

УДК 576.8.094.7

БИОФИЗИКА

Г. М. КОЛЕСОВА, Л. И. БОГУСЛАВСКИЙ, Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗОБЩИТЕЛЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ПЕНТАХЛОРФЕНОЛА С ЛЕЦИТИНОМ

(Представлено академиком А. Н. Фрумкин 24 X 1972)

На митохондриях и бислойных липидных мембранах (б.л.м.) было показано, что действие пентахлорфенола (ПХФ) тесно связано с его растворимостью в липиде (¹), благодаря чему мембрана приобретает новое свойство — избирательную проницаемость по протону. Существует ряд моделей проницаемости (²⁻⁷). Дальнейшая конкретизация схемы переноса протона через б.л.м. кислотами ароматического ряда требует изучения реакций кислот с фосфолипидами, а также изучения реакций между диссоциированными (T^-) и недиссоциированными (НТ) формами кислот, протекающих в фазе с низкой диэлектрической постоянной. В настоящей работе исследовалась реакция ПХФ с лецитином и взаимодействием между НТ- и T^- -формами ПХФ в гептane.

В работе было определено содержание диссоциированной и недиссоциированной форм ПХФ в системе гептан-фосфолипид / вода при различных рН водной фазы. Спектрофотометрические измерения проведены на приборе «Uniscan» SP-800 и EPS-3 фирмы «Хитачи».

Система содержала 20 мл воды и 20 мл гептана. Водная фаза представляла собой цитратно-фосфатно-боратный буфер (0,1M : 0,2M : 0,2M) и 1M NaCl. В опытах использовали смесь лецитина с холестерином в соотношении 4 : 3. Перед началом измерений систему выдерживали не менее суток для установления равновесия.

На рис. 1 приведен спектр ПХФ в гептane в присутствии фосфолипидов при рН водной фазы 7,5. Максимум поглощения при λ 304 мμ соответствует форме НТ, максимум поглощения при λ 327 мμ соответствует форме T^- . Спектры смеси T^- и НТ-форм (рис. 1) совпадают со спектрами, полученными сложением отдельно снятых спектров T^- и НТ-форм, причем каждая из форм в смеси подчиняется закону Ламберта — Бера. Измерения показали, что коэффициенты экстинкции T^- и НТ-форм в гептane, в гептane в присутствии фосфолипидов, в воде и в воде в присутствии фосфолипидов, остаются неизменными в пределах точности эксперимента. Это обстоятельство позволило количественно измерить содержание обеих форм в исследуемой системе.

На рис. 2 показана зависимость содержания T^- в гептane от рН водной фазы. Из рис. 2 видно, что в гептane растворима лишь форма НТ (кривая 1). Форму T^- не удается обнаружить в гептane даже при рН 12 (кривая 2), в этих условиях практически все количество ПХФ находится в воде в диссоциированной форме (кривая 3). В присутствии фосфолипидов, растворенных в гептane, T^- проникает в неводную фазу, и его количество растет с увеличением рН (кривая 4), а содержание НТ-формы соответственно падает (кривая 5). При этом кажущееся $pK_{ПХФ}$ в системе гептан-фосфолипид / вода, найденное из пересечения кривых 4 и 5, равно 6,8, тогда как в воде $pK_{ПХФ} = 4,8$.

Для того чтобы установить, могут ли взаимодействовать между собой T^- и НТ-формы, были поставлены следующие опыты. Как следует из рис. 2, при рН 12 водной фазы в гептane с фосфолипидами количество

$T^- \gg NT$. Гептановый слой такой системы отделяли от водного слоя (рН 12) и высушивали безводным сульфатом натрия. К полученному раствору T^- -формы в гептане с фосфолипидами добавляли раствор NT -формы в гептане. После каждой добавки снимался спектр, из которого определяли концентрацию T^- и NT -форм. На рис. 3 кривыми 1 и 2 показано, как меняется соотношение концентраций T^- и NT -форм ПХФ при добавлении NT , растворенного в гептане. Можно видеть, что первые добавки NT вызывают рост концентрации T^- -формы (кривая 1). Это объясняется тем, что часть NT отдает протон на фосфатные группировки фосфолипидов. После достижения определенной концентрации NT в системе содержание

