

УДК 576.8.094.7

БИОФИЗИКА

А. Д. ИСМАИЛОВ, Л. И. БОГУСЛАВСКИЙ, Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ

ГЕНЕРАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛА НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ  
МЕМБРАНАХ, СОДЕРЖАЩИХ  $\text{Fe}^{3+}$  И УБИХИНОН,  
ПРИ ПРОТЕКАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ  
РЕАКЦИЙ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА

(Представлено академиком А. Н. Фрумкиным 18 II 1974)

В работе НАД-Н — дегидрогеназы митохондрий принимают участие пиридиннуклеотид, флавинмононуклеотид, убихинон, реакции которых на бислойных липидных мембранах (б.л.м.) были изучены нами ранее (1, 2). Было показано, что б.л.м. является электронообменником, когда содержит вещества, способные к окислительно-восстановительным превращениям и контактирует с растворами определенных редокс-систем. В исследованных системах одной из редокс-пар была пара  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ , в которой роль окислителя выполнял кислород воздуха. Желательно было заменить кислород на другой акцептор, концентрацию которого легче дозировать, и показать, что и при этих условиях сохраняются выводы, сделанные ранее. Кроме того, в состав вышеупомянутого ферментного комплекса входит несколько типов железо-протеиновых комплексов (5, 7). Поэтому представляло интерес исследовать возможность протекания на б.л.м. окислительно-восстановительных реакций с участием ионов железа и железо-сульфидных комплексов, встроенных в мембрану.

Для того чтобы выяснить эти два вопроса, были измерены трансмембранные потенциалы в цепи, содержащей ряд окислительно-восстановительных систем, контактирующих с б.л.м., в которых трансмембранный потенциал генерировался в ходе окислительно-восстановительных превращений на границе раздела фаз с участием встроенных в б.л.м.  $\text{Q}_6$ , ионов железа, а также комплексов железа с меркаптэтанолом.

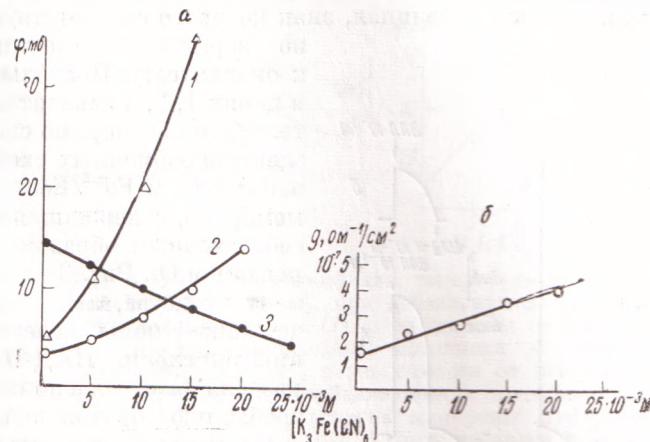
Мембранны готовились из смеси лецитина с холестерином (4:3), растворенных в декане и формировались на отверстии тефлонового стаканчика. За растеканием мембранны следили по изменению емкости на частоте 0,2 Гц. Исходная проводимость  $g$  мембранны была близка к  $10^{-8} \text{ ом}^{-1}/\text{см}^2$ . Трансмембранные потенциалы и проводимость б.л.м. измерялись с помощью хлорсеребряных электродов, соединенных с раствором через агар-агаровые мостики. Изменение потенциалов во времени регистрировалось электрометром (Vibron electrometer model 62A) с самописцем. Коэнзим  $\text{Q}_6$  вносился в раствор липидов в концентрации 10 мг/мл. Ионы трехвалентного железа вносились в мембрану аналогично коэнзиму, для чего высококонцентрированный раствор  $\text{FeCl}_3$  приливался к раствору липидов и взвалтывался. В отдельных опытах раствор  $\text{FeCl}_3$  добавлялся в ячейку к уже сформированной мемbrane всегда со стороны, противоположной той, где находился восстановитель. Поскольку пистинная величина концентрации  $\text{Fe}^{3+}$  в мембране не контролировалась, наблюдался разброс в абсолютных величинах потенциалов.

