

УДК 576.8.094.7

БИОФИЗИКА

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

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

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

В работе НАД-Н — дегидрогеназы митохондрий принимают участие пиридиннуклеотид, флавиномононуклеотид, 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 (³, ⁴). Поэтому представляло интерес исследовать возможность протекания на б.л.м. окислительно-восстановительных реакций с участием ионов железа и железосульфидных 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. Q_6 , ионов железа, а также комплексов железа с меркапттанолом.

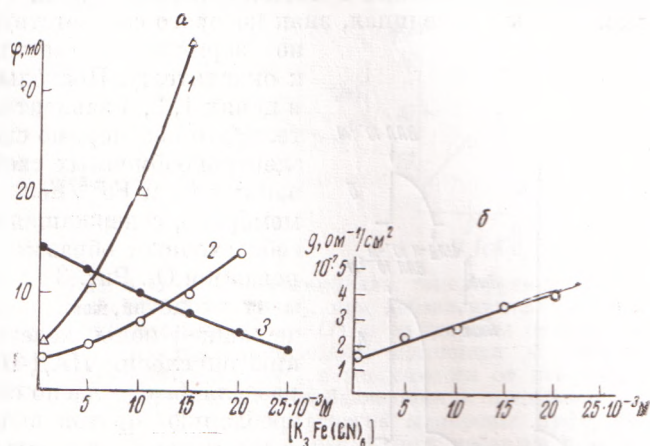
Мембраны готовились из смеси лецитина с холестерином (4 : 3), растворенных в декане и формировались на отверстии тефлонового стаканчика. За растеканием мембраны следили по изменению емкости на частоте 0,2 гц. Исходная проводимость g мембраны была близка к 10^{-8} ом⁻¹/см². Трансмембранные потенциалы 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 Q_6 вносился в раствор липидов в концентрации 10 мг/мл. Ионы трехвалентного железа вносились в мембрану аналогично коэнзиму, для чего высококонцентрированный раствор FeCl_3 приливался к раствору липидов и взбалтывался. В отдельных опытах раствор FeCl_3 добавлялся в ячейку к уже сформированной мембране всегда со стороны, противоположной той, где находился восстановитель. Поскольку истинная величина концентрации Fe^{3+} в мембране не контролировалась, наблюдался разброс в абсолютных величинах потенциалов.

На рис. 1а представлено изменение трансмембранного потенциала, генерируемого системой НАД-Н— 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 H^+ -ионов — тетрахлортрифторметилбензимидазола (ТТФБ) 10^{-5} М при концентрации НАД-Н $8 \cdot 10^{-3}$ М. Плюс э.д.с. всегда соответствовал той стороне мембраны, где был добавлен восстановитель. На рис. 16 показано изме-

Рис. 1. Зависимость величины трансмембранного потенциала φ (а) и проводимости g (б) б.л.м., модифицированной Q_6 , от концентрации феррицианида, добавленного с противоположной от НАД-Н стороны мембраны. Концентрация НАД-Н: 1 — $8 \cdot 10^{-3}$ М, 2 — $3 \cdot 10^{-3}$ М, 3 — $8 \cdot 10^{-3}$ М + 10^{-5} М ТТФБ. Буфер: 10 мМ трис-НСl, 100 мМ 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 Fe^{2+}/Fe^{3+} в мембране. В этом случае цепь выглядит следующим образом:



На рис. 2 показано изменение трансмембранного потенциала в цепи 2 с увеличением концентрации окислителя $K_3Fe(CN)_6$. При этом всегда па-

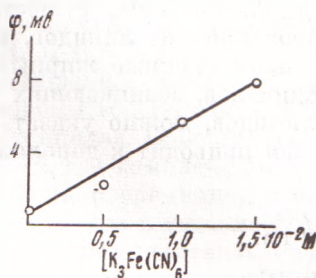
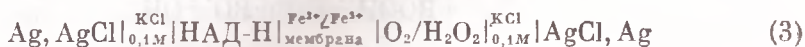


Рис. 2. Зависимость величины трансмембранного потенциала (φ) б.л.м., модифицированной Fe^{3+} , от концентрации феррицианида, добавленного с противоположной от НАД-Н стороны мембраны. Концентрация НАД-Н $3 \cdot 10^{-3}$ М. Буфер: 10 мМ цитрат + 10 мМ трис-НСl + 100 мМ NaCl, pH 8,7

блюдается некий начальный потенциал в отсутствие феррицианида калия, обусловленный присутствием кислорода воздуха. В этом случае генерация потенциала происходит в системе: $НАД-Н - Fe^{2+}/Fe^{3+} - O_2$ (цепь 3). Если подействовать на мембрану, сформированную в цепи 3,



