

Л. И. БОГУСЛАВСКИЙ, С. Т. МЕТЕЛЬСКИЙ

К ИЗУЧЕНИЮ ЛИМИТИРУЮЩЕЙ СТАДИИ В МЕХАНИЗМЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ИОНОВ ВОДОРОДА ЧЕРЕЗ БИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

(Представлено академиком А. Н. Фрумкиным 22 X 1970)

Механизм проницаемости бислойных липидных мембран, предполагающий эстафету⁽¹⁾ или переносчики⁽²⁾, учитывает, что на границе раздела липид — вода протекают поверхностные реакции с участием заряженных частиц. Сохранение равновесия при наложении поля лежит в основе обеих теорий. В ряде работ наблюдались⁽³⁾ и делались попытки объяснить⁽⁴⁾ различную форму вольтамперных кривых на биомолекулярных

липидных мембранах (б. л. м.), а система двух несмешивающихся жидкостей уже давно исследовалась для моделирования проницаемости набивных мембран⁽⁵⁾. В на-

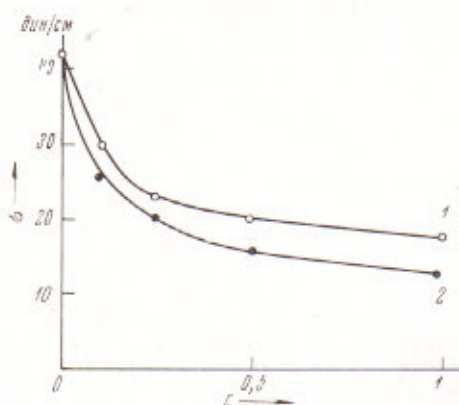


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость межфазного натяжения системы гептан — цитратнофосфатный буфер от концентрации лецитина и холестерина в гептановой фазе при pH водной фазы 2,0 (1) и 12,0 (2). (Единица на оси абсцисс соответствует 5 мМ концентрации лецитина и 2 мМ концентрации холестерина)

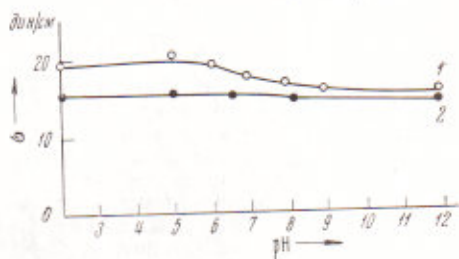


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость межфазного натяжения от pH водной фазы. Без ТФБ (1), концентрация ТФБ $2,6 \cdot 10^{-4}$ М (2)

стоящей работе с целью выяснения условий равновесия на границе раздела мембрана — электролит было исследовано поверхностное натяжение системы двух несмешивающихся жидкостей — воды и гептана, при протекании тока через границу раздела фаз; результаты сопоставлены с импедансными измерениями^(6,7) и вольтамперными характеристиками.

Межфазное натяжение границы раздела двух жидкостей изучалось методом измерения объема отрывающейся капли. Более тяжелая жидкость ($d = 1,02$ г/см³), представляющая собой цитратно-фосфатный буфер (0,1 М $C_6H_5O_7$, 0,2 М Na_2HPO_4), через тefлоновый капилляр ($r = 3,6 \cdot 10^{-3}$ см) выдавливалась в более легкую ($d = 0,622$ г/см³), представляющую собой гептановый раствор яичного лецитина и холестерина. Время жизни капли составляло от 2 до 7 мин. Конечное значение σ вычислялось с учетом поправок на форму капли⁽⁸⁾. Все растворы приготавливались на монодистиллате из солей марки ч.д.а. Лецитин фирмы «Мегк» и холестерин растворялись в гептане марки «эталонный», pH раствора регулировалось добавлением HCl и NaOH. Перед измерением система гептановый раствор — водная фаза выдерживалась в течение суток.

Бимолекулярные липидные мембраны получались из смеси лецитина и холестерина (9). Температура ячейки поддерживалась термостатом равной 20°. Импедансные измерения проведены на установке, описанной в (7).

