



УДК 547.964.4

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРАМИЦИДИНА S  
С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ СИСТЕМАМИСеменов С. Н., Мельник Е. И., Снежкова Л. Г.,  
Мирошников А. И., Иванов В. Т.*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Изучены параметры монослоев грамицидина S и его синтетических аналогов на границе раздела фаз вода — воздух. Найдена связь между поверхностно-активными свойствами соединений и их структурой. Грамицидин S и его аналоги, обладающие положительно заряженными аминогруппами, при взаимодействии с фосфолипидными монослоями образуют комплексы с липидом. Образование такого комплекса, ответственного за антимикробную активность антибиотика, обусловлено электростатическим взаимодействием между  $\text{NH}_3^+$ -группами молекулы грамицидина S и фосфатными группами двух молекул липида. Предложен механизм разрушения биологической мембраны под действием грамицидина S.

Биологическое действие мембрано-активных антибиотиков, как правило, обуславливается особенностями их химического строения. В частности, было показано, что антимикробная активность для грамицидина S и его аналогов коррелирует с расстоянием между  $\text{NH}_3^+$ -группами остатков орнитина ( $\sim 9 \text{ \AA}$ ), расположенных по одну сторону плоскости циклического остова молекулы [1, 2]. С другой стороны, полное совпадение антимикробной активности антибиотика и его энантиомера свидетельствует о том, что грамицидин S, по всей вероятности, не имеет специфического белкового рецептора, а является реагентом, взаимодействующим непосредственно с фосфолипидной частью мембраны [3]. Спектроскопическими методами было показано, что свободные аминогруппы антибиотика образуют солевые связи с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты липидных молекул, при этом конформация грамицидина S сохраняется неизменной [4, 5].

Целью данной работы было в плане продолжения исследования зависимости между химическим строением, пространственной структурой и биологическим действием в ряду грамицидина S и его аналогов изучить поведение этих соединений на границе раздела фаз вода — воздух, а также их взаимодействие с модельными фосфолипидными мембранами. Наряду с природным антибиотиком исследовались два его наиболее характерных аналога: «полностью L»-грамицидин S и *ретро*-грамицидин S [3]. Исследование этих аналогов представляет интерес для понимания роли пространственной структуры циклопептидного остова молекулы антибиотика при его взаимодействии с мембранными системами, поскольку в них сохранены все гидрофобные и гидрофильные группировки грамицидина S, но не наблюдается присущей ему жесткой конформации [6]. Для выяснения функ-

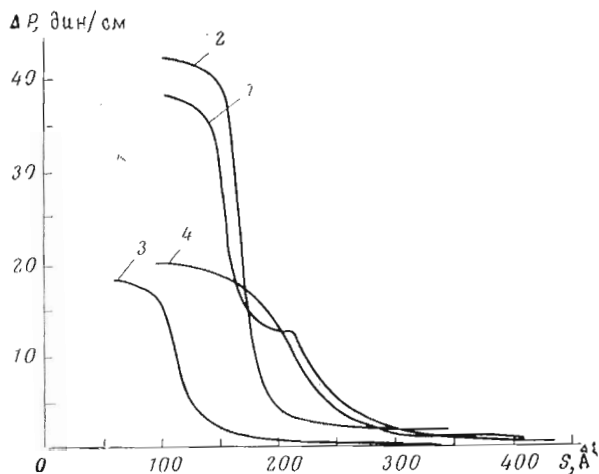


Рис. 1. Зависимость поверхностного давления в монослое (1 М КСl) от площади ( $S$ ), приходящейся на молекулу: 1 — грамицидин S; 2 —  $N,N'$ -диацетилграмицидин S; 3 — «полностью L»-грамицидин S; 4 — *ретро*-грамицидин S

