрації 40 мкг/мл. Поряд з цим частина клітин збільшується в розмірах, причому це збільшення неоднорідне й при різних дозах доходить до величин від 80 фл до 200 фл.

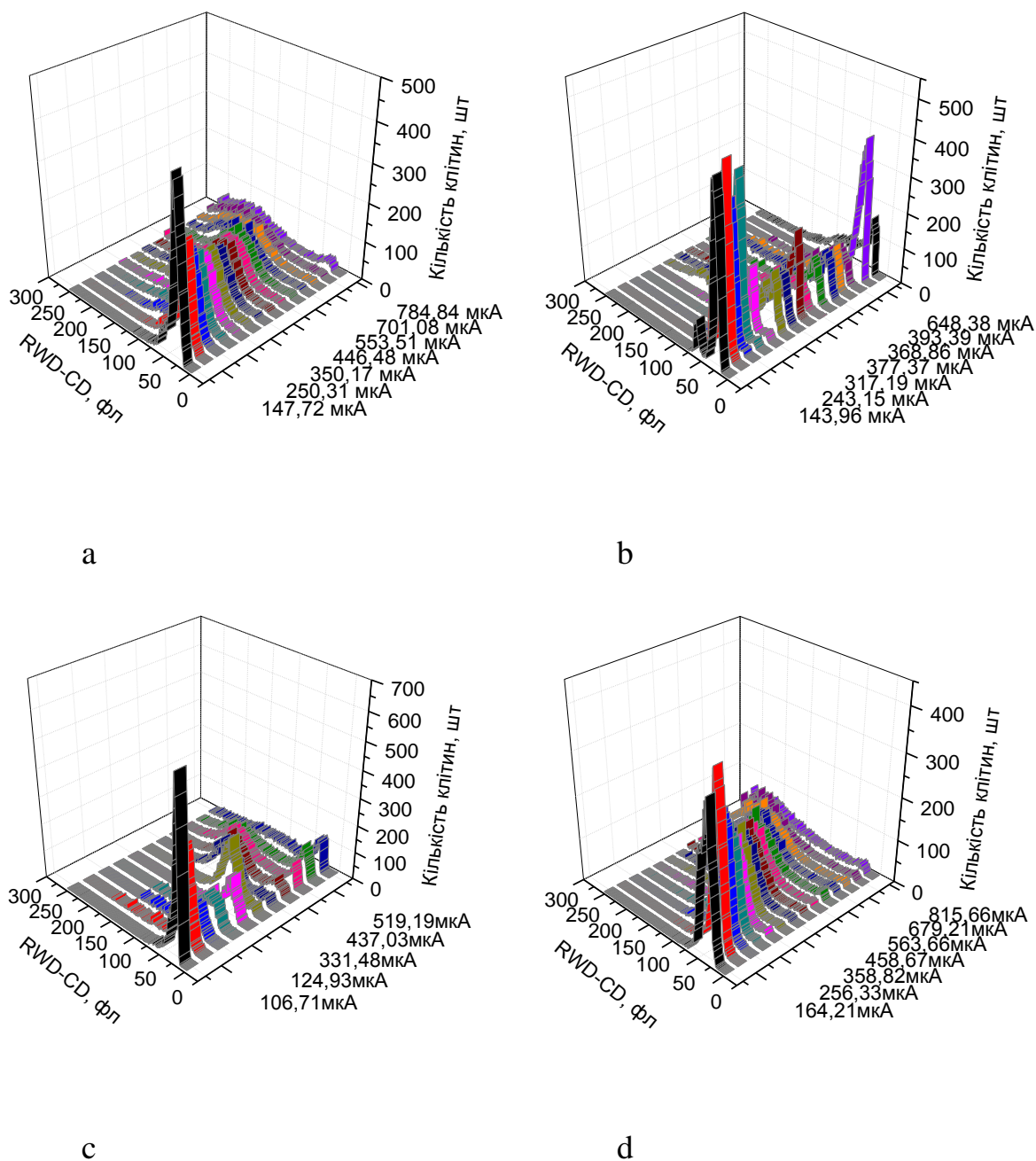


Рис. 5.32. Розподіл еритроцитів за об'ємом (RWD-CD) у зразку еритромаси після інкубації клітин з грамїцидином S у концентраціях 5, 10, 20, 40 мкг на 1 мл суспензії еритроцитів (відповідно – а, б, с, d).

Загальна картина розподілу клітин за об'ємом при дії різних концентрацій антибіотика виглядає таким чином (див. рис. 5.32, а, б, с, d). У пулі еритроцитів є стійка до дії GS субпопуляція клітин, яка складає

найбільшу групу клітин, що мають об'єм, близький до референтних величин. Збільшення дози GS послідовно від 5 до 40 мкг/мл спричиняє різноспрямовані зміни загального пулу клітин за об'ємом. При низьких і середніх дозах в загальній масі з'являються клітини, схильні до зменшення свого об'єму, такі клітини переважають, особливо при концентрації 10 мкг/мл. Зі збільшенням концентрації GS вище за 10 мкг/мл збільшується частка еритроцитів великого об'єму. Зміни в розподілі клітин за об'ємом відбуваються за рахунок еритроцитів основної групи клітин середнього розміру.

Певним чином пояснити механізм взаємодії спостережуваного впливу GS на розподіл популяції еритроцитів за об'ємом, допомагають результати вимірювання струму пробією мембрани клітин, інкубованих із різними концентраціями пептиду.

Формування неоднорідності пулу еритроцитів під дією антибіотика впливає на загальну картину пошкодження еритроцитів при дії струму різної величини (рис. 5.33 а-с). Після інкубації з GS формуються підгрупи еритроцитів з різною стійкістю мембрани до дії електричних імпульсів. Якщо в контрольних зразках електричний пробій явно вказував на наявність двох популяцій еритроцитів у донора, то після інкубації з антибіотиком їх число зростало при малих концентраціях GS (5 і 10 мкг/мл), а при концентрації 20 мкг/мл знову спостерігалася наявність двох субпопуляцій, пробій мембран однієї відбувається при струмі близькому до 125 мкА, другої – при струмі близькому до 550 мкА.

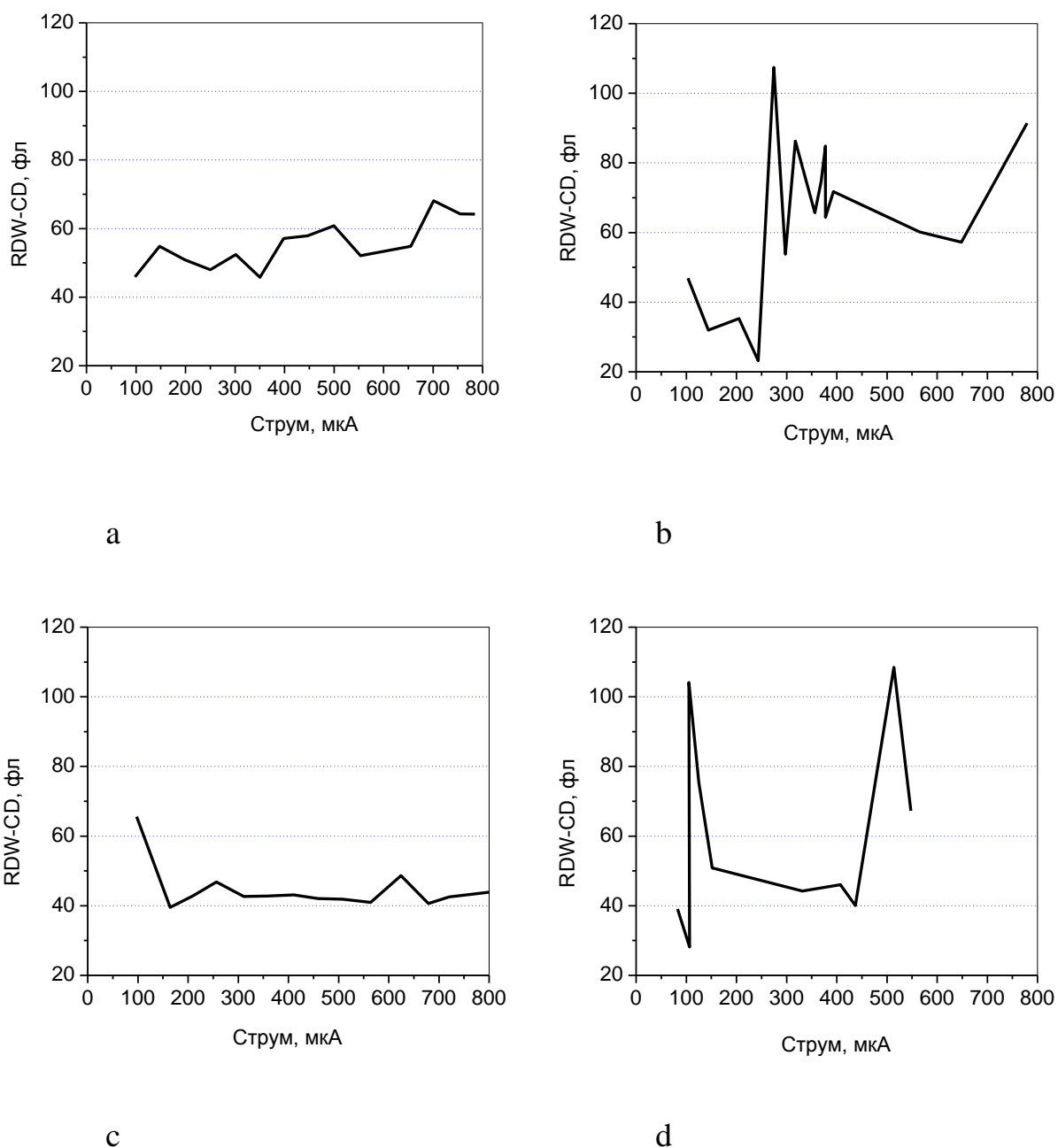


Рис. 5.33. Показники стійкості мембрани еритроцитів до електричного пробою після інкубації клітин з GS в концентраціях 5, 10, 20, 40 мкг на 1 мл еритромаси (відповідно - a, b, c, d).

Привертає увагу й той факт, що при використанні антибіотика в дозах 10 і 20 мкг/мл пошкодження мембран еритроцитів проявлялося в клітинах однакового об'єму, але при різних силах струму. У таких

випадках, імовірно, крихкість клітини залежала від різних причин, тобто пробій був зумовлений різними молекулярними механізмами.

У присутності GS в концентрації 40 мкг/мл вже при мінімальних струмових навантаженнях близько 100 мкА спостерігалось явище, схоже на мембранний пробій, після якого об'єм клітин зменшувався з референтних значень до більш низьких показників. При подальшому збільшенні сили струму не спостерігалось будь-яких подій, що вказували б на електричний пробій мембран і критичну зміну об'єму клітин.

Таким чином, унаслідок проведених досліджень було показано, що при низьких концентраціях GS частина еритроцитів із загального пулу аналізованих клітин зменшується в розмірах. Зниження об'єму еритроцитів в цих умовах може бути пов'язаним із утворенням локальних дефектів мембрани й посиленням процесів утворення мікровезикул. Біогенез і секреція мікровезикул є невід'ємною частиною фізіології еритроцитів, яка пов'язана з дозріванням і старінням клітин і сприяє своєчасному позбавленню від пошкоджених компонентів, які в іншому разі можуть спричинити небажані гемостатичні та імунологічні реакції [226]. Вивільнення мікровезикул супроводжується зміною співвідношення об'єму й площі поверхні клітин унаслідок ремоделювання мембрани [209]. Відділення мікровезикул від еритроцитів сприяє втраті гемоглобіну (до 20%) і частини клітинної мембрани з одночасним зменшенням об'єму клітин і збільшенням їх щільності [210].

Отримані дані частково підтверджуються дослідженнями уніламелярних ліпідних везикул із диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ), що містять різні концентрації граміцидину S, проведеними авторами [112] за допомогою денситометрії та звукової велосиметрії, у яких було встановлено, що включення граміцидину S поступово знижує температуру фазового переходу ДМФХ везикул, а також знижує ступінь

кооперативності основного фазового переходу й збільшує об'ємну стисливість везикул. GS, імовірно, посилює теплові флуктуації в ділянці основного фазового переходу й забезпечує більшу свободу обертального руху для вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів. Здатність GS збільшувати стисливість мембрани й знижувати температуру фазового переходу свідчить про наявність ділянок спотвореної структури мембрани навколо вбудованих молекул граміцидину S.

У нашому дослідженні встановлено підвищення питомого об'єму еритроцитів при відносно високій концентрації GS. Це у свою чергу може вказувати на порушення цілісності ліпідного бішару при взаємодії з високими концентраціями GS.

Певну послідовність морфологічних змін еритроцитів при інкубації з різними концентраціями GS визначено в роботі [221] з використанням моделі двошарового зчеплення (*bilayer-couple hypothesis*) [222]. Автори [221] відзначають, що напочатку GS адсорбується на мембрані еритроцита, що перебуває у формі дискоцита, це розширює його зовнішній ліпідний шар і призводить до трансформації клітини в ехіноцит. Наступна форма, яку спостерігали автори [221] – дискоцит – формується, коли вміст пептиду тимчасово вирівнюється між двома моношарами, унаслідок його переміщення у внутрішній моношар за допомогою критичного механізму або утворення перехідних пор. Оскільки внутрішній ліпідний моношар еритроцитів містить більше негативно заряджених ліпідів, ніж зовнішній моношар [213], GS накопичується у внутрішньому моношарі плазмалемі завдяки своєму подвійному позитивному заряду. Через кінцеву, більш високу концентрацію антибіотика у внутрішньому ліпідному моношарі, площа його збільшується, що й веде до формування стоматоцитів. Коли внутрішній ліпідний моношар насичується GS, зовнішній моношар також дифузно заповнюється пептидом, що знову призводить до формування

еритроцитів – дискоцитів, але, мабуть, з більшим об'ємом, ніж в інтактних клітин. Важливу роль в спостережуваних трансформаціях форми клітин автори вбачають за компонентами цитоскелету еритроцитів, які залишаються за межами розгляду у межах цієї моделі. Водночас було показано, що модель двошарового зчеплення потребує існування еластичного мембранного каркасу, пов'язаного з мембраною, щоб різниця в площях моношарів мембрани спричиняла характерні перетворення форми [214]. Таким чином, починаючи з природної форми дискоцитів, морфологія еритроцитів зазнає послідовності трансформацій: ехіноцит – дискоцит – стоматоцит – дискоцит – сфероцит – тіль. Подальше перетворення еритроцитів на сфероцити виходить за межі моделі двошарового зчеплення, але може бути пояснене збільшенням мембранного натягу: відомо, що деякі амфифільні пептиди збільшують натяг мембрани, яка, в свою чергу, прагне мінімізувати площу своєї поверхні. Спостережувана зміна морфології дискоцитів в сфероцит може бути пов'язано з цим ефектом: сферична форма мінімізує площу поверхні для даного фіксованого об'єму. Підвищений натяг мембрани також може пояснити останній етап у послідовності трансформації форми еритроцитів. Пори мембрани, що виникли внаслідок дефектів, швидко розширюються під дією високого натягу [215], що спричиняє розрив еритроцитів, перетворюючи їх на тині, позбавлені гемоглобіну.

Автори [221] показали, що еритроцити демонструють послідовність перетворень форми при впливі GS в діапазоні концентрацій 10–20 мкМ. Використаний нами метод спектроскопії імпульсів опору не дозволяє безпосередньо визначати форму клітин. Ми припускаємо, що така зміна форми еритроцитів могла відбуватися й за наших експериментальних умов, проте наявність еритроцитів різної форми в аналізованих суспензіях мала б спричинити утворення полімодальних гістограм, чого не

спостерігалось в наших експериментах з проточної цитометрії. Ми пояснюємо отриману надзвичайно гетерогенну картину розподілу еритроцитів як за об'ємом, так і за силою струму електричного пробую (рис. 1–3) зменшенням об'єму клітин внаслідок мікровезикуляції. Цей процес може бути опосередкований вбудовуванням GS у екстрацелюлярний моношар мембрани еритроцита, формуванням обернених або кубічних ліпідних фаз та провокуванням «відшнуровування» фрагментів мембран [217]. Цей ефект, імовірно, не залежить від роботи ліпід-транслокуючих ферментів та цитоскелету. Вищі концентрації GS, використані в нашій роботі, спричиняють збільшення об'єму клітин також не через осмотичні ефекти. Часова залежність цих змін дає нам можливість припустити, що зміна об'єму в цьому разі відбувається за рахунок перерозподілу GS у внутрішній моношар плазмалемі та може бути опосередкована спричиненою GS зміною проникності мембран еритроцитів до іонів  $Ca^{2+}$ , активацією моторних нанодоменів цитоскелету, транслоказ та скрамблаз. Подібну кальцій-залежну активацію тромбоцитів було вивчено у наших попередніх роботах [15].