На рис. 1 представлены кривые, послужившие основой для выбора рабочей концентрации лецитина и холестерина при изучении межфазного

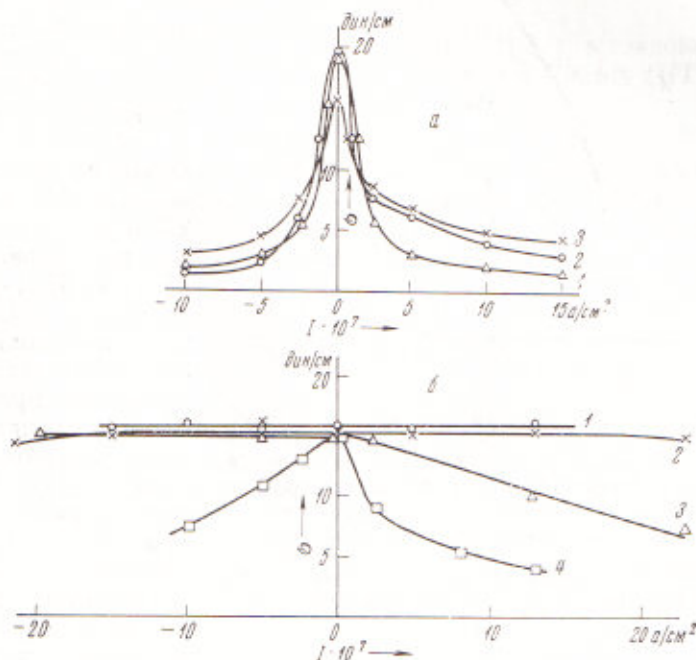


Рис. 3. Зависимость формы $\sigma - I$ -кривых (где I — ток, протекающий через границу раздела) от pH водной фазы. *a* — без ТФБ: 1 — pH 2,0, 2 — pH 5,9, 3 — pH 12,0; *b* — концентрация ТФБ в гептане $2,6 \cdot 10^{-4}$ M: 1 — pH 2,0, 2 — pH 5,2, 3 — pH 8,2, 4 — pH 12,0

натяжения системы гептан — буфер. Концентрация, равная единице, соответствует содержанию 5 мМ и 2 мМ лецитина и холестерина соответственно. Кривые 1 и 2, соответствующие pH 2 и pH 12, обнаруживают участки со слабой зависимостью межфазного натяжения от концентрации липидов. В этой области ошибка в определении концентрации лецитина и холестерина мало влияет на поверхностное натяжение и предполагается, что поверхность покрыта монослоем липидов.

Как видно из рис. 2, добавление разбавителя окислительного фосфорилирования ТФБ (тетрахлортрифторбензимидазол) мало влияет на поверхностное натяжение системы при pH > 9. Разбавитель сглаживает зависимость σ от pH раствора, снижая поверхностное натяжение при pH < 9. Было исследовано влияние внешнего поля на межфазное натяжение. Поскольку неизвестно распределение потенциала на границе раздела фаз гептан — вода, изменение поверхностного натяжения откладывалось в зависимости от тока, текущего через границу раздела. На рис. 3 приведены кривые $\sigma - I$ для различных pH. За положительное направление тока выбран ток, при котором плюс батареи подан на каплю (водная фаза). Во всех трех кривых σ максимально при токе, равном нулю. При токе, равном $3 \cdot 10^{-7}$ а/см², σ для кривой 1 падает в 4 раза по сравнению с максимальным значением поверхностного натяжения.

При добавлении ТФБ в концентрации $2,6 \cdot 10^{-4}$ M при pH 2 в рассматриваемом диапазоне токов межфазное натяжение не зависит от тока (рис. 3б, 1). В щелочной области зависимость σ от I сохраняется.

