

մեծությունից և տեղությունից: 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.

При интоксикации живого организма металлами в результате превышения физиологических значений важно понимание механизма их взаимодействия с плазмой крови, основным транспортным белком ее — сывороточным альбумином.

В работе Катца с сотр. [5] микрокардиологическим методом был обнаружен объемный эффект при взаимодействии  $\text{Cu(II)}$  с глобулярными белками — овалбумином и бычьим сывороточным альбумином (БСА): при увеличении концентрации  $\text{Cu(II)}$  наблюдалось увеличение объема БСА. Авторы выдвинули предположение, что наблюдаемый эффект может быть вызван конформационными изменениями БСА, однако никаких экспериментальных доказательств не было представлено.

Цель нашей работы состояла в подтверждении указанного предположения. Для этого нами был применен метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

*Материал и методика.* Использовались лиофильно высушенный препарат БСА Олайнского завода химреактивов и соль  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  марки «чфа».

Комплексы  $\text{Cu(II)}$ -БСА готовились по методике, описанной в работе Бреслоу [4]. Ионная сила составляла 0,16 М  $\text{KCl}$  в 99,8%  $\text{D}_2\text{O}$ . Концентрация БСА —  $1,6 \cdot 10^{-3}$  М. Значения рD раствора измеряли на рН-метре «рН-673». Буферные растворы нами не использовались во избежание образования тройных комплексов:  $\text{Cu(II)}$ -БСА-буфер [4]. Спектры ЯМР комплексов  $\text{Cu(II)}$ -БСА регистрировались при  $34 \pm 1^\circ$  на ЯМР-спектрометре (60 МГц) фирмы «Varian» (США) типа «Т-60».

В качестве внешнего стандарта использовали ТМС (тетраметилсилан).

*Результаты и обсуждение.* На рис. 1 представлены спектры ЯМР БСА («а») и его комплексов с  $\text{Cu(II)}$  при стехиометрии моль  $\text{Cu(II)}$ :

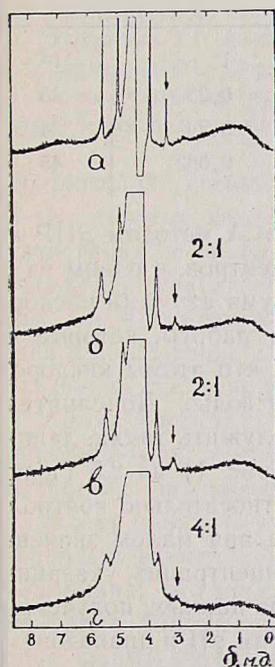


Рис. 1. Спектры ЯМР БСА и его комплексов с  $\text{Cu(II)}$  в 0,16 М  $\text{KCl}$  99,8%  $\text{D}_2\text{O}$  при  $34^\circ$ : а — контроль (БСА), рD=7,58; б — комплексы  $\text{Cu(II)}$ -БСА состава 2:1, рD=7,83; в — комплексы  $\text{Cu(II)}$ -БСА состава 2:1, рD=7,12; г — комплексы  $\text{Cu(II)}$ -БСА состава 4:1, рD=7,48. Стрелки указывают на положение пика боковой полосы сигнала ЯМР от протонов NOD.

моль БСА, равной 2:1 («б») и («в») и 4:1 («г»). В спектре «а» можно выделить две части, одну, связанную с растворителем, другую — с белком. Спектр БСА, связанный с водой, представляет собой центральную

линию от протонов НОД при значении химического сдвига  $\delta$  около 4,5 м. д. В связи с вращением образца (для усреднения неоднородности поля) по обе стороны этого сигнала наблюдаются его боковые полосы, интенсивность которых изменяется по мере добавления  $\text{Cu(II)}$ . В спектре «б» при  $pD=7,83$  и отношении концентрации  $\text{Cu(II)}$  к БСА, равном 2:1, относительная интенсивность пика, отмеченного стрелкой, уменьшается примерно в 4 раза по сравнению с контрольным спектром «а». Такое же уменьшение наблюдается в спектре «в» при  $pD=7,12$  той же стехиометрии. Увеличение этого отношения до 4:1 приводит к дальнейшему уменьшению интенсивности этого пика в 16 раз по сравнению с контролем.

