

УДК 638.178.8:612.118.221.3:616.153.96

## ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА МЕЛИТТИН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛИЗИС ЭРИТРОЦИТОВ

*Ширяев Н. В., Ширяев В. В., Ефименко А. М., Лузин А. В., Ажицкий Г. Ю.*

Появление мелиттина (основного пептида из яда пчелы) в кровяном русле человека сопряжено с двумя принципиальными группами событий: с одной стороны, мелиттин атакует определенные структуры организма (в том числе, клеточные мембраны), с другой стороны, некоторые молекулы человеческого организма могут интенсивно связывать мелиттин и блокировать тем самым его токсическое действие. Токсическому действию мелиттина посвящено огромное количество работ, в то время как защитные системы организма, способные предотвращать токсическое действие мелиттина, изучены слабо.

Ранее показано, что мелиттин-индуцированный лизис форменных элементов крови ингибируется сывороткой крови [3, 9] и отдельно взятым сывороточным альбумином [9]. Оказалось также, что сывороточный альбумин образует в слабощелочных условиях обратимый преципитирующий комплекс с мелиттином [2]. Поэтому роль сывороточного альбумина как естественного антимелиттинового агента в организме человека не подлежит сомнению.

Однако наряду с продолжением изучения антимелиттиновых свойств сывороточного альбумина, нас заинтересовало влияние на токсическую функцию мелиттина IgG и C1q из сыворотки крови человека. Выбор данных белков не случаен, так как наличие взаимодействия IgG с мелиттином показано ранее [5], а гидрофильная головка мелиттина содержит последовательность, которая, по нашему мнению, может успешно мимикрировать под сайт связывания с C1q на молекуле IgG человека [12]. Поэтому мы предположили возможность специфического взаимодействия между мелиттином и головками C1q человека. В дальнейшем также были получены данные, свидетельствующие о связывании мелиттина с молекулами C1q в иммуноферментном анализе [8].

В силу вышеизложенного, в наших исследованиях предпринята попытка изучить влияние IgG и C1q на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов, а также расширить представления о роли сывороточного альбумина как естественного антимелиттинового агента в кровяном русле человека.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты с эритроцитами проводились в изотоническом веронал-NaOH буферном растворе с  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (VBS<sup>2+</sup>): 2 литра раствора содержали 1,66 г веронала, 17,55 г NaCl, 203 мг  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 33 мг  $\text{CaCl}_2$  и дотитровывались NaOH до pH=7,4.

Эритроциты человека получали из свежезятой венозной крови здоровых доноров путем центрифугирования при 1500 g в течение 15 минут. Осадок эритроцитов освобождался от прочих клеточных элементов крови, после чего отмывался не менее 4 раз, каждый раз не менее, чем в четырех объемах VBS<sup>2+</sup> (от объема полученного осадка эритроцитов). Подсчет клеток проводился с помощью микроскопа АУ-12 ЛОМО в камере Фукса-Розенталя. Клетки хранились в VBS<sup>2+</sup> при +4°C. Степень гемолиза эритроцитов под влиянием мелиттина определялась путем центрифугирования пробы при 1500 g в течение 15 минут и последующего измерения экстинкции супернатанта в 1 см кювете на фотометре фотоэлектрическом КФК-3 при длине волны 412 нм (E<sub>412</sub>). Рабочее разведение эритроцитов подбиралось таким образом, чтобы при полном лизисе E<sub>412</sub> супернатанта равнялась 1,0 или была немного выше. В среднем при соблюдении данного условия рабочее разведение содержало 5,4×10<sup>6</sup> эритроцитов в 1 мл суспензии.

Очищенный препарат мелиттина был выделен из пчелиного яда методом ионообменной хроматографии с последующей рехроматографией на обратно-фазовом сорбенте и не обнаруживал остаточной фосфолипазной активности [1].

Для экспериментов использовался бычий сывороточный альбумин (BSA) фирмы "Sigma", США, препарат C1q человека, любезно предоставленный А. М. Ищенко (НИИ особо чистых биопрепаратов Главмикробиопрома РФ, Санкт-Петербург), и поликлональный IgG человека, полученный в нашей лаборатории. Поликлональный IgG человека выделялся из смеси сывороток венозной крови 50-ти здоровых доноров путем осаждения в 17,5%-ном растворе сернокислого аммония с последующей ионообменной хроматографией на колонке с ДЭАЭ-трисакрилом М (LKB, Швеция) [6, 7] и электрофоретической оценкой чистоты выделения. Для экспериментов по лизису эритроцитов использовалась только аутологичная сыворотка крови человека (СКЧ).