Величина граничного сопротивления (рис. 4) получена как разность обратных величин проводимости б. л. м. на постоянном токе и при частоте 5 кгц. На постоянном токе сопротивление мембраны равно сумме сопротивлений ее границ и объема, а при 5 кгц сопротивление мембраны определяется сопротивлением только ее объема (3). Вольтамперные кривые получены на б. л. м. при рН 2,3 и рН 10,6 (рис. 4Б) в присутствии $5 \cdot 10^{-7}$ М ТФБ. Рис. 4Б иллюстрирует суперлинейную зависимость тока от приложенного напряжения при рН 2,3. Функциональная зависимость подчиняется закону $J \sim V^{1/2}$. При подщелачивании $J - V$ кривая переходит в кривую с насыщением.

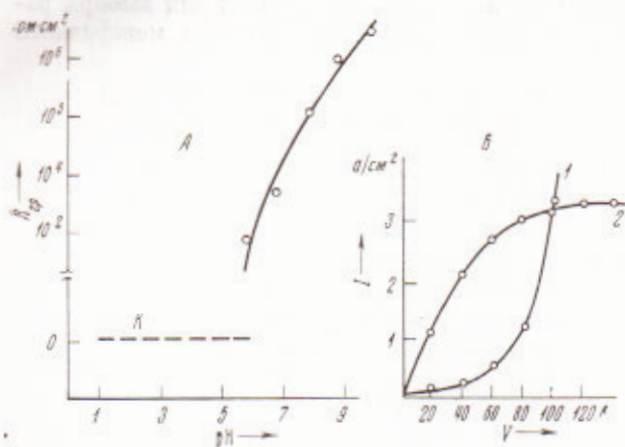


Рис. 4. Электрические характеристики б. л. м. в присутствии $5 \cdot 10^{-7}$ М ТФБ при различных рН раствора. А — сопротивление границы раздела б. л. м. с водной фазой. 0,2 М Na_2HPO_4 + 0,1 М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ + 1 М NaCl при разных рН раствора. К — область рН, где импеданс б. л. м. не зависит от частоты. Б — вольтамперные характеристики б. л. м. Водная фаза. 0,2 М Na_2HPO_4 + 0,1 М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ + 0,2 М NaCl . рН 2,3 (одно деление оси ординат 10^{-9}) (1), рН 10,6 (одно деление оси ординат 10^{-9}) (2)

Лецитин несет как положительные (у атома азота), так и отрицательные (на фосфатных группах) заряды. Амфотерность в свойствах приводит к тому, что поверхностное натяжение σ слабо зависит от рН раствора. Некоторое снижение σ при рН > 6 свидетельствует о накоплении на поверхности позитивных отрицательно заряженных фосфатных групп (рис. 2, 1). При добавлении в систему ТФБ σ перестает зависеть от рН раствора (рис. 2, 2). В щелочной области (рН > 9) ТФБ, существующий в виде аниона T^- , не адсорбируется и не изменяет σ . При рН < 9 адсорбция молекул ТФБ — (ТН) приводит к некоторому снижению σ .

Следующая серия опытов включала измерение поверхностного натяжения системы гептан — вода при наложении внешнего поля. Невозможно определить истинное значение скачка потенциала для каждого значения σ , поэтому на рис. 3а σ представлено как функция тока, текущего через систему. Поскольку использованные фосфолипиды нерастворимы в воде, наложение внешнего поля не может влиять на перераспределение этих макромолекул между двумя фазами (4). Наложение поля сводится к некоторой конформации молекул фосфолипида, что приводит к соответствующему сдвигу групп, несущих заряд. Картина становится совершенно иной, если в систему добавляется вещество (в данном случае ТФБ), растворимое и в водной, и в гептановой фазе (рис. 3б). При рН 12, когда ТФБ существует в виде аниона, который не адсорбируется на поверхности (рис. 2), уменьшение σ с ростом тока почти также значительно, как и в системе без ТФБ, хотя природа этого эффекта иная (рис. 3а, 3, рис. 3б, 4). Вызванные полем концентрационные изменения должны происходить более медленно, чем конформация лецитина, что и замечено в эксперименте. Время установления стационарного значения σ в присутствии ТФБ, по крайней мере, в три раза больше, чем в опытах с системой без примеси разбавителя. При рН 2 (рис. 3б, 1) поверхностное натяжение не зависит от приложенного напряжения. В этих условиях основная часть ТФБ находится в гептане в недиссоциированной форме. При наложении отрицательной поляризации

