

РЕГУЛЯЦИЯ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦЕКРОПИНА А МЕСТНЫМИ АНЕСТЕТИКАМИ

© С. С. Ефимова,* Р. Я. Медведев, Е. Г. Чулков, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: ssefimova@mail.ru

В работе исследовано влияние местных анестетиков на регуляцию каналаобразующей активности антимикробного пептида цекропина А. Определен средненормированный ток, протекающий через одиночные цекропиновые каналы (i_{sc}), и измерен стационарный трансмембранный ток, индуцированный цекропином А (I_{∞}). Показано, что введение 1 мМ бупивакаина, бензокаина или 0.3 мМ тетракаина в мембраноомывающий раствор приводит к уменьшению i_{sc} и I_{∞} . В то же время добавка в мембраноомывающие растворы 1 мМ лидокаина или прокаина не приводит к существенному изменению i_{sc} и I_{∞} . Сравнение абсолютных величин и знака изменения граничного потенциала отрицательно заряженных мембран и относительных изменений i_{sc} и I_{∞} после введения местных анестетиков показывает, что оба параметра не коррелируют с граничным потенциалом мембраны. Результаты изучения влияния тестируемых местных анестетиков на фазовые превращения мембранных липидов позволяют заключить, что наблюдаемые изменения i_{sc} и I_{∞} обусловлены модуляцией эластических свойств мембраны.

Ключевые слова: липидные мембраны, ионные каналы, цекропин А, местные анестетики.

Принятые сокращения: ДОФС — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин, ДОФЭ — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфотаноламин, ДПФХ — 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, i_{sc} — средненормированный ток, протекающий через одиночные цекропиновые каналы, I_{∞} — стационарный трансмембранный ток, индуцированный цекропином А.

Актуальными задачами современной биологии являются поиск новых антибиотиков и улучшение фармакологических характеристик имеющихся лекарственных препаратов на их основе, а также выяснение молекулярного механизма действия антибиотиков. Важным направлением является исследование природных антимикробных пептидов (как правило, это относительно короткие молекулы с длиной цепи не более 40 аминокислотных остатков), служащих рубежом первичной защиты организма-хозяина от патогенных микроорганизмов и участвующих в системе врожденного иммунитета. Механизм действия антимикробных пептидов связан с наличием в их структуре положительно заряженных аминокислотных остатков, которые позволяют связываться с отрицательно заряженной мембраной бактерий. Универсальность влияния на микроорганизмы, способность быстро поражать клетки-мишени, а также широкий спектр антибактериальных свойств позволяют рассматривать антимикробные пептиды в качестве основы для создания новых лекарств, что особенно важно на фоне глобальной проблемы снижения эффективности обычных антибиотиков. Из большого многообразия антимикробных пептидов особый интерес представляют цекропины, выделенные изначально из гемолимфы насекомых (Hultmark et al., 1980, 1982; Steiner et al., 1981; Qu et al., 1982; Teshima et al., 1986).

Молекулы цекропинов содержат от 31 до 39 L-аминокислотных остатков и состоят из двух доменов, скреп-

ленных глицин- и пролинобогатым «шарниром». В физиологических условиях N-концевой домен обладает амфипатическими свойствами и имеет положительный заряд, а C-концевой участок является более гидрофобным, он несет меньший заряд (Fink et al., 1989a, 1989b). В водном растворе незаряженной мембраны полипептидная цепь не структурирована, а в отрицательно заряженной мембране подвергается α -спирализации (Schlamadinger et al., 2012). Такая организация молекулы способствует проявлению цекропинами широкого спектра противомикробной активности (Fink et al., 1989a, 1989b). Такой спектр включает в себя практически все клинически важные грамотрицательные и некоторые грамположительные бактерии (Fink et al., 1989a, 1989b; Moore et al., 1996). Кроме того, цекропины проявляют противоопухолевое действие (Chen et al., 1997; Shin et al., 1999; Suttman et al., 2008; Cerón et al., 2010), обладают низкой токсичностью по отношению к нормальным эукариотическим клеткам и относительно слабой гемолитической активностью (Wade et al., 1992; Moore et al., 1996). Несмотря на то что вторичная структура и биологическая активность цекропинов охарактеризованы, молекулярные механизмы взаимодействия пептидов с клеточными мембранами до сих пор остаются предметом для дискуссии.

В литературе обсуждаются две возможные модели, объясняющие антимикробное действие цекропинов. Согласно первой, сорбция молекул цекропина на поверхности плазмалеммы приводит к образованию пептидного

«ковра», обладающего мембранолитическими свойствами. Согласно другой модели, цекропины формируют поры в плазматической мембране патогенной клетки, что приводит к нарушению водно-солевого баланса и гибели микроорганизма. Точная архитектура пор неизвестна, приводятся доказательства в пользу формирования как пептид-липидных тороидальных пор, так и аламетицин-подобных каналов, организованных по типу «бочонка» (Sato, Feix, 2006).

Мономеры цекропина сорбируются на мембране, формируя вторичную структуру — α -спираль. Богатый лизином N-конец полипептидной цепочки взаимодействует с поверхностью мембраны, в то время как более гидрофобный алифатический амидированный C-конец погружен в толщу липидного бислоя. В зависимости от числа мономеров в канальном комплексе реализуются различные проводящие состояния канала. В то же время богатая лизином гидрофильная часть полипептидной цепи находится на поверхности мембраны, создавая стерические затруднения для дальнейшего встраивания мономеров цекропина в канал.

Ранее нами было показано, что введение цекропина А или цекропина Б (в диапазоне концентраций 2—5 мкМ) в омывающий раствор с одной стороны отрицательно заряженного липидного бислоя и последующее приложение трансмембранного напряжения способствуют формированию хорошо воспроизводимых ионных каналов, обладающих многоуровневой проводимостью (Efimova et al., 2014). Дальнейшее увеличение концентрации пептида (более 10 мкМ) приводит к дестабилизации бислоя и его разрушению. Полученные результаты позволили предположить, что образование ионпроницаемых пор на первом этапе дезинтеграции бислоя, происходящей в результате формирования на поверхности мембраны сплошного пептидного «ковра» (Shai, 2002; Sato, Feix, 2006).