Во всех опытах по лизису эритроцитов порция эритроцитов добавлялась к разведенному до рабочей концентрации мелиттину. Для получения устойчивых результатов образовавшуюся смесь инкубировали в воздушном термостате в течение часа при +37°C. В контроле на самопроизвольный лизис в отсутствие мелиттина E<sub>412</sub> супернатанта не должна была превышать 0,1, в том числе в опытах на "проинкубированных" эритроцитах, которые перед использованием в эксперименте хранились в VBS<sup>2+</sup> при +4°C 10-11 дней.

При использовании потенциальных ингибиторов (СКЧ, BSA, IgG или C1q) они могли добавляться к рабочему разведению мелиттина до или после внесения порции эритроцитов. В случае добавления потенциального ингибитора до внесения порции эритроцитов смесь мелиттина с потенциальным ингибитором инкубировали в воздушном термостате в течение часа при +37°C. В случае добавления потенциального ингибитора после эритроцитов с момента внесения эритроцитов выжидали 15 минут, после чего вносили потенциальный ингибитор. Перед каждой инкубацией все смеси аккуратно и тщательно перемешивали.

В наших экспериментах использовались концентрации мелиттина от 0,2 мкг/мл до 1,4 мкг/мл. В описанных условиях (VBS<sup>2+</sup>, инкубация 1 час при +37°C)

концентрация мелиттина 0,2 мкг/мл никогда не оказывалась литической, а концентрации 1,0-1,4 мкг/мл всегда были литическими. В присутствии минимальных литических концентраций мелиттина ожидаемые эффекты потенциальных ингибиторов должны быть наиболее выраженными.

При выполнении экспериментов использовались отечественные реактивы марки "хч".

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты по изучению эффекта сыворотки крови, разведенной в 30 раз, на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов показали (рис. 1), что прединкубация мелиттина с сывороткой полностью ингибировала лизис при последующем добавлении эритроцитов. Более того, даже добавление сыворотки через 15 минут после смешивания мелиттина и эритроцитов обладало небольшим ингибирующим действием. Поэтому в дальнейшем была предпринята попытка приурочить данный ингибирующий эффект к действию определенных белков сыворотки.

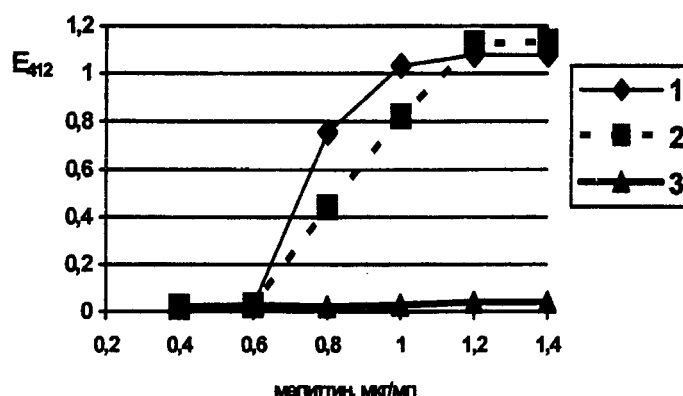


Рис. 1. Ингибирование мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов в присутствии аутологичной сыворотки крови (в разведении 1:30): по оси X – концентрация мелиттина, по оси Y – экстинкция супернатанта результатов инкубации при длине волны 412 нм,

- 1) положительный контроль мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов в отсутствие сыворотки крови,
- 2) сыворотка крови добавлена через 15 минут после смешивания эритроцитов и мелиттина,
- 3) сыворотка крови добавлена к мелиттину за 1 час до внесения эритроцитов.

