

АНАЛИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ГЕМОЛИЗА, ВЫЗЫВАЕМОГО ПОЛИЕНОВЫМИ АНТИБИОТИКАМИ

Султанова Г.Г.

Институт ботаники НАН Азербайджана

Падамдартское ш., 40, г. Баку, AZ1004, Азербайджан; e-mail: sultanqul@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2020

Аннотация: Применение ПА в биомедицинской практике в настоящее время вызывают огромный интерес ученых различных областей знаний, в силу эффективности их действия и большого сродства к биологически клеткам. Нами впервые целенаправленно изучены механизмы действия ряда ПА с известной структурой молекулы на искусственные и биологические мембраны. Впервые проведен анализ изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов, модифицированных ПА антибиотиками, применяемыми для лечения инфекционных и грибковых заболеваний (амфотерицин В и его производные, нистатин, леворин и его производные, этрускомицин, микогептин, филипин). Выявлен дозозависимый эффект взаимодействия антибиотиков с мембранами эритроцитов, определяемый спектрофотометрически по времени взаимодействия с модификатором.

Ключевые слова: полиеновые антибиотики, гемолиз, резистентность, эритроциты

Изучение резистентности клеток организма, в частности эритроцитов, а также БЛМ к действию антибиотиков проанализировано в работах Касумова Х., Султановой Г.Г. с соавт. [1]. В настоящее время активно изучаются механизмы взаимодействия клеток с антибиотиками различных классов, в силу выявления как лечебных, так и негативных эффектов их действия [3,5]. Показано влияние некоторых антибиотиков на физико-химические свойства эритроцитов и тромбоцитов [5], активность макрофагов. Эффект действия препаратов зависит от его концентрации [1,2]. Показано, что оптимальный терапевтический эффект наблюдается при пороговых концентрациях препарата в крови пациента, когда наблюдается высокая вероятность получения положительных и низкая вероятность появления нежелательных побочных и токсических эффектов. Была поставлена задача изучения изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов под действием ПА и выявления наиболее оптимальных концентраций препаратов применительно к медико-биологическим исследованиям, корреляции действия ПА на биологические и искусственные мембраны (БЛМ), механизмов разнонаправленного действия ряда ПА на клеточные мембраны. Выявлено, что исследуемые ПА антибиотики вызывают структурные изменения мембран эритроцитов, связанные временем взаимодействия с антибиотиками. По гемолитической активности компоненты филипина располагаются в ряд в порядке уменьшения их эффективности: филипин II > филипин III ≥ филипин I > филипин IV, что соответствует ряду их биологической активности. Отсюда можно сделать вывод, что филипин является потенциальным гемолитиком. При анализе филипин индуцированного гемолиза эритроцитов человека и свиньи особых различий не обнаружено [1,3]. Надо отметить, что степень гемолиза эритроцитов под действием амфотерицина В и нистатина находится в сильной зависимости от природы эритроцитарной мембраны. Для сравнения относительной эффективности изученных соединений были исследованы равноэффективные концентрации гемолитиков, вызывающих 50% лизис эритроцитов.

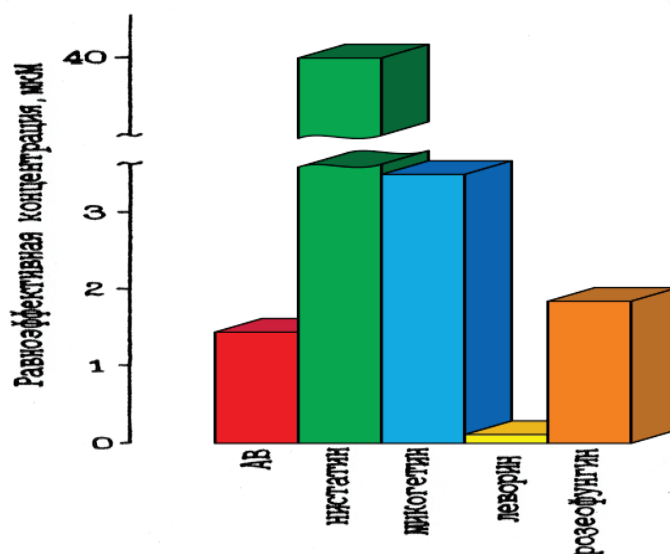


Рисунок 1. Сравнение гемолитической активности равно эффективных концентраций некоторых ПА