Показано, что цекропин А не способен формировать α -спираль в мембранах эукариот, в то время как в мембранах бактерий он формирует ионпроводящие поры (Schlamadinger et al., 2012). Это, возможно, связано с зарядом и геометрией липидного бислоя. Положительно заряженный цекропин способен притягиваться к отрицательно заряженной бактериальной мембране, а отрицательная спонтанная кривизна бактериальных фосфоэтанололаминов помогает пептиду встраиваться в мембрану благодаря меньшему латеральному давлению в области гидрофобных головок липидов по сравнению, например, с фосфохолинсодержащими мембранами эукариот. В незаряженных липидах цекропин не приводит к повышенной проницаемости липидного бислоя.

Целью настоящей работы являлся анализ участия мембранных липидов в процессе формирования ионпроницаемых пор цекропинами и разработка модели строения цекропиновых каналов. Ряд биологически активных низкомолекулярных соединений способен при их связывании с липидным бислоем изменять его физико-химические свойства. Среди них особое место занимают местные анестетики.

Местные анестетики — мембраноактивные вещества, специфически блокирующие потенциалзависимые натриевые каналы. При физиологических значениях pH местные анестетики преимущественно находятся в катионной форме, а эффективность их действия зависит от константы распределения между липидной и водной фазами (Strichartz et al., 1990). Например, более гидрофобные тетракаин и бупивакаин обладают большей активностью

и токсичностью по сравнению с менее гидрофобными прокаинами и лидокаином. Дело в том, что связывание анестетика с натриевым каналом обратимое, поэтому требуется определенная концентрация вещества в мембране. По этой причине более гидрофобные анестетики эффективнее действуют на канал. Помимо специфического действия на потенциалзависимые натриевые каналы местные анестетики обладают широким спектром неспецифической мембранной активности. Установлено, например, что местные анестетики способны увеличивать граничный потенциал фосфохолиновых мембран (Efimova et al., 2016), а также изменять профиль латерального давления (Cantor, 1998; Takeda et al., 2009).

Для достижения цели были поставлены следующие основные задачи: определить количественные характеристики изменения физико-химических свойств модельных липидных мембран при адсорбции местных анестетиков и установить механизмы влияния местных анестетиков на порообразующую способность цекропина А.

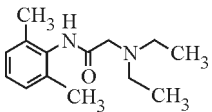
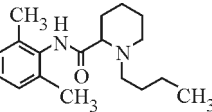
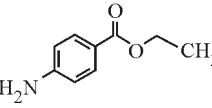
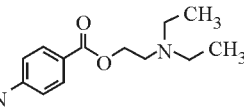
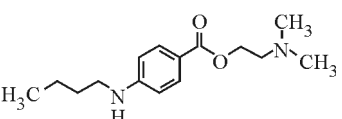
Материал и методика

В работе использовали липиды, 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (ДОФЭ), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) и холестерин (Avanti Polar Lipids, США); цекропин А, онактин, бензокаин, гидрохлориды лидокаина, бупивакаина, прокаина и тетракаина, KCl, KOH, HEPES, пентан, этанол, хлороформ и гексадекан (Sigma, США).

Электрофизиологические измерения по рообразующей активности цекропина А. Формирование мембран проводили по методу Монталла и Мюллера (Montall, Mueller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки — 10 мкм, диаметр отверстия — около 50 мкм. Перед началом процесса формирования бислоев отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали раствором гексадекана. Монослои формировали на границе вода—воздух из раствора липида в пентане (2 мг/мл). Для формирования монослоев использовали липидную смесь ДОФС и ДОФЭ в эквимолярном соотношении (ДОФС/ДОФЭ). Измерение каналообразующей активности антимикробного пептида проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита (0.1 М KCl), pH растворов 7.4 поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES.

Антимикробный пептид цекропин А добавляли из водного раствора в *цис*-отсек экспериментальной камеры до концентраций в диапазоне от 1 до 5 мкМ. В качестве модуляторов мембранной активности цекропинов использовали местные анестетики — лидокаин, бупивакаин, бензокаин, прокаин и тетракаин. Химические структуры модификаторов представлены в таблице. Местные анестетики вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле (бензокаин) или воде (лидокаин, бупивакаин, прокаин и тетракаин) в концентрациях от 0.1 до 1.0 мМ для лидокаина, бупивакаина, бензокаина и прокаина и до 0.3 мМ для тетракаина. В этой концентрации анестетик не нарушал целостности и стабильности липидных бислоев. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре.

Основные характеристики мембранной активности местных анестетиков и регуляция ими поробразующей активности цекропиновых каналов в мембранах из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ

Анестетик	Структура	i_{sc} , пА ^a	I/I_{∞}^0	$N_{op}^{MA}/N_{op}^{контр}$	$\Delta\phi_b$, мВ	ΔT_m , °C ^b	$\Delta T_{1/2}$, °C	ΔH , кДж/моль
Лидокаин, 1 мМ		7.8 ± 1.9	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	34 ± 7	-2.4	-0.6	32
Бупивакаин, 1 мМ		5.9 ± 1.8	0.2 ± 0.1	0.28 ± 0.14	20 ± 8	-4.3	-1.5	70
Бензокаин, 1 мМ		4.3 ± 1.6	0.3 ± 0.1	0.57 ± 0.20	-25 ± 2	-9.6	-1.6	61
Прокаин, 1 мМ		7.8 ± 1.7	1.0 ± 0.1	0.93 ± 0.09	2 ± 2	-2.4	-0.9	69
Тетракаин, 0.3 мМ		3.7 ± 1.1	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.02	55 ± 7	-8.5	-1.6	43

Примечание. i_{sc} — средненормированный ток, протекающий через цекропиновые каналы, при $V = 50$ мВ; $N_{op}^{MA}/N_{op}^{контр}$ — отношение стационарного числа функционирующих в мембране цекропиновых каналов после и до введения анестетика; $\Delta\phi_b$ — изменение граничного потенциала мембран в присутствии анестетика в соответствующей концентрации в околосмембранном растворе; ΔT_m , $\Delta T_{1/2}$, ΔH — изменение соответственно температуры, полуширины пика и энтальпии главного фазового перехода ДПФХ (отношение липид: анестетик 1 : 5). ^a В отсутствие местных анестетиков $i_{sc} = 8.4 \pm 1.4$ пА; ^b для ДПФХ липосом — $\Delta T_m = 41.4$ °C, $\Delta T_{1/2} = 0.5$ °C, $\Delta H = 32$ кДж/моль.

