

К.Є. Киливник, Г.В. Островська, Л.А. Хмарська, Т.В. Рибальченко,
О.С. Ксьонжек, В.К. Рибальченко

Слабкі кислоти як переносники протонів через бішарові ліпідні мембрани

Исучена способность слабых неорганических кислот (H_2S , HCN) и низших карбоновых кислот взаимодействовать с бислойнными липидными мембранами, изменять их электропроводность, выступать в качестве протонофоров. Исучен механизм изменения проводимости бислойных липидных мембран и определены показатели, влияющие на различия во взаимодействии этих кислот. Максимальное изменение электропроводимости наблюдается при рН, равном константе диссоциации слабой кислоты и определяется коэффициентом распределения "октанол (мембрана) – вода".

ВСТУП

Аналіз транспорту невеликих молекул через клітинні мембрани залишається основним питанням біофізики та фізіології. Які шляхи (пасивна дифузія, переносники, канали) більш важливі для проникнення молекул через клітинні мембрани? Як ці транспортні шляхи залежать від будови речовини та поведінки їх у розчині? Як плазматична мембрана вибірково регулює швидкість проникнення речовин у клітину та виходу їх із неї? Однією із важливих властивостей мембрани є підтримання гомеостазу, транспорт іонів та, особливо, протонів для збереження кислотно-основної рівноваги по обидва боки від мембрани. Для цього в мембрані функціонують різні іонофори та протонофори [2]. До класичних протонофорів відносяться: 2,4-динітрофенол, пентахлорфенол, карбонілціанід-м-хлорфенілгідрозол, 5,6-дихлор-2-трифторметилбензимідазол, 4,5,6,7-тетрахлор-2-трифторметилбензимідазол, карбонілціанід-п-трифтор-метоксифенілгідрозол тощо. Їх властивість і здатність переносити протони через мембрани описана в окремих дослідах та в оглядах [15].

Перераховані протонофори є слабкими органічними кислотами [11] з константою іонізації (рК) у межах від 2 до 10, розчинні як у воді, так і в неполярному гідрофобному ліпідному шарі мембрани. Низка неорганічних і низькомолекулярних органічних (наприклад, нижчих карбонових) кислот відповідають основним властивостям протонофорів, але їх протонофорні властивості вивчені недостатньо.

Для дослідження дії протонофорів на мембрани найчастіше використовують бішарові ліпідні мембрани (БЛМ). Немодифіковані ліпідні мембрани є широко розповсюдженою моделлю плазматичних мембран [5, 6, 17], складаються із фосфоліпідних молекул і не містять сполук і структур, які утворюють пори, іонні канали та транспортери [12], що полегшує їх аналіз при введенні індивідуальних модифікаторів.

Метою нашої роботи було вивчення здатності слабких неорганічних і нижчих карбонових кислот взаємодіяти з мембранними структурами та виступати протонофорами, а також визначення показників, які впливають на ці особливості.

МЕТОДИКА

Плоскі БЛМ формували за методом Мюллера–Рудіна [16] на отворі діаметром 1,1 мм у тefлоновій перегородці, яка розділяє два водних розчини електроліту. Для отримання мембран ми використовували сумарну фракцію фосfolіпідів білої речовини головного мозку бика в октані (10 мг/мл). Утворення чорної БЛМ контролювали візуально за допомогою мікроскопа МБС-2 та за зміною питомої провідності ($G_{\text{пит}}$) і питомої ємності ($C_{\text{пит}}$) у процесі її формування та досягнення наступних значень: $\lg G_{\text{пит}} = -(8,4-8,5) \text{ Ом}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$; $C_{\text{пит}} = 0,3-0,4 \text{ мкФ/см}^2$. Сполуки, які досліджували, вводили в розчин, що омиває мембрану, за допомогою мікропіпетки порціями, практично не змінюючи рівень електроліту в комірці. Усі експерименти проводили при кімнатній температурі (18–22 °С). Розчини перемішували магнітними мішалками, рН контролювали протягом усього досліду. Для підтримання іонної сили та наближення умов до фізіологічних як фоновий електроліт використовували 0,9%-й розчин NaCl.