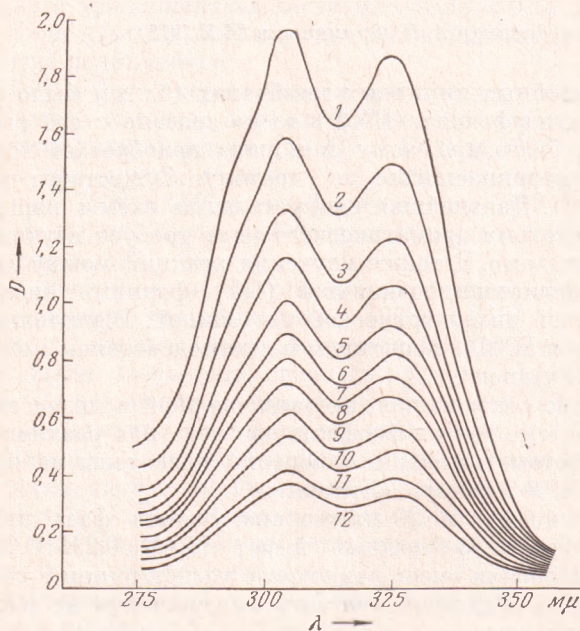


Рис. 1. Спектры смеси NT - и T^- -форм ПХФ в гептане с фосфолипидами при рН водной фазы 7,5. NT -форма — $\lambda_{\max}$ 304 мμ, T^- -форма — $\lambda_{\max}$ 327 мμ. $3,32 \cdot 10^{-3}$ М ПХФ (1); разведено гептаном в отношении 1:1,33 (2); 1:1,66 (3); 1:2 (4); 1:2,33 (5); 1:2,66 (6); 1:3 (7); 1:3,32 (8); 1:4 (9); 1:4,65 (10); 1:5,65 (11); 1:6,32 (12) (толщина кюветы 2 мм)

T^- не увеличивается при увеличении содержания NT и прирост концентрации NT , определенный путем расчета из спектра при λ 304 мμ, точно соответствует количеству добавленной NT -формы, при этом тангенс угла наклона прямой 2 на рис. 3 равен единице.

Если к системе вода — гептан добавлять смесь лецитина и холестерина, то наблюдается постепенное увеличение растворимости T^- в неводной фазе (кривая 1, рис. 4а). При этом равновесная концентрация ПХФ в воде падает, как это следует из хода кривой 2 на том же рисунке. Увеличение растворимости T^- в гептане при добавлении фосфолипида может быть объяснено образованием комплекса



который существенно лучше растворим в гептане, чем T^- -форма (рис. 2).

В более удобной для расчета форме данные рис. 4а могут быть представлены, если на оси ординат отложить логарифм отношения концентраций ПХФ в неводной фазе к его концентрации в воде, а по оси абсцисс отложить логарифм концентрации добавленного лецитина (рис. 4б).

Коэффициент распределения (Q) комплекса L_nT^- , который был определен как отношение концентрации ПХФ в неводной фазе (при концентрации фосфолипидов > 10 мг/мл) к его концентрации в воде (рис. 4а), достаточно велик. Поэтому при расчете в первом приближении можно допустить, что весь комплекс L_nT^- находится в гептане. Тогда кажущаяся

константа равновесия реакции (2) может быть представлена в виде

$$K = \frac{[T_0 - L_n T^-] [L]^n}{L_n T^-}, \quad (2)$$

где T_0 — общее содержание ПХФ в системе, n — число молекул лецитина в комплексе. Из равенства (4) и рис. 4б определены величины $pK_{L_n T^-} = 3,7$ и $n = 1,4$.

Полученные данные позволяют сделать некоторые заключения о взаимодействии ПХФ с фосфолипидами бислойных мембран.

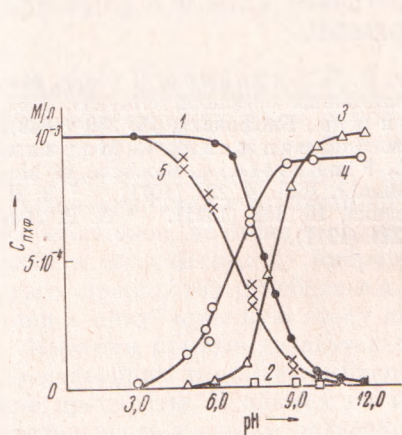


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость содержания ПХФ в водной и неводной фазах от величины pH. 1 — HT в гептане; 2 — T^- в гептане; 3 — T^- в водной фазе в отсутствие фосфолипидов; 4 — T^- в гептане, содержащем лецитин с холестерином; 5 — HT в гептане, содержащем лецитин с холестерином