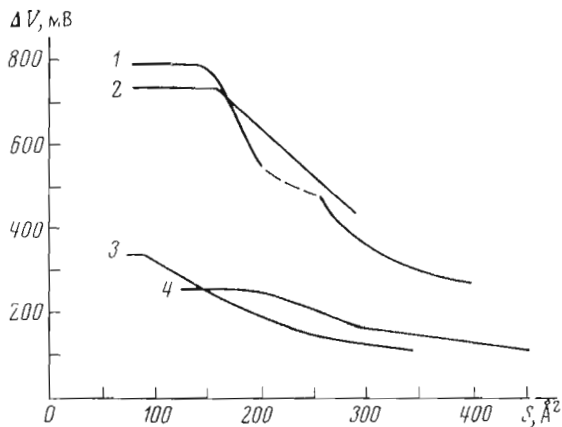


Рис. 2. Зависимость скачка потенциала ( $\Delta V$ ) в монослое (1 М КСl) от площади ( $S$ ), приходящейся на молекулу циклопептида: 1 — грамицидин S (пунктирной линией обозначен участок, который плохо воспроизводится); 2 —  $N,N'$ -диацетилграмицидин S; 3 — «полностью L»-грамицидин S; 4 — *ретро*-грамицидин S

циональной роли свободных аминогрупп остатков орнитина при взаимодействии с фосфолипидами мембран мы также исследовали  $N,N'$ -диацетилграмицидин S [7].

Путем исследования поведения антибиотика и его аналогов на границе раздела фаз вода — воздух мы надеемся установить зависимость параметров монослоев от структуры и ориентации входящих в их состав молекул. Из данных измерения скачка потенциала ( $\Delta V$ ) можно было вычислить величины дипольных моментов и получить данные об ориентации циклопептидов на границе раздела фаз. Изучение поверхностного давления ( $\Delta P$ ) монослоев грамицидина S и его аналогов дало информацию о поверхностно-активных свойствах этих соединений, а также о занимаемой ими площади на поверхности раздела. Анализ экспериментальных данных по изучению поверхностного давления и скачка потенциала при адсорбции антибиотика и его аналогов на фосфолипидных монослоях позволил определить характер взаимодействия циклопептидов с липидом и структуру образующихся при этом комплексов.

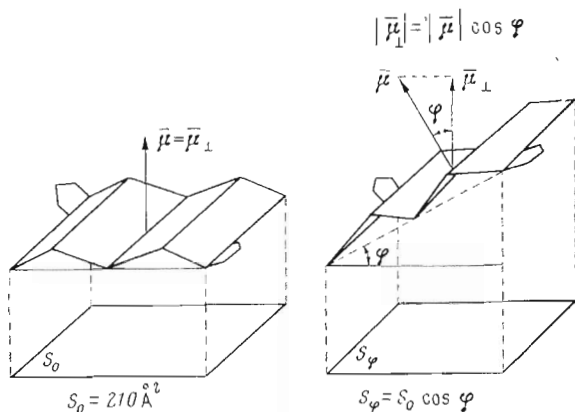


Рис. 3. Схема, показывающая изменение площади, приходящейся на молекулу ( $S$ ), и вертикальной составляющей ( $\bar{\mu}_{\perp}$ ) дипольного момента ( $\bar{\mu}$ ) при переориентации молекулы грамицидина  $S$  на границе раздела фаз

