

стояния в активное. Результаты настоящей работы позволяют сделать вывод, что структурный переход хроматина в активированное состояние может определяться в ходе его сборки на синтезирующейся клетке цедометилированной ДНК. Исследование белкового состава хроматина, сформированного на цедометилированной ДНК, может пролить свет на причины аномалий в его структуре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурьянов Я. Н., Кирьянов Г. Н. Итоги науки и техники, серия «Молекулярная биология», М., 23, 1987.
2. Ванюшин Б. Ф. Успехи совр. биологии, 77, 68—90, 1974.
3. Кирьянов Г. Н., Смирнова Т. А., Исеева Л. В., Ванюшин Б. Ф., Бурьянов Я. Н. Биохимия, 46, 1487—1495, 1991.
4. Кирьянов Г. Н., Смирнова Т. А., Маналимян Т. А., Ходосовская А. М. Биохимия, 52, 11, 1855—1863, 1987.
5. Кирьянов Г. Н., Смирнова Т. А., Маналимян Т. А., Ходосовская А. М. Биохимия, 52, 12, 983—990, 1987.
6. Ходосовская А. М., Исеева Л. В., Смирнова Т. А., Маналимян Т. А., Кирьянов Г. Н., Ванюшин Б. Ф. Изв. АН СССР, сер. биол., 268—275, М., 1986.
7. Hildebrand C. E., Walters R. A. Biochem., Biophys. Res. Commun., 72, 1—4, 1976.
8. Jones P. A., Taylor S. M. Nucl. Acids Res., 9, 2941—2947, 1981.
9. Kuo M., Mandel J., Chambon P. Nucl. Acids Res., 7, 2111—2114, 1979.
10. Mandel J. L., Chambon P. Nucl. Acids Res., 7, 2081—2103, 1979.
11. Taylor U., Guntaka R. V., Erlinger B. F., Miller O. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 435—440, 1981.

Поступило 3.II 1988 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 539.263 + 546.562 + 386.543.253

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ (II) С ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ МЕТОДОМ ЭПР

Р. А. АСАТУРЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР, лаборатория радиационной биологии

Методом ЭПР изучали комплексобразование между медью (II) и глутаминовой кислотой в связи с известной по данным литературы противоопухолевой активностью их на штаммах саркомы S-37 животных. В зависимости от pH выделены и идентифицированы три типа комплексов, два из которых лабильны, а третий стабилен при нейтральных и щелочных значениях pH. Противоопухолевой активностью могут обладать и основном комплексе типа III. Высказывается предположение, что применение метода EXAFS спектроскопии при изучении структуры этих комплексов позволит непосредственно наблюдать эффект Яна-Теллера.

ЭПР-ի մեթոդով ուսումնասիրվել է պղնձի (II) և գլուտամինաթթվի կոմպլեքսագոյացումը, որը համաձայն գրականության տվյալների, ցուցաբերում է հակառակուսյան ակտիվություն սարկոմա S-37 շտամով ուռուցքաիրի կենդանիների համար:

pH-ից կախված սահմանվել է որոշվել են կոմպլեքսների էներգիայի, որոշվել էրկար շարժունակ էն, իսկ էրրորդը կալուն է՝ pH-ի ընդարձակ հատվածների շնորհիվ:

Հակառակորդային ակտիվությունը կարող է օժտված լինել հիմնականում երրորդ փուլի կոմպլեքսը: Ենթադրվում է, որ EXAFS սպեկտրոսկոպիայի մեթոդի կիրառումը այդ կոմպլեքսների կառուցվածքի ուսումնասիրության համար հնարավորություն կտա անմիջականորեն դիտել Յան-Քելլերի էֆեկտը:

The formation of copper (II)—glutamic acid complexes has been studied by the ESR method in connection with the literature data on their antitumour activity on animal tumour strains of sarkoma S—37. Depending on pH there have been extracted and identified three types of complexes, two of which are labile and the third one is stable with pH being neutral and alkaline. Antitumour activity can have mainly complexes of type 3. It is presumed that the study of the structure of these complexes by the method of EXAFS spectroscopy will allow to observe directly the Jahn—Teller effect.

