

Л. И. БАРСУКОВ, Ю. Е. ШАПИРО, А. В. ВИКТОРОВ,
В. Ф. БЫСТРОВ, член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

ОБМЕН МЕЖДУ ЛЕЦИТИНОВЫМИ МИЦЕЛЛАМИ В БЕНЗОЛЕ КАК МОДЕЛЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ

Ранее нами было обнаружено, что в бензоле лецитиновые мицеллы обмениваются молекулами фосфолипида и что этот обмен удается наблюдать ⁽¹⁾ методом спектроскопии я.м.р. с использованием парамагнитных ионов. Систему из двух содержащих воду мицелл лецитина в среде неполярного растворителя (бензола) можно рассматривать как «толстую» мембрану, образованную двумя мономолекулярными слоями липидов, разделенными неполярной фазой (рис. 1). Такая система представляет интерес как модель для изучения переноса фосфолипидных молекул от одной стороны бислойной мембраны к другой через гидрофобную фазу.

Бензольный раствор лецитина, содержащий солюбилизованную воду (D_2O) (образец *A*) или солюбилизованный 0,1 *M* раствор $MnSO_4$ в D_2O (образец *B*), готовили добавлением 20 или 30 μl D_2O или того же объема раствора $MnSO_4$ к 1 мл 10% бензольного раствора лецитина с последующей обработкой ультразвуком с частотой 22 кГц (прибор УЗДН-1) в течение 3 мин. при 5°С. Был использован яичный лецитин, выделенный по методу ⁽²⁾ и очищенный колоночной хроматографией на окиси алюминия и силикагеле. Спектры я.м.р. H^1 сняты при 100 МГц на спектрометре JNM-4H-100 JEOLCO. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (TMS).

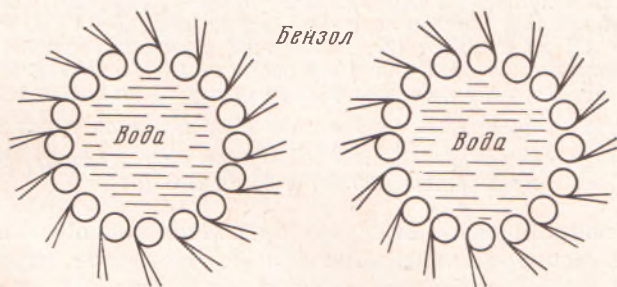


Рис. 1. Структура лецитиновых мицелл, содержащих солюбилизованную воду, в бензоле

Для изучения обмена молекул лецитина между мицеллами в бензоле использовали образец *B*, полученный смешиванием образцов *A* и *B* в соотношении 1:1 по объему. Как и следовало ожидать, интегральная интенсивность сигнала от протонов групп $\overset{+}{N}(CH_3)_3$ в спектре образца *B* составляет примерно половину от интенсивности соответствующего сигнала в спектре образца *A*. Однако полуширина этого сигнала в спектре образца *B* заметно возрастает и составляет 7,9 гц против 2,7 гц для образца *A* при содержании 20 μl D_2O в 1 мл 10% бензольного раствора лецитина. При нагревании образца *B* происходит дальнейшее уширение сигнала $\overset{+}{N}(CH_3)_3$

и при температуре выше 65°C он исчезает из спектра. Однако после охлаждения образца *B* до исходной температуры его спектр возвращается к прежнему виду.

Обратимость температурных изменений, наблюдаемых в спектре образца *B*, свидетельствует не только о том, что при повышении температуры лецитиновые мицеллы не разрушаются, но также и о том, что в процессе нагревания — охлаждения не происходит перераспределения ионов Mn^{2+} между мицеллами. В этих условиях уширение сигнала от протонов групп $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ с ростом температуры обусловлено обменом молекул лецитина между различными магнитными окружениями ⁽³⁾, т. е. между мицеллами