Екстраполюючи результати проведених зараз дослідів впливу різного часу інкубації GS з еритроцитами *in vitro* на рівень цілого організму можемо припустити таке:

- по-перше, навіть сублітичні концентрації GS спричиняють приховані зміни в червоних кров'яних клітинах – зменшується стійкість мембран до електричного пробую. Це відбувається імовірно за все через перерозподіл заряджених та незаряджених ліпідів у мембрані з утворенням кластерів з різною електричною ємністю та через відзначене раніше зменшення поверхневого потенціалу плазматичної мембрани при інкубації з GS [34]. Такі зміни структури мембран можуть призводити до утворення агрегатів клітин, а в наслідок цього – до зниження ефективності газо- та



масообмінних процесів в капілярах й до гіпоксії; крім того, можуть відбуватися зміни в'язкості цільної крові, що позначатиметься на показниках гемодинаміки, можуть вести до гіпертензії, надлишкового навантаження на серце;

- по-друге, сублітичні концентрації GS при тривалому інкубуванні та літичні при коротких експозиціях ведуть до зміни об'єму еритроцитів та зменшення електромеханічної стійкості їх мембран. Крім щойно описаних ефектів спричинених змінами біофізичних характеристик плазматичної мембрани, на рівні системи циркуляції крові та цілого організму зменшення чи збільшення об'єму еритроцитів веде до зменшення концентрації гемоглобіну, зниження ефективності транспорту кисню та CO<sub>2</sub> й зрештою – до гіпоксії та ішемії. Це додаткові до гемолізу еритроцитів несприятливі фактори впливу «прямого» застосування GS через системний кровообіг. Можливість корегування гемолітичної дії GS шляхом застосування комплексів антибіотика із наноносіями та модифікації структури пептиду показано в роботах [2, 36, 40, 255]. Перевагою першого підходу є використання нової лікарської форми зареєстрованого фармпрепарату, оскільки переваги хімічно модифікованих аналогів, виявлені *in vitro*, мають бути підтверджені та пройти тривалу процедуру погодження та реєстрації нового лікарського засобу. Виявлені нами нові побічні ефекти від віртуального системного застосування GS має бути враховано при пошуку можливості внутрішнього використання GS чи створення препаратів-аналогів. З іншого боку, віднайдені особливості взаємодії GS з мембранами клітин ссавців можуть бути універсальними й проявлятися для бактеріальних клітин, простіших за гриби та віруси. У такому разі наведені в нашій статті нові механізми ушкоджуючої дії GS може бути враховано при оптимізації захисту від хвороботворних

мікроорганізмів та у створенні нових підходів до боротьби з антибіотиковою резистентністю.

Крім того, застосований нами підхід до аналізу змін розподілу еритроцитів за об'ємом під впливом фармпрепарату дозволив визначити зміни в різних за віком фракціях еритроцитів. Це може бути корисним з огляду на більш персоналізований підхід до визначення впливу лікарського засобу на окремого пацієнта. Більше того, відому змінок морфофункціональних характеристик різних фракцій еритроцитів під час тривалого зберігання донорської крові чи еритромаси може бути використано для оптимізації кріозахисних середовищ із вмістом GS.

Зміни об'єму та величини електричного пробоя мембрани після інкубації еритромаси з грамїцидином S у всіх обстежених донорів були односпрямованими в гетерогенній популяції еритроцитів здорових донорів.

Сублітичні концентрації грамїцидину S (5 і 10 мкг антибіотика на 1 мл еритромаси) при інкубації протягом 15 хв спричиняють зменшення об'єму частини еритроцитів у всіх донорів.

Інкубація еритроцитів протягом 15 хв з GS в концентрації 20 мкг/мл веде до посилення гетерогенності їх пулу, що, імовірно, пов'язано з граничним заповненням сайтів зв'язування антибіотика на мембрані клітин при такій концентрації.

GS у концентрації 40 мкг/мл спричиняє збільшення об'єму клітин, хоча після 15-хвилинної інкубації не призводить до їх гемолізу.

Отримані дані може бути використано для розширення спектру застосування антибактеріальних пептидів в медичній практиці, а також для розробки більш ефективних і менш токсичних аналогів.

## Висновки до розділу 5

Показано, що субгемолітичні концентрації антимікробного пептиду GS спричиняють 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 й чітко демонструє здатність ліпосом зливатися з клітинними мембранами та вивільняти пептидні «корисні навантаження» до цільових клітин протягом хвилин. Отримані результати може бути використано для оптимізації системного медичного застосування ліпосомальних та інших інкапсульованих форм препаратів на основі мембраноактивних пептидів.

GS-індукований гемоліз еритроцитів може бути своєрідним тестом стану ліпідів мембрани еритроцитів. З підвищенням температури знижується концентрація GS, необхідна для гемолізу еритроцитів. За підвищення температури швидкість гемолізу еритроцитів монотонно збільшується, а час – зменшується.

Підвищення вмісту холестерину в еритроцитах унаслідок атеросклерозу значно послаблює гемолітичний ефект GS. Еритроцити з крові донорів з коронарним атеросклерозом дають унікальну можливість вивчати взаємодію GS з нативними клітинами з різним рівнем холестерину – «природно» збагаченими холестерином еритроцитами. Підвищення рівня холестерину значно послаблює, але не скасовує гемолітичної активності

GS. Високий вміст холестерину в мембранах еритроцитів призводить до зниження текучості мембрани та її деформаційності, що призводить до зниження швидкості взаємодії GS з мембранами, тобто гідрофобні, а також електростатичні взаємодії беруть участь у зв'язуванні GS з клітинними мембранами. Перекисне окислення ліпідів в атеросклеротичних еритроцитах призводить до значного зниження ступеня гемолізу еритроцитів, індукованого GS, *in vitro*.

Розраховано величини енергій активації процесів гемолізу еритроцитів та дезагрегації тромбоцитів.

На відміну від кислотного гемолізу, GS індукований гемоліз еритроцитів чутливий до ліпідного складу мембран. Ще одна з переваг гемолізу еритроцитів за допомогою GS – незмінність рН.

Встановлено фактори, що сприяють зниженню гемолітичної активності GS та, у деяких випадках (підвищений вміст холестерину та процеси ПОЛ у мембрані), навіть повністю пригнічують його гемолітичну активність.

Ці результати може бути використано для раціонального конструювання аналогів GS зі зниженою гемолітичною активністю.

Підсумовуючи вивчення впливу циклічного антимікробного пептиду граміцидину S на поверхневий потенціал клітин крові, маємо зауважити, що  $\zeta$ -потенціал еритроцитів значною мірою зумовлено наявністю негативно заряджених залишків сіалових кислот у складі гліколіпідів та глікопротеїнів. Часткова або майже повна втрата сіалових кислот унаслідок обробки поверхні еритроцитів, відповідно, трипсином або нейрамінідазою спричиняє значне зменшення величини  $\zeta$ -потенціалу клітин. Граміцидин S у концентраціях від 5 до 20 мкг/мл зменшує  $\zeta$ -потенціал інтактних еритроцитів, насамперед, частково нейтралізуючи негативний заряд сіалових кислот за рахунок позитивно заряджених

аміногруп залишків орнітину. Граміцидин S незалежно від концентрації не впливає на  $\zeta$ -потенціал модифікованих еритроцитів, які втратили більшу частину сіалових кислот унаслідок обробки нейрамінідазою.

Продемонстровано модулюючий ефект щільності пакування, мікрров'язкості, ступеня окислення ліпідів мембран на індуковані GS морфо-функціональні зміни клітин крові. Модифікація гідروفобних, а також електростатичних взаємодій у мембрані впливає на зв'язування GS з клітинами крові й веде до зміни функціональної активності еритроцитів. Установлено кореляцію між ступенем модифікації структурного стану та фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під впливом гамма-опромінення, про- та антиоксидантів, фармпрепаратів та кінетичними характеристиками 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. Розраховано 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, і зумовлена відмінностями в структурі глікокаліксу та складі мембран клітин крові.

Результати досліджень цього розділу наведено в публікаціях здобувача: [2], [3], [7], [8], [14], [24], [26], [33], [36], [40], [41].

## РОЗДІЛ 6

### СПОСОБИ КЕРУВАННЯ ВЗАЄМОДІЄЮ АНТИМІКРОБНОГО ПЕПТИДУ GS З ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ

#### 6.1 Модуляція мембранних ефектів граміцидину S зміною ліпідного складу мембрани та міжмолекулярних взаємодій

Для одного мембраноактивного пептиду – зареєстрованого медичного препарату GS – молекулярні механізми мембранотропної дії було досліджено у розділах 4 та 5 з використанням різноманітних методичних підходів, направлених на всебічне та цілковите з'ясування міжмолекулярних взаємодій саме цього поліпептиду, а не низки аналогів та похідних. Тепер у модельних кількокомпонентних ліпідних системах ми спробуємо перевірити припущення 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. Відомо, що за концентрацій GS вище 2 моль % відбувається утворення додаткової фази ліпідів й поява додаткового піку ДСК на 3° С нижче за основний, певно пов'язаного з різницею в МД мономерів та олігомерів GS. Саме за цих концентрацій спостерігається й бактерицидний ефект GS. На зв'язування GS із мембранами ФХ впливає присутність інших речовин, зокрема іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації близько 100 мМ та вище [32,38].

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, інші автори 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.

За даними літератури GS має якісно та кількісно різний вплив на мембрани різного ліпідного складу. Для модельних мембран з цвітеріонного ДПФХ спостережуване підвищення інтенсивності ІЧ полоси  $1220\text{ см}^{-1}$  свідчить про збільшення долі фосфатних груп, не зв'язаних з водою, – тобто, про дегідратацію поверхні мембрани ДПФХ у присутності GS та/або зв'язування P=O-груп із GS. У від'ємно зарядженій мембрані ДПФХ-ДПФГ декапептид GS також викликає дегідратацію фосфатних груп та розупорядкування упаковки вуглеводневих ланцюгів, тоді як у мембрані ДПФХ-Хол ефект зворотній [32,38]. Для цих типів мембран слід враховувати фазове розділення ліпідів у присутності холестерину, із

утворенням холестерин-збагаченої та холестерин-збідненої фаз, а отже збільшенням кількості міжфазних границь, які можуть слугувати місцями зв'язування пептиду з мембраною.

Показано підвищену спорідненість GS до мембрани ДПФХ-Хол, яку можна з іншого боку розглядати як покращення розподілення холестерину у мембрані ДПФХ у присутності GS. Індивідуальна дія холестерину щодо дегідратації P=O груп виявилась якісно аналогічною до дії GS.

Для мембрани ДПФХ-Хол встановлено, що як холестерин, так і GS викликають короткохвильовий зсув ІЧ смуг  $\nu\text{C}=\text{O}$ . При цьому GS додатково збільшує число гідратованих карбонільних груп, що разом може свідчити про підвищення доступу води в область інтерфейсу мембрани.

## **6.2 Вплив гідратації ліпідів та в'язкості полярної області бішару на взаємодію пептиду GS з модельними ліпідними мембранами**

Мікрров'язкість ліпідної компоненти мембран досліджували з використанням гідрофобного зонду пірену, молекули якого локалізуються в гідрофобній області бішару серед залишків жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів. При фіксованій температурі та концентрації зонду ступінь ексімеризації зонду залежить від мікрров'язкості його оточення і може виступати її характеристикою. Мікрров'язкість ліпідної компоненти мембран визначали за ступенем ексімеризації пірену. Була встановлена чутливість спектральних характеристик зонду до зміни ліпідного складу мембран. На ступінь ексімеризації пірену в бішарі впливають як наявність заряджених молекул кардіоліпіну (КЛ) так і молекул холестерину (рис. 6.1).

З аналізу результатів вивчення ексімеризації пірену (рис. 6.1) в присутності GS прослідковується тенденція зменшення мікрров'язкості гідрофобної області ліпосом різного фосфоліпідного складу при взаємодії з GS.



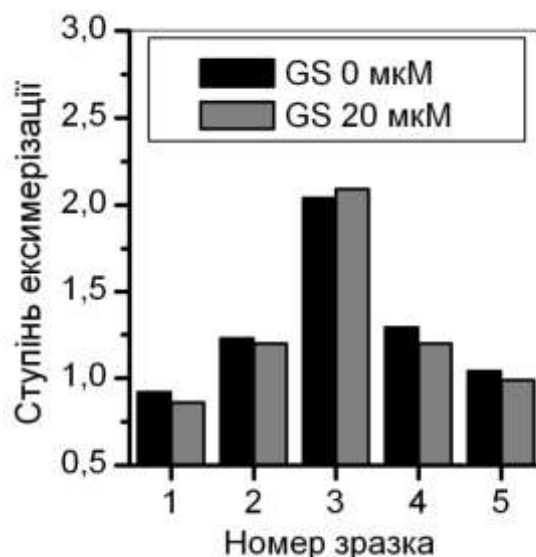


Рис. 6.1 Ступінь ексимеризації пірену в зразках ліпосомальних мембранах в контролі та в присутності граміцидину: 1 – ФХ 100%; 2 – КЛ 10% + ФХ 90%; 3 – ХЛ 10% + ФХ 90%; 4 – ХЛ 30% + ФХ 70%; 5 – ХЛ 60% + ФХ 40%.

Додавання КЛ і ХЛ в кількості 10% призводить до зростання ступеня ексимеризації пірену. В присутності ХЛ упорядковуються гідрофобні хвости ліпідного бішару, загалом, змінюючи його мікрів'язкість та ступінь гідратації гідрофільних головок.

Гідратацію оцінювали методом мікрохвильової діелектрометрії, вимірювали діелектричну проникність і діелектричні втрати водних суспензій ліпосом. Діелектричні параметри суспензій ліпосом нижчі ніж у води, що зумовлено, переважно, наявністю ліпідів у зразках (рис. 6.2). Найменші значення діелектричної проникності і втрат характерні для ліпосом з ДПФХ.

Додавання КЛ або ХЛ призводить до збільшення діелектричних параметрів суспензій ліпосом, пропорційного до частки ХЛ в мембрані. Це свідчить про збільшення в суспензіях кількості вільної води внаслідок дегідратації ліпосом.

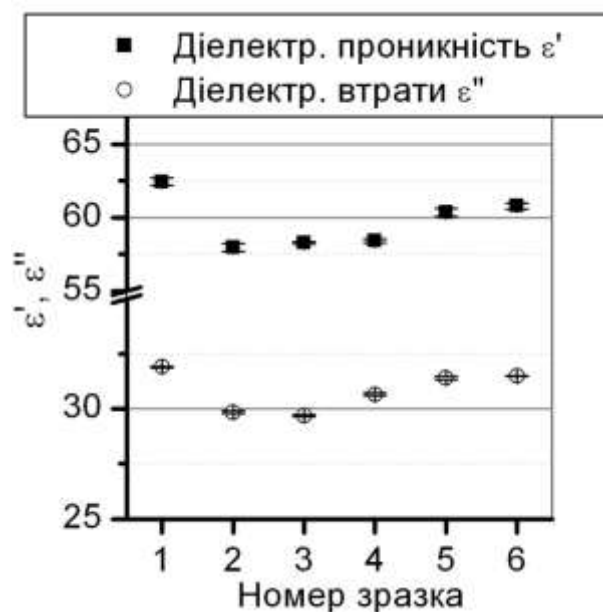


Рис. 6.2 Діелектрична проникність і діелектричні втрати суспензій ліпосом: 1 –  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 – ФХ 100 %, 3 – КЛ 10 % + ФХ 90 %, 4 – ХЛ 10 % + ФХ 90 %, 5 – ХЛ 30 % + ФХ 70 %, 6 – ХЛ 60 % + ФХ 40 %.

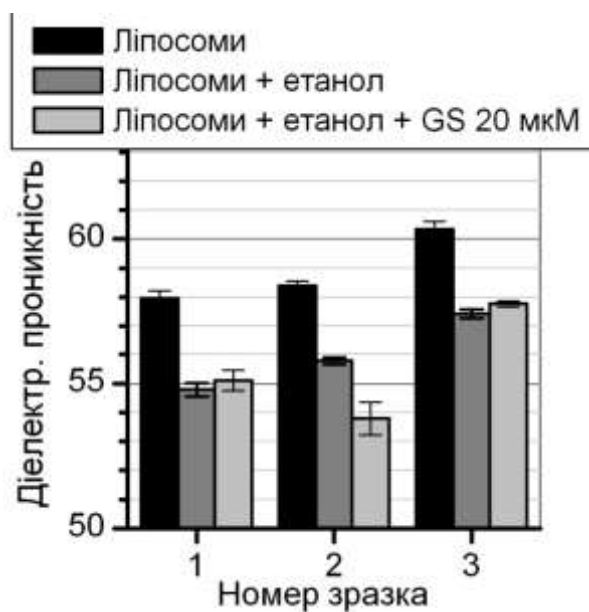


Рис. 6.3 Вплив GS на діелектричну проникність суспензій ліпосом: 1 – ФХ 100 %, 2 – ХЛ 10 % + ФХ 90 %, 3 – ХЛ 30 % + ФХ 70 %.

На рис. 6.3 наведено діелектричну проникність суспензій ліпосом при додаванні до них GS. Оскільки GS розчиняли в етанолі, для

врахування впливу етанолу на діелектричні властивості зразків, його також окремо додавали до суспензій ліпосом.