Как видно из рисунка 1, наиболее эффективным гемолитиком является леворин, так как при инкубации с эритроцитами лизис наблюдается при наименьшей концентрации препарата. По-видимому, в области низких концентраций эти антибиотики формируют в мембранах водные поры размера одинакового с амфотерициновыми каналами. Можно сказать, что для изученных ПА существуют определенные пороговые концентрации, выше которых наблюдаются резкое увеличение размеров пор и разрыв мембраны, то есть превалируют детергентные свойства МАС. Вызывает интерес изучение гемолитической активности некоторых ПА, таких как нистатин, микогептин, леворин и филиппин близких по химическому строению к АмФ. Филиппин, как нейтральный полиен, отличается от других ПА. Исследована способность некоторых антибиотиков вызывать лизис эритроцитов человека. При сравнении литического действия ПА была выявлена различная степень их мембранотропной активности. Из рис. 1. видно, что наиболее гемолитически активным среди препаратов оказался леворин. В основе различий гемолитической активности ПА могут лежать свойства формируемых ими каналов, способность к растворимости, возможность связывания с поверхностью мембран и т.д. Одними из важных характеристик взаимодействия ПА с мембраной является размер образуемой ими поры, то есть радиус канала, катионно-анионная избирательность. Было показано, что амфотерицин и его алкильные производные формируют в липидных мембранах анион-селективные ионные каналы [1,2]. Анализ литературных данных позволяет предположить, что биологическая активность ПА зависит от межмолекулярных взаимодействий антибиотика и фосфолипидов с образованием водородной связи между ними. В некоторых случаях такие комплексы образуются на поверхности мембраны, даже в отсутствие стерина [5]. Отмечено, что несмотря на высокую активность ПА по отношению к патогенным грибковым клеткам, они характеризуются определенной токсичностью к человеческому организму, определяемому изменением гемолитической активности в присутствии антибиотиков. Основную роль в этих процессах играет взаимодействие полиенов с липидным компонентом мембран. Высокие концентрации ПА приводят к разрушению мембран, а низкие концентрации приводят к структурным изменениям мембран. Низкая растворимость АмФ в воде снижает его терапевтический эффект. Некоторыми авторами для лечения гнойных инфекций рекомендовано производное амфотерицина В – MS-8209 ввиду меньшей токсичности. В то же время, несмотря на создание новых форм амфотерицина В, по эффективности действия на системные грибковые инфекции, они не сравнимы с АВ. Было показано, что полиены могут тормозить рост злокачественных новообразований. Эффективность лизиса клеток (клетки карциномы), по-видимому, связана с взаимодействием амфотерицина В с мембранами, содержащими определенные стерина [2,4]. ПА по сегодняшний день остаются самыми эффективными соединениями в борьбе с грибковыми инфекциями. В настоящее время в связи с пандемией распространения Covid-19 затрагивающей население многих стран и приведшим на сегодняшний день к большим человеческим потерям необходимо, помимо лечения и вакцинации найти возможности более ранней диагностики заболевания. Известно, что динамика изменения геометрических параметров и появления регулярных структур эритроцитов при различных воздействиях позволяет говорить о возможности косвенного измерения механических параметров клеток – деформируемости. Мерой деформируемости эритроцитов может служить их резистентность (степень устойчивости) к различного вида воздействиям как физической, так и химической природы и, в частности, к воздействию силы осмотического давления, возникающей при помещении эритроцитов в гипосмотическую среду. В связи с этим исследование различных характеристик эритроцитов, в частности, их размеров, формы и показателя преломления, при различных системных, инфекционных, гематологических и онкологических заболеваниях представляет определенный теоретический и, несомненно, практический интерес. Для оценки деформируемости эритроцитов наиболее часто используют спектрофотометрические методы, процессы эндогенного и экзогенного гемолиза [1,4]. Спектрофотометрия, методы физического и химического воздействия на клетки крови, дифрактометрия как оптические методы реологического контроля эритроцитов обладают целым спектром достоинств. Работы проводились по дифрактометрии мазков крови и дифрактометрии суспензии (гипосмотического набухания эритроцитов) с целью выявления информационных параметров наличия патологии и динамики ее лечения. В биологии и медицине широко применяются когерентно-оптические методы исследования и диагностики биологических объектов микроскопических размеров. Одним из наиболее распространенных объектов исследования являются красные клетки крови. Не ослабевающий интерес исследователей к ним объясняется их высокой чувствительностью к патологическим изменениям в организме человека и животного. Дифрактометрия основана на зависимости параметров дифракционной картины (ДК) от параметров объекта. Особенно возрос интерес к дифрактометрии в последние годы в связи с исследованием деформируемости эритроцитов. В большинстве работ при рассмотрении дифракции эритроцитов предполагается, что он имеет дискоидную форму, и в качестве его модели используют приближение теневого сечения. В патогенезе многих заболеваний, а также состояний и осложнений важное место принадлежит гемореологическим и микроциркуляторным расстройствам. В формировании таких патологических состояний большая роль отводится функциональным свойствам эритроцитов, которые составляют основную массу клеток крови. Существенные нарушения, связанные с изменением реологических показателей эритроцитов, наблюдаются при множественной миеломе (ММ), острых и хронических лейкозах, анемиях, раке легкого, сердечно-сосудистых, инфекционных заболеваниях и ВИЧ инфекции [2]. В то же время надо сказать что в природе существует единственный класс соединений макролактонной структуры способный наиболее эффективно воздействовать на целый ряд заболеваний инфекционного, вирусного и онкологического характера. Нами предложен скрининг метод УЗ диагностики состояния мембран эритроцитов, который нашел отражение при различных стрессах и заболеваниях. Показано,