Эти изменения спектров ЯМР наряду со смещением вправо центра спектра ЯМР этих комплексов относительно контроля и уширением сигнала с увеличением концентрации  $\text{Cu(II)}$  (табл.) могут быть обусловлены, на наш взгляд, контактным взаимодействием между магнитным моментом неспаренного электрона атома  $\text{Cu(II)}$  и протонами молекул НОД, приводящим к укорочению времен релаксации протонов молекул НОД [2, 3, 6].

Таблица

Зависимость параметров центральной части спектров ЯМР комплексов  $\text{Cu(II)}$ —БСА от концентрации  $\text{Cu(II)}$  в области нейтральных значений  $pD$

Исследуемый образец в 0,16М КСl, 99,8% D <sub>2</sub> O	Значение $pD$	Моль $\text{Cu(II)}$ : Моль БСА	Смещение центра спектра ЯМР относи- тельно контро- ля, Гц	Относительная интенсивность боковой ком- поненты от протонов НОД	Ширина центральной части спектра ЯМР, Г
БСА — контроль	7,50	0:1	0	1	14
Комплекс $\text{Cu(II)}$ —БСА	7,83	2:1	2,5	0,23	35
Комплекс $\text{Cu(II)}$ —БСА	7,12	2:1	5,3	0,24	34,6
Комплекс $\text{Cu(II)}$ —БСА	7,48	4:1	7,5	0,062	45

Ранее при исследовании комплексов  $\text{Cu(II)}$ —БСА методом ЭПР нами были обнаружены два типа связывающихся центров, в одном из которых  $\text{Cu(II)}$  связан с двумя атомами азота и двумя атомами кислорода [1]. Основываясь на результатах настоящей работы, которые дополняют эти данные, можно однозначно считать, что атомы кислорода в этом типе комплексов принадлежат молекулам воды. Дополнительным основанием для такого утверждения могут служить также данные (табл.) о смещении вправо центра спектра «б» (рис. 1) на 2,5 Гц при  $pD=7,83$  и спектра «в» на 5,3 Гц при  $pD=7,12$  относительно контрольного спектра «а». Увеличение смещения спектра при малом значении  $pD$  можно объяснить тем, что относительная концентрация указанных комплексов, связанных с водой, как это следует из данных, полученных методом ЭПР [1], монотонно уменьшается с ростом  $pH$  в диапазоне от 6,5 до примерно 9,5. В связи с этим увеличение значения этого смещения вправо в спектрах ЯМР с понижением  $pD$  указывает на повышение концентрации этих комплексов.

На рис. 2 представлены спектры ЯМР БСА и его комплексов с  $\text{Cu(II)}$ , не связанных с растворителем, выделенные из рис. 1.

В области поглощения протонов ароматических аминокислот гистидина, тирозина, фенилаланина и триптофана от 6,6 до 7,6 м. д. наблюдаются некоторые изменения при добавлении  $\text{Cu(II)}$  относительно контроля. На этом же рисунке стрелками показаны области поглоще-