На рис. 1 и 2 показано изменение поверхностного давления и скачка потенциала исследуемых соединений, нанесенных на поверхность 1 М раствора KCl, в зависимости от площади, приходящейся на одну молекулу в монослое. Аналогичные кривые получены и для других концентраций KCl и NaCl в водных растворах. Характерной особенностью кривой, присущей для грамицидина  $S$ , является наличие плато в области  $220 \text{ \AA}^2$ , причем дальнейшее сжатие монослоев приводит к их коллапсу в районе  $145 \text{ \AA}^2$ . Значение величины площади, занимаемой молекулой грамицидина  $S$  в коллапсе, зависит от скорости сжатия монослоя, что свидетельствует о переходе антибиотика с поверхности раздела в водную фазу. Поэтому величина площади молекулы грамицидина  $S$  ( $145 \pm 15 \text{ \AA}^2$ ) получена при достаточно высоких скоростях сжатия монослоя ( $\sim 50 \text{ \AA}^2/\text{мин}$ ), заметно превышающих скорость перехода антибиотика в водную фазу. С другой стороны, параметры монослоя до давлений, соответствующих плато на кривой сжатия, практически не зависят от скорости сжатия, т. е. в этой области грамицидин  $S$  не переходит в водную фазу. Из этих данных следует, что на границе раздела фаз вода — воздух грамицидин  $S$  может существовать в двух различных конформационных состояниях с площадями, приходящимися на одну молекулу:  $213 \pm 10$  и  $145 \pm 15 \text{ \AA}^2$ . Первая величина совпадает с площадью  $210 \text{ \AA}^2$ , полученной при рентгеноструктурных исследованиях молекулы грамицидина  $S$  в конформации типа «складчатый лист» [8—10]. Конформация этого типа была обнаружена и в растворах [7]. Совпадение площадей, занимаемых молекулой грамицидина  $S$  на поверхности раздела фаз вода — воздух и в кристалле, свидетельствует о плотной упаковке антибиотика в том и другом случае, поэтому дальнейшее увеличение поверхностного давления и скачка потенциала на границе раздела фаз нельзя объяснить эффектом переупаковки. Любая переориентация молекулы грамицидина  $S$ , имеющего ось симметрии второго порядка, направленную перпендикулярно плоскости циклопептидного остова молекулы в конформации типа «складчатый лист», должна привести к падению измеряемых дипольных моментов (рис. 3), в то время как вертикальные составляющие дипольных моментов как для плато, так и для коллапса ( $2,7 \pm 0,4$  и  $3,1 \pm 0,3 D$  соответственно) имеют один и тот же знак (минус — в воде) и близки по абсолютной величине. Остается предположить, что при сжатии грамицидин  $S$  из состояния, характерного для конформации типа «складчатый лист», переходит в новую конформацию. Такое конформационное состояние молекулы антибиотика с площадью  $145 \text{ \AA}^2$  хорошо согласуется со «смешанной  $\alpha$ - $\beta$ -структурой», обсуждавшейся

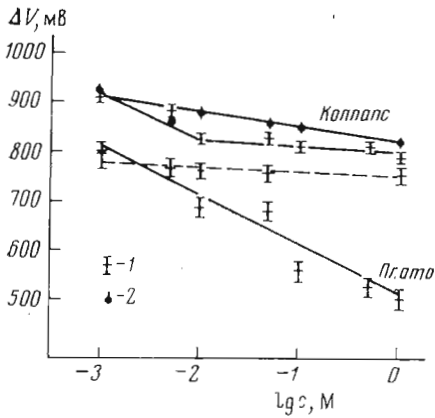


Рис. 4

Рис. 4. Влияние концентрации соли на величину скачка потенциала монослоев грамицидина S (сплошная линия) и N,N'-диацетилграмицидина S (пунктирная линия), нанесенных на поверхность растворов KCl (1) и NaCl (2)

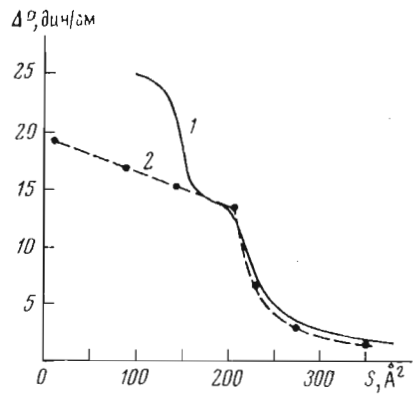


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость поверхностного давления монослоя от площади, приходящейся на молекулу в монослое (0,01 M KCl): 1 — сжатие нанесенного на поверхность грамицидина S; 2 — изменение поверхностного давления при адсорбции внесенного в раствор грамицидина S на границе раздела фаз вода — воздух. Площадь, приходящаяся на молекулу, вычислена в предположении, что весь антибиотик выходит на поверхность

Ходчкин и Оугтоном [10] в качестве одной из моделей, удовлетворяющих рентгеноструктурным данным.

При изучении зависимости скачка потенциала грамицидина S от ионной силы подстилающего раствора для состояний молекулы в области плато и в коллапсе (рис. 4) получено, что если в области плато антибиотик проявляет свойства положительно заряженного монослоя, то в коллапсе он ведет себя как нейтральная молекула, подобная N,N'-диацетилграмицидину S, для которого скачок поверхностного потенциала в коллапсе не зависит от ионной силы раствора. По-видимому, нейтрализацию положительных зарядов грамицидина S можно объяснить его взаимодействием с анионами раствора (вероятнее всего, с ионами Cl<sup>-</sup>).