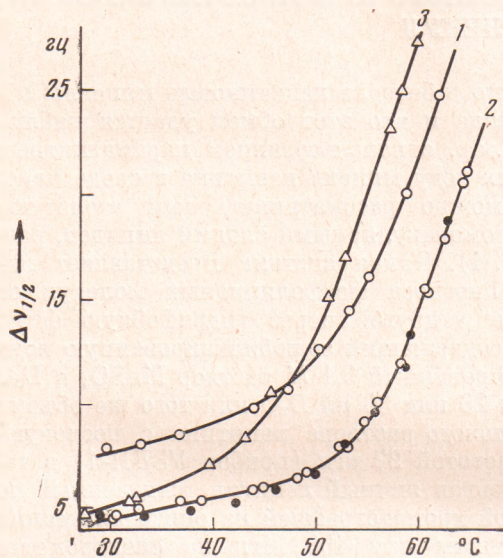


Рис. 2

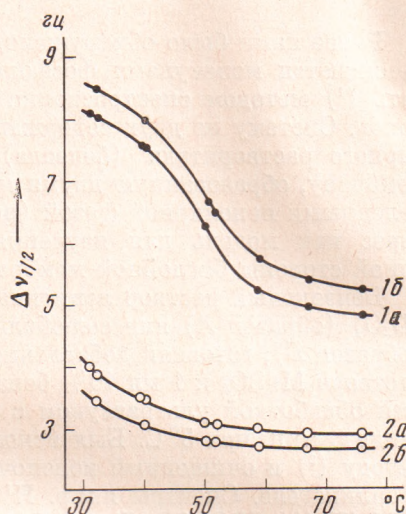


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость полуширины ($\Delta\nu_{1/2}$) сигнала протонов группы $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ от температуры для образца *B*. 10% раствор лецитина, содержащий 20 μl D_2O в 1 мл раствора (1), 30 μl D_2O в 1 мл раствора (2), то же с добавкой лизолецитина (2 мол.% от лецитина) и содержащий 30 μl D_2O в 1 мл раствора (3) (зачерненные кружки отвечают 5% раствору лецитина, содержащему 15 μl D_2O в 1 мл)

Рис. 3. Зависимость полуширины ($\Delta\nu_{1/2}$) сигналов от протонов групп $(\text{CH}_2)_n$ (1) и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (2) от температуры для образца *A*. 10% раствор лецитина, содержащий в 1 мл раствора 20 (а) и 30 μl D_2O (б)

типа *A* (не имеющими ионов Mn^{2+} во внутренней водной полости) и мицеллами типа *B* (содержащими ионы Mn^{2+}). Частичное перераспределение ионов Mn^{2+} между мицеллами происходит в присутствии лизолецитина, о чем свидетельствует уменьшение интегральной интенсивности сигнала $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ в спектре образца *B* по мере роста концентрации лизолецитина.

При малом содержании лизолецитина в мицеллах (1–2 мол.% от лецитина) интенсивность сигнала $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ близка к интенсивности соответствующего сигнала в случае чисто лецитиновых мицелл, однако его полуширина при повышении температуры возрастает заметно быстрее (рис. 2, кривая 3). На основании этого можно заключить, что в гидрофобной среде лизолецитин облегчает обмен молекул лецитина между мицеллами.

Как видно из зависимости полуширины сигнала $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ от температуры для образца *B* (рис. 2, кривые 1 и 2), есть две области изменения $\Delta\nu_{1/2}$: в диапазоне $25\text{--}50^{\circ}\text{C}$ полуширина сигнала $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ медленно уве-

личивается; выше 50°С наблюдается резкое возрастание $\Delta\nu_{1/2}$ с повышением температуры. В присутствии лизолецитина этот температурный переход сглажен и смещен в область меньших температур (рис. 2, кривая 3).

Поскольку полуширина сигнала $N^+(CH_3)_3$ в случае образца А медленно и монотонно уменьшается с ростом температуры (рис. 3), наблюдаемый для образца В характер зависимости $\Delta\nu_{1/2}$ от температуры указывает на существенные изменения в механизме обмена при температурах выше 50°С. Эти изменения, вероятно, связаны с изменением структуры лецитиновых мицелл, так как полуширина сигнала групп $(CH_2)_n$ в случае образца А (рис. 3), а также в случае образцов В и В в области ~50°С существенно уменьшается, что свидетельствует о возрастании подвижности углеводородных цепей молекул лецитина.

Термодинамические параметры ($\Delta G^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$) процесса обмена молекул лецитина между его мицеллами вычислены по уравнению Эйринга с использованием значений τ (среднего времени жизни молекулы лецитина в одной мицелле), полученных из уравнений Блоха — Мак-Коннелла (³) при упрощающих допущениях $\omega_A = \omega_B$, $T_{2A} \gg T_{2B}$ и $\tau \gg T_{2B}$, вытекающих из спектральных характеристик исследуемой системы.

Таблица 1

Энтальпия $\Delta H^\ddagger$, энтропия $\Delta S^\ddagger$, свободная энергия $\Delta G^\ddagger$ активации процесса обмена молекул лецитина между мицеллами

Содержание D ₂ O (мл) в 1 мл образца В	25—50° С			>50° С		
	$\Delta H^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$, э.е.	$\Delta G^\ddagger_{313^\circ \text{ К}}$, ккал/моль	$\Delta H^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$, э.е.	$\Delta G^\ddagger_{313^\circ \text{ К}}$, ккал/моль
20	6,3	—29,0	15,8	18,3	5,8	16,3
30	7,8	—29,4	17,0	22,7	17,4	16,9

Примечание. Абсолютные погрешности составили для $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta G^\ddagger$ $\pm 0,1$ ккал/моль, а для $\Delta S^\ddagger$ $\pm 0,1$ э.е.