Для подачи напряжения и фиксации сигнала использовали хлор-серебряные электроды (Ag/AgCl), которые соединяли с растворами камеры через агарозные мостики (1.5%-ный агарозный гель, 2 М KCl). Положительным считали трансмембранное напряжение, вызывающее поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instrument, США). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

Для анализа проводимостей цекропиновых каналов использовали ранее разработанный подход (Efimova et al., 2014); рассчитывали средненормированный трансмембранный ток, протекающий через одиночные каналы, i_{sc} :

$$i_{sc} = \sum_k i_k p_k, \quad (1)$$

где i_k — среднее значение тока для k -го пика, p_k — площадь под пиком с k -м уровнем проводимости. Обоснованность определения величины i_{sc} с помощью выражения (1) определяется сходством кинетических характеристик различных подсостояний проводимости каналов.

Все пики на гистограммах оценивали плотностью нормального распределения. В качестве критерия проверки гипотезы о законе нормального распределения использовали критерий χ^2 ($P < 0.05$).

Изучение зависимости пачечной активности цекропина А от концентрации добавленного модификатора ($\delta_{sc}(C_i)$) проводили по относительному значению i_{sc} :

$$\delta_{sc}(C_i) = \frac{i_{sc}(C_i)}{i_{sc}(0)}, \quad (2)$$

где $i_{sc}(0)$ и $i_{sc}(C_i)$ — значения i_{sc} , протекающего через цекропиновые каналы, до и после добавления местных анестетиков соответственно.

Для характеристики изменения каналаобразующей активности антимикробных пептидов использовали отношение стационарных макроскопических трансмембранных токов (I_{∞}/I_{∞}^0), индуцированных открыванием большого числа каналов после (I_{∞}) и до (I_{∞}^0) введения местных анестетиков. Стационарное число функционирующих в мембране каналов (N_{op}) определяли как отношение I_{∞}^0 к i_{sc} (равновесного интегрального трансмембранного тока (I_{∞}^0) к средненормированному току одиночных цекропиновых каналов i_{sc}). Проводили от 3 до 9 независимых экспериментов и вычисляли среднюю величину $N_{op}^{MA}/N_{op}^{контр}$ (отношение числа цекропиновых каналов после (N_{op}^{MA}) и до ($N_{op}^{контр}$)) введения местных анестетиков и ее ошибку.

Измерение изменений граничного потенциала бислоев. Плоские липидные бислои формировали, как описано выше (в 0.1 М растворе KCl и 5 мМ НЕРЕС-КОН, pH 7.4). Для образования монослоев использовали смесь ДОФЭ и ДОФС в эквимолярном соотношении. Ионофор нонактин из спиртового (7 мг/мл) раствора добавляли к водной фазе обеих отделений камеры до конечной концентрации 10^{-7} — 10^{-5} М. Местные анестетики вводили в оба отделения камеры в диапазоне концентраций от 0.1 до 5 мМ в околосмембранных растворах в случае лидокаина, бупивакаина, бензокаина и прокаина и до 0.3 мМ в случае тетракаина.

Проводимость мембраны G определяли как отношение стационарного тока I , протекающего через бислою липидную мембрану, к трансмембранной разности потенциалов V , равной 50 мВ. Изменение ϕ_b ($\Delta\phi_b$) при введении анестетиков определяли с использованием статистики Больцмана:

$$\Delta\phi_b = \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{G_m}{G_m^0} \right), \quad (3)$$

где G_m^0 и G_m — значения стационарной K^+ -проводимости бислоя, обусловленной нонактином, до и после введения анестетика; e — элементарный заряд; k — постоянная Больцмана ($1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К), T — термодинамическая температура ($T = 294$ К) (Andersen et al., 1976). Средние величины изменения граничного потенциала мембран определяли как средние арифметические значения $\Delta\phi_b$ в каждой из экспериментальных систем при измерении от 3 до 5 бислоев.

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия везикул. Гигантские одноламеллярные липосомы изготавливали методом электроформации с помощью «Nanion vesicle prep pro» (Германия) (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 55 °С). Полученную липосомную суспензию доводили до 800 мкл буферным раствором (5 мМ НЕРЕС, pH 7.4). Конечная концентрация липида составляла 3 мМ. В экспериментальные образцы вводили местные анестетики при соотношении липида и анестетика 1 : 5. Растворители в использованной концентрации не оказывали влияния на фазовый переход ДПФХ (Коупова, Caffrey, 1998). Контрольные образцы не модифицировали. Термограммы липосомных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μ DSC7 (Setaram, Франция). Соответствующее количество липосомной суспензии помещали в одну ячейку и нагревали с постоянной скоростью 0.2 К/мин, во вторую ячейку помещали буферный раствор. Воспроизводимость температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения. Пики на термограммах характеризовали температурой максимума (T_m) и шириной на полувысоте ($T_{1/2}$), отвечающей кооперативности фазового перехода (размеру ячейки).

Результаты

На рис. 1 приведен пример записей флуктуаций тока, протекающих через каналы, образованные цекропином А, в отрицательнозаряженных мембранах из эквимолярной смеси ДОФС и ДОФЭ в отсутствие и в присутствии местных анестетиков. Видно, что в контроле регистриру-

ется несколько (I —5) стабильных подуровней проводимости цекропиновых каналов (рис. 1, а). На рис. 1, б, д видно, что добавка 1 мМ лидокаина и прокаина слабо влияет на i_{sc} , в то время как бупивакаин, бензокаин и тетракаин снижают вероятность появления высоких подуровней проводимости (рис. 1, в, з, е), т. е. ступенеобразных флуктуаций тока, соответствующих пятому и более высоким подуровням, не наблюдается.

В таблице показаны значения i_{sc} в контроле и в присутствии местных анестетиков. В отсутствие местных анестетиков ток i_{sc} , протекающий через цекропиновые каналы, равен 8.4 ± 1.4 пА. Введение в мембраноомывающие растворы 1 мМ лидокаина или прокаина не приводит к изменениям i_{sc} в пределах погрешности. Величины составляют 7.8 ± 1.9 и 7.8 ± 1.7 пА соответственно. Бупивакаин, бензокаин и тетракаин вызывают падение i_{sc} до 5.9 ± 1.8 , 4.3 ± 1.6 и 3.7 ± 1.1 пА соответственно.