Зв'язування циклічного поліпептидного антибіотика GS з цвіттеріонними ФХ ліпосомами, а також з ФХ ліпосомами, що містять 30% ХЛ, підвищує їх діелектричну проникність (рис. 6.3.) і знижує ступінь ексимеризації пірену (рис. 6.1). Одночасно спостерігається зменшення діелектричних втрат суспензії (рис. 6.4).

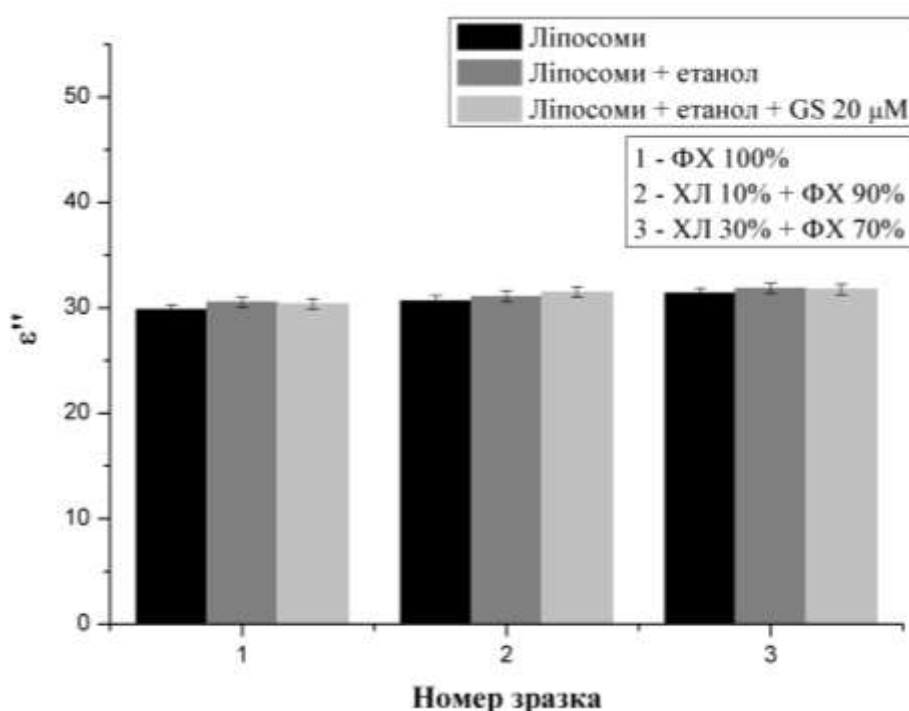


Рис. 6.4 Діелектричні втрати суспензій ліпосом з GS на частоті 9, 2 ГГц

Така зміна діелектричних параметрів свідчить про розупорядкування в зразках структури об'ємної води, в результаті чого диполі води стають більш рухливими (рис. 6.5).

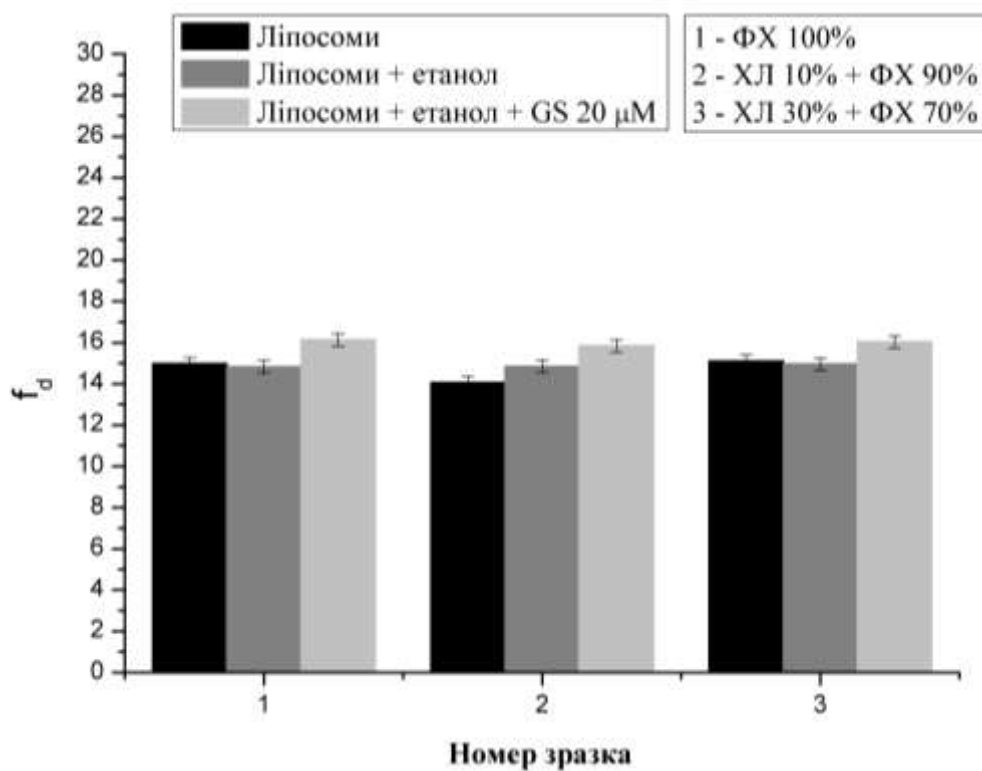


Рис. 6.5 Частота діелектричної релаксації суспензій ліпосом з GS

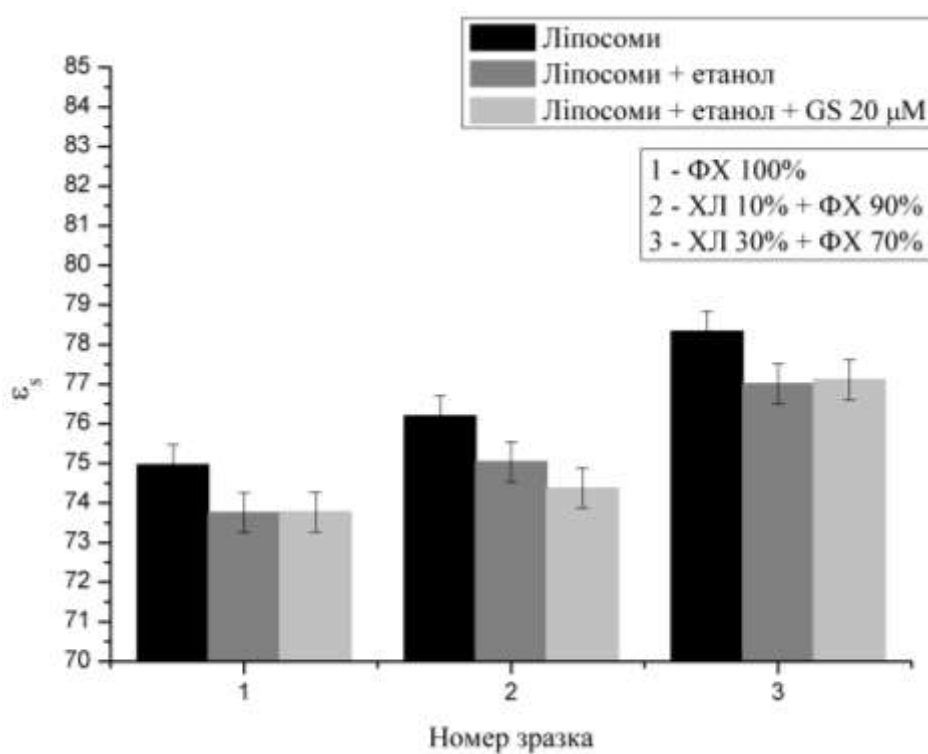


Рис. 6.6 Статична діелектрична проникність суспензій ліпосом + GS

При додаванні холестерину до складу модельних ліпідних мембран спостерігається збільшення значень статичної діелектричної проникності. Додавання 10% холестерину збільшує  $\epsilon_s$  на 1,1 одиницю, а 30% - на 3,5 одиниць. Додавання етанолу та граміцидину не змінює цю тенденцію. Проте сам етанол знижує статичну діелектричну проникність на 1,2 одиниць. Зв'язування граміцидину з мембранами ліпосом, що містять 10 % холестерину, веде до зменшення статичної діелектричної проникності суспензії везикул. Ці зміни можуть бути наслідком збільшення кількості зв'язаної ліпідами води внаслідок зміни фізичних властивостей ліпідного бішару.

Кореляцію між сорбцією GS в області інтерфейсу та зміною мікрров'язкості гідрофобної області модельних ліпідних мембран було проведено методом флуоресценції.

В дослідженнях використовували спиртовий розчин граміцидину S з робочою концентрацією 1 мг/мл. Кінцеві концентрації пептиду в зразках ліпосом становили 1 мкМ, 2 мкМ та 4 мкМ, 20 мкМ, 40мкМ та 80 мкМ.

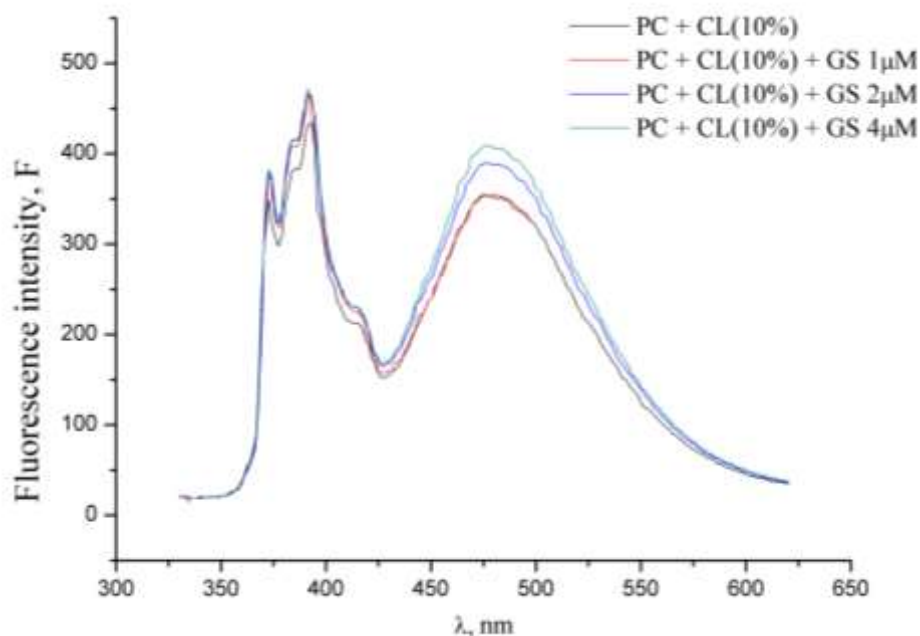
Одношарові ліпосоми діаметром 100 нм із фосфатидилхоліну отримували методом екструзії. Загальна концентрація ліпосомальної суспензії становила 10 мМ. Кінцева концентрація ліпідів в досліджуваних зразках становила 0,5 мМ.

Реєстрацію спектрів флуоресценції зондів в ліпосомальних мембранах проводили на спектрофлуориметрі «Hitachi-850 (Японія)» у кварцевих кюветах 1 см при 22 °С - 24°С. Флуоресценцію пірену збуджували на довжині хвилі 320 нм, спектри реєстрували в діапазоні довжин хвиль 340 нм - 600 нм. Кінцева концентрація пірену в зразках становила  $0,5 \times 10^{-3}$  М. Флуоресценцію АНС збуджували на довжині хвилі 360 нм, спектри реєстрували в діапазоні довжин хвиль (380–700) нм. Кінцева концентрація АНС в зразках становила  $0,5 \times 10^{-3}$  М. Похибка вимірювання відповідно до паспортних даних прибору не перевищувала 1%.

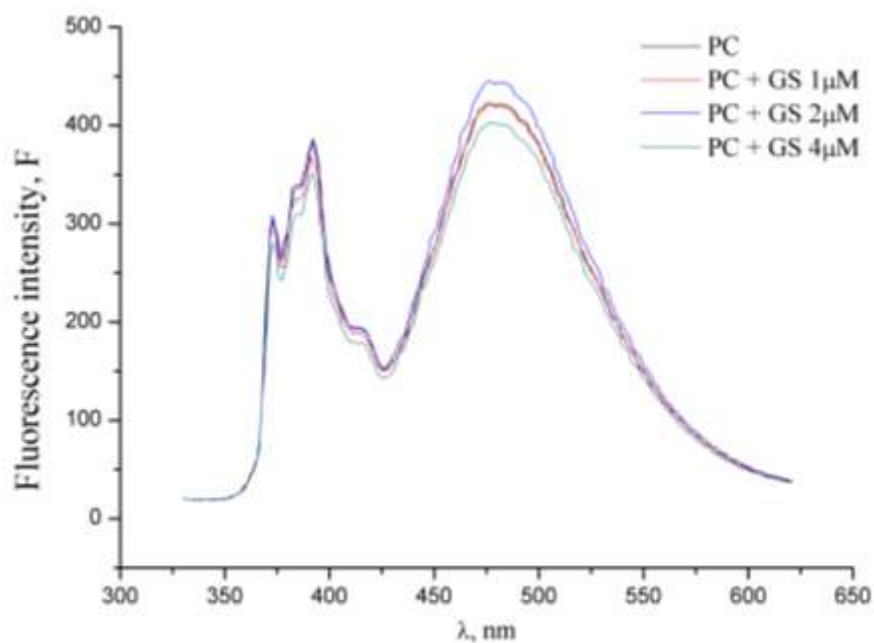
Зміну мікрров'язкості ліпідного бішару в суспензіях ліпосом контролювали за допомогою флуоресцентного зонда пірену. Здатність зонда до утворення ексимерної і мономерної форми в ліпідному бішарі залежить від щільності упаковки ліпідів [35]. Флуоресценція мономерних форм пірену переважає в разі щільної упаковки ліпідів з максимумом флуоресценції 373 нм, а в разі зменшення в'язкості гідрофобної області бішару з'являється нова широка смуга флуоресценції ексимерів з максимумом при 493 нм. Ступінь ексимеризації пірену оцінювали по співвідношенню  $F_m/F_e$ , при  $\lambda_{36} = 319$  нм, де  $F_m$  - інтенсивність флуоресценції мономерів пірена при 373 нм;  $F_e$  - інтенсивність флуоресценції ексимерів пірена при 493 нм. Коефіцієнт ексимеризації зростає при збільшенні концентрації пірену і зменшенні в'язкості середовища [35].

Взаємодія GS з модельними ліпідними мембранами забезпечується, перш за все, наявністю позитивно зарядженої амінокислоти орнітину в складі пептиду та розподілом зарядів на поверхні ліпосомальних мембран із заряджених фосфоліпідів. Аторами [111] методом диференційної сканувальної калориметрії встановлено, що GS сильніше взаємодіє з аніонними, ніж з цвіттеріонними фосфоліпідними бішарами, ймовірно, через більш сприятливі електростатичні взаємодії між позитивно зарядженим пептидом і негативно зарядженими полярними групами гідрофільних голівок в таких системах. Виявлена чутливість GS до фазового стану цвіттеріонних та аніонних фосфоліпідів в складі модельних ліпідних мембран та зроблено припущення, що пептид розташовується на полярно-неполярній межі рідких кристалічних шарів, взаємодіючи, в основному, з полярними групами та гліцериновими залишками в молекулах фосфоліпідів, тоді як взаємодія пептиду з вуглеводневими ланцюгами ліпідного бішару є вторинною.

В проведених нами експериментальних дослідженнях методом флуоресцентної спектроскопії з застосуванням флуоресцентного зонду пірену була виявлена чутливість модельних ліпідних мембран різного фосфоліпідного складу до присутності граміцидину S в інтервалі концентрацій від 1 мкМ до 80 мкМ. Флуоресцентний ліпофільний зонд пірен ефективно перерозподіляється в гідрофобній області ліпідного бішару та реагує на щільність упаковки вуглеводневих хвостів фосфоліпідів ступенем утворення ексимерних форм. В області малих концентрацій 1 мкМ - 4 мкМ GS показані (рис. 6.7) незначні зміни ступеню ексимеризації пірену як для фосфатидилхолінових ліпосом, так і для ліпосом з вмістом 20% кардіоліпіну, що свідчить про збурення гідрофобної області ліпідного бішару молекулами пептиду. Ці результати не суперечать загальним уявленням про асоціацію GS в ліпідний бішар модельних мембран: тим ефективніша взаємодія пептиду, чим більш розупорядкований ліпідний бішар з негативним поверхневим зарядом.



a)



b)

Рис. 6.7 Спектри флуоресценції пірену в ліпосомальних мембранах з ФХ - (а) та в ліпосомах 80% ФХ + 20% КЛ - (b) з додаванням GS.

Моделювання ліпідного складу ліпосомальних мембран молекулами холестерину призводить до упорядкування полярно-неполярної міжфазної області ліпідного бішару та збільшення щільності упаковки ліпідних вуглеводневих хвостів. Збільшення концентрації холестерину в модельних мембранах призводить до лінійного зростання мікров'язкості ліпідного бішару [253]. За результатами ДСК досліджень [111] встановлено, що холестерин знижує ступінь взаємодії GS з подвійними шарами ДПФХ.