На рис. 1а представлено изменение трансмембранного потенциала, генерируемого системой НАД-Н— $\text{Q}_6$ — $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  в цепи



в зависимости от концентрации окислителя. Концентрация восстановителя (НАД-Н) оставалась постоянной и была  $8 \cdot 10^{-3}$  (кривая 1) и  $3 \cdot 10^{-3}$  (кривая 2). Кривая 3 снималась в присутствии переносчика  $\text{H}^+$ -ионов — тетрахлортифторметилбензимидазола (ТТФБ)  $10^{-5} M$  при концентрации НАД-Н  $8 \cdot 10^{-3} M$ . Плюс э.д.с. всегда соответствовал той стороне мембранны, где был добавлен восстановитель. На рис. 1б показано изменение проводимости б.л.м., соответствующее условиям, в которых измерялась э.д.с. цепи 1 (кривая 2).

Рис. 1. Зависимость величины трансмембранных потенциала  $\varphi$  (а) и проводимости  $g$  (б) б.л.м., модифицированной  $Q_6$ , от концентрации феррицианида, добавленного с противоположной от НАД-Н стороны мембранны. Концентрация НАД-Н: 1 —  $8 \cdot 10^{-3} M$ , 2 —  $3 \cdot 10^{-3} M$ , 3 —  $8 \cdot 10^{-3} M + 10^{-5} M$  ТТФБ. Буфер: 10 mM трип-НCl, 100 mM NaCl, pH 8,7



нение проводимости б.л.м., соответствующее условиям, в которых измерялась э.д.с. цепи 1 (кривая 2).

Сходную с описанной цепь можно построить, если заменить  $Q_6$  на систему  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  в мембране. В этом случае цепь выглядит следующим образом:



На рис. 2 показано изменение трансмембранных потенциала в цепи 2 с увеличением концентрации окислителя  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . При этом всегда па-

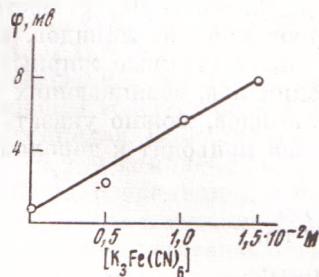
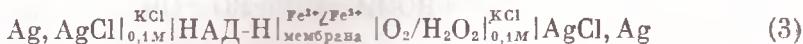


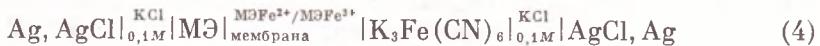
Рис. 2. Зависимость величины трансмембранных потенциала ( $\varphi$ ) б.л.м., модифицированной  $\text{Fe}^{3+}$ , от концентрации феррицианида, добавленного с противоположной от НАД-Н стороны мембранны. Концентрация НАД-Н  $3 \cdot 10^{-3} M$ . Буфер: 10 mM дигидрофосфат + 10 mM трип-НCl + 100 mM NaCl, pH 8,7

блудается некий начальный потенциал в отсутствие феррицианида калия, обусловленный присутствием кислорода воздуха. В этом случае генерация потенциала происходит в системе: НАД-Н —  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  —  $\text{O}_2$  (цепь 3). Если подействовать на мембрану, сформированную в цепи 3,



разобщителем окислительного фосфорилирования ТТФБ ( $5 \cdot 10^{-6} M$ ), сообщающим мембране протонную селективность, то наблюдается резкое возрастание трансмембранных потенциалов (рис. 3а). Валиномицин (ВАЛ) снимает генерируемый в цепи 3 потенциал. Подобно тому, как это было сделано в работе (1), включение флавинмононуклеотида (ФМН) в цепь 3 увеличивает трансмембранный потенциал (рис. 3в). Если добавить в систему НАД-Н —  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  —  $\text{O}_2$  меркаптоэтанол (МЭ), то генерируемый на мембране потенциал всегда исчезает, вне зависимости от того, в какую часть цепи 3 он был добавлен — к восстановителю или к окислителю

(рис. 4а). Меркаптоэтанол, кроме того, был использован вместо НАД-Н в качестве восстановителя. На рис. 4б показано, как изменяется э.д.с. цепи



в зависимости от концентрации окислителя (феррицианида калия).