EXAFS спектроскопия—*g-тензор—суперсверхтонкая структура спектров ЭПР—эффект Яна-Теллера*

Известно [16], что некоторые комплексные соединения платины, в частности, $\text{cis-Pl}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, обладают противоопухолевыми свойствами. Однако сильное побочное действие—почечная недостаточность—ограничивает их применение. Поиски новых противоопухолевых средств с менее выраженными побочными действиями привели к синтезу комплексов меди (II) с фенилантрапиновой кислотой и ее производными [4, 5, 10], а также с аминокислотами [6—8]. Координационным соединением меди (II) с α -аминокислотами придается большое значение, так как они, являясь липидорастворимыми, могут транспортировать медь (II) через плазматическую и другие мембраны [7, 9]. Кроме того, эти комплексы являются модельными системами для большинства активных центров медьсодержащих белков и ферментов [7]. В работе [6] представлены данные о противоопухолевой активности комплексов меди (II) с глутаминовой кислотой на штаммах саркомы S-37 животных, вызывающих торможение роста опухоли на 40—60%. Механизм этого эффекта неясен. Для понимания функции этих комплексов важно изучить их структуру. Первый шаг в этом направлении сделан [3] при теоретическом изучении электронной структуры комплексных соединений меди (II) с α -аминокислотами.

Целью наших исследований являлось изучение методом ЭПР структуры комплексов меди (II) с глутаминовой кислотой и применение затем метода EXAFS спектроскопии для получения структурных параметров этих комплексов, как это было сделано нами для комплексов медь (II)—альбумин [11, 12].

Материал и методика. Использовали L-глутаминовую кислоту («Reanal», Венгрия) «4» и соль $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ «чда». Исходный раствор меди (II) готовили в смеси диетилат: метанол с объемной стехиометрией 1:1 и концентрацией 5 мМ. Комплексы готовили при 50° на магнитной мешалке и имели молярную стехиометрию медь (II): глутаминовая кислота, 1:2.

Измерения pH проводили на стандартном pH-метре типа pH-673 с ошибкой измерения ± 0.025 , откалиброванном по стандартным буферным растворам. Буферные

растворы для исходных комплексов не использовали во избежание комплексообразования меди (II) с компонентами буфера. Необходимые значения pH получали добавлением малых количеств 0,1 N HCl и 0,6 N NaOH.

Спектры ЭПР регистрировали на ЭПР спектрометре «Varian»-E-4 при комнатной температуре и -190° .

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены спектры ЭПР при комнатной температуре (спектры а, б, в, г, д, е) и при -190° (спектры а', б', в', г', д', е') комплексов меди (II) с глутаминовой кислотой при различных значениях pH. При pH меньше изоэлектрической точки глутаминовой кислоты (pI 3,08), равном 2,2 (спектр а), наблюдается синглетный спектр шириной около 14,0 мТ.

На первый взгляд можно предположить, что это сигнал гидратированной меди (II). Однако запись этого же образца при -190° (спектр а') показывает присутствие четырех компонент СТС (отмечены цифрами 1, 2, 3 и 4) с величиной $A_{\parallel} = 11,2 \pm 0,1$ мТ и значениями $g_{\parallel} = 2,427 \pm$

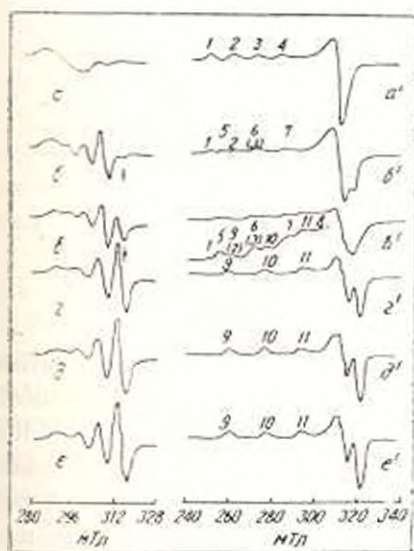


Рис. 1.

