

УДК 577.352

ДЕЙСТВИЕ МЕСТНЫХ АНЕСТЕТИКОВ НА ПЛОСКИЕ ФОСФОЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

Л. Г. МИКАЕЛЯН, А. К. КАРАПЕТЯН, Е. И. КУРГИН

Изучено влияние местных анестетиков дибукаина, пропраналола, лидокаина на устойчивость в электрическом поле и проводимость бислойных липидных мембран. Показано, что все три анестетика увеличивают среднее время жизни мембран в 1,6—2,2 раза. Значение тангенса угла наклона зависимости плотности вероятности от времени жизни БЛМ на малых временах в логарифмических координатах равно 1,82, что указывает на появление второго энергетического барьера. Направление изменения проводимости мембран при аппликации местных анестетиков зависит от их концентрации, величины и длительности приложенного напряжения.

Изученные анестетики оказывают стабилизирующее влияние на структуру липидных мембран, однако в определенных условиях способны индуцировать в бислое потенциалзависимые каналы проводимости.

Ключевые слова: местные анестетики, фосфолипидные мембраны, электрическая проводимость.

Известно, что местные анестетики (МА) оказывают стабилизирующее влияние на биологические мембраны, блокируя проведение нервного импульса и увеличивая осмотическую резистентность эритроцитов. С целью установления роли липидного матрикса биомембран в анестетическом эффекте во многих работах исследовалось взаимодействие МА с молекулами липидов на различных системах (монослоях, бислоях, везикулах и др.). Подробное обсуждение этих экспериментальных данных можно найти в работах Ландау [4] и Файнштейна [6]. Здесь отметим только наиболее характерные стороны действия МА на эти системы: конденсация монослоев, увеличение подвижности алифатических цепей молекул липидов и их дипольного момента, а также уменьшение отрицательного поверхностного заряда. На плоских бислойных липидных мембранах (БЛМ) действие МА изучено недостаточно. В работе Гринфельда и Нарушевичуса [2] было обнаружено ступенчатое уменьшение сопротивления во времени БЛМ из яичного лецитина при одностороннем добавлении МА в водный раствор. Аналогичные данные были получены ранее Гуткнехтом и Тостесоном [8]. Необходимо отметить, что указанными авторами были использованы клинические концентрации МА.

В связи с малоизученностью вопроса о влиянии МА на плоские БЛМ, а также отсутствием данных об их действии на устойчивость этой липидной системы нами были предприняты настоящие эксперименты.

Материал и методика. Суммарные фосфолипиды мозга быка или крысы экстрагировались согласно Мюллеру с соавт. [9]. БЛМ формировали на отверстии диаметром 1 или 2 мм в перегородке тefлоновой камеры на границе двух водных растворов. Использовали 2%-ные растворы фосфолипидов в смеси растворителей н-декана и н-геп-

тана, взятых в соотношении 1:1 по объему. Небуферные водные растворы содержали 0,1 М хлорид натрия. В экспериментах использовали аптечные препараты МА, предназначенные для инъекций. Устойчивость БЛМ оценивали по среднему времени жизни τ при данном потенциале. Методика этих экспериментов, а также основы теории электрического разрушения БЛМ подробно изложены в работе Чизмаджева с соавт. [3]. Время жизни БЛМ τ регистрировали на запоминающем осциллографе С8-11. Напряжение на БЛМ подавали от генератора прямоугольных импульсов оригинальной конструкции, созданного в нашей лаборатории. Ток измеряли с помощью операционного усилителя «Кейтлы 301» в режиме фиксации напряжения и записывали на самопишущем приборе И37 с использованием усилителя И37. Время установления стрелки самописца—1 сек. В целях предотвращения влияния вибраций на электрические измерения экспериментальная камера вместе с экранирующим блоком была установлена на стальной плите массой 100 кг, подвешенной на стальной балке с помощью нейлоновых троссов согласно методической рекомендации Фиттлпеллея и др. [7]. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Для получения данных об τ измеряли τ не менее 100 БЛМ.