Вміст 10 моль% холестерину в складі фосфатидилхолінових ліпосом модифікує фізичні властивості ліпідного бішару та є суттєвим для взаємодії GS з модельними мембранами. За даними флуоресцентної спектроскопії (рис. 6.8) додавання пептиду в суспензію ліпосом (90% ФХ + 10% ХЛ) в концентрації до 40 мкМ зменшує ступінь ексімеризації пірену в 1,3 рази відносно контролю, що свідчить про зменшення рухливості мономерних форм пірену в гідрофобній товщі біомембрани.



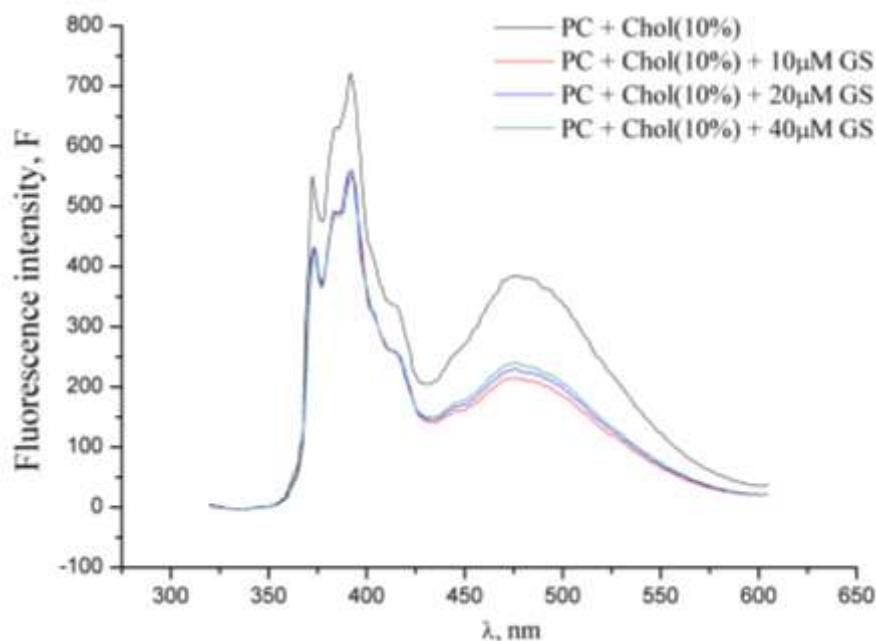
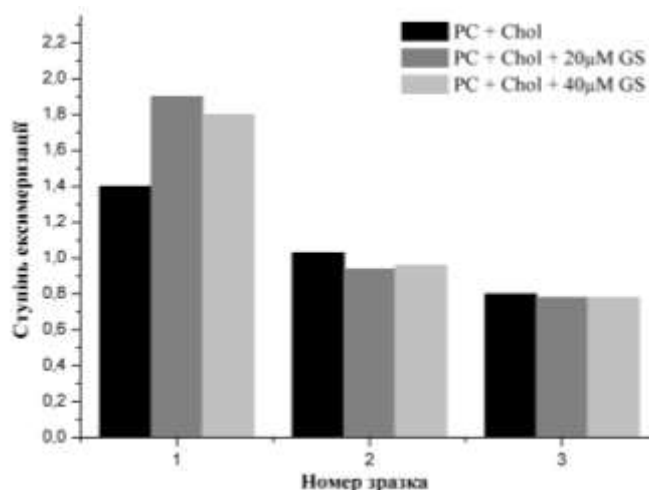


Рис. 6.8 Спектри флуоресценції пірену в ліпосомальних мембранах 90% ФХ + 10% ХЛ з додаванням грамїцидину S.

Виявлені зміни ступеню ексимерізації пірену викликані перерозподілом молекул антибіотику в ліпідний бішар, що, можливо, спричинює ущільнення ацильних ланцюгів. Слід зазначити, що для суспензії ліпосом з вмістом холестерину 30% та 60% збільшення концентрації GS до 20 мкМ та 40 мкМ не впливає на ступінь ексимерізації пірену (рис. 6.9) за даними флуоресцентної спектроскопії.



1 – ФХ 90% + ХЛ 10%, 2 – ФХ 70% + ХЛ 30%, 3 – ФХ 40% + ХЛ 60%

Рис. 6.9 Ступінь ексимерізації пірену в зразках ліпосом з вмістом холестерину.

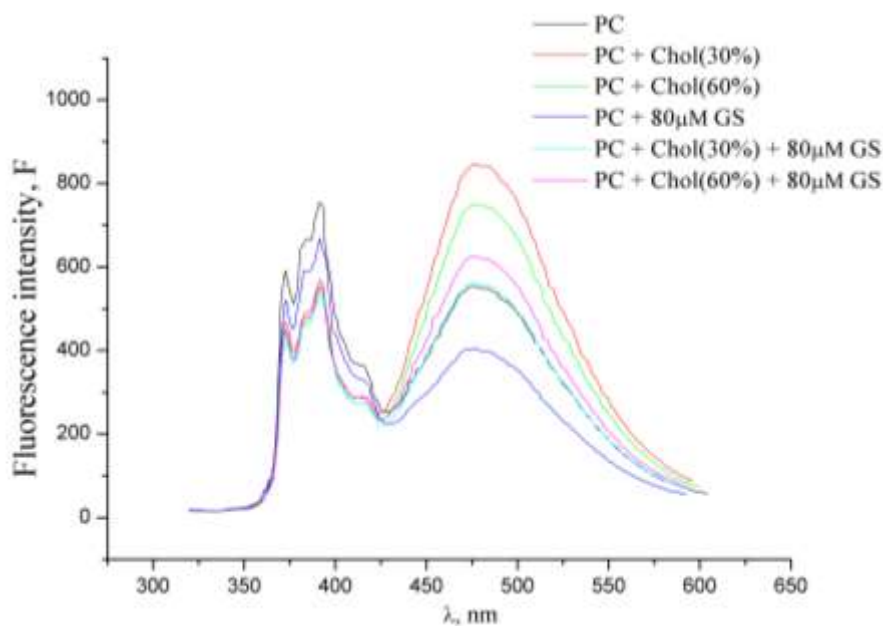


Рис. 6.10 Спектри флуоресценції пірену в ліпосомальних мембранах з різним вмістом холестерину з додаванням GS в концентрації 80 мкМ.

Однак, при додаванні пептиду в концентрації 80 мкМ до зразків ліпосомальних мембран встановлено (рис. 6.10) однонаправлену зміну ексимерізації пірена, яка свідчить про зростання мікров'язкості бішару як для суспензії ліпосом із фосфатидилхоліну так і для ліпосом з вмістом холестерину 30 % та 60%.

Первинна сорбція грамїцидину на поверхні біомембран зумовлена електростатичною взаємодією позитивно заряджених груп в складі пептиду та груп з від'ємним зарядом в мембранних ліпідах. Моделювання поверхневих властивостей біомембран за допомогою кардіоліпіну збільшує від'ємний заряд поверхні ліпосом, що робить ліпідні мембрани ще більш привабливими для молекул пептиду. За допомогою водорозчинного аніонного флуоресцентного зонду АНС було здійснено моніторинг мембранної поверхні (рис. 6.11).

Завдяки своїм структурним особливостям зонд не здатний проникати глибоко в бішар, його заряджена сульфогрупа повинна залишатися на поверхні. Зі зростанням від'ємного поверхневого заряду мембрани інтенсивність флуоресценції АНС зменшується в ряду досліджуваних зразків

ліпосомальних мембран: фосфатидилхолінові, з вмістом 5% кардіоліпіну, з вмістом 10% кардіоліпіну та ліпосоми із суміші ліпідів 3% кардіоліпіну і 24% холестерину за рахунок зменшення кількості позитивно заряджених центрів сорбції зонду (рис. 6.11, а). При додаванні 20 мкМ граміцидину до вказаних зразків модельних ліпідних мембран суттєвих змін в інтенсивності флуоресценції зонду не виявлено (рис. 6.11, б).

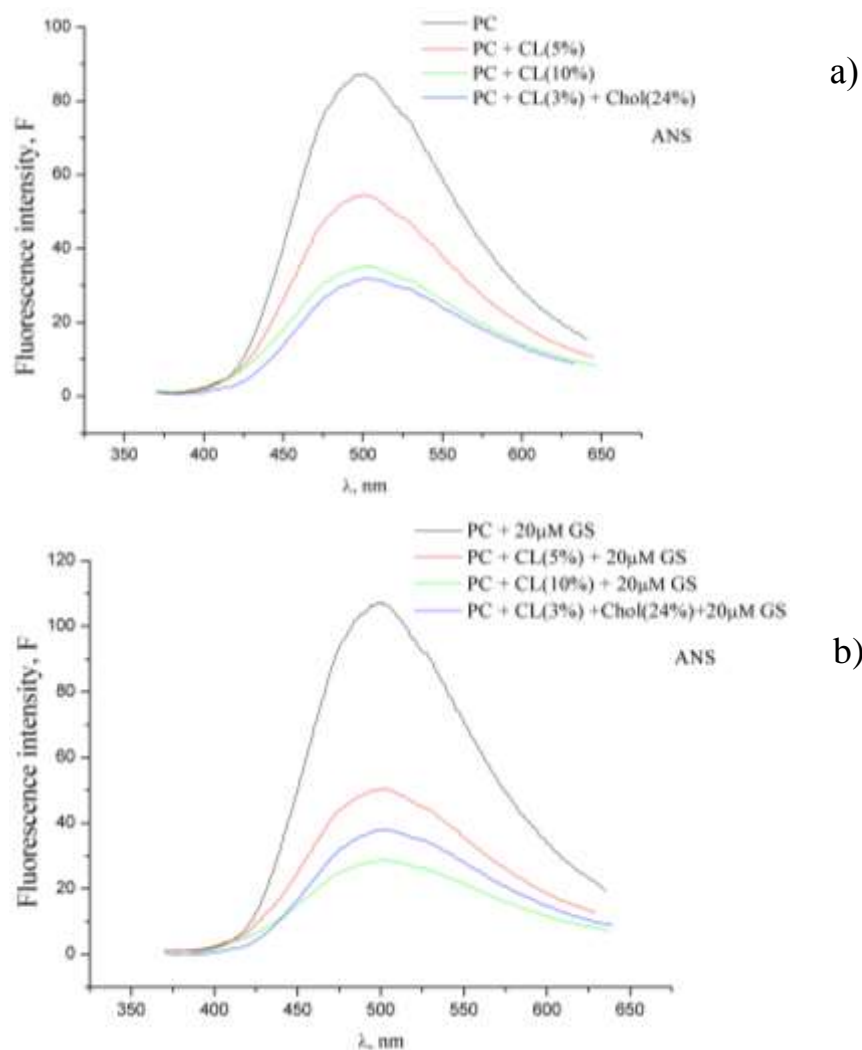


Рис. 6.11 Спектри флуоресценції АНС в ліпосомальних мембранах з різним вмістом кардіоліпіну з додаванням  $[GS] = 20\text{мкМ}$ .

Разом з тим, оцінка ступеню ексімеризації пірену у зразках модельних мембран модифікованих вмістом кардіоліпіну виявила збільшення мікрів'язкості ліпідного бішару в присутності 20 мкМ граміцидину (рис. 6.12, а).

Зростання ступеня ексімерізації пірену з 0,45 до 0,54 встановлено для ліпосомальних мембран з вмістом 5% кардіоліпіну (рис. 6.12, b).

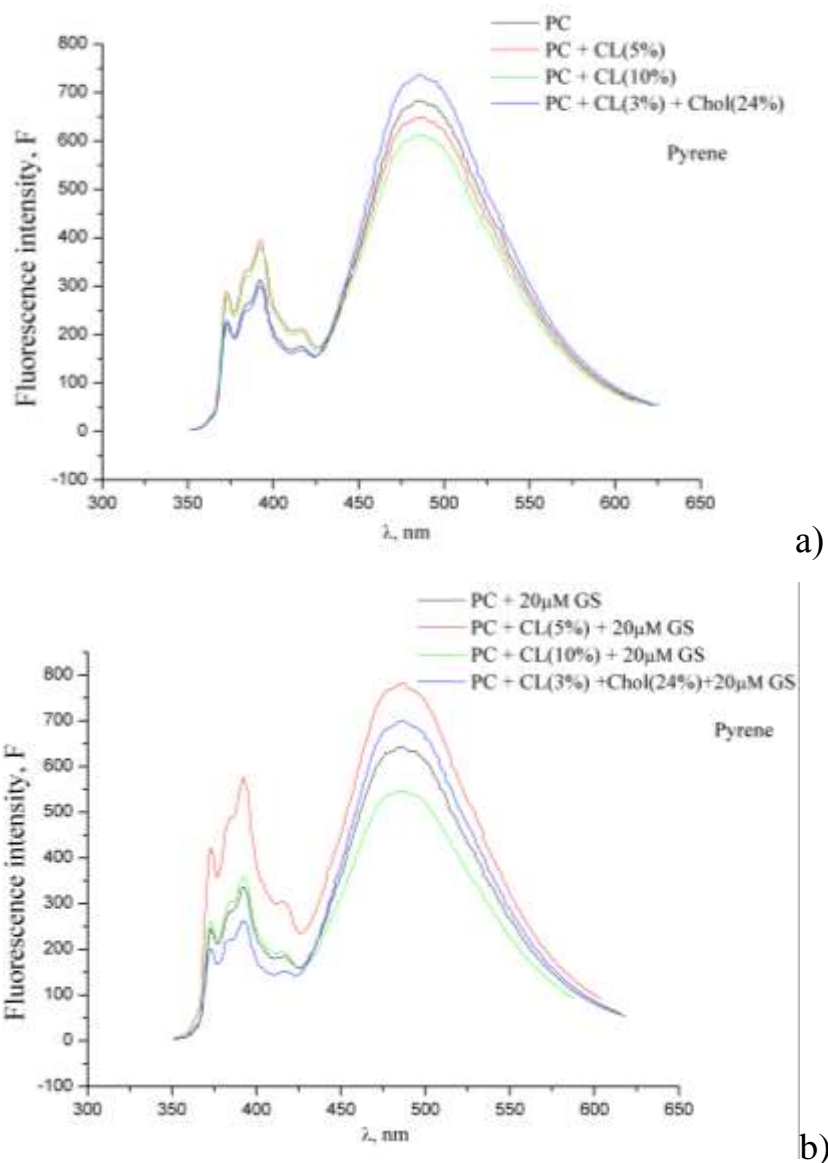


Рис. 6.12 Спектри флуоресценції пірену в ліпосомальних мембранах з різним вмістом кардіоліпіну з додаванням грамїцидину S в концентрації 20 мкМ.

Доцільно припустити, що збільшення від'ємного заряду ліпосомальної поверхні може бути засобом захвату молекул грамїцидину з примембранного простору. З поверхні мембрани пептид швидко вбудовується в ліпідний бішар. Найбільш ефективними в цьому відношенні є 5% вміст кардіоліпіну.

Чисельні дослідження показали, що включення холестерину в ліпідний бішар спричинює не тільки зміну щільності упакування молекул, а й зміну ступеню гідратації полярних голівок ліпідів. Холестерин заповнює в бішарі вільний об'єм між ацильними ланцюгами та витісняє молекули вільної води на поверхню в примембранний простір.

За допомогою флуоресцентної спектроскопії досліджено вплив антибіотика GS на модельні фосфоліпідні мембрани. В присутності GS в інтервалі концентрацій 0 мкМ - 40 мкМ прослідковується тенденція до зростання мікрров'язкості гідрофобної області ліпосом з вмістом холестерину 10%. Дослідження впливу антибіотика GS на модельні фосфоліпідні мембрани дозволяють глибше зрозуміти структурно-функціональні зв'язки між GS і модельними фосфоліпідними мембранами, що може сприяти розробці нових медичних систем транспорту препаратів на основі GS.

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.

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

Варіації ліпідного складу клітинних біомембран залежно від біологічно виду [121], тим значніші, чим більше еволюційна відстань видів, є одним з потужних механізмів диференціації дії лікарських речовин. Наприклад, для мембран ссавців характерна наявність фосфатидилхолінів, а для мембран бактерій – фосфатидилгліцеринів та кардіоліпінів [121]. Зміна ліпідного складу мембрани та навіть зміна розподілення ліпідів у її межах (асиметрія ліпідного складу [273]) може

мати істотний вплив на проникність лікарських речовин [123, 126]. Так, зміна ліпідної композиції бішару вважається одним з механізмів резистентності клітин до дії антибіотиків [274, 275].

Встановлено, що активність GS у мембрані великою мірою керується властивостями ліпідів, що її складають [262]. Цей висновок добре збігається з результатами [220], які свідчать про причетність GS до зміни локалізації мембранних ліпідів, а також про його здатність утворювати у мембрані великі домени рідкокристалічної фази ліпідів. Зокрема, показано зменшення зв'язування GS з мембраною при вмісті холестерину (ХЛ) близько 40 моль % [254], характерному для мембран ссавців [121]. Втім, холестерин у нижчих концентраціях (10 моль%), навпаки, сприяє зв'язуванню GS з ліпідною мембраною [262].