Фиг. 1. Спектры ЭПР комплексов меди (II)-глутаминовая кислота при комнатной температуре (спектры а, б, в, г, д, е) и -190° (спектры а', б', в', г', д', е'). Значения pH: а, а'—2,2; б, б'—3,6; в, в'—5,1; г, г'—7,5; д, д'—10,4; е, е'—12,5. Цифры над спектрами указывают на компоненты сверхтонкой структуры. Часть спектра а' повторно записана при усилении в 4 раза больше. Стрелки под спектрами б и в указывают на компоненту спектра, которая растет с увеличением pH.

Рис. 2. Значения g-тензоров комплексов меди (II)-глутаминовая кислота для I, II и III типов комплексов в зависимости от pH.

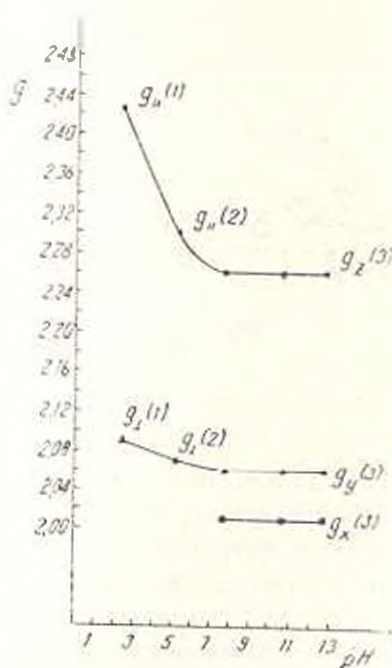


Рис. 2.

0,001 и $g_{\perp} = 2,094 \pm 0,001$ (рис. 2). Расщепление компонент СТС в области магнитного поля, когда ось комплексов меди (II)-глутаминовая кислота параллельна направлению магнитного поля, указывает на иммобилизацию меди (II). На это указывает также запись того же рас-

творя при комнатной температуре, в спектре которого (спектр *а*) виден пик в области магнитного поля 312 мТ, связанный с незначительной иммобилизацией меди (II) глутаминовой кислотой. Эта точка зрения подтверждается и малой величиной константы СТС, равной 11,2 мТ, и большими значениями $g_{\parallel} = 2,427 \pm 0,001$ и $g_{\perp} = 2,094 \pm 0,001$ (рис. 2). В соответствии с данными работы [14] по исследованию комплексов кобальт (II)—гистидин методом ЯМР авторы при значении pH, равном 1, когда изоэлектрическая точка гистидина равна 7,6, считают, что кобальт (II) наряду с пятью лигандными молекулами воды должен быть координирован с атомом кислорода карбоксильной группы в качестве шестого лиганда. Кроме того, учитывая приведенный в этой же работе эмпирический ряд, в соответствии с которым кобальт (II) с ростом pH вначале предпочитает связываться с молекулами воды, а затем, по мере роста pH, с карбоксильными и аминными группами, можно считать, что при pH ниже изоэлектрической точки глутаминовая кислота координирована с медью карбоксильной группой в аксиальном положении (рис. 3а). Обозначим их в виде комплексов типа I.