Концентрационная зависимость $\delta_{sc}(C_i)$ в присутствии тестируемых местных анестетиков представлена на рис. 2. Показано, что лидокаин и прокаин в пределах погрешности не влияют на приведенное значение i_{sc} . Добавка в омывающие мембрану растворы 3 мМ бензокаина или 0.3 мМ тетракаина приводит к снижению δ_{sc} на 50 %.

На рис. 3 представлены результаты измерения стационарного трансмембранного тока, индуцированного цекропином, до и после введения местных анестетиков. Видно, что при концентрации 1 мМ лидокаин и прокаин (рис. 3 а, з) не влияют на I_{∞} . На рис. 3, б, в видно, что бупивакаин и бензокаин вызывают падение мультиканальной активности цекропина А. Самым выраженным действием обладает тетракаин, введение которого вызывает падение I_{∞} до флуктуаций одиночных каналов (рис. 3, д). Средние величины отношения стационарного трансмембранного тока, индуцированного цекропином А, и равновесного числа открытых цекропиновых каналов после и до введения различных модификаторов мембраны представлены в таблице.

В таблице также представлены результаты действия местных анестетиков на граничный потенциал мембран ДОФС/ДОФЭ (50/50 мол. %). Лидокаин, бупивакаин и тетракаин увеличивают граничный потенциал отрицательнозаряженных мембран на 34 ± 7 , 20 ± 8 и 55 ± 7 мВ соответственно. Бензокаин уменьшает величину ϕ_b на 25 ± 2 мВ, в то время как прокаин не влияет на граничный потенциал мембран ($\phi_b = 2 \pm 2$ мВ).

Рис. 4 показывает термограммы липосом из ДПФХ в отсутствие (контроль) и в присутствии местных анестетиков (лидокаина, бупивакаина, бензокаина, прокаина и тетракаина) при соотношении липида и анестетика 1 : 5. В отсутствие модификаторов температура главного фазового перехода ДПФХ T_m составляет 41.4 °С, ширина пика на полувысоте, характеризующая кооперативность фазового перехода, $T_{1/2}$, равна 0.5 °С. Соответствующие величины изменения температуры, полуширины пика и изменения энтальпии главного фазового перехода ДПФХ представлены в таблице.

Обсуждение

Местные анестетики наиболее известны как селективные блокаторы потенциалзависимых натриевых каналов (Fozzard et al., 2005), поэтому ингибирующий эффект местных анестетиков на цекропиновые каналы может быть связан со специфическим взаимодействием анесте-

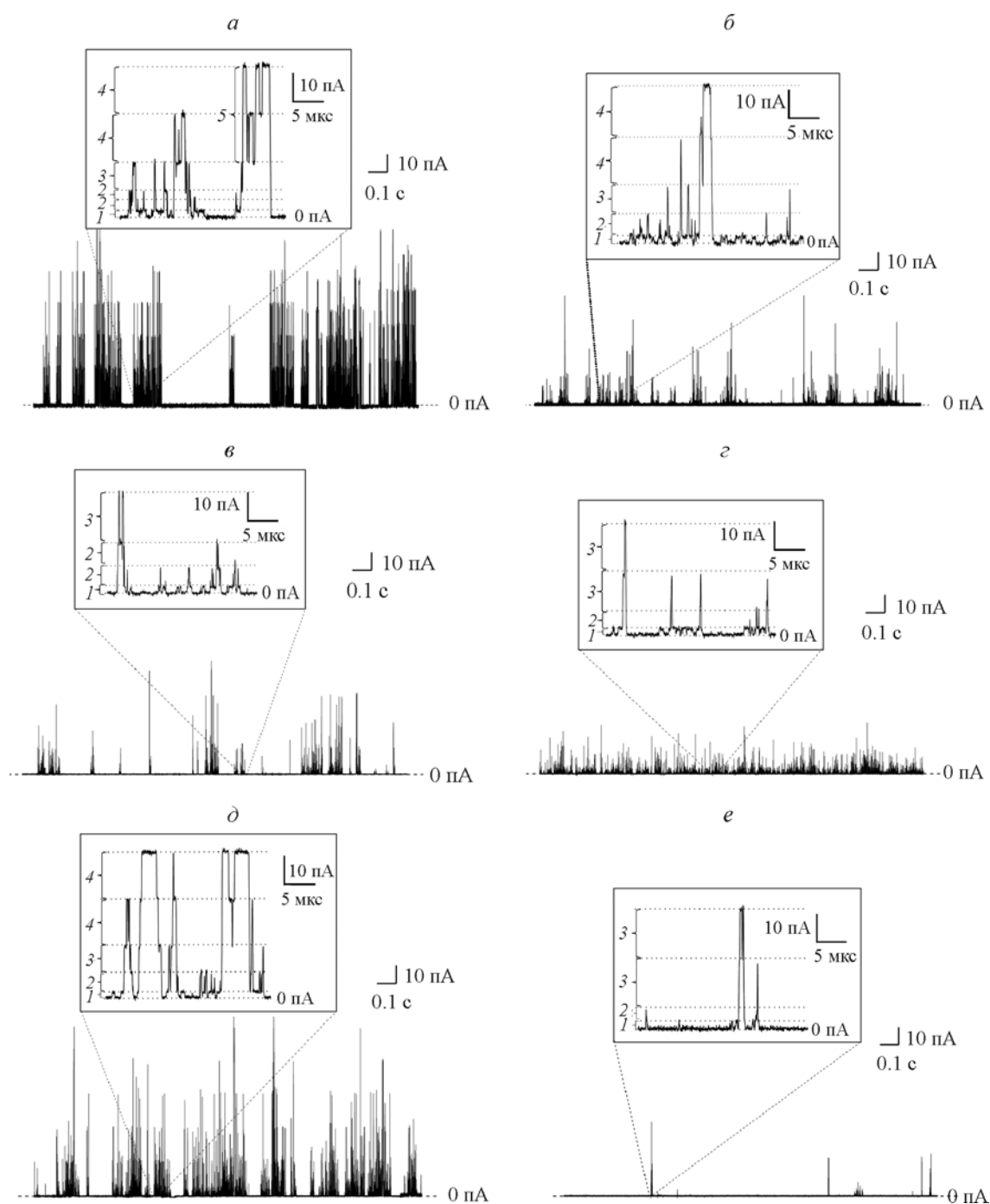


Рис. 1. Записи флуктуаций тока, протекающего через цекропиновые каналы, в отсутствие (а) и в присутствии местных анестетиков — 1 мМ лидокаина (б), бупивакаина (в), бензокаина (г), прокаина (д) и 0.3 мМ тетракаина (е).