Поверхностные давления грамицидина S и N,N'-диацетилграмицидина S в коллапсе имеют близкие значения (рис. 1), причем площади, занимаемые молекулами, и вертикальные составляющие дипольных моментов для обоих соединений практически совпадают. Отсюда следует, что ацетилированный аналог грамицидина S в коллапсе также имеет конформацию типа «смешанной α-β-структуры». Относительно высокие значения поверхностного давления и скачка потенциала для грамицидина S и N,N'-диацетилграмицидина S, по-видимому, связаны с жесткой пространственной структурой, которая обеспечивается системой четырех внутримолекулярных водородных связей. Отсутствие стабилизированной структуры такого рода в аналогах антибиотика — «полностью L»-грамицидине S и *ретро*-грамицидине S — приводит к заметному падению поверхностного давления в монослоях (рис. 1). Наблюдаемые при сжатии изломы скачка потенциала, вероятно, связаны с конформационными переходами этих аналогов на поверхности раздела фаз (рис. 2). В пользу этого говорит и слабая зависимость скачка потенциала в коллапсе для этих двух соединений от ионной силы подстилающего раствора (ΔV падает на 20 ± 5 мВ при увеличении концентрации KCl на порядок).

Из данных по адсорбции грамицидина S, внесенного в 0,01 M водный раствор KCl, на границе раздела фаз вода — воздух (рис. 5) видно, что весь антибиотик выходит на поверхность в конформации типа «складчатый лист», а дальнейшее повышение концентрации грамицидина S приводит

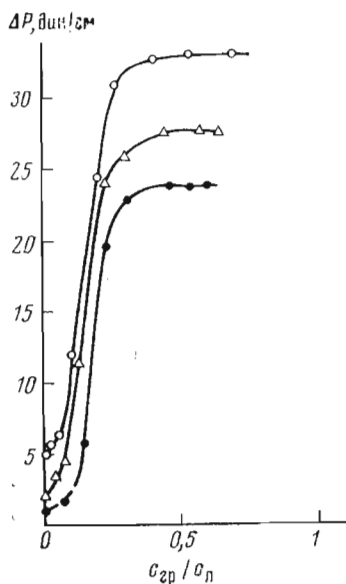


Рис. 6

Рис. 6. Титрование фосфатидной кислоты грамицидином S из 0,01 М раствора KCl ( $c_{gp}/c_l$  — отношение числа молекул грамицидина S, внесенного в раствор, к количеству липидных молекул на поверхности). Кривые титрования приведены для различных начальных поверхностных давлений фосфатидной кислоты

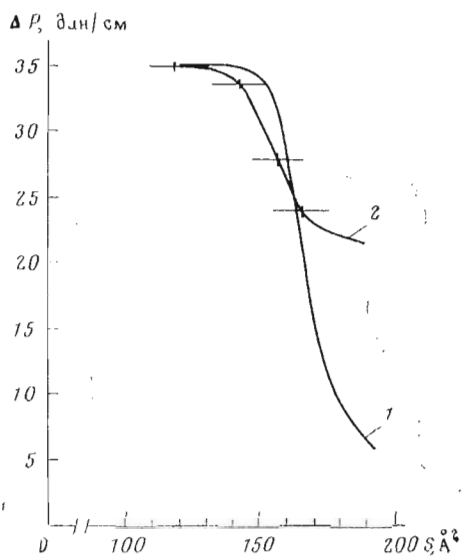


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу в монослое (0,01 М KCl): 1 — N,N'-диацетилграмицидин S, 2 — липид-грамицидиновый комплекс

к незначительному росту поверхностного давления и скачка потенциала, что, по-видимому, связано с полислойной адсорбцией циклопептида на границе раздела. Сравнение кривых зависимостей поверхностного давления при сжатии нанесенного монослоя и при адсорбции грамицидина S (рис. 5) показывает, что антибиотик не адсорбируется на стенках ячейки, а полностью находится на границе раздела фаз.