что с помощью кинетического анализа гемолитического процесса в поле действия УЗ волн также возможно выявить нарушение реологических показателей эритроцитов в кровотоке зараженных больных с Covid-19[1].

В течение многих лет ведется поиск новых антибиотиков и на их основе проводится химическая модификация структуры молекул с целью получения антибиотиков, обладающих целенаправленным действием и имеющих низкую степень токсичности. В связи с этим необходим поиск и синтез новых производных ПА с улучшенной биологической активностью и с менее низкой токсичностью. Так, например, некоторые ПА, в том числе и амфотерицин В, обладают нефротоксичностью и гемолитической активностью. Отмывка ПА из мышечных клеток идет с большей скоростью, чем из липидных мембран [2]. Степень повреждения клеток зависит от концентрации антибиотика, увеличение которой приводит к большой степени повреждения мембран. Очевидно, биологический эффект антибиотика связан активностью изменения проницаемости мембраны. Проводимость, индуцированная в бислойных липидных мембранах (БЛМ) связана с временем нахождения препарата в мембране. В условиях организма (*in vivo*), который является проточной системой, происходит постепенная отмывка клеток от антибиотика. Процесс выведения антибиотика из мембран резко усиливается при введении ПА в комплексе с диметилсульфоксидом (ДМСО). Исследована кинетика индуцированного филипином, амфотерицином В и нистатином гемолиза эритроцитов человека. Филипин-индуцированный гемолиз характеризуется как детергентный. Это процесс "все или ничего", частично ингибируемый Ca^{2+} или Ba^{2+} , но не Mg^{2+} , Na^{+} или SO_4^{2-} . Гемолитическая активность филипина объясняется образованием агрегатов в мембране эритроцита в виде крупных перфораций, проницаемых для веществ с низкой молекулярной массой, а также для макромолекул, включая гемоглобин. В изотоническом растворе КСl амфотерицин В и нистатин в низких концентрациях образуют меньшие агрегаты в мембранах. В результате проницаемость мембран для КСl увеличивается и происходит гемолиз. Однако кинетика гемолиза, вызванного двумя полиенами, является сложной. При этом наблюдается изменение проницаемости, а также повреждения мембран. Предполагается, что амфотерицин В и нистатин могут одновременно образовывать ряд транспортных систем, различающихся по своей молекулярной организации и гемолитической активности. Их участие в проницаемости мембран эритроцитов может быть изменено небольшими изменениями в структурной организации мембран и химическом составе инкубационной среды. В изотонических растворах хлоридов двухвалентных катионов и при более высокой концентрации антибиотиков появляются дополнительные агрегаты, позволяющие проникать двухвалентным катионам.