Цифрами 1—5 отмечены подостояния проводимости цекропиновых каналов. Здесь и на рис. 2, 3: мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и омываются 0.1 М КСl и 5 мМ НЕРЕС, рН 7.4. Трансмембранное напряжение равно 50 мВ.

тика с ионным каналом. Цекропин А состоит из 37 аминокислотных остатков (Hoshkin, Ramamoorthy, 2008). Мы сравнили аминокислотные последовательности цекропина А и α -субъединицы натриевого канала $Na_v1.7$ (NCBI Reference Sequence: NP_002968.1), экспрессирующегося в клетках нейронов чувствительных афферентных нервных волокон. Дело в ароматических аминокислотных остатках, с которыми связывается анестетик. У цекропина А их два в N-концевом участке, не участвующем в формировании поры. Поэтому специфическое связыва-

ние местных анестетиков с цекропиновым каналом маловероятно. В пользу различия механизмов действия местных анестетиков на цекропиновые и потенциалзависимые натриевые каналы говорит и факт, что только три из пяти протестированных местных анестетиков оказывают ингибирующее влияние на одиночные цекропиновые каналы.

Снижение i_{sc} (рис. 1, 2; см. таблицу) может реализовываться двумя путями — за счет снижения тока, протекающего через каналы определенного типа, или вследствие

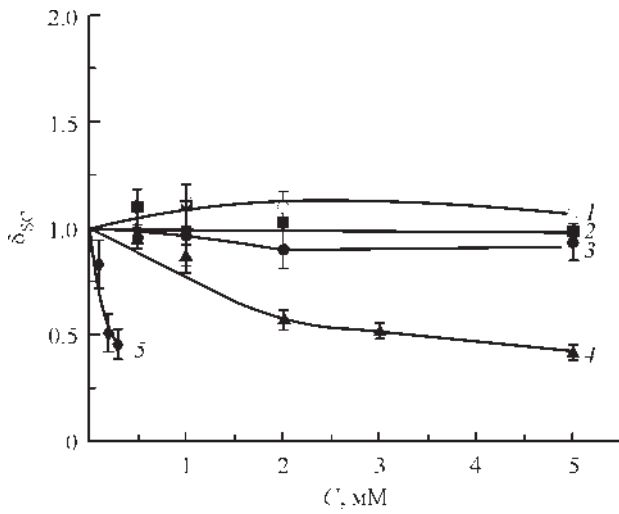


Рис. 2. Зависимость относительного средненормированного тока, протекающего через одиночные цекропиновые каналы ($\delta_{sc}(C_i)$) от концентрации введенных в мембраноомывающие растворы местных анестетиков (C): 1 — прокаин, 2 — лидокаин, 3 — бупивакаин, 4 — бензокаин, 5 — тетракаин.

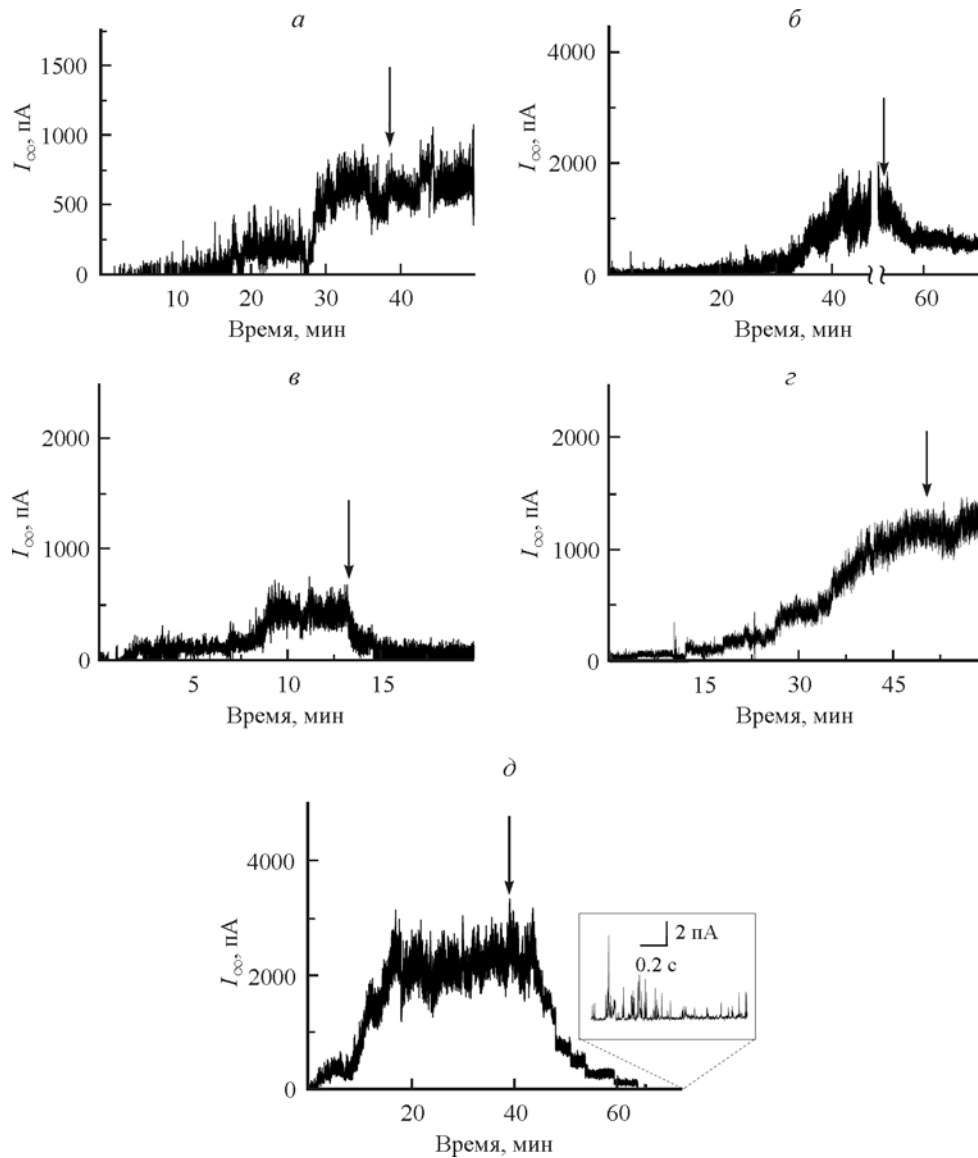


Рис. 3. Влияние лидокаина (а), бупивакаина (б), бензокаина (в), прокаина (з) в концентрации 1 мМ и тетракаина (д) в концентрации 0.3 мМ на стационарный трансмембранный ток, индуцированный цекропином А (I_{oo}).