Исследование взаимодействия грамицидина S с монослойной фосфолипидной мембраной, построенной из дипальмитоилфосфатидной кислоты, нанесенной на поверхность 0,01 М раствора KCl, показывает (рис. 6), что с увеличением количества антибиотика, введенного в водный раствор, давление монослоя возрастает и при определенном соотношении циклопептид — липид наступает насыщение. С одной стороны, давление, при котором наступает насыщение, значительно превышает как исходное давление липидного монослоя (начальные точки на кривых при  $c_{gp} = 0$ ), так и давление монослоя грамицидина S (см. рис. 5), а с другой — насыщение всегда наступает при молярном соотношении циклопептид — липид, равном 1 : 2. Эти данные свидетельствуют о взаимодействии между двумя липидными молекулами в монослое и молекулой антибиотика с образованием липид-грамицидинового комплекса, обладающего существенно большим поверхностным давлением, чем каждый из его компонентов в отдельности. Из кривой сжатия липид-грамицидинового комплекса (рис. 7) видно, что площадь, занимаемая этим комплексом на границе раздела фаз, и соответствующее ему поверхностное давление совпадают с величинами, характерными для N, N'-диацетилграмицидина S, т. е. для соединения с блокированными положительными зарядами. Таким образом, очевидно, что образование липид-грамицидинового комплекса сопровождается нейтрализацией электрического заряда антибиотика в результате взаимодействия положительно заряженных аминогрупп грамицидина S с отрицатель-

но заряженными остатками фосфорной кислоты молекул липида. При добавлении в водный раствор солей лантана, который, как известно, эффективно связывается с фосфатными группами липида, липид-граммицидиновый комплекс разрушается, при этом происходит быстрое снижение поверхностного давления до значения, соответствующего давлению монослоя антибиотика. Скачок поверхностного потенциала монослоев липид-граммицидинового комплекса ( $700 \pm 20$  мВ) в коллапсе меньше, чем у монослоев, образованных грамицидином S (см. рис. 4), на величину, соответствующую значению скачка потенциала для монослоя, образованного дипальмитоилфосфатидной кислотой ( $200 \pm 20$  мВ).

Аналогичные результаты были получены и на монослоях, построенных из яичного лецитина и синтетического дипальмитоиллецитина.

Так как вертикальная составляющая дипольного момента липид-граммицидинового комплекса примерно равна разности между дипольным моментом антибиотика и вертикальными составляющими дипольных моментов двух молекул липида, наиболее простым объяснением экспериментальных фактов является предположение, что внедрение грамицидина S в фосфолипидный монослой сопровождается переориентацией молекул фосфолипидов, связанных с антибиотиком (рис. 8). Очевидно, что при такой структуре липид-граммицидинового комплекса его поверхностно-активные свойства будут подобны свойствам электронейтрального аналога грамицидина S — N, N'-дианетилграмицидина S.

Исследования аналогов грамицидина S показали, что «полностью L»-граммицидин S и *ретро*-граммицидин S увеличивают поверхностное давление фосфолипидных монослоев. Равномерное увеличение поверхностного давления при адсорбции этих соединений из 0,01 M раствора KCl на фосфолипидных монослоях приводит к значениям  $9,0 \pm 0,3$  дин/см для комплексов с «полностью L»-граммицидином S и  $9,2 \pm 0,3$  дин/см для комплексов с *ретро*-аналогом (поверхностное давление этих соединений в коллапсе для 0,01 M KCl равно 7—8 дин/см), в то время как величина поверхностного давления для комплексов грамицидина S с липидом равна 34,5 дин/см. Эти данные свидетельствуют о том, что для образования антибиотиком с фосфолипидом комплекса, обладающего высокой поверхностной активностью, недостаточно только наличия положительно заряженных аминогрупп, взаимодействующих с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты липидных молекул. Необходимым условием является уникальная пространственная структура грамицидина S, в которой орнитинные аминогруппы ориентированы по одну сторону циклопептидного остова и находятся на расстоянии, примерно соответствующем расстоянию между отрицательно заряженными группами фосфолипидов в плотно упакованной мембране [2].