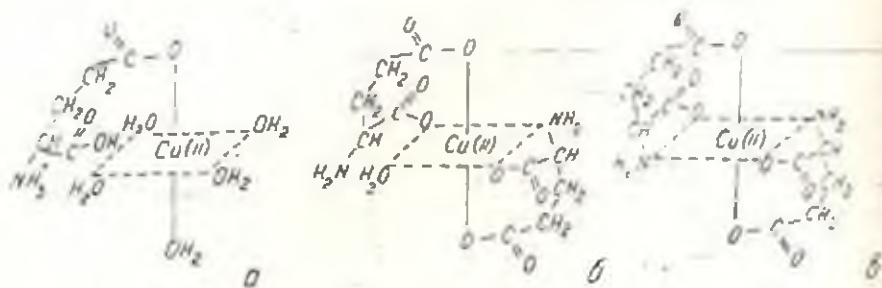


Рис. 3. Схематические структуры комплексов меди (II)—глутаминовой кислоты: а—комплекс типа I, б—типа II, в—типа III.

При дальнейшем повышении pH в спектре ЭПР при комнатной температуре (спектр *б*) появляется сверхтонкая структура с величиной изотропного сверхтонкого взаимодействия, равной 5,7 мТ. При -190° спектр *б'* этого же раствора изменяется таким образом, что компоненты СТС 1 и 2 комплексов типа I уменьшаются и, наряду с ними, появляются компоненты СТС—5,6 и 7. Кроме того, в области магнитного поля около 320 мТ появляется дополнительный пик. Такое изменение спектров говорит о том, что при увеличении pH от 2,2 до 3,6 появляется другой тип комплексов наряду с комплексами типа I, причем соотношение их концентраций примерно равное.

При повышении pH до 5,1 в спектре при комнатной температуре происходят резкие изменения: сильно увеличивается интенсивность правой крайней компоненты (она отмечена на спектрах стрелкой), на которой появляется суперсверхтонкая структура из трех компонент с величиной расщепления $1,0 \pm 0,05$ мТ (число компонент и величину расщепления удалось обнаружить в специальных условиях записи спектров ЭПР). Значение изотропного g-фактора равно 2,114, а изотропное сверхтонкое расщепление равно $6,0 \pm 0,05$ мТ. Запись этого же раствора при -190° (спектр *в'*) показывает полную трансформацию предыдущего спектра

б'. Запись сигнала ЭПР в области, когда ось комплекса параллельна направлению внешнего магнитного поля при большем усилении, показала, что в спектре а' наблюдаются компоненты СТС от трех типов центров: соотношение между их концентрациями таково, что максимальную из них имеет центр, у которого компоненты СТС имеют номера 5, 6, 7 и 8; компоненты СТС с номерами 9, 10 и 11 и тем более 1, 2 и 3 имеют явно меньшую интенсивность. В связи со сказанным в спектр а' основной вклад вносит новый тип комплексов с компонентами СТС 5, 6, 7 и 8.

Значение A_1 этого типа комплексов (тип II) равно уже 15,7 мТ. В перпендикулярной ориентации комплексов наблюдается суперсверхтонкая структура тоже из трех компонент с величиной расщепления $A_1 = 2,3 \pm 0,1$ мТ. Спектр имеет аксиальную симметрию с $g_{\parallel} = 2,313 \pm 0,001$ и $g_{\perp} = 2,074 \pm 0,001$ (рис. 2). Увеличение константы СТС до 16,7 мТ, уменьшение $g_{\parallel}$ от 2,427 до 2,313 и $g_{\perp}$ от 2,094 до 2,074 (рис. 2), а также число суперсверхтонких компонент как в изотропном спектре при комнатной температуре, так и в перпендикулярной ориентации при -190° указывают на такую структуру, в которой один из экваториальных лигандов должен быть атомом азота. Кроме того, в соответствии с требованиями упомянутого выше эмпирического ряда при данных значениях pH медь (II) должна связываться с большим количеством карбоксильных групп, чем с молекулами воды. Учитывая, что данная структура комплексов медь (II) — глутаминовая кислота должна быть не очень стабильной, так как она сохраняется в очень малом интервале значений pH (от 4 до 5), мы можем предложить структуру комплексов типа II в виде, приведенном на рис. 3б.