Все исследованные в настоящей работе цепи (1—4) генерируют трансмембранный потенциал, знак которого соответствует переходу отрицательно заряженной частицы от восстановителя к окислителю. Поскольку величина потенциала в цепях 1, 2, 4 зависит от концентрации окислителя, это неоспоримо свидетельствует о наличии электронообменных свойств б.л.м., модифицированных Q<sub>6</sub> и Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>. Как следует из рис. 2, мембрана, содержащая в липидах железо, ведет себя сходным образом с мембраной, модифицированной Q<sub>6</sub>. Рис. 3 иллюстрирует еще один элемент сходства, а именно способность цепи, содержащей ионы железа, катализировать реакцию окисления НАД-Н кислородом на границе раздела фаз согласно схеме 1, приводящей к потреблению протонов в примембранным слое и его подщелачиванию.

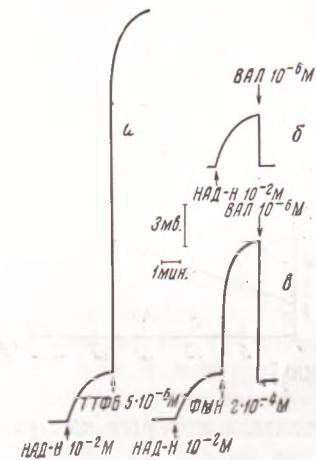
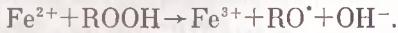
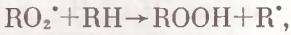
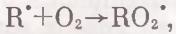
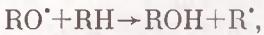


Рис. 3. Кинетические кривые генерации трансмембранного потенциала в системе НАД-Н - Fe<sup>3+</sup> - O<sub>2</sub> при добавлении в отсек с НАД-Н ТТФБ (а), ВАЛ (б), ФМН (с). Буфер тот же, что в подписи к рис. 2; pH 7,5; FeCl<sub>3</sub> добавлен к мембране с противоположной от НАД-Н стороны

ты. Хотя нет прямых данных о природе радикалов, возникающих при реакциях ионов железа с гидроперекисями липидов, можно указать наиболее вероятный путь течения реакций, которая приводит к дополнительному подщелачиванию примембранного слоя:

RO<sup>·</sup> расходуется на:

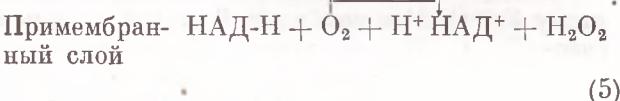


Регенерация Fe<sup>2+</sup> идет с той стороны мембранны, куда был добавлен восстановитель, например сульфидные соединения RSH:



или природные восстановители дыхательной цепи митохондрий (НАД-Н, ФМН-Н и т. д.). Поэтому перекисное окисление липидов в митохондриальной мембране через взаимодействие систем Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> и НАД-Н - ФМН-Q<sub>6</sub> связано с состоянием цепи переноса электрона. Многочисленные

Схема 1



Как уже было показано в работе (3), система Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> не может быть рассмотрена в отрыве от перекисной редокс-системы, существующей в б.л.м., сформированной из липидов, в состав которых входят ненасыщенные жирные кисло-