Стрелкой указан момент введения местного анестетика.

Рис. 4. Термограммы плавления ДПФХ ($C_p(T)$) в отсутствие (1, контроль) и в присутствии лидокаина (2), бупивакаина (3), бензокаина (4), прокаина (5) и тетракаина (6).

Соотношение липида и анестетика 1 : 5.

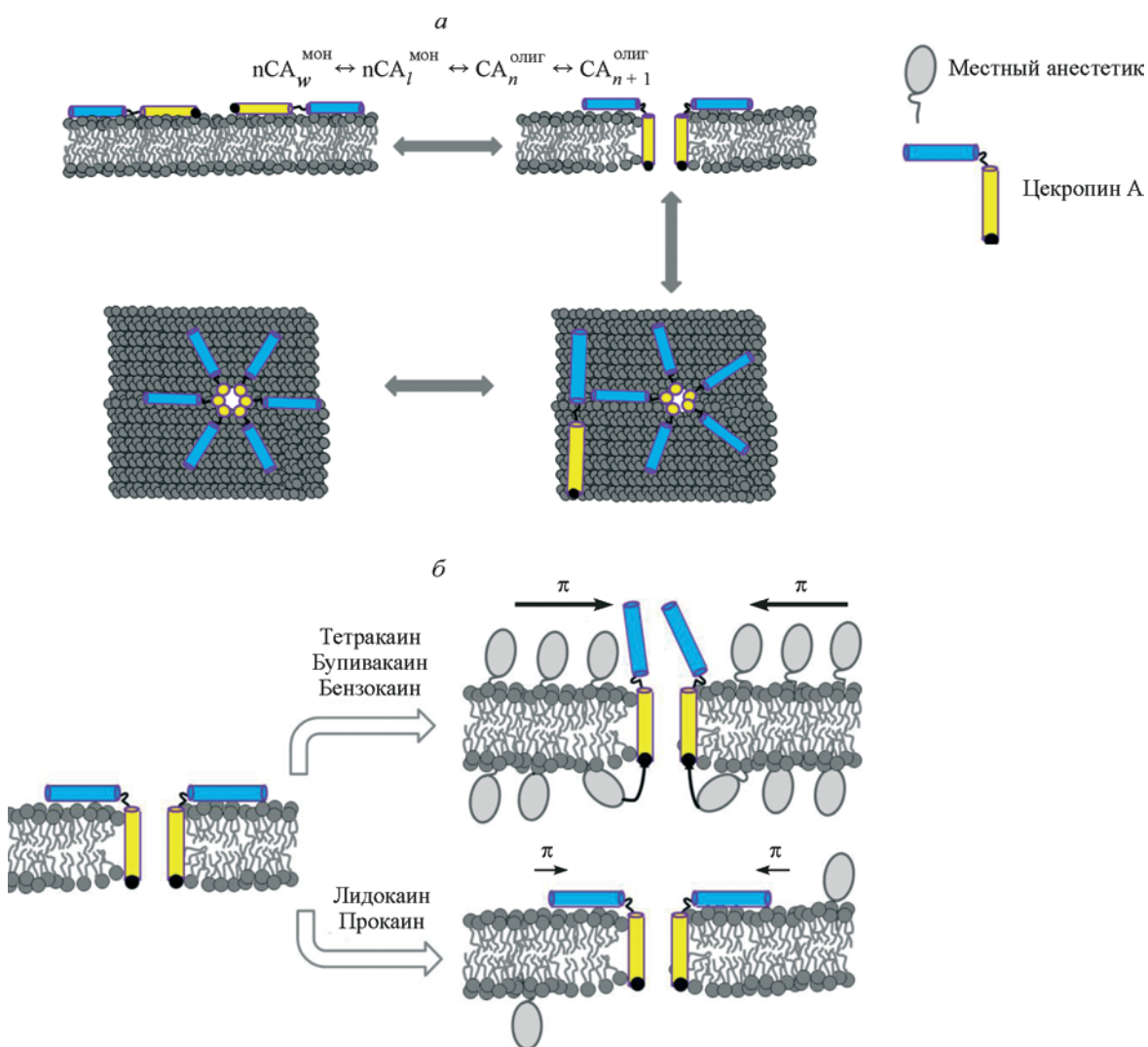
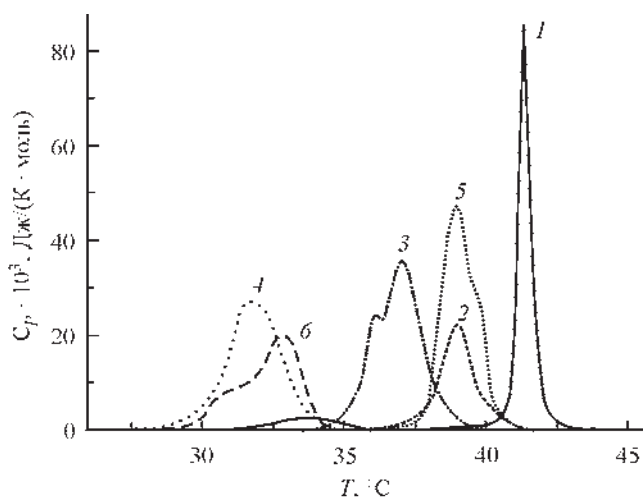


Рис. 5. Схемы формирования цекропиновых каналов и действия тетракаина, бупивакаина и бензокаина на ток, протекающий через одиночные цекропиновые каналы.