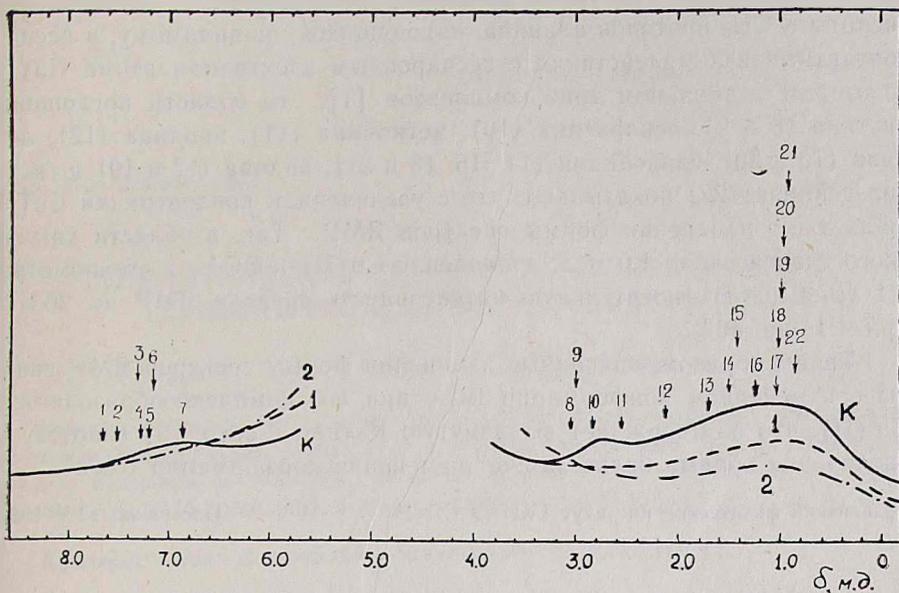


Рис. 2. Спектры ЯМР из рис. 1, наложенные друг на друга, без центральной части, связанной с протонами  $\text{HOD}$ : к—контрольный спектр ЯМР БСА,  $pD=7,58$ ; 1—спектр комплексов  $\text{Cu(II)}$ —БСА при  $pD=7,83$  и стехиометрии 2:1; 2—спектр комплексов  $\text{Cu(II)}$ —БСА при  $pD=7,48$  и стехиометрии 4:1. Стрелками показаны положения химических сдвигов протонов отдельных групп различных аминокислот, не находящихся в контактных и псевдоконтактных взаимодействиях с неспаренным электроном  $\text{Cu(II)}$ .

ния протонов ароматического кольца триптофана (1—5) и тирозина (6—7), которые не находятся в контактных и псевдоконтактных взаимодействиях с неспаренным электроном атома  $\text{Cu(II)}$  [6]. Области поглощения, связанные с гистидином и фенилаланином, нами не показаны, так как атом азота  $\text{N(3)}$  имидазольного кольца гистидина находится в контактном взаимодействии с  $\text{Cu(II)}$  как в первом типе центра связывания, так и во втором [1].

Ароматическое кольцо фенилаланина, занимая положение 19 в аминокислотной последовательности белка (БСА), находится рядом с гистидином (положение 18), связанным с  $\text{Cu(II)}$  [8]. Это, по-видимому, может привести к псевдоконтактному взаимодействию [2] между неспаренным электроном  $\text{Cu(II)}$  и протонами ароматического кольца фенилаланина, что проявится в уширении линий при значениях поглощения фенилаланина около 7,4 м. д. В связи с этим наблюдаемые изменения формы спектров ЯМР в области химических сдвигов от 6,6 до 7,6 м. д. должны быть обусловлены изменением конформации БСА при добавлении  $\text{Cu(II)}$  вблизи триптофановых и тирозиновых аминокислот.

Рассмотрим область поглощения аминокислот БСА при значениях химических сдвигов от 0,9 до 3,0 м.д. Если исключить области поглощения  $\text{CH}_2$  протонов гистидина и аспарагиновой кислоты,  $\text{CH}_3$  протонов треонина, с которыми атомы  $\text{Cu(II)}$  непосредственно образуют стабильные комплексы [7],  $\text{CH}_2$  групп лизина, находящегося вблизи центрального атома  $\text{Cu(II)}$  в этом же типе комплексов [8], а также области поглощения  $\text{CH}_2$  групп аргинина, фенилаланина, глутаминовой кислоты и  $\text{CH}_3$  протонов аланина, находящихся, по-видимому, в псевдо-контактных взаимодействиях с неспаренным электроном атома  $\text{Cu(II)}$  во втором лабильном типе комплексов [1], то области поглощения цистина (8 и 9), аспарагина (10), метионина (11), пролина (12), лейцина (13 и 20), изолейцина (14—16, 18 и 21), валина (17 и 19) и гистидил-лейцина (22) показывают, что с увеличением концентрации  $\text{Cu(II)}$  происходят изменения формы спектров ЯМР. Так, в области химического сдвига около 1,0 м.д. добавление  $\text{Cu(II)}$  к БСА в стехиометрии 2:1 уменьшает относительную интенсивность сигнала ЯМР на 26%, а при 4:1—на 46%.