Результаты и обсуждение. Исходя из специфики измерений τ БЛМ, последние формировали при наличии в водном растворе МА. Измерения начинали после полного почернения мембран, время которого составляло 5—15 минут. На гистограмме (рис. 1) представлены τ БЛМ относительно контроля, который

был равен 85 мсек при потенциале 400 мВ. Из рис. 1 видно, что в присутствии МА τ БЛМ увеличивается в 1,6—2,2 раза. По эффекту стабилизации МА располагаются в следующем убывающем порядке: дибукаин, пропраналол, лидокаин. Таким образом, дибукаин и пропраналол, содержащие в своей структуре нафтильное кольцо, оказались наиболее эффективными стабилизаторами структуры БЛМ. Из этих данных следует также, что МА проявляют известное стабилизирующее действие и на БЛМ, не содержащие каких-либо специфических белковых молекул. Здесь важно отметить, что стабилизирующий эффект МА на БЛМ наблюдается при низких концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} М.

Каким же образом МА стабилизируют структуру БЛМ? Точный механизм этого эффекта нам неизвестен, однако анализ функции распределения τ показал, что в присутствии МА эта функция на малых временах не является экспоненциальной—характерной для одностадийного процесса разрушения БЛМ в электрическом поле [1], но описывается параболой. Это указывает на появление второго энергетического барьера, преодолеваемого дефектом. Двухбарьерный процесс разрушения БЛМ в электрическом поле в наших экспериментах четко обнаруживается из значения тангенса угла наклона на кривой зависимо-

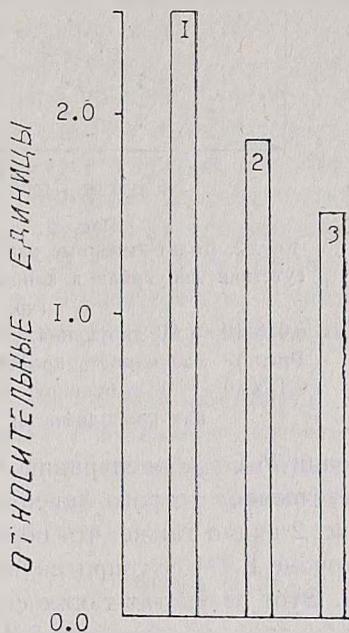


Рис. 1. Средние времена жизни БЛМ в присутствии 10^{-5} М а) дибукаина, б) пропраналола, в) лидокаина.

сти плотности вероятности от τ БЛМ в логарифмических координатах, близкого к 2. Таким образом, одним из факторов стабилизирующего действия МА на структуру БЛМ является появление второго энергетического барьера, природу которого предстоит выяснить.

МА оказывают влияние также и на проводимость БЛМ (данные по проводимости на остальных рисунках относятся только к дибукаину, однако качественно сходные результаты получены и для двух других МА). На рис. 2 представлены вольт-амперные характеристики (ВАХ) БЛМ в контроле (кр. 3) и при добавлении в один или оба отсека камеры дибукаина (кр. 1, 2, 4). ВАХ снимались после полного почернения мембран, а также через 20 мин после добавления МА. Как видно из рис. 2, ВАХ БЛМ как в контроле (3), так и при одностороннем добав-

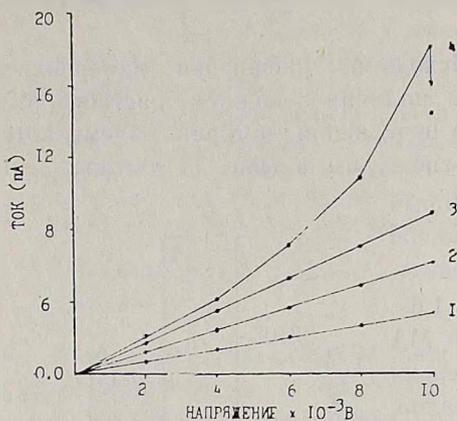


Рис. 2.

Рис. 2. Вольт-амперные характеристики БЛМ в контроле (кр. 3) и в присутствии дибукаина в концентрациях $1,66 \times 10^{-6}$ М (кр. 2), $3,32 \times 10^{-6}$ М (кр. 1), $6,64 \times 10^{-6}$ М (кр. 4).