Зміни електрохімічних властивостей контролювали методом циклічної вольтамперометрії [3] в інтервалі потенціалів від –100 до +100 мВ. Опір мембрани визначали за нахилом вольт-амперної кривої. Для виміру струму через мембрану використовували вольт-електрометр В7-30 (вхідний опір $2 \cdot 10^{14} \text{ Ом}$, діапазон вимірюваних струмів від 10^{-15} до 10^{-7} А).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одним із головних факторів, які впливають на взаємодію сполук з ліпідною мембраною, є їх здатність до іонізації в водному розчині. По-перше, багато сполук утворюють у розчині заряджені іони внаслідок приєднання чи відщеплення про-

тона (згідно зі всесвітнім переліком ліків, 63 % лікарських препаратів мають групи, здатні до іонізації). По-друге, від константи дисоціації речовин залежать їх розчинність, ліпофільність, коефіцієнт розподілення “ліпід–вода”, проникність і, головним чином, – здатність переносити протони через мембрани (протонофорні властивості).

Взагалі у водних розчинах слабких кислот існує динамічна рівновага гомогенної реакції: $\text{HA}_p \rightleftharpoons \text{H}_p^+ + \text{A}_p^-$. При цьому

$$K_a = \frac{[\text{H}_p] [\text{A}_p]}{[\text{HA}_p]} \quad (1),$$

де K_a – константа дисоціації кислоти на катіон H^+ і аніон A^- ; індекс p – розчин. Концентрація кожної форми слабкої кислоти в розчині або їх частки визначаються рівновагою (1) і рН розчину, можуть бути легко розраховані [1] та представлені у вигляді розподільних діаграм (рис. 1).

Константи дисоціації та інші властивості вивчених кислот наведено в таблиці.

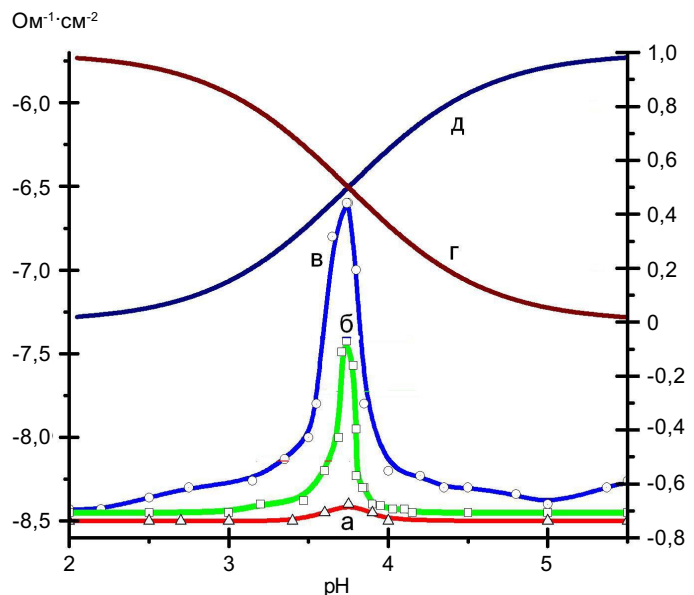


Рис. 1. Залежність питомої електропровідності бішарових ліпідних мембран від рН розчину при концентрації мурашиної кислоти (моль/л) у розчині: а – 10^{-4} , б – 10^{-3} , в – 10^{-2} , відносний вміст молекулярної (г) та іонної (д) форм мурашиної кислоти

Властивості вивчених кислот [11, 16]

Кислота	Молекулярна маса	Розчинність у воді, г/л	Константа іонізації (рK _a) при 25°C	Коефіцієнт розподілення в системі „октанол–вода” (K _{ов})
H ₂ S	34,08	∞	7,05	0,23
HCN	27,03	∞	9,233	-0,25
HCOOH	46,026	∞	3,737	-0,54
CH ₃ COOH	60,052	∞	4,75	-0,17
CH ₃ CH ₂ COOH	74,079	∞	4,875	0,33
C ₄ H ₈ O ₂	88,11	∞	4,82	0,790
C ₅ H ₁₀ O ₂	102,13	24	4,82	1,39
C ₆ H ₁₂ O ₂	116,16	10,3	4,88	1,92
C ₇ H ₁₄ O ₂	130,19	2,820	4,8	2,36

Коефіцієнт розподілення “ліпід–вода”, як показник ліпофільності K_{ов} (або міра ліпофільності) речовини показує її здатність проникати через ліпідний матрикс мембран. Його найчастіше визначають як співвідношення концентрації неіонізованої сполуки в органічній (найчастіше октанол, а також – олія, ліпіди тощо) та у водній фазах у рівновазі [10]:

$$K_{\text{ов}} = \left(\frac{C_{\text{о}}}{C_{\text{в}}} \right)_{\text{рівновага}} \quad \text{p}K_{\text{ов}} = \lg \left(\frac{C_{\text{о}}}{C_{\text{в}}} \right) \quad (2),$$

де C_в – концентрація розчинної сполуки у воді, C_о – концентрація розчинної сполуки в октанолі, K_{ов} вимірюється від 10⁻⁴ до 10⁸, тому частіше використовується pK_{ов} = lgK_{ов}.