Таким образом, описанные изменения формы спектров ЯМР связаны с изменением конформации БСА при его комплексообразовании с  $\text{Cu(II)}$ , что подтверждает выдвинутую Катцем с сотр. [5] гипотезу об увеличении объема белка за счет изменения конформации БСА.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 13.V 1983 г.

## ՄԱՎԱԼԱՅԻՆ ԷՖԵԿՏԸ $\text{Cu(II)}$ -ՑՇԱ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐՈՒՄ

Բ. Ա. ԱՍԱՏՈՒՐՅԱՆ

*$\text{Cu(II)}$ -ի և ցլի շիճուկի ալբումինի (ՑՇԱ) փոխազդեցության ժամանակ առաջացող ծավալային էֆեկտն ուսումնասիրվել է ՄՄՌ-ի մեթոդով (60 ՄՀց)  $\text{Cu(II)}$ —ՑՇԱ կոմպլեքսների ՄՄՌ-ի սպեկտրների ձևի նկատվող կախվածությունը  $\text{Cu(II)}$ -ի խտությունից վկայում է սպիտակուցային գլոբուլայի կոնֆորմացիոն փոփոխությունների մասին:*

## VOLUME EFFECT IN $\text{Cu(II)}$ — BSA COMPLEXES

R. A. ASATURIAN

The volume effect arising during the interaction of  $\text{Cu(II)}$  with bovine serum albumin has been studied by the NMR (60 MHz) method. The observed dependence of the NMR spectra shape of  $\text{Cu(II)}$  — albumin complexes on the  $\text{Cu(II)}$  concentration testifies to conformation changes of the protein globule.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асатурян Р. А. Тез. I Всесоюзн. биофиз. съезда, 4, 3, М., 1982.
2. Итон Д. Р., Филиппс В. Д. Ж. структ. химии, 9, 153—183, 1968.

3. Тиеззи Е., Валенсин Д. Биофизика, 21, 401—408, 1976.
4. Breslow E. J. Biol. Chem., 239, 3252—3259, 1964.
5. Katz S., Shinaberry S. G., Heck E. Z., Squire W. Biochem., 19, 3805—3813, 1980.
6. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 85, 3736—3742, 1963.
7. Peters T. Jr., Blumenstock F. A. J. Biol. Chem., 242, 1574—1578, 1967.
8. Shearer W. T., Bradshaw R. A., Gurd F. R. N. J. Biol. Chem., 242, 5451—5459, 1967.

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

УДК 616—073:577.15.087

## АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В РАСТВОРАХ

А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН, Ц. М. АВАКЯН

Описана аналитическая система для определения концентрации  $\beta$ -D-глюкозы в различных биологических растворах с отдельным электронным блоком. Воспроизводимость измерений не ниже 5%, линейный диапазон определяемых концентраций—10—400 мг% (0,55÷22,0 мМ), время отклика— не более 40 сек.

*Ключевые слова:* глюкоза, иммобилизованная глюкозооксидаза.

Глюкоза является самым универсальным источником углерода и энергии для живых организмов. Нарушение ее концентрации в крови обычно свидетельствует о патологическом состоянии организма. Она является также важнейшим компонентом питательных сред при ферментации микроорганизмов. Количество глюкозы в ряде сельскохозяйственных культур влияет на качество изготавливаемых пищевых продуктов. Поэтому понятно, что быстрое и точное определение концентрации глюкозы в биологических растворах крайне актуально. Применяемые в широкой аналитической практике методы ее определения в полной мере не отвечают требованиям быстроты, точности и, что очень важно, специфичности определений, предъявляемых в настоящее время при решении многих задач. Единственным методом, отвечающим требованиям высокой специфичности и точности измерений, является ферментативный метод определения концентрации глюкозы [1]. Однако широкому распространению его до недавнего времени препятствовала неэкономичность проводимого анализа, связанная с невозможностью многократного использования фермента.

Методы иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях, разработанные в последние два десятилетия, позволили преодолеть эти трудности. Были созданы аналитические системы для полуавтоматического и автоматического определения концентрации глюкозы [3—5]. Использование различных ферментов в таких системах позволяет определять концентрации целого ряда органических веществ в многокомпо-