а: изначально n мономеров цекропина (CA_w^{MON}) по отдельности сорбируются на мембране параллельно ее плоскости в области гидрофильных головок (CA_l^{MON}). Пептид погружает гидрофобную последовательность в область гидрофобных хвостов, формируется ионпроницаемая пора, состоящая из n молекул цекропина ($CA_n^{ОЛИГ}$). Дополнительные мономеры встраиваются в существующую пору, образуя каналы большей проводимости ($CA_{n+1}^{ОЛИГ}$). Все процессы обратимы и находятся в равновесии. *б:* латеральное давление (π), создаваемое анестетиком в области гидрофильных головок липидов, приводит к деолигомеризации канального комплекса и снижению как проводимости одиночного канала, так и числа открытых каналов. Лидокаин и прокаин ввиду меньшего сродства к мембране не оказывают значимого влияния на латеральное давление в бислое.

вие уменьшения вероятности открывания подуровней с высокой проводимостью. Рис. 1 показывает, что в присутствии бупивакаина, бензокаина и тетракаина не наблюдаются подуровни с высокой проводимостью, а токи, соответствующие подуровням с низкой проводимостью, практически не изменяются. На рис. 5, а показана модель формирования цекропиновых каналов высокой проводимости из каналов меньшей проводимости за счет встраивания в каналный олигомерный комплекс дополнительных мономеров цекропина, предложенная на основании ранее полученных данных (Efimova et al., 2014). Высокий суммарный заряд обогащенного лизином цекропина А делает его сродство к мембране чувствительным к изменениям поверхностного электрического потенциала. Следовательно, увеличение граничного электрического потенциала мембраны может вызывать десорбцию цекропина, влекущую за собой как снижение числа мономеров в олигомерном каналном комплексе, так и уменьшение общего числа каналов в мембране. В рамках этой гипотезы можно объяснить снижение i_{sc} и I_{∞} .

Местные анестетики при нейтральных значениях рН имеют преимущественно положительный заряд. Таким образом, сорбируясь на мембране, они способны изменять граничный мембранный потенциал. Однако значимой корреляции между результатами влияния местных анестетиков на электрические свойства мембраны и i_{sc} не выявлено (см. таблицу). Тетракаин и бензокаин, например, приводят к снижению I_{∞} и i_{sc} , но первый увеличивает, а второй уменьшает граничный потенциал мембраны. При этом лидокаин, увеличивающий ϕ_b , вообще не оказывает влияния на I_{∞} и i_{sc} (рис. 3; см. таблицу). Таким образом, можно сделать вывод о том, что изменения электрических свойств бислоя при адсорбции местных анестетиков не является определяющим фактором, влияющим на проводимость одиночных цекропиновых каналов и интегральный трансмембранный ток, индуцированный цекропином.

Другим фактором, влияющим на активность амфифильных пептидов в мембране, являются степень разобщения и форма молекул липидов в бислое (Bezrukov et al., 1998; Apetrei et al., 2009; Mereuta et al., 2009). Степень разобщения липидов амфифилами можно оценить, изучая фазовые переходы насыщенных фосфохолинов. Показано, что лидокаин и прокаин слабо влияют на температуру фазового перехода и полуширину пика, соответствующего плавлению цепей ДПФХ (рис. 4; см. таблицу). В то время как бупивакаин, бензокаин и тетракаин оказывают существенное влияние на фазовый переход ДПФХ, температура и кооперативность плавления заметно снижаются. Кооперативность фазового перехода характеризует степень разобщения липидов мембраны. Энтальпия фазового перехода ДПФХ не имеет значимой корреляции с эффектами, оказываемыми анестетиками, в отношении I_{∞} и i_{sc} , что может указывать на комплексную природу процесса взаимодействия анестетиков с мембраной. Возможно, повышение энтальпии свидетельствует об увеличении области, занятой бислоем, а снижение — о ее уменьшении за счет перехода липида в небислоую фазу. При этом термограммы в присутствии указанных анестетиков характеризуются комплексной природой, что также свидетельствует о существовании нескольких фаз анестетик—липид (рис. 4). Это подтверждает идею о встраивании анестетика в мембрану в область головок фосфолипидов, что способствует разобщению фосфолипидного остова мембраны. Благодаря этому эффекту

ацильные хвосты противоположных монослоев могут проникать друг в друга, в результате чего наблюдается образование интердигитированной анестетик—ДПФХ бислоевой фазы (Takeda et al., 2009). Исчезновение на термограммах пика от предперехода гидрофильных головок ДПФХ, наблюдаемого при температуре около 34 °С в присутствии анестетиков (рис. 4, ср. кривую 1 с кривыми 2—6), может указывать на разобщающее действие анестетика в области гидрофильных головок мембраны. Было показано, что среднее расстояние между молекулами тетракаина в мембране составляет 5.8 нм, в то время как между молекулами прокаина или лидокаина — 14.6 нм (Ohki, 1984; Ohki, Ohshima, 1996). Следовательно, можно сделать вывод о более сильном разобщающем действии тетракаина по сравнению с прокаином и лидокаином. Рис. 5, б показывает гипотетическую схему такого воздействия. Избыточное латеральное давление, создаваемое анестетиком в области гидрофильных головок липидов, приводит к деолигомеризации каналного комплекса и вытеснению мономеров цекропина из каналного комплекса и мембраны в целом. Ввиду меньшего сродства к мембране меньше молекул лидокаина и прокаина сорбируется на бислое; таким образом, эти анестетики не оказывают значительного влияния на латеральное давление в мембране и, следовательно, на коэффициенты распределения цекропина А в системах раствор—мембрана и мономер—олигомерный каналный комплекс.

Влияние местных анестетиков на мембранную активность цекропина определяется преимущественно степенью разобщения липидов мембраны. Гидрофобные местные анестетики тетракаин, бупивакаин и бензокаин способны изменять профиль латерального давления в мембране, способствуя десорбции молекул цекропина, что приводит к смещению равновесия в сторону мономеров цекропина. Это приводит к деолигомеризации каналов как высокой, так и низкой проводимости, что снижает как средненормированный ток, протекающий через одиночные цекропиновые каналы, так и общее число каналов в мембране.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00565; изучение мембранной активности цекропина А) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (изучение влияния местных анестетиков на свойства отрицательнозаряженных мембран). О. С. Остроумова отмечена субсидией администрации Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности. С. С. Ефимова отмечена стипендией Президента РФ.