разобщителем окислительного фосфорилирования ТТФБ ($5 \cdot 10^{-6}$ М), сообщаящего мембране протонную селективность, то наблюдается резкое возрастание трансмембранного потенциала (рис. 3а). Валиномицин (ВАЛ) снимает генерируемый в цепи 3 потенциал. Подобно тому, как это было сделано в работе (1), включение флавиномононуклеотида (ФМН) в цепь 3 увеличивает трансмембранный потенциал (рис. 3б). Если добавить в систему $НАД-Н - Fe^{2+}/Fe^{3+} - O_2$ 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 транс-мембранный 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 электрообменных свойств б.л.м., модифицированных Q_6 и $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Как следует из рис. 2, мембрана, содержащая в липидах железо, ведет себя сходным образом с мембраной, модифицированной Q_6 . 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 примембранном слое и его подщелачиванию.

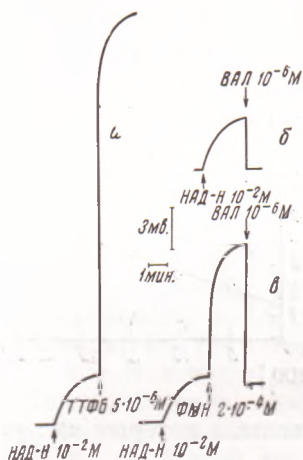
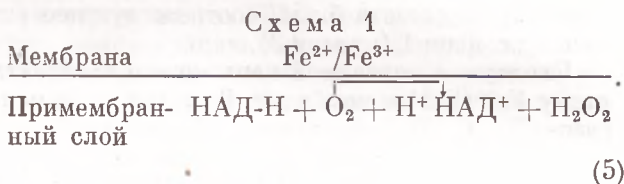


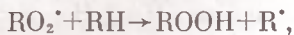
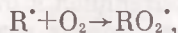
Рис. 3. Кинетические кривые генерации трансмембранного потенциала в системе НАД-Н — Fe^{3+} — O_2 при добавлении в отсек с НАД-Н ТТФБ (а), ВАЛ (б), ФМН (в). Буфер тот же, что в подписи к рис. 2; рН 7,5; FeCl_3 добавлен к мембране с противоположной от НАД-Н стороны



Как уже было показано в работе (3), система $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ не может быть рассмотрена в отрыве от перекисной редокс-системы, существующей в б.л.м., сформированной из липидов, в состав которых входят ненасыщенные жирные кислоты.

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

RO^\cdot расходуется на:



Регенерация Fe^{2+} идет с той стороны мембраны, 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 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ и НАД-Н — ФМН- Q_6 связано с состоянием цепи переноса электрона. Многочисленные

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 проницаемой по протону, выявляет трансмембранный градиент рН, который в условиях опыта, приведенного на рис. 3а, соответствует 0,5 единицы рН. Существование, 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

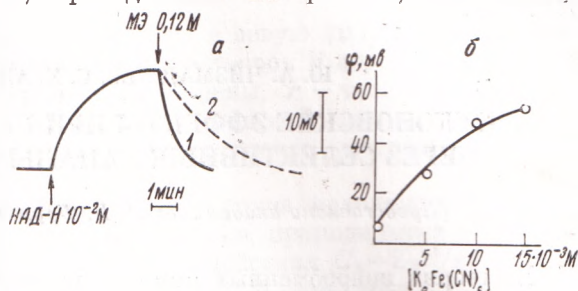


Рис. 4. а — сброс потенциала, генерируемого системой НАД-Н- Fe^{3+} - O_2 , при добавлении МЭ со стороны восстановителя (1) и со стороны окислителя (2); б — трансмембранный потенциал в системе: $\text{МЭ}-\text{Fe}^{3+}-\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в зависимости от концентрации феррицианида, добавленного с противоположной от МЭ (0,12 М) стороны мембраны. Буфер тот же, что в подписи к рис. 1. Fe^{3+} добавлен в липид

встроен в цепь 3 так же, как и в систему НАД-Н-ФМН- Q_6 - O_2 , рассмотренную ранее (²). Добавление ФМН увеличивает трансмембранный потенциал. Это позволяет предположительно записать систему редокс-реакций в виде: НАД-Н-ФМН- $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ - O_2 , причем это увеличение может быть связано как с интенсификацией трансмембранного переноса электронов, так и с возникновением протонного канала, который реализует градиент рН в примембранном 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- $\text{M9Fe}^{2+}/\text{M9Fe}^{3+}$ - O_2 . 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^+ 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^+ - O_2 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
Академия наук СССР
Москва

Поступило
9 I 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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