Некоторые из изученных антибиотиков вызывают детергентный эффект действия на мембрану эритроцита. Как видно из рисунка 2, при низких концентрациях препарата 10^{-6} М наблюдается эффект стабилизации мембран некоторыми из ПА.

Предполагается, что изучаемые препараты, проникая в эритроцитарные клетки, химически модифицируют молекулы гемоглобина, приводя к денатурации его макромолекул.

Из рисунка 2 видно, что ПА по-разному влияют на гемолитическую стойкость эритроцитов в поле действия УЗ: одни активируют, другие замедляют, а третьи стабилизируют механическое разрушение эритроцитов. Такого рода изменения механической прочности эритроцитов под влиянием полиенов, по-видимому, могут быть связаны с нарушением микровязкости белково-липидной системы. Из экспериментальных данных следует, что некоторые препараты в малых концентрациях стабилизируют структуру мембран, а при высоких концентрациях способствует ее разрушению, по-видимому адсорбируясь на мембране препараты предохраняют ее от разрушения, т.е. препятствуют окислительным свободно-радикальным превращениям липидных и белковых компонентов мембраны [6]. По видимому ПА, внедряясь в липопротеидную область мембраны, способны взаимодействовать с гидрофобными участками мембран эритроцитов или могут сами формировать в них структурные каналы, изменяя при этом ионную проницаемость мембран [2,5]. Полиен-индуцированный гемолиз эритроцитов, по-видимому, протекает за счет градиента онкотического давления, действующего на

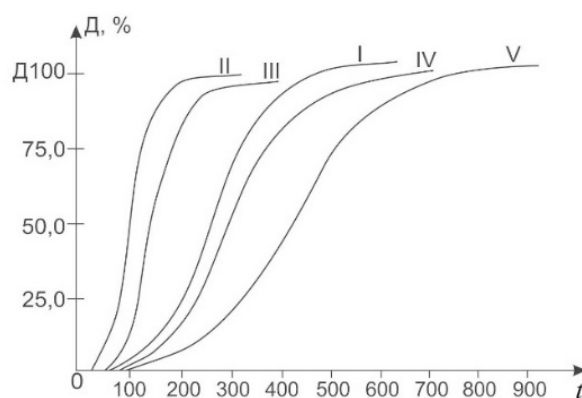


Рисунок 2. Кинетические кривые гемолиза эритроцитов, индуцированных эквимолярными концентрациями изученных антибиотиков. I – контроль, II – амфотерицин В, III – леворин, IV – бутамфоцин, V – изолеворидон. По оси ординат – светопропускание. По оси абсцисс – время гемолиза в сек.

эритроцитарную мембрану. S-образная кривая лизиса эритроцитов, индуцированного ПА, характерна для коллидно-осмотического механизма. Структурно все исследованные ПА состоят из амфифильного макролидного кольца, гидрофобной и гидрофильной частей, состоящих из двойных связей, карбоксильных и карбонильных групп. Изменения в структуре макролидного кольца приводит к изменению селективности поры (амфотерицин В, нистатин, микогептин) и к изменению транспортной функции поры на примере леворина - из анионно селективной она превращается в катион селективную. Изменения общего заряда молекулы полиенов не сказывается на ионной избирательности, однако гемолитическая активность чувствительна к таким изменениям [1,5].