Для обнаружения ингибирующего эффекта сывороточных белков на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов IgG и BSA взяты в двукратном молярном избытке по сравнению с тетрамерным мелиттином, а C1q – в двукратном молярном избытке головок C1q. Таблица 1 показывает, что BSA обладает выраженным ингибирующим эффектом (достоверность различия  $P < 0,001$ ), в то время как для IgG и C1q ингибирующий эффект незначителен. Эксперименты, проведенные для СКЧ

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ  
НА МЕЛИТТИН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛИЗИС ЭРИТРОЦИТОВ**

(рис. 1), были повторены для BSA в концентрации 100 мкг/мл (рис. 2). Результат в целом позволяет приурочить ингибирующий эффект сыворотки к действию BSA, способного прочно связывать мелиттин [2]. Небольшое ингибирующее действие BSA, добавленного после смешивания мелиттина и эритроцитов, можно объяснить одной из двух возможных причин: 1) BSA извлекает дополнительные количества мелиттина из клеточных мембран в буферный раствор, 2) BSA непосредственно ингибирует литическую активность мелиттина, встроенного в мембрану эритроцита.

**Таблица 1. Влияние белков сыворотки крови на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов**

Инкубационная смесь для эритроцитов в VBS <sup>2+</sup>	Экстинкция супернатанта E <sub>412</sub>
(контроль – max) Мелиттин 1 мкг/мл	1,229±0,006
Мелиттин 1 мкг/мл C1q 10 мкг/мл	1,169±0,005
Мелиттин 1 мкг/мл IgG 25 мкг/мл	1,057±0,020
Мелиттин 1 мкг/мл BSA 12 мкг/мл	0,305±0,036
(контроль – min) чистый VBS <sup>2+</sup>	0,049±0,001

Аналогичный эксперимент для поликлонального IgG человека (Рис. 3), добавленного в концентрации 100 мкг/мл к мелиттину до внесения эритроцитов, показал практически полное отсутствие ингибирующего эффекта на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов. Таким образом, можно заключить, что IgG образует сравнительно непрочный комплекс с мелиттином и полностью проигрывает конкуренцию за мелиттин мембранам эритроцитов.

Особый интерес представляют опыты с “проинкубированными” эритроцитами, которые до использования в эксперименте хранились в VBS<sup>2+</sup> при +4°C 10-11 дней, но не демонстрировали после хранения значительного спонтанного лизиса.

Добавление BSA через 15 минут после смешивания мелиттина и эритроцитов приводило в данном случае к неоднозначным последствиям при литических и при сублитических концентрациях мелиттина (рис. 4). Ингибирующий эффект BSA при действии литических концентраций мелиттина сохранялся, однако для “проинкубированных” эритроцитов наблюдался также выраженный активирующий эффект на утечку гемоглобина из эритроцитов при сублитических концентрациях мелиттина. Данный результат позволяет заключить, что существует по меньшей мере два принципиально разных механизма действия мелиттина на эритроцитарную мембрану, на которые BSA влияет противоположным образом.

Активация BSA мелиттин-индуцированной утечки гемоглобина, похоже, наблюдается и для свежеполученных эритроцитов, однако в данном случае она

малозаметна из-за низкого уровня утечки гемоглобина в контрольном эксперименте при действии сублитических концентраций мелиттина без добавления ингибиторов (рис. 2). Усиление мелиттин-индуцированной утечки гемоглобина из “проинкубированных” эритроцитов при действии сублитических концентраций мелиттина скорее всего объясняется нарушением организации интегральных белков мембран, облегченная агрегация которых может способствовать формированию пор для утечки гемоглобина.