Дальнейшее увеличение pH до 7,5 приводит к полной трансформации спектров как при комнатной температуре (спектр а), так и при -190° (спектр а'). При комнатной температуре резко изменяется соотношение между компонентами сверхтонкой структуры, возникающей в результате взаимодействия неспаренного электрона атома меди (II) со своим ядром ($I = 3/2$): происходит их уширение с уменьшением магнитного поля. Причины этого явления были рассмотрены Мак Коннели еще в 1956 г. [15].

Детальная запись спектра ЭПР в специальных условиях показала, что на самой интенсивной компоненте СТС появилась суперсверхтонкая структура из 5 компонент с величиной расщепления $1,05 \pm 0,05$ мТ. Кроме того, увеличилась изотропная константа сверхтонкого взаимодействия от 6,0 мТ до 6,9 мТ и изменилось значение изотропного g-фактора от 2,114 до $2,125 \pm 0,001$.

В спектре ЭПР этого же раствора при -190° присутствуют в основном компоненты СТС с номерами 9, 10 и 11. В области магнитного поля несколько больше 320 мТ появилась дополнительная компонента, свидетельствующая о анизотропии g-тензора по осям x и y. Значение константы СТС в параллельной ориентации ($A_{\parallel}$) увеличилось от $15,7 \pm 0,1$ до $17,0 \pm 0,1$ мТ, а значение $g_{\parallel}$ уменьшилось от $2,313 \pm 0,001$ до $2,261 \pm 0,001$, что указывает на рост лигандного поля (рис. 2). Анизотропные значения g-тензора по осям x и y имеют значения: $g_x = 2,011$ —

0,001 и $g_{\parallel} = 2,062 \pm 0,002$ (рис. 2). В перпендикулярной ориентации комплексов медь (II) — глутаминовая кислота, то есть когда ось комплексов перпендикулярна внешнему магнитному полю, наблюдается 5 суперсверхтонких компонент спектра с величиной расщепления $A_{\perp} = 1,1 \pm 0,1$ мТ. Эта величина примерно в два раза меньше, чем $A_{\parallel}$ для комплексов типа 2, для которых $A_{\parallel} = 2,3 \pm 0,1$ мТ.

Эти данные, наряду с количеством компонент суперсверхтонкой структуры, позволяют однозначно считать, что спектры α и α' должны соответствовать таким комплексам медь (II) — глутаминовая кислота, в которых медь (II) взаимодействует с двумя эквивалентными аминными группами этой кислоты.

Такое предположение подтверждается также требованием эмпирического ряда работы [14], в соответствии с которым с ростом pH медь (II) должна предпочитать связываться с аминной группой больше, чем с карбоксильной и тем более с молекулами воды. Кроме того, повышение pH от 7,5 до 12,5, как это видно из спектров $\alpha, \alpha', \delta, \delta', \epsilon, \epsilon'$ (рис. 1), приводит к увеличению концентрации этих комплексов, т. е. в диапазоне pH, когда концентрация ионов водорода увеличивается в 100 000 раз, никаких изменений в структуре этих комплексов не происходит. Это говорит о том, что в этом диапазоне pH должны образовываться очень устойчивые и стабильные комплексы типа III, что, по-видимому, связано с необходимостью принимать состояние с минимальной энергией. Для сравнения комплексы типа I и II являются очень нестабильными, так как они сохраняются в очень малых интервалах значений pH (рис. 2).

Таким образом, требования стабильности к предполагаемой структуре комплексов типа III, эквивалентного взаимодействия с двумя симметричными атомами азота двух аминных групп, которые должны находиться в экваториальной плоскости, а также требование эмпирического ряда [14] позволяют считать, что структура комплексов типа III имеет вид, представленный на рис. 3в.

Противоопухолевая активность комплексов медь (II) — глутаминовая кислота при нейтральных значениях pH в отношении различных штаммов перевиваемых клеток саркомы S-37 (на 40—60% торможение роста опухоли) [6] должна быть обусловлена, на наш взгляд, активностью только комплексов типа III, так как комплексы типа I и II нестабильны и существуют лишь при кислых значениях pH.