указания различных авторов (4, 5, 7) на роль дыхательной цепи в реакциях перекисного окисления могут быть прямо проиллюстрированы результатами, представленными на рис. 2 и 4. Добавление ТТФБ, делающего мембрану провицаемой по протону, выявляет трансмембранный градиент рН, который в условиях опыта, приведенного на рис. 3а, соответствует 0,5 единицы рН. Существенно, что в то время как добавление ТТФБ увеличивает э.д.с. цепи 3, оно сводит к нулю генерацию потенциала в цепи 2, где наблюдается только перенос электрона через б.л.м. Это говорит о том, что существует конкуренция между реакцией (5), приводящей к градиенту рН в примембранных слоях б.л.м., и реакцией трансмембранного переноса электрона на феррицианид. ФМН может быть встроен в цепь 3 так же, как и в систему НАД-Н – ФМН – Q<sub>6</sub> – O<sub>2</sub>, рассмотренную ранее (2). Добавление ФМН увеличивает трансмембранный потенциал. Это позволяет предположительно записать систему редокс-реакций в виде: НАД-Н – ФМН – Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> – O<sub>2</sub>, причем это увеличение может быть связано как с интенсификацией трансмембранного переноса электронов, так и с возникновением протонного канала, который реализует градиент рН в примембранным слое за счет реакции (5).

Известно, что в НАД-Н-дегидрогеназе митохондрий атомы железа находятся в виде комплексов с SH-группами белков (негемовые железопротеиды). Исходя из этого факта, была сделана попытка использовать в качестве трансмембранного переносчика электронов комплексы железа в системе НАД-Н – МЭFe<sup>2+</sup>/МЭFe<sup>3+</sup> – O<sub>2</sub>. Из рис. 4а видно, что добавление МЭ к мембране, содержащей ионы железа как со стороны окислителя, так и со стороны восстановителя, приводит к полному снятию трансмембранного потенциала. Сопоставляя эти данные с результатами, приведенными на рис. 4б, где комплекс МЭ – Fe<sup>+</sup> в б.л.м. служит переносчиком электронов с МЭ на феррицианид и на кислород (начальная точка рис. 4б), можно полагать, что в системе НАД-Н – МЭ – Fe<sup>+</sup> – O<sub>2</sub> комплекс МЭ с железом не способен восстанавливаться пиридиннуклеотидом. При работе дыхательной цепи митохондрий, согласно существующим представлениям (7), происходит трансмембранный перенос электронов. Изучение модельных систем показало, что роль трансмембранного переносчика заряда могут выполнять ионы трехвалентного железа в реакциях окисления НАД-Н. Такую же функцию может выполнять комплекс железа с меркаптоэтанолом в реакциях окисления меркаптоэтанола.

Институт электрохимии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
9 I 1974

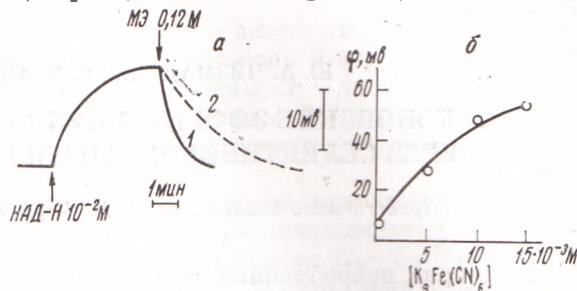


Рис. 4. а – сброс потенциала, генерируемого системой НАД-Н – Fe<sup>3+</sup> – O<sub>2</sub>, при добавлении МЭ со стороны восстановителя (1) и со стороны окислителя (2); б – трансмембранный потенциал в системе: МЭ – Fe<sup>3+</sup> – K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> в зависимости от концентрации феррицианида, добавленного с противоположной от МЭ (0,12 M) стороны мембраны. Буфер тот же, что в подписи к рис. 1. Fe<sup>3+</sup> добавлен в липид

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. Д. Исаилов, Л. И. Богуславский и др., ДАН, т. 210, № 3 (1973). <sup>2</sup> А. Д. Исаилов, Л. И. Богуславский, Л. С. Ягужинский, Биофизика мембран (Паланга), 1973. <sup>3</sup> И. Гюндель, Л. И. Богуславский, ДАН, т. 203, 951 (1972). <sup>4</sup> Ю. А. Влади-миров, А. И. Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, «Наука», 1972. <sup>5</sup> J. Hatefi, W. G. Hanstwin, Arch. Biochem. and Biophys., v. 138, 73 (1970). <sup>6</sup> P. Mitchell, Glynn Research Laboratories, Bodmin, 1966. <sup>7</sup> В. П. Скулачев, Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», 1972.