1—максимальная проводимость, 2—минимальная.

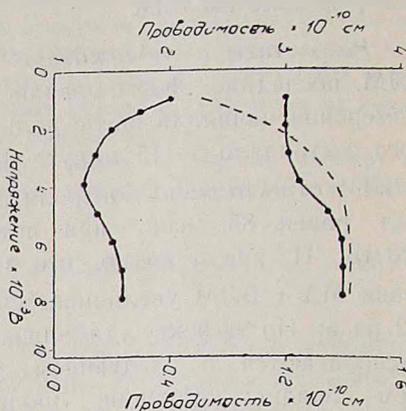


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость проводимости БЛМ от напряжения в присутствии $6,64 \times 10^{-6}$ М дибукаина, 1—максимальная проводимость, 2—минимальная проводимость, 3—дифференциальная проводимость.

лении МА в концентрации $1,66 \times 10^{-6}$ М, $3,32 \times 10^{-6}$ М (кр. 2 и 1 соответственно) строго линейны в пределах напряжений 0—100 мВ. Из рис. 2 видно также, что по мере увеличения концентрации МА на одной стороне БЛМ ее сопротивление увеличивается соответственно в 2 и 4 раза. Этот результат также свидетельствует о стабилизирующем действии дибукаина на структуру БЛМ. Иная картина наблюдается при выравнивании концентраций дибукаина по обе стороны от БЛМ (кр. 4). ВАХ мембраны становится нелинейной и проводимость ее резко возрастает, особенно при высоких напряжениях. На кр. 4 видно, однако, что при напряжении 100 мВ наблюдается резкий скачок проводимости БЛМ в сторону ее уменьшения (указано стрелкой). Если длительно измерять ток через БЛМ при этом напряжении, то проводимость БЛМ будет флуктуировать между двумя дискретными значениями. Этот результат указывает на то, что при данной концентрации дибукаина и данном напряжении в бислое происходят некие структурные изменения, которые обуславливают два значения проводимости. Эксперименты пока-

зали, что они носят необратимый характер. Это подтверждается тем, что если с БЛМ снять напряжение и повторно измерить ВАХ, то указанные флуктуации тока будут наблюдаться уже при более низких напряжениях ~ 40 мВ. При более высоких концентрациях дибукаина, $6,64 \times 10^{-6}$ М, внесенных в водный раствор симметрично к БЛМ, ток имеет сложный характер. На рис. 3 представлены зависимости максимальной, минимальной и дифференциальной проводимости (кр. 2, 1 и 3 соответственно) от напряжения. Видно, что дифференциальная проводимость резко возрастает с увеличением напряжения до 40 мВ и незначительно изменяется при дальнейшем повышении его. Напротив, базовая минимальная проводимость с ростом напряжения до 40 мВ резко уменьшается, а затем несколько увеличивается. Полученные данные указывают на то, что при взаимодействии достаточно низких концентраций МА с БЛМ протекают два процесса—уменьшение базовой проводимости и формирование структур, обеспечивающих высокую проводимость. Эти структуры являются, по-видимому, каналами, параметры которых существенно зависят от величины напряжения на БЛМ.

Уменьшение базовой проводимости БЛМ, по всей вероятности, является результатом конденсации монослоев, обусловленной уменьшением сил электростатического отталкивания между молекулами фосфолипидов в результате нейтрализации катионной формой анестетиков отрицательного поверхностного заряда. Другой процесс—формирование каналоподобных структур—может быть результатом «компарментализации» нейтральных молекул МА, внедрившихся в бислои, и усиления фазового разделения липидов. Такое предположение не лишено основания, поскольку известно, что в липидных мембранах имеются участки сильного и слабого связывания молекул МА [5]. Если учесть, что БЛМ в наших экспериментах формировались из материала с гетерогенным фосфолипидным составом, то допущение о «компарментализации» молекул МА станет более обоснованным.