Результаты настоящей работы позволяют предложить молекулярный механизм биологического действия грамицидина S. Предлагаемый нами механизм, конечно, не отражает всех тех сложных процессов, которые происходят в биологических системах, однако позволяет выделить основные стадии, характеризующие взаимодействие грамицидина S с фосфолипидными участками биомембран. На первой стадии антибиотик в конформации «складчатый лист» взаимодействует с фосфолипидными участками мембраны, образуя липид-граммицидиновый комплекс (рис. 9 А). Для образования такого комплекса, состоящего из одной молекулы грамицидина S и двух молекул фосфолипидов, необходимо наличие в циклопептиде двух положительных зарядов, расположенных на определенном расстоянии друг от друга по одну сторону плоскости цикла. После образования липид-граммицидинового комплекса последний внедряется в мембрану, изменяя при этом конформацию циклопептидного остова (рис. 9 Б). С этой точки зрения понятна и меньшая биологическая активность исследованных аналогов, так как комплексы, образованные липидом и «полностью L»- или *ретро*-граммицидином S, обладают существенно меньшей поверхностной

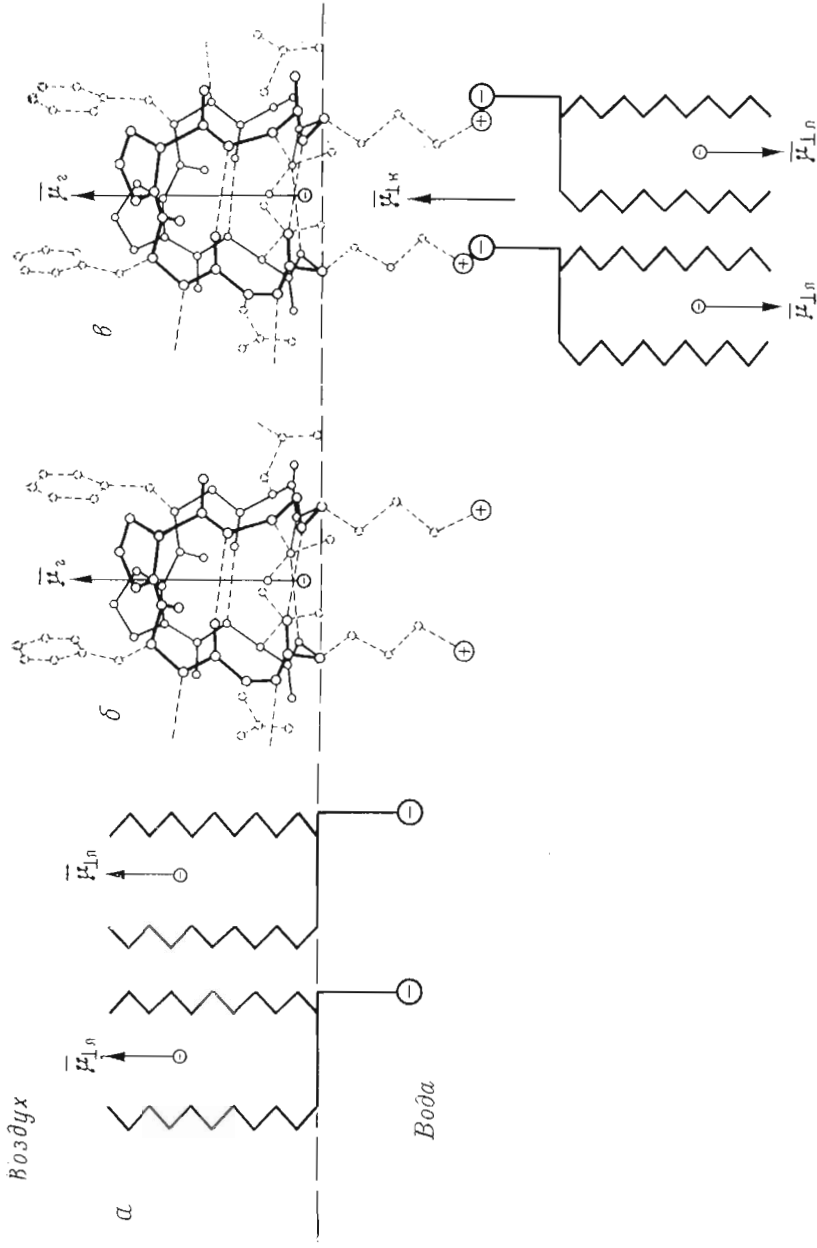


Рис. 8. Ориентация дипольных моментов на границе раздела фаз: *a* — ориентация вертикальной составляющей дипольного момента молекул липида ( $\vec{\mu}_{лн}$ ); *b* — ориентация дипольного момента молекулы грамицидина S ( $\vec{\mu}_{гс}$ ); *в* — ориентация вертикальной составляющей дипольного момента липид-грамицидинового комплекса ( $\vec{\mu}_{лгк}$ )