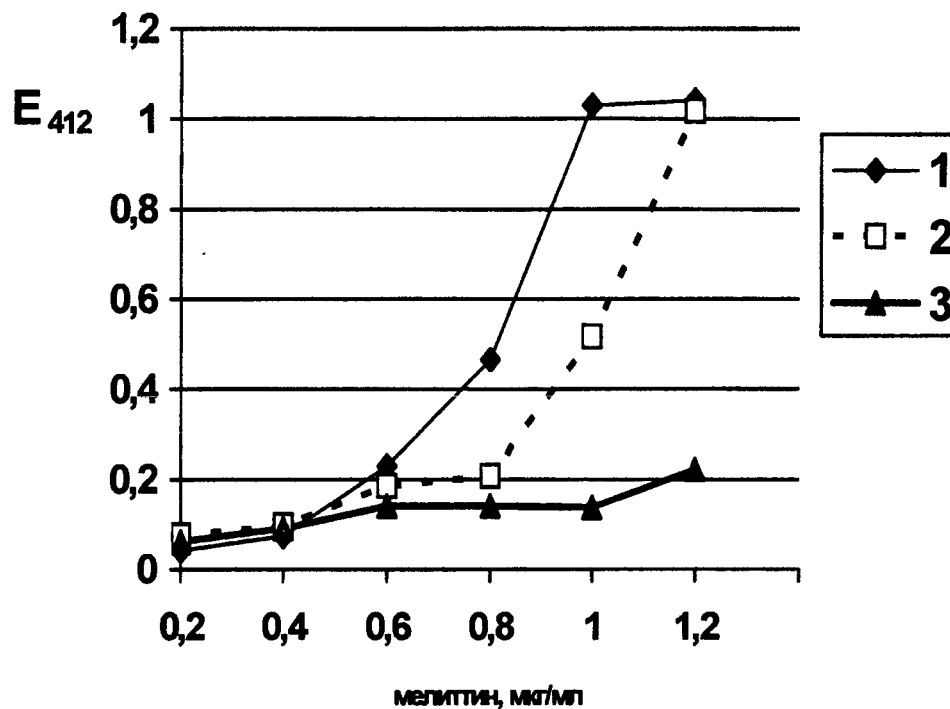
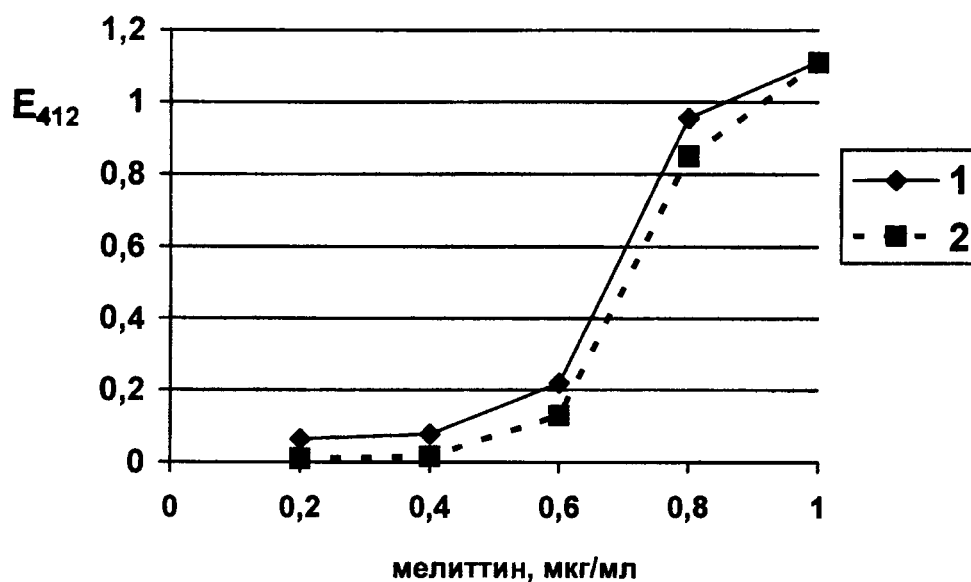


Рис. 2. Ингибирование мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов в присутствии бычьего сывороточного альбумина (в концентрации 100 мкг/мл): по оси X – концентрация мелиттина, по оси Y – экстинкция супернатанта результатов инкубации при длине волны 412 нм, 1) положительный контроль мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов в отсутствие бычьего сывороточного альбумина, 2) бычий сывороточный альбумин добавлен через 15 минут после смешивания эритроцитов и мелиттина, 3) бычий сывороточный альбумин добавлен к мелиттину за 1 час до внесения эритроцитов.

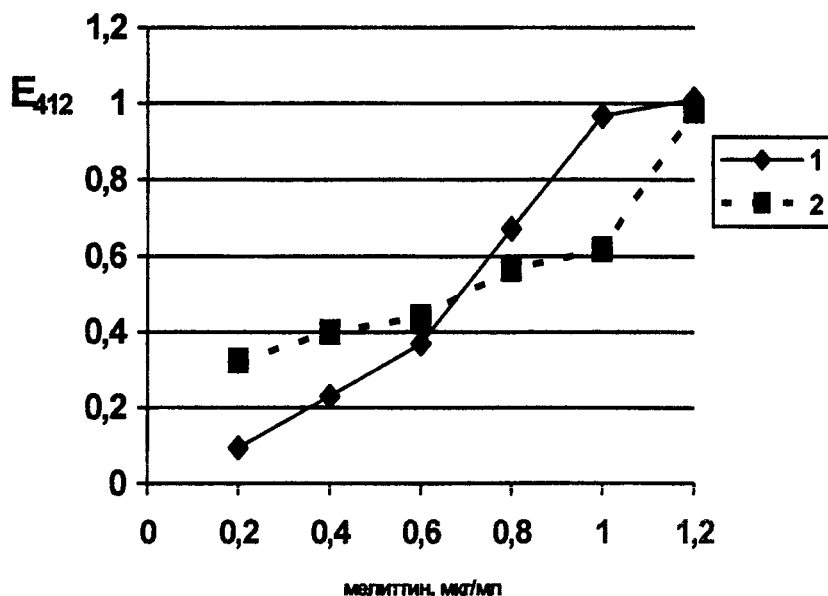
**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ  
НА МЕЛИТТИН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЛИЗИС ЭРИТРОЦИТОВ**