Можно предположить, что комплексы типа III являются «ловушками» свободных супероксидных радикалов, находящихся в избытке в раковых клетках [13], чем и может быть обусловлена их противоопухолевая активность.

Анализ спектров ЭПР α' и α'' (рис. 1) при низкой температуре показывает, что произошло превращение спектра α' с аксиальной симметрией окружения в спектр α'' с ромбической симметрией окружения, т. е. симметрия окружения понизилась с повышением pH от 5,1 до 7,5. Такой конфигурационный переход, на наш взгляд, должен быть обусловлен «динамическим эффектом Яна-Теллера» [1, 2], приводящими октаэдрические комплексы меди (II) к тетрагональному искажению из-за

увеличения расстояния между аксиальными лигандными атомами кислорода двух симметричных карбоксильных групп по вертикальной оси Z и центральным атомом меди (II).

Такой эффект Яна-Теллера можно прямо наблюдать методом EXAFS спектроскопии [12] с использованием синхротронного излучения накопителя электронов на комплексах типа III.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альтшулер С. А., Козырев Б. М. Электронный парамагнитный резонанс соединений элементов промежуточных групп, М., 1972.
2. Берсухер И. Б. Эффект Яна-Теллера и вибрарные взаимодействия в современной химии. М., 1987.
3. Будников С. С., Дону С. В., Чапурина А. Ф., Берсухер И. Б., Дьяков Н. А. Тез. докл. XV Всесоюзн. Чугаевск. совещ. по химии комплексных соединений, 3—5 сент., 212, Киев, 1985.
4. Крист Е. Е., Григорьева А. С., Яцимирский К. Б. Журн. неорг. химии, 21, 175—181, 1976.
5. Крист Е. Е., Гарничкая О. Г., Григорьева А. С., Коханович Н. Ф., Петренко Е. С., Филалов Ю. А. Хим.-фармац. журн., 17, 567—571, 1983.
6. Низова Н. А., Антошина Г. М., Краснов В. П., Алексеева Л. В. Тез. докл. XV Всесоюзн. Чугаевск. совещ. по химии комплексных соединений, 3—5 сент., 451, Киев, 1985.
7. Трешакина Е. М., Коновалова Л. Л., Преснов М. А., Чапурина А. Ф., Белачук Н. Н., Дьяков Н. А. Докл. АН СССР, 248, 1273—1275, 1979.
8. Чапурина А. Ф., Дьяков Н. А., Дону С. В., Будников С. С. Проблемы современной бионеорганической химии, Новосибирск, 1986.
9. Яцимирский К. Б. Теор. экстер. химии, 13, 643—647, 1982.
10. Яцимирский К. Б., Крист Е. Е., Григорьева А. С. Докл. АН СССР, 221, 153—156, 1975.
11. Asaturian R. A. Gen. Physiol. Biophys., 5, 105—108, 1985.
12. Asaturian R. A., Avakian Ts. M., Ershov V. P., Agayan A. L., Kostan M. A. J. Physique, 47, C8—1245—1249, 1986.
13. Georgieff K. K. Science, 173, 137—139, 1971.
14. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 85, 3736—3742, 1963.
15. McConnell H. I. Chem. Phys., 25, 749—751, 1967.
16. Rosenberg B., Camp L. V., Troxen J. E., Mansour V. N. Nature, 222, 385—386, 1969.

Поступило 22.VII 1987 г.

Биол. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 591.813:612.013

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫХ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНА

Э. С. ГЕВОРКЯН, Ж. В. ЯВРОЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Изучен белковый состав ядерных мембран, фракции поровых комплексов и ядерного матрикса клеток печени крыс при воздействии гидрокортизона. Более существенные изменения в белковом составе наблюдаются во фракции поровых комплексов и ядерном матриксе. Примечательно, что гидрокортизон вызывает уменьшение содержания средней полосы ламин-