Раніше було встановлено суттєве підвищення розподілення GS у мембрану L- $\alpha$ -дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ) у присутності 10 мас. % ХЛ (17 моль%), що обумовило задачу детального вивчення мембранотропної дії GS у присутності ХЛ [32].

Дослідження методом диференціальної сканувальної калориметрії проводили в тісній співпраці зі співробітниками ІСМа НАНУ. Постановку задачі та інтерпретацію результатів виконано спільно з д.ф.-м.н. Ващенко О.В., дані ДСК отримано й оброблено к.ф.-м.н. Будянською (Свєчніковою) Л.В., спектри FTIR отримано к.ф.-м.н. Софроновим Д.С. Досліджувані зразки (15–20 мг), запечатані у стандартному алюмінієвому тиглі вмістом 40 мкл, сканували в діапазоні від 20 °С до 50 °С послідовними циклами «охолодження – нагрівання». Швидкість термосканування становила 1 К/хв. Отримані ДСК-профілі містили піки двох фазових переходів мембрани ДПФХ: передпереходу (~ 36 °С), який відповідає переходу мембрани з фази гелю до складчастої фази, та основного фазового переходу (~ 41 °С), який відповідає переходу зі складчастої до рідкокристалічної фази. Для переходу до рідкокристалічної фази (або плавлення), на підставі даних ДСК визначали низку термодинамічних параметрів: максимум піку

плавлення  $T_m$ , ентальпія плавлення  $\Delta T_m$ , напівширина піку плавлення  $\Delta T_{m1/2}$ .

Раніше нами було показано, що при вмісті GS у мембрані ДПФХ вище 1 мас. % спостерігається поява додаткового низькотемпературного піка з максимумом  $T_m^*$ , ентальпією  $\Delta H_m^*$  та напівшириною  $\Delta T_{m1/2}^*$ . Цей пік був віднесений на підставі літературних даних [262] до зв'язування з мембраною олігомерів GS.

Вказана процедура розкладання ДСК-піків була виконана для мембран ДПФХ із вмістом 5 мас. % GS при варіюванні вмісту ХЛ ( $c_{хол}$ ). Отримані концентраційні залежності виявилися суттєво нелінійними (рис. 6.13). Так, до значення пік  $c_{хол} \sim 18$  мас. %, пік  $T_m^*$  зменшувався, а пік  $T_m$  залишався майже незмінним. Вище цієї концентрації пік  $T_m^*$  починав зростати, разом із  $T_m$ .

Те ж критичне значення концентрація  $c_{хол} \sim 18$  мас. % ( $\sim 30$  моль %) відзначається й на концентраційних залежностях напівширини (рис. 6.14). Як можна бачити, високотемпературний пік (2) за цієї концентрації починає звужуватися, тоді як низькотемпературний (1) – різко розмиватися. Наявне підвищення  $\Delta T_{m1/2}$  та  $\Delta T_{m1/2}^*$  разом зі зниженням  $\Delta T_m^*$  свідчить про з'явлення у системі додаткового вільного об'єму. На підставі цього вельми вірогідним уявляється механізм підвищення розподілення в мембрану на межах розділу доменів різної щільності. Подібний специфічний ефект холестерину у модельних фосфоліпідних мембранах спостерігався в літературі для структурного білку спектрину [246] та пояснювався збільшенням кількості міжфазних границь, які можуть слугувати місцями зв'язування спектрину з мембраною. Згідно [277], 10 % холестерину не викликає фазового розділення мембрани, втім, приводить до неоднорідності упаковки ліпідів.

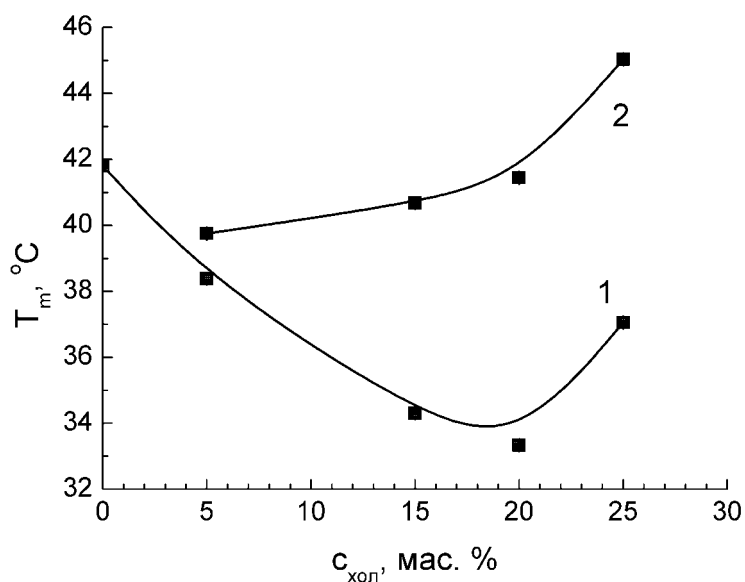


Рисунок 6.13 Залежності  $T_m$  (1) та  $T_m^*$  (2) від вмісту ХЛ в мембрані ДПФХ в присутності 5 мас. % GS.

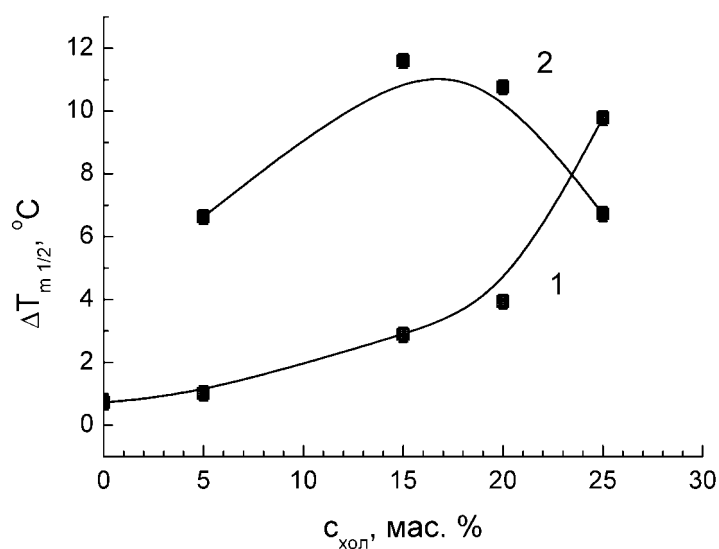


Рис. 6.14 Залежності напівширини високотемпературного (1) та низькотемпературного (2) піків мембрани ДПФХ+5 мас. % GS від вмісту ХЛ.

Дані щодо значень ентальпії вказаних піків (рис. 6.15), вони свідчать про наочну первісну перевагу частки високотемпературного піку, яка з підвищенням вмісту ХЛ зменшується та згодом зникає, що цілком узгоджується з відомим ефектом ХЛ у ліпідних мембранах [123].



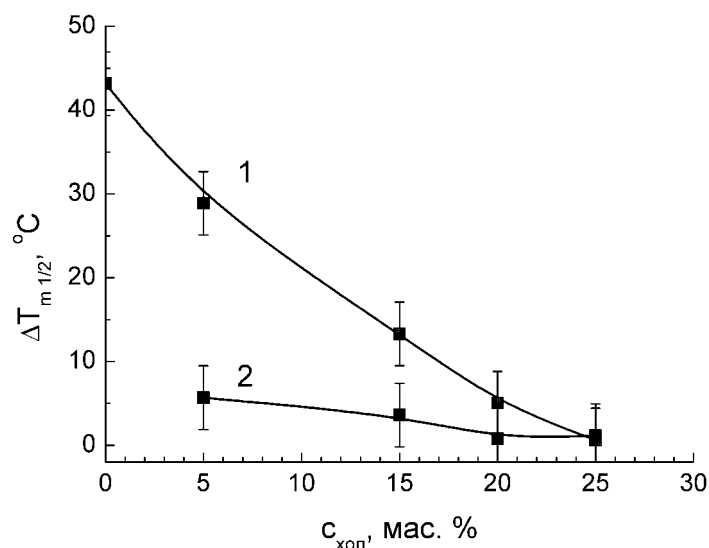


Рис. 6.15 Залежності ентальпії високотемпературного (1) та низькотемпературного (2) піків мембрани ДПФХ+5 мас. % GS від вмісту ХЛ.

Таким чином, у мембрані ДПФХ в присутності 5 мас.% GS встановлене критичне значення вмісту ХЛ (~30 моль%), при якому спостерігається якісна зміна мембранотропних ефектів, що пояснює суперечливі дані [254] та [262] щодо протилежних ефектів ХЛ за концентрацій 10 моль% та 40 моль % у мембрані. З огляду на те, що в мембранах бактеріальних клітин стерини відсутні [121], отримані результати можна віднести скоріше до механізмів, що мінімізують негативні побічні ефекти GS, зокрема гемоліз еритроцитів [14, 38].

Аналіз результатів експериментальних досліджень, в яких 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. Амфифільний 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 спостережану 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 витрачатися 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 при поверхневому 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.

Підвищення зв'язування GS з мембраною за механізмом збільшення її вільного об'єму може бути у бактеріальних клітинах реалізований штучно – наприклад, шляхом уведення разом із GS допоміжної речовини.

Цікавим було вивчення впливу розгалуженого поліаніонного наноносія на взаємодію GS з мембранами. Молекули D-g-РАА(PE) можуть слугувати моделлю глікокаліксу природних мембран і таким дати змогу зінтерпретувати результати експериментів з клітинами крові та епітеліальної тканини висновками модельного експерименту.

#### **6.4 Модуляція мембранотропної дії граміцидину S декстран-поліакриламідним полімером**

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(PE), синтезований д. х. н. Куцевол Н. В. (Київський національний університет ім. Т. Г. Шевченка). Згідно [278, 279], 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 % (рис. 6.16). У попередніх

дослідженнях були протестовані його властивості як носія лікарських речовин [280], а також його здатність зв'язуватися з ліпідними мембранами [281].

При приготуванні модельних ліпідних мембран ДПФХ з вмістом GS та полімеру D-g-РАА(РЕ) замість водної субфази використовували буферний розчин Хенкса без фенолового червоного, який містив 2% вказаного полімеру. Зрештою процедура приготування співпадала з описаною вище. Структура полімеру наведено на рис. 6.19.



Рисунок 6.16 Схематична структура декстран-графт-поліакрил-амідного кополімеру D-g-РАА(РЕ).

На рис. 6.17 проведено порівняння залежностей температур піків  $T_m$  та  $T_m^*$  від концентрації GS ( $c_{GS}$ ), для мембран ДПФХ з GS у присутності та за відсутності D-g-РАА(РЕ). Як можна бачити, при концентрації GS 8 мас.% його первісний ефект GS на мембрану у присутності D-g-РАА(РЕ) зменшується, тоді як мембранна гетерогенність підвищується.

На рис. 6.18 наведено аналогічне порівняння вищевказаних систем за параметром напівширини піків. Можна зазначити, що в цілому напівширина піків фазових переходів мембрани ДПФХ із вмістом GS не зазнає істотних змін у присутності D-g-РАА(РЕ). На підставі даних рис. 6.17, 6.18 можна зробити висновок, що у присутності полімеру теж має місце зв'язування GS з мембраною у вигляді мономерів та олігомерів GS.

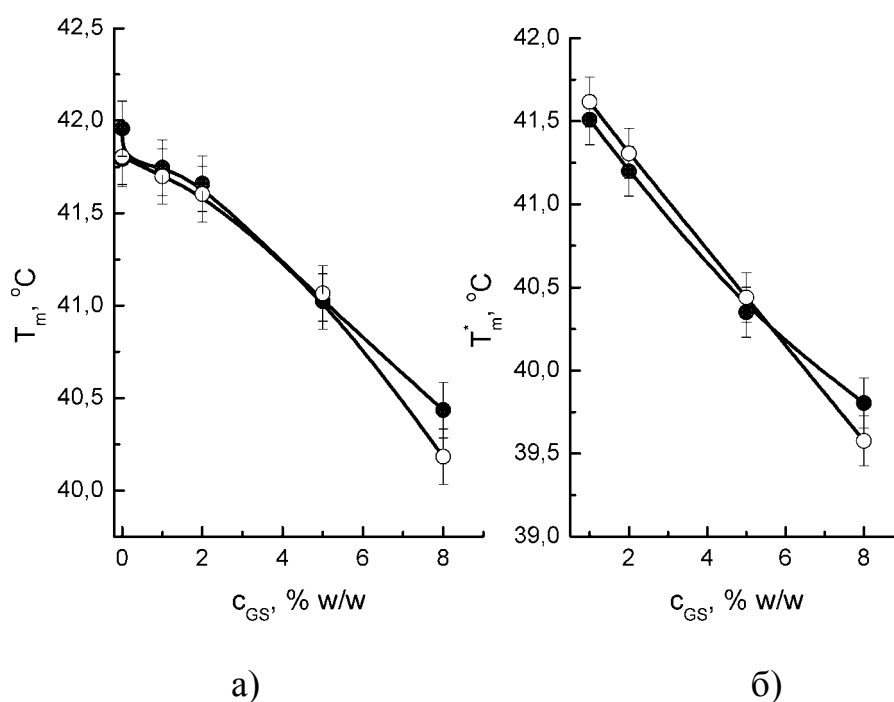


Рис. 6.17 Значення  $T_m$  (а) та  $T_m^*$  (б) для мембран ДПФХ з вмістом GS (●) та GS разом із D-g-PAA(PE) (○).

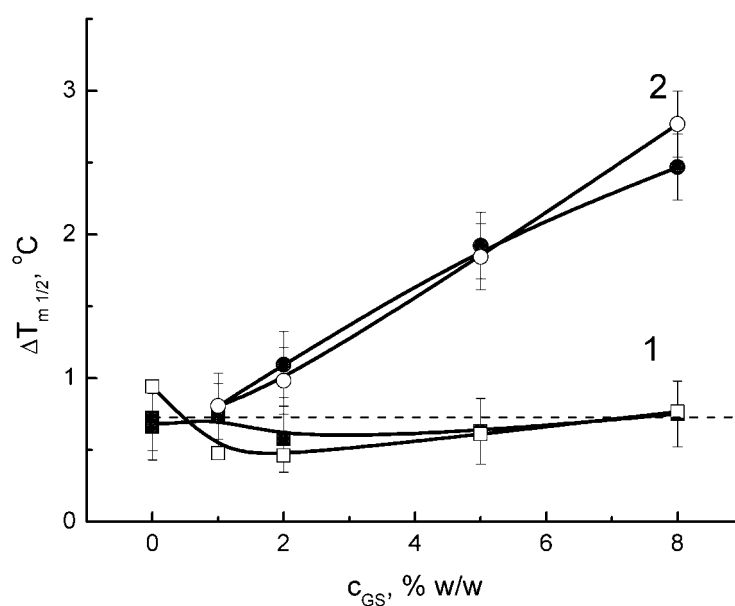


Рис. 6.18 Значення напівширини ДСК-піків мономерів (1) та олігомерів (2) для мембран з GS (відкриті символи) та GS разом із D-g-PAA(PE) (суцільні символи). Пунктирною лінією позначена величина  $\Delta T_{m1/2}$  для мембрани ДПФХ без домішок.

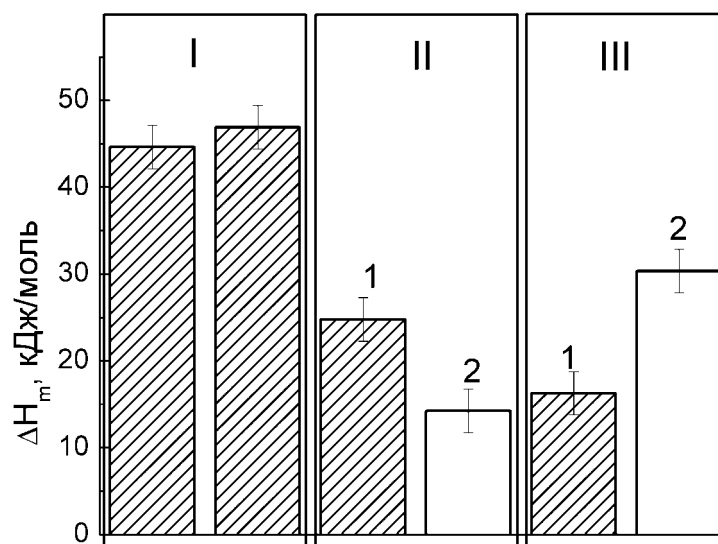


Рис. 6.19 Значення ентальпії ДСК-піків, ДСК-піків мономерів (1) та олігомерів (2) для мембран з GS (II) та GS разом із D-g-PAA(PE) (III). Окремо наведені значення ентальпії для мембран без GS (I). Вміст GS в усіх випадках становив 5 мас. % відносно ДПФХ.

Встановлено, що присутність полімеру викликає перерозподіл ентальпії зв'язування мономерів та олігомерів GS у бік останніх (рис. 6.19), що може розглядатися як підвищення зв'язування з мембраною олігомерів GS за рахунок мономерів.