**Рис. 3.** Влияние поликлональных IgG человека (в концентрации 100 мкг/мл) на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов: по оси X – концентрация мелиттина, по оси Y – экстинкция супернатанта результатов инкубации при длине волны 412 нм, 1) положительный контроль мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов в отсутствие поликлональных IgG человека, 2) поликлональный IgG человека добавлен к мелиттину за 1 час до внесения эритроцитов.

В последнее время в литературе все чаще встречаются попытки объяснить мелиттин-индуцированный гемолиз пептид-белковыми взаимодействиями мелиттина в ущерб пептид-липидной версии гемолиза [10, 14]. Данный подход, однако, не может быть определяющим, так как в противном случае очевидная приспособленность молекулы мелиттина к лизису чисто липидных мембран [4] оказывается бессмысленной с эволюционной точки зрения. Исходя из вышеизложенного, мы связываем быстро нарастающий мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов именно с мелиттин-липидными взаимодействиями, хотя и не исключаем значительного влияния мелиттин-белковых взаимодействий на данный процесс. Быстрый переход от почти полного отсутствия лизиса к почти полному лизису эритроцитов, происходивший в наших экспериментах при повышении концентрации мелиттина от 0,6 мкг/мл до 1,0 мкг/мл, может быть объяснен в таком случае существованием некоторой пороговой концентрации мелиттина в липидной фазе эритроцитарной мембраны, при превышении которой термодинамически

выгодным становится образование олигомерных форм мелиттина, вызывающих лизис липидных мембран [15]. В результате, по мере быстрого накопления олигомерных форм мелиттина в плоскости липидного слоя мембран, лизис эритроцитов при незначительном повышении концентрации мелиттина драматически возрастает.



**Рис. 4.** Влияние бычьего сывороточного альбумина (в концентрации 100 мкг/ мл) на мелиттин-индуцированный лизис “проинкубированных” эритроцитов: по оси X – концентрация мелиттина, по оси Y – экстинкция супернатанта результатов инкубации при длине волны 412 нм,  
 1) положительный контроль мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов в отсутствие бычьего сывороточного альбумина,  
 2) бычий сывороточный альбумин добавлен через 15 минут после смешивания эритроцитов и мелиттина.

С другой стороны, утечка гемоглобина из эритроцитов, особенно “проинкубированных”, при действии сублитических концентраций мелиттина связана, по всей видимости, со способностью мелиттина агрегировать интегральные белки мембран эритроцитов [11, 16]. Мы предполагаем, что агрегаты интегральных белков в плоскости липидной мембраны могут включать эритроцитарный гемоглобин и способствовать его выходу за пределы эритроцитов. Ведущую роль мелиттин-белковых взаимодействий в данном процессе подтверждает активация утечки гемоглобина сывороточным альбумином – белковым фактором, который хорошо взаимодействует с мелиттином [2] и может легко встраиваться в эритроцитарную мембрану [13].

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что противопоставление пептид-липидных и пептид-белковых механизмов литического действия мелиттина на эритроцитарную мембрану является искусственным и методически неверным подходом. Только допущение одновременного существования различных механизмов повреждающего действия мелиттина на эритроциты позволит создать синтетическую модель мелиттин-индуцированного лизиса эритроцитов, не противоречащую основной массе накопленного экспериментального материала.

### **ВЫВОДЫ**

1. Ингибирующий эффект сыворотки крови на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов обусловлен действием сывороточного альбумина, способного при физиологических условиях прочно связывать мелиттин. IgG и C1q хотя и могут по некоторым данным взаимодействовать с мелиттином, однако проигрывают конкуренцию за мелиттин мембранам эритроцитов и практически не ингибируют мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов.