Полученные результаты позволяют спрогнозировать фармакологический эффект препарата, повысить качество проводимой терапии и разработать эффективную схему лечения пациентов с минимальным риском побочных эффектов, проанализировать механизмы повреждения мембран и макромолекул соматических клеток организма при модификации антибиотиками различной природы. Эффект химической модификации компонентов эритроцитарных мембран необходимо учесть при развитии патологических процессов различной этиологии с применением ПА при их терапии и последующем лечении. Различия во взаимодействиях антибиотиков с эритроцитами рекомендуют соблюдения режима дозирования, контроля морфологической картины эритроцитов и, по-видимому, пересмотра назначаемой дозы антибиотика с учетом положительного эффекта. Проведены исследования гемолитических эффектов метамфоцина, этамфоцина, карболеворина, изолеваридона, филипина и т.д. за исключением пропамфоцина, леворидон и леворина которые являются слабыми гемолитиками. Показано, что степень гемолитической активности эритроцитов определяется химической природой модификатора, его концентрацией и временем взаимодействия с клеткой. По-видимому, исследованные антибиотики, проникая в эритроциты, вызывают изменение белок-липидных взаимодействий, а в случае стабилизации мембраны создают защитный барьер, препятствующий нарушению целостности мембран эритроцитов.

Выводы.

Нами установлено, что молекулы исследуемых антибиотиков обладают определенным сродством к эритроцитам донорской крови, оказывая влияние на структурно-функциональное состояние последних. Мембраны эритроцитов и БЛМ проницаемы для данных антибиотиков. Механизмы взаимодействия антибиотиков с клетками про- и эукариот различаются ввиду различия сродства к холестерину и эргостерину. Однако в силу способности антибиотиков воздействовать на белково-липидные компоненты цитоплазматических мембран и возможности представления эритроцита как модельной системы плазматических мембран, возможно провести аналогию с действием ПА на эти клетки. Методами регистрации осмотических, химических и ультразвуковых эритрограмм установлено, что модификация эритроцитарного цитоскелета способствует изменению функционального состояния клетки и деформационной способности эритроцитов в сосудистом русле. Степень изменения гемолитической активности эритроцитов определяется химической природой модификатора и временем его взаимодействия с клеткой. Осмотическая резистентность эритроцитов приводит к структурным повреждениям в белково-липидном слое мембран эритроцитов. Установлено, что амфотерицин В, метамфоцин, этамфоцин и бутамфоцин характеризуются способностью модифицировать мембранный каркас эритроцитов. При этом химическая модификация белков эритроцитарной мембраны приводит к снижению резистентности низкостойких эритроцитов, а накопление структурных повреждений - к уменьшению её проницаемости для полярных веществ и ионов. На основании полученных нами данных можно заключить, что особенности взаимодействия антибиотиков с эритроцитарными клетками позволяют исследовать степень токсичности используемых концентраций антибиотиков, что подтверждается результатами нашего исследования действия на эритроциты исследуемых модификаторов в более низких концентрациях (10^{-6} М) [1,2]. В работе [3,5] методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что ПА вызывают концентрационно-зависимые изменения в популяции эритроцитов, приводя к снижению количества дискоцитов и появлению большего количества необратимо модифицированных форм клеток, а, следовательно, к их ускоренному старению. На примере грамицидина [5] показана динамика изменения поверхностной архитектоники эритроцитов, в ходе которой наблюдается появление клеток с более глубокими морфологическими нарушениями. Аналогичные изменения наблюдались в процессе инкубации суспензии эритроцитов с филипином. Показано, что филипин взаимодействуя с мембраной вызывает повреждения диаметром 25 нм, выявленные методом сканирующей электронной микроскопии [1,6]. По-видимому, изученные антибиотики обладают определенным сродством к молекуле гемоглобина. Проникая в эритроцитарные клетки, они изменяют структурную жесткость последнего, а, значит, и его способность влиять на проницаемость мембран эритроцитов для веществ и их диффузию в цитоплазме. Таким образом можно сделать следующие выводы: изученные антибиотики являются слабыми гемолитическими агентами. Установлено, что изученные антибиотики химически модифицируют белки эритроцитарной мембраны, что приводит к изменению её проницаемости. Пропамфоцин и леворидон в концентрациях ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) вызывают необратимые изменения эритроцитов, вызывая токсический эффект. Степень активности антибиотиков в отношении плазматических мембран эритроцитов определяется их концентрацией и химической природой модификатора [1]. По степени проницаемости липидных мембран ПА можно расположить следующий ряд: филипин > амфотерицин > леворин > нистатин, что согласуется с литературными данными по оценке их биологической активности и результатами собственных исследований [1-3]. Это свидетельствует о существующей корреляции между действием ПА на клеточные и бислоиные липидные мембраны. Полиеновые антибиотики – это