Полученные данные (табл. 1) подтверждают вывод, что выше 50°С механизм обмена молекул лецитина между мицеллами меняется. Если при температурах выше 50°С обмен определяется главным образом энтальпийным фактором, то в интервале 25—50°С решающим является вклад энтропийного фактора; большое отрицательное значение $\Delta S^\ddagger$ свидетельствует о том, что при этих температурах обмен происходит через переходное состояние, отличающееся высокой степенью упорядоченности своей структуры.

Обмен лецитином между мицеллами в бензоле может осуществляться двумя путями: 1) обмен индивидуальными молекулами через истинный раствор; 2) обмен мицеллами меньшего размера, состоящими всего из нескольких молекул лецитина (существование таких легких мицелл, включающих от 5 (⁴) до 15 (⁵) молекул лецитина, доказано ранее). Отрицательная величина энтропии активации, указывающая на высокую упорядоченность переходного состояния процесса обмена в области 25—50°С, позволяет предположить, что в этом температурном интервале второй механизм обмена преобладает.

Полученные нами данные доказывают, что в бензоле лецитиновые мицеллы, содержащие солюбилизованную воду, сохраняют свою целостность во всем изученном диапазоне температур. Однако с ростом температуры может происходить частичная дезагрегация этих мицелл, приводящая к некоторому уменьшению их размера и, как следствие этого, разрушению липидного слоя, окружающего внутреннюю водную фазу. Это подтверждается характером зависимости полуширины сигнала групп

$(\text{CH}_2)_n$ от температуры, указывающим на существенное возрастание подвижности углеводородных цепей при температурах выше 50°C .

С другой стороны, дезагрегации подвергаются также и легкие лецитиновые мицеллы, в результате чего концентрация истинного раствора лецитина, находящегося в равновесии с мицеллярной фазой, с повышением температуры растет. Поэтому вероятность участия одиночных молекул лецитина в обмене между мицеллами с ростом температуры увеличивается, и при температурах выше 50°C этот путь обмена, по-видимому, становится доминирующим. Об этом свидетельствуют положительное значение энтропии активации, прямо указывающее на усиление процессов дезагрегации, и значительное возрастание энтальпии активации.

При температурах ниже 50°C одиночной молекуле лецитина труднее покинуть монослой, образующий мицеллу, чем агрегату из нескольких таких молекул, поскольку в пересчете на одну молекулу энергия, требуемая для преодоления сил, удерживающих молекулу в мицелле, в случае выхода агрегата должна быть существенно меньшей. Таким образом, обмен лецитином между двумя мономолекулярными слоями через гидрофобную фазу протекает не как обмен отдельными молекулами, а преимущественно путем переноса агрегата из нескольких молекул от одного монослоя к другому.

В присутствии лизолецитина облегчается как обмен, протекающий через легкие мицеллы, так и обмен с участием одиночных молекул лецитина: влияние лизолецитина проявляется на обоих участках температурной зависимости полуширины сигнала $\dot{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ (см. рис. 2). Можно предположить, что под действием лизолецитина липидный слой, образующий тяжелую мицеллу, также несколько разрыхляется, и поэтому выход из него молекул лецитина требует уже меньших энергетических затрат, чем в отсутствие лизолецитина. При больших концентрациях лизолецитина это приводит к тому, что мицеллы обмениваются между собой не только липидом, но и ионами Mn^{2+} , входящими во внутреннюю водную полость мицелл.

Используя метод спиновой метки, Кориберг и Мак-Коннелл ⁽⁶⁾ показали, что в бислойных фосфолипидных мембранах происходит медленный обмен липидом между внутренним и наружным слоями. Учитывая данные настоящей работы, можно предположить, что этот обмен протекает не как обмен одиночными молекулами, а как кооперативный процесс, требующий одновременного участия в акте обмена нескольких молекул липида. Можно также ожидать, что в присутствии лизолецитина скорость такого обмена должна возрасти.

Институт химии природных соединений
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. F. Bystrov, N. I. Dubrovina et al., *Chem. Phys. Lipids*, 6, 343 (1971).
² R. M. Dawson, *Biochem. J.*, 88, 414 (1963). ³ T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.*, 37, 307 (1962). ⁴ P. H. Elworthy, *J. Chem. Soc.*, 1959, 1951. ⁵ J. P. M. Janson, M. Kunst et al., *Chem. Phys. Lipids*, 9, 147 (1972). ⁶ R. D. Cornberg, H. M. McConnell, *Biochemistry*, 10, 111 (1971).