2. В опытах на эритроцитах, проинкубированных перед использованием в эксперименте при +4°C 10-11 дней, наряду с ингибирующим действием на мелиттин-индуцированный лизис эритроцитов, сывороточный альбумин обладает также активирующим действием на утечку гемоглобина из эритроцитов при сублитических концентрациях мелиттина. Это свидетельствует о наличии, как минимум, двух принципиально различных механизмов повреждающего действия мелиттина на клеточную мембрану.

### **Список литературы**

1. Ажицкий Г. Ю., Ажицкий Д. Г. Разработка высокоэффективного метода разделения компонентов пчелиного яда // Укр. биохим. журн. – 1993. – Т. 65, № 4. – С. 7-11.
2. Ажицкий Д. Г., Ажицкий Г. Ю., Борисенко С. Н. Взаимодействие мелиттина пчелиного яда с альбумином человека // Укр. биохим. журн. – 1995. – Т. 67, № 4. – С. 64-67.
3. Гушин И. С., Читаева В. Г., Порошина Ю. А., Щербенко Н. Б. Диагностическое значение использования цельного яда пчел и его компонентов в кожных пробах и в реакции высвобождения гистамина из базофилов больных аллергией к ужалению пчелой // Иммунология. – 1990. – № 3. – С. 42-45.
4. Демченко А. П., Костржевская Е. Г. Мелиттин: структура, свойства, взаимодействие с мембраной // Укр. биохим. журн. – 1986. – Т. 58, № 5. – С. 92-103.
5. Ефетов К. А., Троицкий Г. В. Конформационный переход в иммуноглобулине при взаимодействии с амфифильными соединениями // Докл. АН Украины. Математика, естественные, технические науки. – 1993. – № 1. – С. 89-93.
6. Ефетов К. А., Ширяев Н. В. Методика очистки моноклональных иммуноглобулинов на ДЭАЭ-Трисакриле М // Междунар. науч. конф., посвященная 150-летию со дня рождения И. И. Мечникова “Идеи И. И. Мечникова и развитие современного естествознания” (Харьков, ноябрь, 1995 г.): Тез. докл. – Харьков, 1995. – С. 110-111.
7. Ефетов К. А., Ширяев Н. В. Очистка миеломных парапротеинов методом ионообменной хроматографии // II съезд онкологов стран СНГ “Онкология 2000” (Киев, май, 2000 г.): Тез. докл. – Экспериментальная онкология. – 2000. – Vol. 22, Suppl. – № 227.
8. Ефетов К. А., Ширяев Н. В. Усиление взаимодействия IgG с C1q в присутствии мелиттина как возможная причина анафилаксии при действии пчелиного яда // Укр. биохим. журн. – 2001. – Т. 73, № 5. – С. 49-54.



9. Руденко С. В., Нипот Е. Е. Модуляция мелиттин-индуцированного гемолиза эритроцитов // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 12. – С. 2116-2124.
10. Руденко С. В., Нипот Е. Е., Павлюк О. М. Влияние ионов Zn на гемолиз эритроцитов, индуцированный мелиттином // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 5. – С. 723-733.
11. Clague M. J., Cherry R. J. A comparative study of band 3 aggregation in erythrocyte membranes by melittin and other cationic agents // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – V. 980, № 1. – P. 93-99.
12. Duncan A. R., Winter G. The binding site for C1q on IgG // Nature. – 1988. – V. 332, № 6166. – P. 738-740.
13. Houle J. J., Hoffmann E. M. Blocking antibodies specific for human albumin interfere with the hemolytic activity of the membrane attack complex of complement // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – V. 200, № 1. – P. 135-141.
14. Portlock S. H., Clague M. J., Cherry R. J. Leakage of internal markers from erythrocytes and lipid vesicles induced by melittin, gramicidin S and alamethicin: a comparative study // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – V. 1030, № 1. – P. 1-10.
15. Tarasenko A., Petrina I., Kostrzhevskaja E. Investigation of the aggregation state of melittin bound to phospholipid bilayer // W. Mejbbaum-katzenellenbogen's Seminars in Molecular Biology: Abstr. – Wroclaw (Poland). – 1996. – P. 20.
16. Turrini F., Arese P., Yuan J., Low Ph. S. Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, № 35. – P. 23611-23617.

*Поступила в редакцию 27.10.2003 г.*