Разом усі спостережувані ефекти свідчать про наявність взаємодій GS та D-g-PAA(PE) у мембранному середовищі – безпосередніх або опосередкованих мембранним середовищем. Безпосередні взаємодії стосуються утворення міжмолекулярних комплексів між катіонним GS та аніонним D-g-PAA(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 антибіотику. Можливою причиною того, що катіон-

аніонний комплекс GS – D-g-РАА(РЕ) 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(РЕ) є модулюючим фактором взаємодії GS з мембраною ДПФХ: по-перше, зменшує загальний мембранотропний ефект пептиду, по-друге, полімер сприяє зв'язуванню з мембраною олігомерів GS за рахунок мономерів.

### **Висновки до розділу 6**

За допомогою методів флуоресцентної спектроскопії і мікрохвильової діелектрометрії було досліджено вплив антибіотика GS на модельні фосфоліпідні мембрани. В присутності GS прослідковується тенденція до зменшення мікрор'язкості гідрофобної області ліпосом різного фосфоліпідного складу. Виявляється зразок ліпосом, що містить 10% ХЛ. За даними мікрохвильової діелектрометрії встановлено розупорядкування структури об'ємної води в присутності GS в зразках ліпосом з вмістом 30% ХЛ. Однак, в зразках модельних мембран, які містять 10% ХЛ, спостерігаються протилежні зміни діелектричних параметрів, що може бути наслідком більшого упорядкування структури вільної води.

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(РЕ) 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.

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 (спостерігаються як у мультишарових модельних мембранах із фосфатидилхоліну, так і у сферичних ліпосомах).

Визначено немонотонний модулюючий ефект холестеролу на утворення комплексів циклопептидного антибіотика GS з модельними та природними мембранами. Механізм модифікуючого впливу холестеролу на структурно-динмічний стан мембран обумовлений зміною ступеня гідратації ліпідів, збільшенням мікров'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.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора: [30], [32], [37], [38], [39].



## 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 плоских 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 перемикання 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 мікров'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 грамїцидину S на функціонування тромбоцитарної ланки системи гемостазу. Встановлено, що GS викликає сферуляцію та активацію тромбоцитів, опосередковану іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Грамїцидин 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 перекичному 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

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 S. *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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.
17. Yemets B.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.
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.

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 Gramicidin S on erythrocyte membrane. *28 International and 3 European Peptide Society Congress : Abstracts*, Prague, 5–8 September 2004. Prague, 2004. P. 332.

25. Hackl E.V., Berest V.P., Al-Amush 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 ІV 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. 227.
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 Ultra-short Impulse Signals : Abstracts*, Odessa, 4–7 September 2018, Odessa, 2018. P. 285–289.
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. Vorikov O.Y., Morozova O.M., Berest V.P. Sub-Microfluidic Setup to Quan-



tify Cell Surface & Charge Density. *2019 IEEE 2nd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering*, Lviv, 2019. P. 256–259.

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.

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 Membrantropic Effects. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019 № 29 (2). P. 161.

38. Berest V., Budianska L., Vashchenko O., Kutsevol N., Harahuts Yu., Kasian N., Lisetski L. Membrantropic 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.

41. Berest V., Sichevska L., Gorobchenko O. Adsorption of gramicidin S on na-

nosized 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.

42. Pirtskhalava M., Vishnepolsky B., Grigolava M., Managadze G. Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021. № 14(5). P. 471.

43. Cardoso P., Glossop H., Meikle T.G., Aburto-Medina A., Conn C.E., Sarojini V., Valery C. Molecular engineering of antimicrobial peptides: Microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. *Biophys. Rev.* 2021. № 13. P. 35–69.

44. Mookherjee N., Anderson M.A., Haagsman H.P., Davidson D.J. Antimicrobial host defence peptides: Functions and clinical potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020. № 19. P. 311–332.

45. Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 2020. № 11. P. 2559.

46. Lazzaro B.P., Zasloff M., Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*. 2020. № 368: P. 5480.

47. Sabapathy T., Deplazes E., Mancera R.L. Revisiting the Interaction of Melittin with Phospholipid Bilayers: The Effects of Concentration and Ionic Strength. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. № 21. P. 746.

48. Berest V., Gatash S. Effect of gamma irradiation and temperature on human blood platelet aggregation. *Experimental Hematology*. 2003. Vol. 31. Issue. 7. Supplement: 1. P. 236-236.

49. Epand R.F., Savage P.B., Epand R.M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins) *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2007. № 1768. P. 2500–2509.

50. Savini F., Loffredo M.R., Troiano C. et al. Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2020. № 1862. P. 183291.

51. Hasper H.E., Kramer N.E., Smith J.L., Hillman J.D., Zachariah C., Kuipers O.P., de Kruijff B., Breukink E. An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science*. 2006. № 313. P. 1636–1637.
52. Sani M.A., Separovic F. How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. *Acc. Chem. Res.* 2016. № 49. P. 1130–1138.
53. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys. J.* 2001. № 81. P. 1475–1485.
54. Wenzel M., Chiriac A.I., Otto A., Zweytick D., May C., Schumacher C., Gust R., Albada H.B., Penkova M., Krämer U., et al. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. № 111. P. 1409.
55. Park C.B., Kim H.S., Kim S.C. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. № 244. P. 253–257.
56. Di Pisa M., Chassaing G., Swiecicki J.-M. Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers. *Biochemistry*. 2015. №54. P. 194–207.
57. Bowie J.U. Membrane protein folding: How important are hydrogen bonds? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011. № 21. P. 42–49.
58. Tang M., Hong M. Structure and mechanism of  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy. *Mol. Biosyst.* 2009. № 5. P. 317–322.
59. Iqbal U.H., Zeng E., Pasinetti G.M. The Use of Antimicrobial and Antiviral Drugs in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. № 21. P. 4920.
60. Sarig H., Rotem S., Ziserman L., Danino D., Mor A. Impact of Self-Assembly Properties on Antibacterial Activity of Short Acyl-Lysine Oligomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. № 52. P. 4308.

61. Bowerman C.J., Liyanage W., Federation A.J., Nilsson B.L. Tuning  $\beta$ -Sheet Peptide Self-Assembly and Hydrogelation Behavior by Modification of Sequence Hydrophobicity and Aromaticity. *Biomacromolecules*. 2011. № 12. P. 2735–2745.
62. Feder R., Dagan A., Mor A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2000. № 275. P. 4230–4238.
63. Torrent M., Andreu D., Nogués V.M., Boix E. Connecting Peptide Physicochemical and Antimicrobial Properties by a Rational Prediction Model. *PLoS ONE*. 2011. № 6. P. 16968.
64. Torrent M., Valle J., Nogués M.V., Boix E., Andreu D. The Generation of Antimicrobial Peptide Activity: A Trade-off between Charge and Aggregation? *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. № 50. P. 10686–10689.
65. Schnaider L., Brahmachari S., Schmidt N.W., Mensa B., Shaham-Niv S., Bychenko D., Adler-Abramovich L., Shimon L.J.W., Kolusheva S., DeGrado W.F. Self-assembling dipeptide antibacterial nanostructures with membrane disrupting activity. *Nat. Commun.* 2017. № 8. P. 1365.
66. Lombardi L., Falanga A., Del Genio V., Galdiero S. A New Hope: Self-Assembling Peptides with Antimicrobial Activity. *Pharmaceutics*. 2019. № 11. P. 166.
67. Chen W., Yang S., Li S., Lang J.C., Mao C., Kroll P., Tang L., Dong H. Self-Assembled Peptide Nanofibers Display Natural Antimicrobial Peptides to Selectively Kill Bacteria without Compromising Cytocompatibility. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. № 11. P. 28681–28689.
68. Glossop H.D., De Zoysa G.H., Hemar Y., Cardoso P., Wang K., Lu J., Valéry C., Sarojini V. Battacin-Inspired Ultrashort Peptides: Nanostructure Analysis and Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2019. № 20. P. 2515–2529.
69. Babakhani A., Gorfe A.A., Kim J.E., McCammon J.A. Thermodynamics of Peptide Insertion and Aggregation in a Lipid Bilayer *The Journal of Physical Chemistry B* 2008. № 112 (34). P. 10528–10534

70. Sengupta D., Leontiadou H., Mark A.E., Marrink S.-J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2008. № 1778. P. 2308–2317.
71. Ulmschneider J.P. Charged Antimicrobial Peptides Can Translocate across Membranes without Forming Channel-like Pores. *Biophys. J.* 2017. № 113. P.73–81.
72. Wang Y., Chen C.H., Hu D., Ulmschneider M.B., Ulmschneider J.P. Spontaneous formation of structurally diverse membrane channel architectures from a single antimicrobial peptide. *Nat. Commun.* 2016. № 7. P. 13535.
73. Dias S.A., Freire J.M., Pérez-Peinado C., Domingues M.M., Gaspar D., Vale N., Gomes P., Andreu D., Henriques S.T., Castanho M.A.R.B., et al. New Potent Membrane-Targeting Antibacterial Peptides from Viral Capsid Proteins. *Front. Microbiol.* 2017. № 8. P. 775.
74. Gregory S.M., Cavanaugh A., Journigan V., Pokorny A., Almeida P.F.F. A Quantitative Model for the All-or-None Permeabilization of Phospholipid Vesicles by the Antimicrobial Peptide Cecropin A. *Biophys. J.* 2008. № 94. P. 1667–1680.
75. Oreopoulos J., Epanand R.F., Epanand R.M., Yip C.M. Peptide-Induced Domain Formation in Supported Lipid Bilayers: Direct Evidence by Combined Atomic Force and Polarized Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* 2010. № 98. P. 815–823.
76. Tamba Y., Ariyama H., Levadny V., Yamazaki M. Kinetic Pathway of Antimicrobial Peptide Magainin 2-Induced Pore Formation in Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B.* 2010. № 114. P. 12018–12026.
77. Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., van Wijk R. Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol.* 2018. N 9. Article. 656.
78. Fernandes H.P., Cesar C.L., Barjas-Castro Mde. L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011. 33(4). P. 297-301.

79. Hale J.D.F., Hancock R.E.W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2007. №5. P. 951–959.
80. Lee T.H., Hall K.N., Aguilar M.I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016. № 16. P. 25–39.
81. Графская Е.Н. Антимикробные пептиды секрета слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* : дис. ...канд. биол. Наук : 03.01.04. Москва, 2021. 119 с.
82. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006. Vol. 19. № 3. P. 491-511.
83. Campagna S., Saint N., Molle G., Aumelas A. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry.* 2007. Vol. 46. № 7. P. 1771–1778.
84. Ludtke S.J., Ke H., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L., Huang H.W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry.* 1996. Vol. 35. № 43. P. 13723–13728.
85. Matsuzaki K., Murase O., Yoneyama S. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry.* 1996. Vol. 35. № 25. P. 8450–8456.
86. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1999. Vol. 1462. № 1–2. P. 55–70.
87. Gazit E., Miller I.R., Structure and Orientation of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 within Phospholipid Membranes peptide-membrane interaction; toxic mechanism. *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 258. № 99 P. 860–870.
88. Huang H.W. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry.* 2000. Vol. 39. № 29. P. 8347–8352.

89. Lohner K., Hilpert K. Antimicrobial peptides: Cell Membrane and Microbial Surface Interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 1858. № 5. P. 915–917.
90. Wimley W.C., Hristova K. Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions. *J. Membr. Biol.* 2011. № 239. P. 27–34.
91. Jean-François F., Castano S., Desbat B., Odaert B., Roux M., Metz-Boutigue M.-H., Dufourc E.J. Aggregation of Cateslytin  $\beta$ -Sheets on Negatively Charged Lipids Promotes Rigid Membrane Domains. A New Mode of Action for Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*. 2008. № 47. P. 6394–6402.
92. Epanand R.M., Rotem S., Mor A., Berno B., Epanand R.F. Bacterial Membranes as Predictors of Antimicrobial Potency. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. № 130. P. 14346–14352.
93. Kumagai A., Dupuy F.G., Arsov Z., Elhady Y., Moody D., Ernst R.K., Deslouches B., Montelaro R.C., Peter Di Y., Tristram-Nagle S. Elastic behavior of model membranes with antimicrobial peptides depends on lipid specificity and d-enantiomers. *Soft Matter*. 2019. № 15. P. 1860–1868.
94. Palm C., Netzereab S., Hällbrink M. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*. 2006. № 27. P. 1710–1716.
95. Strandberg E., Tremouilhac P., Wadhvani P., Ulrich A.S. Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2009. № 1788. P. 1667–1679.
96. Hong R.W., Shchepetov M., Weiser J.N., Axelsen P.H. Transcriptional Profile of the Escherichia coli Response to the Antimicrobial Insect Peptide Cecropin A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. № 47. P. 1.
97. Shagaghi N., Bhave M., Palombo E.A., Clayton A.H.A. Revealing the sequence of interactions of PuroA peptide with Candida albicans cells by live-cell imaging. *Sci. Rep.* 2017. № 7. P. 43542.

98. Herce H.D., Garcia A.E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. № 104. P. 20805–20810.
99. Marxer M., Vollenweider V., Schmid-Hempel P. Insect antimicrobial peptides act synergistically to inhibit a trypanosome parasite. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2016. № 371.
100. Cokol M., Chua H.N., Tasan M., Mutlu B., Weinstein Z.B., Suzuki Y., Nergiz M.E., Costanzo M., Baryshnikova A., Giaever G., et al. Systematic exploration of synergistic drug pairs. *Mol. Syst. Biol.* 2011. № 7
101. Tamma P.D., Cosgrove S.E., Maragakis L.L. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012. № 25. P. 450–470.
102. Worthington R.J., Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* 2013. № 31. P. 177–184.
103. Matsuzaki K., Mitani Y., Akada K.-Y., Murase O., Yoneyama S., Zasloff M., Miyajima K. Mechanism of Synergism between Antimicrobial Peptides Magainin 2 and PGLa. *Biochemistry*. 1998. № 37. P. 15144–15153.
104. Zerweck J., Strandberg E., Bürck J., Reichert J., Wadhvani P., Kukharenc O., Ulrich A.S. Homo- and heteromeric interaction strengths of the synergistic antimicrobial peptides PGLa and magainin 2 in membranes. *Eur. Biophys. J.* 2016. № 45. P. 535–547.
105. Антибиотики-полипептиды: (Структура, функция и биосинтез) /под ред. Н.С. Егорова. М. : Изд-во МГУ, 1987. 264 с.
106. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., 1994. 512 с.
107. Гаузе Г.Ф. Грамицидин С и его применение. М.: Б.и., 1952. 153 с.
108. Sanger F. The free amino group of gramicidin S. *Biochem. J.* 1946. Vol. 40. № 2. P. 261–262.
109. Abraham T., Marwaha S., Kobewka D.M. The relationship between the binding to and permeabilization of phospholipid bilayer membranes by GS14dK4,



a designed analog of the antimicrobial peptide gramicidin S. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1768. № 9. P. 2089–2098.

110. Полин А.Н., Егоров Н.С. Структурно-функциональные особенности грамицидина С в связи с его антибиотической активностью. *Антибиотики и химиотерапия*. 2003. № 48(12). С. 29–32.

111. Prenner E.J., Lewis R.N.A.H., Kondejewski L.H., Hodges R.S., McElhaney R.N. Diffraction scanning calorimetry study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. № 147. P.211–223.

112. Krivanek R., Rybar P., Prenner J., McElhaney R.N., Hianik T. Interaction of the antimicrobial peptides gramicidin S with dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a densitometry and sound velocity study. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. № 1510. P.452–463.

113. Prenner E.J., Lewis R.N.A.H., Kondejewski L.H., Hodges R.S., McElhaney R.N. Nonlamellar phases induced by the interaction of gramicidin S with lipid bilayers. A possible relationship to membrane-disrupting activity. *Biochemistry*. 1997. № 36. P. 7906–7916.

114. Staudegger E., Prenner E.J., Kriechbaum M., Degovics G., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N., Lohner K. X-ray studies on the interaction of gramicidin S with microbial lipid extracts: evidence for cubic phase formation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. № 1468. P. 213–230.

115. Lewis R.N.A.H., Prenner E.J., Kondejewski L.H., Flach C.R., Mendelsohn R., Hodges R.S., McElhaney R.N. Fourier transform infrared spectroscopic studies of the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid micelles and with lipid monolayer and bilayer membranes. *Biochemistry*. 1999. № 38. P.15193–15203.

116. Prenner E.J., Lewis R.N.A.H., Jelokhani-Niaraki M., Hodges R.S., McElhaney R.N. Cholesterol attenuates the interaction of antimicrobial peptide gramicidin S

with phospholipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. № 1510. P.83–92.

117. Salgado J., Grage S. L., Kondejewski L.H., Hodges R.S., McElhaney R.N., Ulrich A. S. Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial beta-sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state <sup>19</sup>F-NMR. *J. Biomol NMR*. 2001. № 21(3). P. 191–208.

118. Jelokhani-Niaraki M., Hodges R.S., Meissner J.E., Hassenstein U.E., Wheaton L. Interaction of Gramicidin S and its Aromatic Amino-Acid Analog with Phospholipid Membranes. *Biophys J*. 2008. № 95(7). P. 3306–3321.