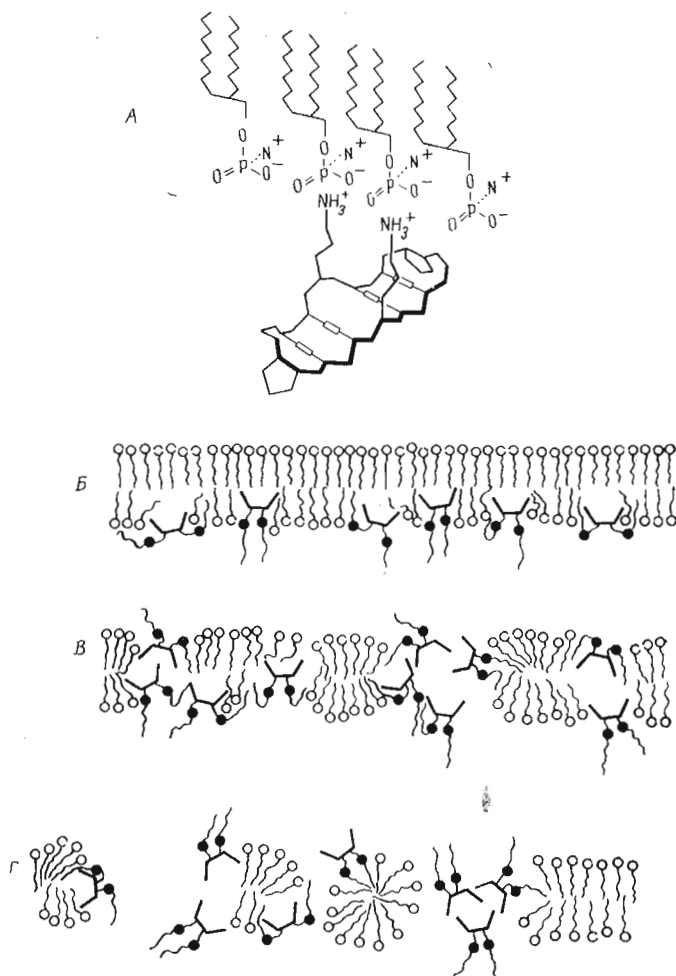


Рис. 9. Предлагаемый механизм разрушения мембраны (см. пояснения в тексте)

активностью и не способны легко внедряться в фосфолипидный бислои. Следующий этап разрушения мембраны — возникновение мозаичной структуры, т. е. появление участков липидного бислоя, окруженных липид-грамицидиновыми комплексами (рис. 9 B). Наконец, разделенная на отдельные блоки мембрана переходит в коллоидный раствор (рис. 9 Г), что наблюдалось ранее при изучении взаимодействия грамицидина S с фосфолипидными липосомами [5].

### Экспериментальная часть

Измерение параметров монослоев производили на установке, описанной ранее [11]. Поверхностное давление регистрировали по методу Вильгельми с помощью механотрона 6М × 1С, предварительно проградуированного в дин/см. В качестве измерительного элемента использовали вольфрамовую пластинку периметром 10 см и толщиной 0,1 мм. Метод Вильгельми позволял регистрировать поверхностное давление с точностью не ниже  $\pm 0,3$  дин/см.

Поверхностный потенциал монослоев измеряли методом вибрирующего электрода [12], в качестве которого использовали платиновую пластинку диаметром 1 см. Частота колебаний была равна 1100 Гц — частота собственных колебаний системы электрод—вibrator. Точность метода  $\sim 5\%$ .

При исследовании скачка потенциала и поверхностного давления от



степени сжатия мономолекулярного слоя употребляли ванну из оргстекла площадью 850 см<sup>2</sup> и глубиной 1 см, с парафинированными бортами и тефлоновой пластиной в качестве подвижного барьера. Скорость сжатия монослоев изменялась от 5 до 50 Å<sup>2</sup>/мин. При изучении адсорбционных явлений эту ванну заменяли на ячейку из оргстекла объемом 157 см<sup>3</sup>, с площадью поверхности раздела фаз вода — воздух 78,5 см<sup>2</sup>.