единственная группа противогрибковых антибиотиков, которые непосредственно воздействуют на плазматическую мембрану через специфическое взаимодействие с основным грибковым стероидом-эргостеролом, часто приводящее к проницаемости мембраны. В отличие от других полиеновых антибиотиков, которые формируют поры в мембране, способ действия натамицина остается неясным, но не связан с проницаемостью мембраны. Это связано с эргостерол-специфическим и обратимым ингибированием мембранных транспортных белков. Предполагается, что эргостерол зависимое ингибирование мембранных белков является общим способом действия всех полиеновых антибиотиков

Список литературы / References:

1. Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М. Гемолиз эритроцитов при комбинированном действии ультразвуковых волн и полиеновых антибиотиков. *Антибиотики*, 2008, № 9-10, с. 9-13. [Sultanova G.G., Samedova A.A., Qasimov Kh.M. Hemolysis of red blood cells in the combined action of ultrasound waves and polyene antibiotics. *Antibiotics*, no. 9-10, pp. 9-13. (In Russ.)]
2. Sultanova G.G., Samedova A.A. Modern conceptions about antibiotics Levorin A₂ and its derivatives action in cell and bilayer lipid membranes. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 2016, vol. 5, iss. 4, pp. 2276-2279.
3. Yvonne Maria te Welscher, Martin Richard van Leeuwen, Ben de Kruijff, Jan Dijksterhuis, Eefjan Breukink Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109 (28), pp. 11156-11159.
4. Байбеков И.М., Ибрагимов Ф.А., Байбеков А.И. Влияние лазерного облучения донорской крови на форму эритроцитов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 2011, № 12, с. 702-706. [Baibekov I.M., Ibragimov F.A., Baibekov A.I. The influence of laser irradiation of donor blood on the shape of red blood cells. *Bull. eksperim. biology and medicine*, 2011, no. 12, pp. 702-706. (In Russ.)]
5. Hackl E.V., Gramicidin S effect on human blood platelets depends on the mobility of membrane lipids. *Journal of Peptide Science*, 2006, vol. 12, iss. SI, p. 227.
6. Aminov R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 1, no. 12, pp. 2970-2988.

ANALYSIS OF POSSIBLE MECHANISMS OF HEMOLYSIS CAUSED BY POLYENE ANTIBIOTICS

Sultanova G.G.

Institute of Botany of the national Academy of Sciences of Azerbaijan
Padamdart highway, 40, Baku, AZ1004, Azerbaijan; e-mail: sultanqul@mail.ru

Abstract: The application of PA in biomedical practice is currently of great interest to scientists in various fields of knowledge, due to the effectiveness of their action and their great affinity for biological cells. For the first time, we have purposefully studied the mechanisms of action of a number of PA with a known structure of the molecule on artificial and biological membranes. For the first time the analysis of changes of structurally functional properties of erythrocytes, modified PA antibiotics used to treat infectious diseases and fungal infections (amphotericin b and its derivatives, nystatin, levorin and its derivatives, etruskomicyne and philippines). A dose-dependent effect of the interaction of antibiotics with erythrocyte membranes was detected, determined spectrophotometrically by the time of interaction with the modifier.

Key words: polyene antibiotics, haemolysis, fragility, erythrocytes.