119. Mihailescu D., Smith J. C. Atomic detail peptide-membrane interactions: molecular dynamics simulation of gramicidin S in a DMPC bilayer. *Biophys. J*. 2000. № 79. P. 1718–1730.

120. Huang H.W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. № 1758. P. 1292–1302.

121. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. М. : Наука, 1982. 224 с.

122. Хмельницкий А.И., Василевская И.В., Черенкевич С.Н. Структура и свойства ионных каналов биологических мембран. : учеб. пос. Минск : БГУ, 2004. 167 с.

123. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. М. : Наука, 1981. 293 с.

124. Martinotti C., Ruiz-Perez L., Deplazes E., Mancera R.L. Molecular Dynamics Simulation of Small Molecules Interacting with Biological Membranes. *Chemphyschem*. 2020. № 21 (14). P. 1486–1514.

125. London E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2005. Vol. 1746. P. 203–220.

126. Rivel T., Ramseyer C., Yesylevskyy S. The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin. *Sci Rep*. 2019. № 9. P. 5627

127. Кратнов А.Е. Атеросклероз и ИБС: роль окислительного стресса. Ярославль, 2003. 196 с.
128. Ланкин В.З., Тихазе А.Г., Беленков Ю.Н. Свободно-радикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. *Кардиология*. 2000. № 7. С. 48–61.
129. Ишанходжаев Т.Я., Берников В.Т., Зайнутдинов Б.Р. Влияние изменений липидного состава мембран на функциональную активность тромбоцитов. *Биохимия*. 1990. Т. 55. Вып 3. С. 1507–1512.
130. Peng B., Geue S., Coman C., Münzer P., Kocczynski D., Has C., Hoffmann N., Manke M.C., Lang F., Sickmann A., Gawaz M., Borst O., Ahrends R. Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome. *Blood*. 2018. № 132(5).
131. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. № 5. P. 414–418.
132. Efremov R.G., Volynsky P.E., Polyansky A.A., Nolde D.E., Arseniev A.S. Protein-membrane interactions: lessons from in silico studies. *Structure and Biophysics - New Technologies for current Challenges in Biology and Beyond*. Springer, 2007. P. 19–39.
133. Corradi V., Sejdiu B.I., Mesa-Gallosio H., Abdizadeh H., Noskov S.Y., Marrink S. J., Tieleman D.P. Emerging Diversity in Lipid-Protein Interactions. *Chem Rev.* 2019. № 119(9). P. 5775-5848.
134. Gupta K., Donlan J.A.C., Hopper J.T.S., Uzdavinyas P., Landreh M., Struwe W.B., Drew D., Baldwin A.J., Stansfeld P.J., Robinson C.V. The role of interfacial lipids in stabilizing membrane protein oligomers. *Nature*. 2017. № 541 (7637). P. 421–424.
135. Michalak J., Kadziolka A., Pruszkowska R. et.al. Compensatory mechanisms in erythrocyte lipids in patients with atherosclerosis. *Lipids*. 1988. V. 23, N 5. P. 476-480.
136. Fauvel J., Chap H., Roques V., Levy-Toledano S., Douste-Blazy L. Biochemical characterization of plasma membranes and intracellular membranes

- isolated from human platelets using Percoll gradients. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. Vol. 856. P. 155–164.
137. Golan D.E., Alecio M.R., Veatch W.R., Rando R.R. Lateral mobility of phospholipid and cholesterol in the human erythrocyte membrane: effects of protein-lipid interactions. *Biochemistry*. 1984. V. 23. P. 332–339.
138. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Структурно-функциональное состояние тромбоцитов на начальной стадии агрегации. *Биофизика*. 1989. Т. 34. Вып. 2. С. 267–271.
139. Vaz W.L.C., Goodsaid-Zalduondo F., Jacobson K. Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer membranes. *FEBS Lett*. 1984. V. 174. P. 199–207.
140. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*. 1993. № 294 (Pt 1) . P. 1-14.
141. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. Минск, 1990. 104 с.
142. Rink T.J., Sage S.O. Calcium signaling in human platelets. *Annual Review of Physiology*. 1990. Vol. 52. № 4. P. 311–319.
143. Estevez B., Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2017. № 32 (2). P. 162–177.
144. Coles B., Bloodsworth A., Eiserich J.P., Coffey M.J., McLoughlin R.M., Giddings J.C., Lewis M.J., Haslam R.J., Freeman B.A., O'Donnell V.B. Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277. Part 8. P. 5832–5840.
145. Goto S., Handa S., Takahashi E., Abe S., Handa M., Ikeda Y. Synergistic effect of epinephrine and shearing on platelet activation. *Thrombosis Research*. 1996. Vol. 84. №. 5. P. 351–359.
146. Filkova A.A., Martyanov A.A., Garzon Dasgupta A.K., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments. *Sci Rep*. 2019. № 9 (1). P. 6217.

147. Kaatze U. Measuring the dielectric properties of materials. Ninety-year development from low-frequency techniques to broadband spectroscopy and high-frequency imaging. *Measurement Science and Technology*. 2013. V. 24. P. 12005.
148. Hackl E. V., Gatash S. V., Nikolov O. T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. № 63 (2). P. 137–148.
149. Gatash S. V., Styopin L. D. The dielectric permittivity of disordered dispersion systems with particles of different shapes and structures. *Telecommunications and Radio Engineering*. 2002. № 58 (7–8). P. 160–166.
150. Николов О. Т., Жилиякова Т. А. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями. *Журнал физической химии*. 1991. № 65 (5). С. 1417–1420.
151. Born G.V.R. Observation on the change in shape of blood platelets brought about by ADP. *J. Physiol*. 1970. V. 209. № 3. P. 487–494.
152. Latimer P., Born G.V., Michal F. Application of light-scattering theory to the optical effects associated with the morphology of blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys*. 1977. V. 180. № 1. P. 151–159.
153. Latimer P., Wamble F. Light scattering by aggregates of large colloidal particles. *Appl. Opt*. 1982. V. 21. № 13. P. 2447–2455.
154. Иванов И.Т. Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека. *Биофизика*. 2001. Вып. 2(46). С. 281–290.
155. Терсков И.А. Метод химических (кислотных) эритрограмм. *Биофизика*. 1957. Вып. 2(2). С. 259–266.
156. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Phys. Rev*. 2002. № 82. P. 503–568.
157. Jentsch T.J., Friedrich T., Schriever A., Yamada H. The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch*. 1999. № 437. P. 783–795.
158. Szewczyk A. The intracellular potassium and chloride channels: properties pharmacology and function (review). *Mol. Membr. Biol*. 1998. №15. P. 49–58.

159. Ashcroft F.M. Ion Channels and Disease. Channelopathies. San Diego : Academic Press, 2000.
160. Waldegger S., Jentsch T.J. From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000. № 11. P. 1331– 1339.
161. Lipecka J., Bali M., Thomas A., Fanen P., Edelman A., Fritsch J., Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. № 282. P. 805–816.
162. George A.L., Bianchi L., Link E.M., Vanoye C.G. From stones to bones: the biology of ClC chloride channels. *Curr. Biol.* 2001. № 11. P. 620–628.
163. Greene J.R., Brown N.H., Di Domenico B.J., Kaplan J., Eide D.J., The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol. Gen. Genet.* 1993. № 241. P. 542–553.
164. Schwappach B., Stobrawa S., Hechenberger M., Steinmeyer K., Jentsch T.J. Golgi localization and functionally important domains in the NH<sub>2</sub> and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p, *J. Biol. Chem.* 1998. № 273. P. 15108– 15110.
165. Gaxiola R.A., Yuan D.S., Klausner R.D., Fink G.R. The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. № 95. P. 4046–4050.
166. Skoneczny M., Rytka J. Maintenance of the peroxisomal compartment in glucose-repressed and anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochimie.* 1996. № 78. P. 95–102.
167. Zinser E., Daum G. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1995. № 11. P. 493–536.
168. Jones E. Tackling the protease problems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymology.* 194. San Diego : Academic Press, 1991. P. 428–453.
169. Camadro J.M., Labbe P. Purification and properties of ferrochelatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a precursor form of the protein. *J. Biol. Chem.* 1988. № 263. P. 1182– 11675.

170. Hausler A., Ballou L., Ballou C.E., Robbins P.W. Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 1992. № 89. P. 6846–6850.
171. Rupert L.A., Engberts J.B., Hoekstra D., Effect of poly(ethylene glycol) on the Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of didodecyl phosphate vesicles. *Biochemistry*. 1988. № 27. P. 8232–8239.
172. Weinreich F., Jentsch T.J. Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J. Biol. Chem.* 2001. №276. P. 2347–2353.
173. Middleton R.E., Pheasant D.J., Miller C., Homodimeric architecture of aClC-type chloride ion channel. *Nature*. 1996. № 383. C. 337–340.
174. Prusiner S.B., Scott M.R., DeArmond S.J., Cohen F.E. Prion protein biology. *Cell*. 1998. № 93. P. 337–348.
175. Prusiner S.B. Prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998. № 95. P. 13363–13383.
176. Chapron Y., Peyrin J-M., Crouzy S., Jaegly A., Dormont D. Theoretical analysis of the implication of PrP in neuronal death during transmissible subacute spongiform encephalopathies: hypothesis of a PrP oligomeric channel. *J. Theor. Biol.* 2000. № 204. P. 103–111.
177. Kourie J.I., Culverson A. Prion peptide fragment PrP[106-126] forms distinct cation channel types. *J. Neurosci.* 2000. № 62. 120–133.
178. Chiesa R., Harris D.A. Prion diseases: what is a neurotoxic molecule. *Neurobiol. Dis.* 2001. № 8. 743–763.
179. Kourie J.I. Prion channel proteins and their role in vacuolation and neurodegenerative diseases. *Eur. Biophys. J.* 2002. № 31. 409–416.
180. Zahn R., Liu A., Riek R., Von Schroetter C., Garcia F.L., Billeter M., Calzolari L., Wider G., Wutrich K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2000. № 97. P. 145–150.
181. O'Donovan C.N., Tobin D. Cotter T.G. Prion protein fragment PrP(106-126) induces apoptosis via mitochondrial disruption in neuronal SH-SY5Y cells. *J. Biol. Chem.* 2001. № 276. P. 43516–43523.

182. Katsu T., Kobayashi H., Hirota T., Fujita Y., Sato K., Nagai U. Structure-activity relationship of gramicidin S analogues on membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 899. № 2. P. 159–170.
183. Kiricsi M., Prenner E.J., Jelokhani-Niaraki M., Lewis R.N.A.H., Hodges R.S., McElhaney R.N. The effect of ring-size analog of the antimicrobial peptide gramicidin S on phospholipids bilayer model membranes and on the growth of *Acholeplasma laidlawii* B. *Eur. J. Biochem*. 2002. V. 269. P. 5911–5920.
184. Sauerheber R.D., Zimmermann T.S., Esgate J.A. et al. Effects of calcium, lanthanum, and temperature on the fluidity of spin-labeled human platelets. *Journal of Membrane Biology*. 1980. Vol. 52. № 3. P. 201–219.
185. Королев П.Н., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Королев Н.П., Мильграм В.Д. Влияние грамицидина S на ионную проницаемость бислойных липидных мембран. *Научные доклады высшей школы, Биологические науки*. 1988. № 7. С. 31–35.
186. Weisel J.W., Shuman H., Litvinov R. I. Protein-protein unbinding induced by force: single-molecule studies. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2003. V.13. P. 227–235.
187. Берест В.П., Гаташ С.В. Залежність агрегації тромбоцитів від температури. *Фізіологічний журнал*. 1998. Т.44. №5–6. С.89–94.
188. Островский Д.Н., Булгакова В.Г., Жукова И.Г., Капрельянц А.С., Розанцев Е.Г. Изменения липид-белковых взаимодействий в мембранах бактерий обработанных грамицидином S. *Биохимия*. 1976. Т.41. Вып.1. С.175–182.
189. Kozlov M.M., Markin V.S. On the theory of membrane fusion. The adhesion-condensation mechanism. *Gen. Physiol. Biophys*. 1984. № 5. P. 379–402.
190. Белицер Н.В., Анищук М.Г., Позднякова Т.М., Горкун О.В. Ультраструктурные изменения тромбоцитов при АДФ-стимулируемой агрегации (в присутствии фибриногена). *Цитология и генетика*. 1989. Т. 23. № 3. С. 3–7.
191. Israels S.J., McMillan-Ward E.M. Platelet tetraspanin complexes and their association with lipid rafts. *Thromb. Haemost*. 2007. V. 98. № 5. P. 1081–1807.
192. Schootemeijer A., Van Beekhuizen F.E., Gorter G., Tertoolen L.G.J. Rapid alterations in lateral mobility of lipids in the plasma membrane of activated human



megakaryocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1994. Vol. 221. Issue 1. P. 353–362.

193. Gordon L.M., Mobley P.W., Esgate J.A., Hofmann G., Whetton A.D., Houslay M.D. Thermotropic lipid phase separations in human platelet and rat liver plasma membranes. *Journal of Membrane Biology*. 1983. Vol. 76. № 2. P. 139–149.

194. Булгакова В.Г., Королев П.Н., Петрыкина З.М. и др. Изменения оптической плотности суспензии протопластов бактерий подвергнутых действию мембрано-активных антибиотиков. *Антибиотики*. 1984. Т. 29. № 10. С. 756–760.

195. Shattil S.J. Not just another pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . *Thromb. Haemost.* 1997. V.78. № 1. P. 220–225.

196. Гаташ С.В., Берест В.П., Воробейчик М.В. Математическая модель динамики агрегации тромбоцитов. Определение зависимости кинетических параметров от температуры. *Вісн. Харк. ун-ту*. 1999. № 434. *Біофізичний вісн.* Вип. 3. С.71–77.

197. Vasilev G.A, Filkova A.A, Sveshnikova A.N. Study of Reversible Platelet Aggregation Model by Nonlinear Dynamics. *Mathematics*. 2021. № 9(7). С. 759.

198. Деев А.И., Осис Ю.Г., Формаюзк В.Е. и др. Увеличение содержания воды в липидной фазе липопротеинов при перекисном окислении. *Биофизика*. 1983. Т. 28. Вып. 4. С. 629–631.

199. Marsh S.A., Coombes J.S. Vitamin E and alpha-lipoic acid supplementation increase bleeding tendency via an intrinsic coagulation pathway. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2006. V. 12. №. 2. P. 169–173.

200. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. : Наука, 1972. 252 с.

201. Берест В.П., Гаташ С.В., Воробейчик М.А. Влияние гамма-облучения на агрегацию тромбоцитов. *Вісн. Харк. ун-ту*. 1999. № 450. *Біофізичний вісн.* Вип.4. С. 96–99

202. Tatara M. Radiation damage to lymphocyte membranes II. Structural changes of lipid domain after low doses of high let irradiation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 1996. Vol. 209. № 2. P. 331–339.
203. Stensrud G., Passi S., Larsen T., Sandset P. M., Smistad G., Mönkkönen J., Karlsen J. Toxicity of gamma irradiated liposomes. *In vitro* interactions with blood components. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999. Vol. 178. Issue 1. P. 33–46.
204. Kubasova T., Varga L.P., Köteles G.J. Surface alterations of mammalian cells upon ionizing radiation as detected by a lectin-binding technique 1. Binding of concanavalin a by blood cells of X-irradiated mice. *International Journal of Radiation Biology*. 1981. Vol. 40. Issue 2. P. 175–186.
205. Berroud A., Le Roy A., Voisin P. Membrane oxidative damage induced by ionizing radiation detected by fluorescence polarization. *Radiation and Environmental Biophysics*. 1996. Vol. 35. № 4. P. 289–295.
206. Leyko W., Bartosz G. Membrane Effects of ionizing radiation and hyperthermia. *International Journal of Radiation Biology*. 1985. Vol. 49. Issue 5. P. 743–770.
207. Benderitter M., Vincent-Genod L., Berroud A., Muller S., Donner M., Voisin P. Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? *International Journal of Radiation Biology*. 1999. Vol. 75. Issue 8. P. 1043–1053.
208. Hoffmann J.J.M.L., Nabbe K.C.A.M., van den Broek N.M.A. Effect of age and gender on reference intervals of red blood cell distribution width (RDW) and mean red cell volume (MCV). *Clin Chem Lab Med*. 2015. № 53(12). P. 2015–2019.
209. Leal J.K.F., Adjobo-Hermans M.J.W., Bosman G.J.C.G.M. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. *Front Physiol*. 2018. №9, 703.