на водную фазу анионы ТФБ, существующие преимущественно в водной фазе, выталкиваются в гептан. Пропускание тока не вызывает изменения суммы зарядов на границе раздела вследствие того, что убыль (T^-)



компенсируется за счет дополнительной диссоциации молекул ТФБ:



так, что коэффициент распределения $\gamma = [T^-] / (T^-)$, а следовательно, и скачок потенциала на границе раздела не меняется. Расход (HT) компенсируется за счет реакции



Особенности границы раздела гептан — вода в рассматриваемых различных условиях можно сопоставить с импедансными измерениями на б. л. м., проведенными в работе (2). В кислой области при $pH < pK_{ТФБ}$ высокочастотная и низкочастотная кривые совпадают, что свидетельствует о том, что не поверхность, а объем лимитирует ток через мембрану. В модельной системе гептан — вода при тех же pH раствора (рис. 3б, 1) пропускаемый ток не сдвигает равновесия на границе раздела: σ не зависит от J .

Если $pH > pK_{ТФБ}$ 5,9, то зависимость $\sigma - J$ уже не представляет собой прямой, параллельной оси абсцисс. Равновесие на границе нарушается вследствие замедленности одной из стадий поверхностной реакции. На импедансных кривых (3) в этих условиях появляется дисперсия емкости и проводимости, что свидетельствует о том, что переход заряженных частиц через границу раздела становится лимитирующим процессом. В количественном виде замедленность поверхностной реакции может быть выражена зависимостью от pH раствора граничного сопротивления $R_{гг}$ мембраны, что просто вычисляется (7) из дисперсионных кривых (рис. 4а). В том случае, когда ток лимитируется подвижностью ионов T^- , наблюдается разгибающаяся вольтамперная характеристика (рис. 4б). Отклонения от закона Ома могут быть связаны в данном случае с изменением подвижности в сильном поле внутри мембраны ионов T^- . Если лимитирует поверхностная стадия, то вольтамперные кривые обнаруживают участки с насыщением, которые, возможно свидетельствуют о замедленности реакции (2) или доставки дефицитного иона к границе раздела.

Таким образом, при исследовании проницаемости б. л. м. в присутствии ТФБ установлено, что в кислой области ($pH < 5,9$) лимитирующей стадией является движение заряженных частиц внутри мембраны, а проходящий через границу раздела ток не приводит к изменению поверхностного натяжения, так как не меняется поверхностная концентрация частиц T^- и HT , от которых зависит поверхностное натяжение. В щелочной области переход зарядов через границу раздела становится лимитирующим процессом в б. л. м. Исследование отдельно границы раздела водной фазы с липидом приводит к выводу, что этот лимитирующий процесс сопровождается накоплением заряда на границе раздела, возможно, в виде ионов T^- .

Институт электрохимии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
6 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Маркин, Мол. биол., 3, 610 (1969). ² Ю. А. Чизмаджев, В. С. Маркин, Р. Н. Куклин, Биофизика, 16, № 3 (1971). ³ Е. А. Либерман, А. В. Бабков, Биофизика, 13, 362 (1968). ⁴ Le Blan, Biochim. et biophys. acta, 193, 350 (1969). ⁵ R. Bentnev, Phys. Chemistry of Living Tissues and Life Processes as Studies by Artificial Imitation of their Single Phases, Baltimore, 1933. ⁶ А. В. Лебедев, Л. И. Богуславский, ДАН, 189, 1122 (1969). ⁷ А. В. Лебедев, Л. И. Богуславский, Биофизика, 16, 221 (1971). ⁸ Вайсбергер, Физ. методы орг. химии, 1, ИЛ, 1950. ⁹ H. T. Tien, L. Diana, Chem. and Phys. Lipids, 2, 55 (1968). ¹⁰ M. Blank, S. Feig, Science, 141, 1173 (1963).

* Круглые скобки означают нахождение молекул в водной фазе, квадратные — в гептановой фазе.