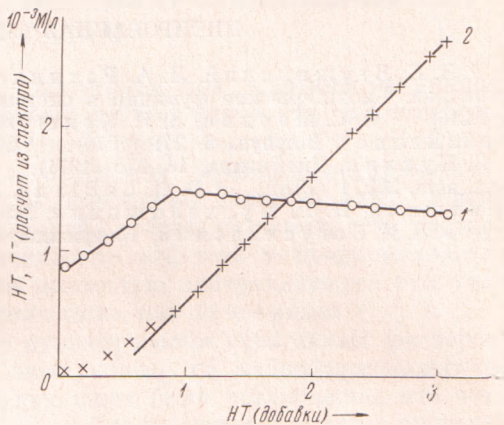


Рис. 3

Рис. 3. Изменение концентрации T^- (1) и HT (2) в смеси гептана с фосфолипидами при добавлении гептанового раствора HT-формы (10^{-3} М/л)

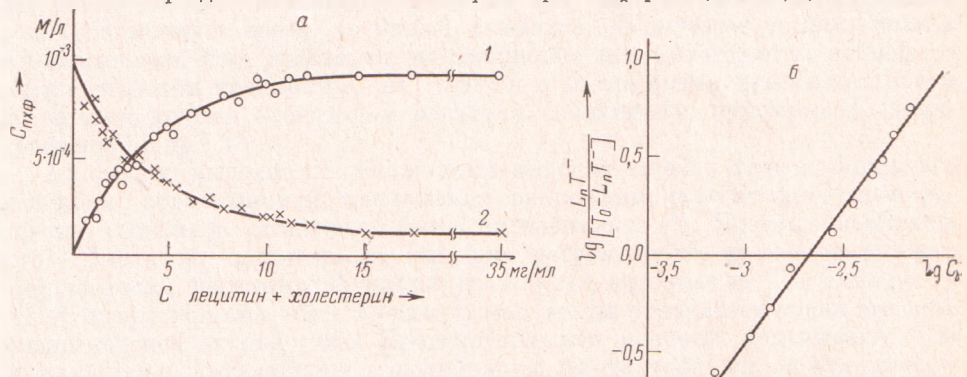


Рис. 4. а — зависимость содержания T^- в гептане (1) и в воде (2) от концентрации фосфолипидов; б — данные рисунка 4а в координатах $\lg \frac{L_n T^-}{[T_0 - L_n T^-]}$ и $\lg C_{\text{лецитин}}$

Высокая устойчивость комплекса $L_n T^-$ позволяет думать, что анионы ПХФ при контакте с бислойными мембранами должны связываться полярными группами фосфолипидов, которые расположены на границе раздела фаз. При этом концентрация T^- на границе должна значительно превосходить концентрацию T^- в объеме мембраны. С другой стороны, по-видимому, нельзя исключить возможности того, что комплекс $L_n T^-$ участвует в переносе заряда через объем мембраны.

То обстоятельство, что при добавлении к раствору фосфолипидов в гептане малых количеств НТ-формы наблюдается быстрое образование Т⁻-формы ПХФ, говорит о том, что в присутствии фосфолипидов в среде углеводорода между Т⁻ и НТ должен иметь место интенсивный обмен протоном.

Институт электрохимии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
24 X 1972

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. С. Ягужинский, Л. А. Ратникова, В. П. Скулачев, В сборн. Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных органелл, «Наука», 1969, стр. 216. ² В. С. Маркин, Л. И. Крипталик и др., Биофизика, **14**, 256 (1969). ³ L. I. Bruner, Biophys., **6**, 241 (1970). ⁴ Ю. А. Чизмаджев, В. С. Маркин, Р. Н. Куклин, Биофизика, **16**, 230 (1971). ⁵ A. Finkelstein, Biochem. et biophys. acta, **205**, 1 (1970). ⁶ O. H. LeBlanc, J. Membr. Biol., **4**, 227 (1971). ⁷ Л. Н. Ермишкин, Н. П. Мухелишвили, Биофизика, **16**, 842 (1971). ⁸ А. В. Лебедев, Л. И. Богуславский, Биофизика, **16**, 221 (1971).