На основании полученных данных можно сделать следующее заключение: МА оказывают стабилизирующее действие на структуру БЛМ; при низких концентрациях и в симметричных условиях они способны индуцировать каналоподобные структуры, параметры которых существенно зависят от напряжения на БЛМ.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 13.V 1983 г.

ՏԵՂԱՅԻՆ ԱՆՉԳԱՅԱՑՈՒՑԻԶՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՐԹ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆԵՐԻ ՎՐԱ

Լ. Գ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Չ. Կ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ե. Ի. ԿՈՒՐԳԻՆ

Ուսումնասիրվել է տեղային անդալագուցիչների (SU)¹ դիբուկաինի, լիդոկաինի և պրոպրանոլոլի ազդեցությունը երկշերտ լիպիդային մեմբրանների (ԵԼՄ) էլեկտրական դաշտում կայունության և հաղորդականության վրա:

Ցույց է տրվել, որ ուսումնասիրված SU-ները 1.6—2.2 անգամ մեծացնում են ԵԼՄ-ի կյանքի միջին տևողությունը: SU-ի առկայության դեպքում առաջանում է երկրորդ էներգետիկական պատճենը: ԵԼՄ-ի հաղորդականության փոփոխման ուղղությունը կախված է SU-ի խտությունից, ինչպես նաև լարման

մեծությունից և տեղումնությունից: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ *SL*-ները կայունացնում են *blU*-ի կառուցվածքը, սակայն որոշակի պայմաններում երկշերտում առաջացնում են կառուցվածքային փոփոխություններ, որոնք էլ հանգեցնում են իոնային ուղիների առաջացմանն, իսկ վերջիններիս հաղորդականությունը կախված է պոտենցիալից:

THE ACTION OF LOCAL ANAESTHETICS ON THE PLANE PHOSPHOLIPID MEMBRANES

L. G. MIKAEIAN, H. C. CARAPETIAN, E. I. KURGIN

The influence of local anaesthetics (LA) dibucaine, lidocaine and propranolol on the BLM electrical conduction and stability in the electric field has been studied. It has been shown that all the three anaesthetics increase the average lifetime of BLM by 1,6—2,2 times. The value of tangent of dip angle of the dependence of density of probability on the lifetime of BLM in logarithmic coordinates is equal to 1,82, thus indicating the appearance of the second energetic barrier. The direction of BLM conduction change in case of LA application depends on their concentration, the magnitude and duration of the applied potential. The obtained data lead to the conclusion that LA stabilize the BLM structure, whereas under certain conditions they induce structural changes of bilayer, leading to the formation of ion canals, conduction of which is potential-dependent.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аракелян В. Б. Автореф. канд. дисс., М., 1980.
2. Гринфельдт А. Э., Нарцшевичус Э. В. Сб. Биофизика мембран. Мат-лы симп., 2, Каунас, 1972.
3. Итоги науки и техники ВИНТИ. Биофизика мембран, 2, 161, 1981.
4. Ландау М. А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. М., 1981.
5. Boulanger Y., Schreier Sh., Leitch L., Smith L. Canad. J. Biochem., 58, 986, 1980.
6. Feinstein M. B. J. Gen. Physiol., 49, 1043, 1966 (b).
7. Fettiplace et al. In Methods in Membrane biology, N.—Y., 1975.
8. Gutknecht J., Tosteson D. C. J. Gen. Physiol., 55, 359, 1970.
9. Mueller P., Rudin D. In Laboratory Techniques in Membrane Biophysics, Berlin, 1969.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 578.088:547.963.4

ОБЪЕМНЫЙ ЭФФЕКТ В КОМПЛЕКСАХ $Cu(II)$ -БСА

Р. А. АСАТУРЯН

Объемный эффект, возникающий при взаимодействии $Cu(II)$ с бычьим сывороточным альбумином, изучен методом ЯМР (60 МГц). Наблюдаемая зависимость формы спектров ЯМР комплексов $Cu(II)$ —альбумин от концентрации $Cu(II)$ свидетельствует о конформационных изменениях белковой глобулы.

Ключевые слова: контактное взаимодействие, неспаренный электрон, время релаксации.