Список литературы

- Andersen O. S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. 1976. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. *J. Gen. Physiol.* 67 : 749—771.
- Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. 2009. The RH 421 styryl dye induced, pore model-dependent modulation of antimicrobial peptides activity in reconstituted planar membranes. *Biochim. biophys. acta.* 1790 : 809—816.
- Bezrukov S. M., Rand R. P., Vodyanoy I., Parsegian V. A. 1998. Lipid packing stress and polypeptide aggregation: alamethicin channel probed by proton titration of lipid charge. *Faraday Discuss.* 111 : 146—173.
- Cantor R. S. 1998. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Toxicol. Lett.* 100—101 : 451—458.

- Cerón J. M., Contreras-Moreno J., Puertollano E., de Cienfuegos G. A., Puertollano M. A., de Pablo M. A. 2010. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Peptides*. 31 : 1494—1503.
- Chen H. M., Wang W., Smith D., Chan S. C. 1997. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochim. biophys. acta*. 1336 : 171—179.
- Efimova S. S., Schagina L. V., Ostroumova O. S. 2014. Channel forming activity of cecropins in lipid bilayers. Effect of agents modifying the membrane dipole potential. *Langmuir*. 30 : 7884—7892.
- Efimova S. S., Zakharova A. A., Schagina L. V., Ostroumova O. S. 2016. Local anesthetics affect gramicidin A channels via membrane electrostatic potentials. *J. Membr. Biol.* 249(6): 781—787.
- Fink J., Boman A., Boman H. G., Merrifield R. B. 1989a. Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* 33 : 412—421.
- Fink J., Merrifield R. B., Boman A., Boman H. G. 1989b. The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity. *J. Biol. Chem.* 264 : 6260—6267.
- Fozzard H. A., Lee P. J., Lipkind G. M. 2005. Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. *Curr. Pharm. Des.* 11 : 2671—2686.
- Hoskin D. W., Ramamoorthy A. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. biophys. acta*. 1778 : 357—375.
- Hultmark D., Engström A., Bennich H., Kapur R., Boman H. G. 1982. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *Eur. J. Biochem.* 127 : 207—217.
- Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. G. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal protein from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106 : 7—16.
- Koynova R., Caffrey M. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. biophys. acta*. 1376 : 91—145.
- Mereuta L., Luchian T., Park Y., Hahm K. S. 2009. The role played by lipids unsaturation upon the membrane interaction of the *Helicobacter pylori* HP(2-20) antimicrobial peptide analogue HPA3. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 : 79—84.
- Montal M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 65 : 3561—3566.
- Moore A. J., Beazley W. D., Bibby M. C., Devine D. A. 1996. Antimicrobial activity of cecropins. *J. Antimicrob. Chemother.* 37 : 1077—1089.
- Ohki S. 1984. Adsorption of local anesthetics on phospholipid membranes. *Biochim. biophys. acta*. 777 : 56—66.
- Ohki S., Ohshima H. 1996. Distribution of local anesthetics in lipid membranes. *Colloids Surf. B*. 5 : 291—305.
- Qu X. M., Steiner H., Engstrom A., Bennich H., Boman H. G. 1982. Insect immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.* 127 : 219—224.
- Sato H., Feix J. B. 2006. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. biophys. acta*. 1758 : 1245—1256.
- Schlamadinger D. E., Wang Y., McCammon J. A., Kim J. E. 2012. Spectroscopic and computational study of melittin, cecropin A, and the hybrid peptide CM15. *J. Phys. Chem. B*. 116 : 10 600—10 608.
- Shai Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 66 : 236—248.
- Shin S. Y., Kang J. H., Hahm K. S. 1999. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J. Pept. Res.* 53 : 82—90.
- Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H. G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 292 : 246—248.
- Strichartz G. R., Sanchez V., Arthur G. R., Chafetz R., Martin D. 1990. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol: buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. *Anesthesia and Analgesia*. 71 : 158—170.
- Suttman H., Retz M., Paulsen F., Harder J., Zwergel U., Kamradt J., Wullich B., Unteregger G., Stöckle M., Lehmann J. 2008. Antimicrobial peptides of the cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol.* 8 : 5.
- Takeda K., Okuno H., Hata T., Nishimoto M., Matsuki H., Kaneshina S. 2009. Interdigitation and vesicle-to-micelle transformation induced by a local anesthetic tetracaine in phospholipids bilayers. *Colloids Surf. B*. 72 : 135—140.
- Teshima T., Ueki Y., Nakai T., Shiba T. 1986. Structure determination of lepidopteran, self-defense substance produced by silkworm. *Tetrahedron*. 42 : 829—834.
- Wade D., Andreu D., Mitchell S. A., Silveira A. M., Boman A., Boman H. G., Merrifield R. B. 1992. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40 : 429—436.

Поступила XII 2017

REGULATION OF PORE-FORMING ACTIVITY OF CECROPINS BY LOCAL ANESTHETICS

S. S. Efimova,* R. Ya. Medvedev, E. G. Chulkov, L. V. Schagina, O. S. Ostroumova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: ssefimova@mail.ru

In the present work, the influence of local anesthetics on the regulation of the channel forming activity of the antimicrobial peptide cecropin A was investigated. The mean normalized current through the single cecropin channels (i_{sc}) and the steady-state transmembrane current (I_{∞}) induced by cecropin A were measured. It was shown that the addition of 1 mM bupivacaine, benzocaine or 0.3 mM tetracaine to the membrane bathing solution decreased i_{sc} and I_{∞} . At the same time, the addition of lidocaine or procaine up to the concentration of 1 mM did not lead to significant changes in i_{sc} and I_{∞} . Comparison of the absolute values and the sign of the changes in the boundary potential of negatively charged membranes and the relative changes in i_{sc} and I_{∞} after addition of local anesthetics showed that the changes in mean normalized current through the single cecropin channels and peptide multichannel activity did not correlate to the membrane boundary potential. The results of studying the effect of tested local anesthetics on the phase transition of lipid membrane lipids allowed to conclude that the observed changes in i_{sc} and I_{∞} were caused by the modulation of the elastic properties of the membranes.

Key words: lipid membrane, ion channel, cecropins, low-molecular amphiphiles, local anesthetics.