210. Blanc L., De Gassart A., Géminard C., Bette-Bobillo P., Vidal M. Exosome release by reticulocytes – An integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells Mol Dis*. 2005. № 35(1). P. 21–6.
211. Thangaraju K., Neerukonda S.N., Katneni U., Buehler P.W. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021. № 22(1). P. 153.
212. Lim G.H.W., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. № 99 (26). P. 16766–16769.
213. Murate M., Abe M. Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., Kobayashi T. Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J Cell Sci*. 2015. № 128(8). P. 1627–1638.
214. Huang H.W., Chen F-Yu, Lee M.T. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys Rev Lett*. 2004. № 92 (19). P. 198304.
215. Karatekin E., Sandre O., Brochard-Wyart F. Transient pores in vesicles. *Polym Int*. 2003. № 52 (4). P. 486–493.
216. Grover N.B., Naaman J., Ben-Sasson S., Doljanski F., Nadav E. Electrical Sizing of Particles in Suspensions : II. Experiments with Rigid Spheres. *Biophys J*. 1969. № 9 (11). P. 1415–1425.
217. Penič S, Mesarec L, Fošnarič M, Mrówczyńska L, Hägerstrand H, Kralj-Iglič V, Iglič A. Budding and Fission of Membrane Vesicles: A Mini Review. *Front Phys*. 2020. № 8. P. 342.
218. Abdalla M.A., MCGaw L.J. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics. *Mini review. Molecules*. 2018. № 23 (8). P. 2080
219. Magana M., Pushpanathan M., Santos A. L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect. Dis*. 2020. Vol. 20 (9). P. 216–230.

220. Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H. M., Zaitseva E. The Multifaceted Antibacterial Mechanisms of the Pioneering Peptide Antibiotics Tyrocidine and Gramicidin S. *mBio*. 2018. Vol. 9 (5). P. 802–818.
221. Semrau S., Monster M. W. L., Van der Knaap M., Florea B. I., Schmidt T., Overhand M. Membrane lysis by gramicidin S visualized in red blood cells and giant vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1798 (11), P. 2033–2039.
222. Sheetz M. P., Singer S. J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974. Vol. 71 (11). P. 4457–4461.
223. Lim G. H. W., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99 (26), P. 16766–16769.
224. Monteiro N., Martins A., Reis R. L., Neves N. M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *J. R. Soc. Interface*. 2014. Vol. 11(101). P. 2014.
225. Yazdanbakhsh K., Lomas-Francis C., Reid M.E. Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane. *Transfusion Medicine Reviews*. 2000. № 14 (4). P. 364–374.
226. Rodi P.M., Trucco V.M., Gennaro A.M. Factors determining detergent resistance of erythrocyte membranes. *Biophysical Chemistry*. 2008. № 135 (1–3). P. 14–18 .
227. Mobasherry N., Nielsen C., Andersen O.S. The conformational preference of gramicidin channels is a function of lipid bilayer thickness, *FEBS Lett*. 1997. № 412 (1). P. 15–20.
228. Shaheen S.M., Shakil F.R., Hossen M.N., Amran M.S, Ul-Islam M.A. Liposome as a carrier for advanced drug delivery. *Pak J Biol Sci*. 2006. № 9(6). P. 1181–1191.

229. Dimova R., Aranda S., Bezlyepkina N., Nikolov V., Riske K.A., Lipowsky R. A practical guide to giant vesicles. probing the membrane nanoregime via optical microscopy *J. Phys. Condens.* 2006. 28 (0). P. 1151–1176.
230. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм. *Биофизика*. 1957. Т. 2. С. 259–266.
231. Гончарова Е.И., Пинаев Г.П. Белки цитоскелета эритроцитов. *Цитология*. 1988. Т. 30. №1. С.5–18.
232. Козлов М.М., Маркин В.С. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель. *Биологические мембраны*. 1986. Т.3. № 4. С.404–421.
233. Takakuwa Y., Manno S. Structure of erythrocyte membrane skeleton. *Nippon Rinsho*. 1996. V. 54. P. 2341–2347.
234. Rodgers W., Glaser M. Characterization of lipid domains in erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 88. P. 1364–1368.
235. Брейлсфорд Дж. Д. Механоэластические свойства биологических мембран. *Текущность мембраны в биологии. Концепции мембранной структуры*. К.: Наук. думка, 1989. С.276–301.
236. Sadchenko A.O., Vashchenko O.V., Kasian N.A., Budianska L.V., Lisetski L.N. Correlations between molecular parameters of guest substances and their effect on model lipid membranes. *Func. Mater.* 2016. № 23 (2). P. 230-235.
237. Popov I., Ben Ishai P., Khamzin A. Feldman Y. The mechanism of the dielectric relaxation in water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. № 18. P. 13941-13953.
238. Buchanan T. J., Haggis J. H., Hasted J. B., Robinson B. J. The dielectric estimation of protein hydration. *Proc. Roy. Soc.* 1952. № 213. P. 379–391.
239. George D. K., Charkhesht A., Hull O. A. New insights into the dynamics of zwitterionic micelles and their hydration waters by gigahertz-to-terahertz dielectric spectroscopy *J. Phys. Chem. B*. 2016. № 120 (41). P. 10757–10767.
240. Clark P., Hawkins H. E., Karow A. M. The influence of vehicle solutions on the toxicity of dimethyl sulfoxide to renal cortex. *Cryobiology*. 1983. № 20 (6). P. 701.

241. Корниенко Е. М. Исследование кинетики детергентного гемолиза эритроцитов, модифицированных ДМСО. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2012. Вип. 15. № 1008. С. 171–176.
242. Udo K. Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature.. *J. Chem. Eng. Data*. 1989. № 34(4). P. 371–374.
243. Ohtake S., Schebor C., Palecek S. P., de Pablo J. J. Phase behavior of freeze-dried phospholipid–cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. 1713. P. 57 – 64.
244. Benesch M. G. K., Lewis R. N. A. H., Mannock D. A., McElhaney R. N. A DSC and FTIR spectroscopic study of the effects of the epimeric cholestan-3-ols and cholestan-3-one on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: Comparison with their 5-cholesten analogs. *Chem. Phys. Lipids*. 2015. № 187. P. 34–49.
245. Radhakrishnan A., McConnell H. M. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biophys. J*. 1999. № 77. P. 1507–1517.
246. Cholesterol affects spectrin–phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition / Diakowski W., et al.. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. № 1758. P. 4–11.
247. Selle C., Pohle W. Fourier transform infrared spectroscopy as a probe for the study of the hydration of lipid self-assemblies. II. Water binding versus phase transitions. *Biospectroscopy*. 1998. № 4. P. 281–294.
248. Blume A., Hübner W., Messner G. Fourier transform infrared spectroscopy of <sup>13</sup>C=O labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry*. 1988. № 27. P. 8239–8249.
249. Popova A. V., Hinch D. K. Effects of cholesterol on dry bilayers: interactions between phosphatidylcholine unsaturation and glycolipid or free sugar. *Biophys. J*. 2007. № 93 (4). P. 1204–1214.

250. Ulmschneider J. P., Smith J. C. Reorientation and dimerization of the membrane-bound antimicrobial peptide PGLa from microsecond all-atom MD simulations. *Biophys. J.* 2012. № 103 (3). P. 472–482.
251. Jia Y., Qian Z., Zhang Y., Wei G. Adsorption and orientation of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) monomer at anionic lipid bilayers: Implications for membrane-mediated aggregation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. № 14. P. 6241–6258.
252. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993. № 98. P. 10089.
253. Dresdner G. Preparation and properties of spin-labeled lecithin-cholesterol liposomes. *J. Membr. Biol.* 1982. № 64(3). P. 145–53.
254. Abraham T., Prenner E.J., Lewis R. N., et al. Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2014. № 1838. V. 5. P. 1420-1429.
255. Guan Q., Huang S. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. *Med. Chem.* 2019. № 62(17). P. 7603–7617.
256. Нагорнов Ю. С., Богомолов А. С. Вычисление объема эритроцитов при анализе данных атомно-силовой микроскопии. *Фундаментальные исследования.* 2013. № 1 (часть 1). С. 181–184.
257. Gause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature.* 1984. № 154. P. 703.
258. The crystal structure of a hydrated gramicidin S-urea complex / Hull S. E., Karlsson R., et al. *Nature.* 1978. № 275. P. 206–207.
260. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R.E.W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *E. coli*. *Biochemistry.* 1999. № 38 (22). P. 7235–7242.
261. Grotenbreg G. M., Witte M. D. Synthesis and biological evaluation of gramicidin S dimmers. *Org. Biomol. Chem.* 2005. №3 (2). P. 233–238.

262. Afonin S., Dürr U.H.N. Solid state NMR structure analysis of the antimicrobial peptide gramicidin S in lipid membranes: concentration-dependent re-alignment and self-assembly as a  $\beta$ -barrel. *Top. Curr. Chem.*, 2008. № 273. P. 139–154.
263. Grotenbreg G. M., Timmer M. S. M. An unusual reverse turn structure adopted by a furanoid sugar amino acid incorporated in gramicidin S. *J. Am. Chem. Soc.* 2004. № 126 (11). P. 3444–3446.
264. Ledwozyw A., Michalak J., Stepień A., Kadziółka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* 1986. V. 155, N 3. P. 275-283.
265. Karatekin E., Sandre O., Brochard-Wyart F. Transient pores in vesicles. *Polym. Int.* 2003. № 52. P. 486–493.
266. Doktorova M., Drew Marquardt D. Gramicidin increases lipid flip-flop in symmetric and asymmetric lipid vesicles. *Biophys. J.* 2019. 116(5). P. 860–873.
270. Wenzel M., Schriek P. Influence of lipidation on the mode of action of a small RW-rich antimicrobial peptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. № 1858(5). P.1004–1011.
271. Berditsch M., Trapp M. Antimicrobial peptide gramicidin S is accumulated in granules of producer cells for storage of bacterial phosphagens. *Sci. Rep.* 2017. № 7. P. 44324.
272. Abe S., Ochi H. Characteristic biological effects of itraconazole on L929 fibroblasts and their cell membrane. *J. Infect. Chemother.* 2000. № 6 (1). P. 35–40.
273. Koynova R., Tenchov B. Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles. *Biochemistry.* 2013. 1(1). 9.
274. Delcour A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1794(5). P. 808–816.
275. Dunnick J. K., O'Leary W. M. Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 101 (3). P. 892–900.



276. Diakowski W., Ozimek Ł. Cholesterol affects spectrin – phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. № 1758. P. 4–12.
277. Miller I. R., Bach D., Wachtel E. J., Eisenstein M. Interrelation between hydration and interheadgroup interaction in phospholipids. *Bioelectrochem*. 2002. Vol. 58. P. 193–196.
278. Kutsevol N. V., Chumachenko V. A. Star-like polymers dextran-polyacrylamide: the prospects of application for nanotechnology. *J. Struct. Chem*. 2015. № 56 (5). P. 1016–1023.
279. Kutsevol N., Bezuglyi M. Star-like dextran-graft-(polyacrylamid-copolyacrylic acid) copolymers. *Macromol. Symp*. 2014. № 335. P. 13–16.
280. Telegeev G., Kutsevol N. Dextran-polyacrylamide as matrices for creation of anticancer nanocomposite *Int. J. Polymer Sci*. 2017. Article 4929857. P. 9.
281. Kutsevol N., Harahuts Yu. Impact of surface properties of branched polyacrylamides onto model lipid membranes of various compositions. *Mol. Cryst. Liq. Cryst*. 2018. № 671(1). P. 9–16.
282. Kaatze U. Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature. *J Chem Eng Data*. 1989. V. 34(4). P. 371–374.
283. Sandhu M., Ali A., Hunter I. C., Roberts N. S. A new method for the precise multiband microwave dielectric measurement using stepped impedance stub. *Measurement Science and Technology*. 2016. V. 27. № 11. P. 117001.
284. George D.K., Charkhesht A., Hull O.A., Mishra A., Capelluto D. G. S., Mitchell-Koch K. R., Vinh N. Q. New insights into the dynamics of zwitterionic micelles and their hydration waters by gigahertz-to-terahertz dielectric spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*. 2016. V. 120. № 41. P. 10757–10767.
285. Жилиякова Т. А., Горобченко О. А., Николов О. Т., Голубничая Г. В. СВЧ-диэлектрметрия биотехнологических жидкостей. К.: Наук. думка, 2015. 112 с.

**Додаток А. Список публікацій здобувача за темою дисертації*****Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати 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. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналіз літературних даних, проведення експериментів, обробка, аналіз та інтерпретація результатів, написання статті*)
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 (*Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні задач дослідження, участь в отриманні та обробці даних світлорозсіювання, узагальнення отриманих результатів, участь у аналізі результатів та підготовці публікації*).
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. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, участь в отриманні та обробці експериментальних даних, аналіз результатів та підготовка публікації*).
4. **Берест В.П.**, Аренкин П.В. Программно-аппаратный комплекс для изучения проводимости и емкости бислоиных липидных мембран. *Біофізичний вісник*. 2009. Вып. 23(2). С. 148–154. (*Особистий внесок*

здобувача: постановка задачі, участь у створенні прототипу обладнання, узагальнення отриманих результатів, написання статті).

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. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз літератури, участь у створенні устаткування, отримання та обробка агрегометричних даних, розрахунок параметрів моделі, участь у аналізі результатів та написання статті).

6. Шевченко Е.Е., **Берест В.П.** Приложение для симуляции осмотического поведения одиночного эритроцита. *Біофізичний вісник*. 2011. Вып. 27(2). С. 90–92. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз літератури, узагальнення отриманих результатів, підготовка публікації).

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. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз літератури, участь у обробці даних світлорозсіювання, узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).

8. Овсяннікова 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. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз літератури, участь в отриманні та обробці даних проточної цитометрії, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз

літератури, участь у розробці математичної моделі, узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).

**Статті у наукових періодичних виданнях інших держав**

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**). (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь в підготовці публікації).

11. Szewczyk A., Kicinska A., Debska G., Skalska J., **Berest V**. Wewnatrzkomorkowe kanały jonowe. *Działalność Naukowa PAN. Wybrane Zagadnienia.* 2001. № 12. S. 67–69. (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні задач дослідження, участь у підготовці публікації).

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**). (Особистий внесок здобувача: участь у отриманні та обробці даних БЛМ експерименту, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).

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**). (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, підбір та аналіз літератури, отримання та обробка даних БЛМ експерименту, флуоресценції та потенціометрії, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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**). (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні

задач дослідження, участь в отриманні та обробці даних кислотного гемолізу, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).

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**). (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, отримання та обробка даних агрегометрії, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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**). (Особистий внесок здобувача: узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).

17. Yemets B.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**). (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні задач дослідження, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).

**Праці, 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. (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, узагальнення отриманих результатів).

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. (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, узагальнення отриманих результатів).

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. (Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні задач дослідження, участь в отриманні та обробка агрегометричних даних, узагальнення отриманих результатів, написання статті).

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. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі, отримання та обробка експериментальних даних, узагальнення отриманих результатів, написання статті).

#### ***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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, отримання та обробка експериментальних даних, аналіз результатів та участь у підготовці публікації).

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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у отриманні та обробці даних, участь у підготовці публікації).

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**). (Заочна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, участь в аналізі результатів та підготовці публікації).

25. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Alamush A., Gatash S.V., Vasylyeva 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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, отримання та обробка даних світлорозсіювання, участь у підготовці публікації).

26. Hackl E.V., **Berest V.P.**, Al-Amoush A., Gatash S.V. Interaction of antimicrobial peptide with model and cell membranes. *Тези доповідей ІV з'їзду Українського біофізичного товариства*. м. Донецьк, 19–21 грудня 2006 р. Донецьк, 2006. С. 94–95. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз літератури, участь у формулюванні задач дослідження, отримання та обробка калориметричних даних, узагальнення отриманих результатів, участь у підготуванні публікації, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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**) (Заочна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, отримання та обробка даних, участь у підготовці публікації).

28. **Берест В.П.**, Пащенко В.В. Адаптация математической модели осмотического поведения одиночной эпителиальной клетки для анализа структурно-функциональных превращений тромбоцитов при агрегации. *Матеріали ХІ конференції по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці*, м. Київ, 4–6 листопада 2010 р. Київ, 2010. С. 91. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, адаптація

кінетичної моделі, узагальнення отриманих результатів, підготовка публікації).

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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, участь у модифікації математичної моделі, узагальнення отриманих результатів, підготовка публікації).

30. Берест В.П., Лонгус К.С. Моделирование взаимодействия грамицидина S с липидным бисаром методом молекулярной динамики. *Материалы VI з'їзду Українського біофізичного товариства*. Луцьк : СНУ імені Лесі Українки, 2015. С. 98. (Заочна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, участь у проведенні моделювання, підготовка публікації).

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). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, підбір та аналіз літератури, узагальнення отриманих результатів, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: робота з літературними джерелами, участь у аналізі результатів та підготовці публікації)



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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, участь в отриманні та обробці даних імпедансної спектроскопії, аналіз результатів та підготовка публікації).
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**). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, аналіз літератури, участь у розробці устаткування мікрофлюїдики, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).
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**). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, узагальнення отриманих результатів, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).
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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, узагальнення отриманих результатів, написання тез).
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**). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, участь у аналізі результатів та підготовка публікації).

38. **Berest V.**, Budianska L., Vashchenko O., Kutsevol N., Harahuts Y., 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. (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, узагальнення отриманих результатів, участь у підготовці публікації).

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. (Он-лайн участь. Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, участь у аналізі результатів та підготовці публікації).

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**). (Он-лайн участь. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, участь в отримання даних поточної цитометрії, аналіз результатів та підготовка публікації).

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. (**SCOPUS**). (Очна форма участі. Особистий внесок здобувача: постановка задачі, обробка, аналіз та інтерпретація результатів, написання тез)