Непосредственно перед измерением поверхность раствора очищали стряхиванием верхнего слоя жидкости тефлоновым барьером.

Для приготовления растворов использовали дважды дистиллированную воду с удельным сопротивлением не менее  $1 \cdot 10^5$  Ом·см<sup>-1</sup> и соли KCl и NaCl (х. ч.). Все измерения проводили при  $20 \pm 1,5^\circ$  и pH водного раствора  $6,7 \pm 0,2$ .

В работе использовали метанольные растворы грамицидина S и его синтетических аналогов [3], которые получали растворением соответствующих навесок в метаноле марки х. ч. Исходные растворы имели концентрации  $(1,4-5,8) \cdot 10^{-3}$  М. Хроматографически однородные препараты яичного лецитина, дипальмитоиллецитина и синтетической фосфатидной кислоты были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории химии липидов Л. И. Барсуковым и Ю. Г. Молотковским (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР). Фосфатидную кислоту растворяли в смеси метанол — хлороформ, 1 : 2; лецитины — в смеси хлороформ — метанол — гексан, 1 : 1 : 3 [13]. Полученные растворы имели концентрации  $(2,0-6,3) \cdot 10^{-3}$  М. Максимальное содержание растворителей при монослойных измерениях не превышало 0,2%, что, как было предварительно проверено, не влияло на свойства монослоев.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. Т., Мирошников А. И., Снежкова Л. Г., Овчинников Ю. А., Куликов А. В., Лихтенштейн Г. И. (1973) Химия природы. соедин., **1**, 94—98.
2. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. (1975) Tetrahedron, **31**, 2177—2209.
3. Снежкова Л. Г., Шепель Е. Н., Рябова И. Л., Мирошников А. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1975) Биоорган. химия, **1**, 347—358.
4. Pache W., Chapman D. (1972) Biochim. et biophys. acta, **255**, 348—357.
5. Pache W., Chapman D., Hillaby R. (1972) Biochim. et biophys. acta, **255**, 358—364.
6. Снежкова Л. Г., Рябова И. Д., Мирошников А. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1974) III Всесоюзный симпозиум по химии пептидов и белков, с. 139, Киев.
7. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Miroshnikov A. I., Shepel E. N., Abdullaev N. D., Efremov E. S., Senyavina L. B. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **39**, 270—275.
8. Schmidt G. M. J., Hodgkin D. C., Oughton B. M. (1957) Biochem. J., **65**, 744—750.
9. Synge R. L. M. (1957) Biochem. J., **65**, 750—752.
10. Hodgkin D. C., Oughton B. M. (1957) Biochem. J., **65**, 752—756.
11. Cadenhead D. A. (1969) Ind. and Eng. Chem. Prod. Res. and Develop., **61**, 22—28.
12. Бабаков А. В., Мягков И. В., Сотников П. С., Терехов О. П. (1972) Ж. физ. химии, **46**, 1873—1876.
13. Dinesh O. Shan (1969) J. Colloid and Interface Sci., **29**, 240—245.

Поступила в редакцию  
20.I.1977

#### THE MODE OF GRAMICIDIN S ACTION ON MODEL LIPID SYSTEMS

SEменов S. N., MELNIK E. I., SNEZKOVA L. G.,  
MIROSHNIKOV A. I., IVANOV V. T.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The parameters of monolayers prepared from gramicidin S and its synthetic analogs at the air-water interface have been studied. At the collapse point the surface pressure was high for gramicidin S and its N,N'-diacetyl analog and considerably lower for either «all-L» or retro-gramicidin S. The interaction of gramicidin S and its analogs carrying positively charged amino-groups with the phospholipid monolayers results in the formation of lipid-peptide complexes. The latter are responsible for the antimicrobial activity and arise due to electrostatic interactions between NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-groups of the gramicidin S molecule and the phosphate groups of two lipid molecules. The mechanism for gramicidin S elicited destruction of biological membranes has been proposed.