Коефіцієнт розподілення “мембрана–вода” залежить від будови молекули, збільшуючись зі збільшенням довжини вуглеводневого радикала (див. таблицю), і змін хімічного потенціалу m₀ при переході з водної фази в ділянку упорядкованих вуглеводневих хвостів мембрани:

$$K_{\text{ов}} = \exp \left(\frac{\Delta\mu_0}{kT} \right) \quad (3),$$

де k – постійна Больцмана, T – абсолютна температура, K.

Іонізована форма сполуки має значно менший коефіцієнт розподілення “ліпід–вода”, ніж молекулярна, і сумарна проникність сполуки через мембрану буде визначатися внеском кожної форми при даному рН.

У першому наближенні опір проникності (R) речовини через упорядкований ліпофіль-

ний матрикс мембрани та, відповідно, проникність мембрани (P_м) залежать від її товщини (d), коефіцієнта дифузії (D_м) розчину в мембрані та коефіцієнта розподілення “мембрана–розчин” K_{ов} [14], і розраховується за рівнянням:

$$R = \frac{l}{P_{\text{м}}} = \frac{\delta}{D_{\text{м}} \cdot K_{\text{ов}}} \quad (4).$$

Проникність молекулярної та іонних форм у шарі, який не перемішується, на поверхні мембрани при відсутності різниці потенціалів визначається товщиною і коефіцієнтом дифузії у водній фазі (D₀ ≈ 5·10⁻⁶ см²/с) цього шару (h ≈ 10⁻² см). Для більшості речовин така проникність варіює від 1·10⁻⁴ до 5·10⁻⁴ см/с, тоді як проникність через саму мембрану P_м змінюється в широких межах від 10⁻¹² до 10² см/с. Проходження нейтральних молекул через бішар визначається коефіцієнтом дифузії в неперемішуваному шарі біля поверхні мембрани, а рух іонів повністю залежить від їх здатності проникати через гідрофобну ділянку мембрани.

Усі представлені фактори (здатність до іонізації, розчинність у воді, коефіцієнт розподілення “мембрана–вода” та проникність через бішар [7]) взаємопов’язані та визначають здатність хімічної сполуки проникати через мембрани та, відповідно, виявляти біологічну активність, в т.ч. і токсичність.

Дія мурашиної кислоти на електропро-

відність БЛМ визначалася при різних значеннях рН і концентрації розчину. Після формування БЛМ кислоту додавали в розчин з одного боку мембрани і одночасно реєстрували рН та вольт-амперні залежності (несиметричні умови). Окрім цього, мембрану формували в розчині з однаковими значенням рН та концентрації кислоти по обидва боки БЛМ (симетричні умови). В обох випадках було виявлено, що нахил вольт-амперних кривих і, відповідно, електропровідність мембран змінювалися тільки в ділянці рН, близькій до значення рК мурашиної кислоти. Аналіз вольт-амперних кривих при різних концентраціях та рН показав, що питома електропровідність БЛМ має максимум при рН розчину, який рівний рК дисоціації мурашиної кислоти, коли концентрація її молекулярної та іонної форм в розчині однакова. При цьому питома електропровідність БЛМ збільшується з підвищенням концентрації кислоти (див. рис.1).

Аналіз залежності питомої електропровідності БЛМ від концентрації мурашиної кислоти при постійному рН, яке рівне рК (3,75) свідчить, що електропровідність лінійно залежить від концентрації та в

логарифмічних координатах представляє пряму з нахилом близько 45° (рис. 2,а).

Експерименти були повторені для інших нижчих карбонових кислот (оцтової, пропіонової, пентанової, гептанової). Так само, як і для мурашиної кислоти, при наявності цих кислот зміни питомої електропровідності від рН мали максимальне значення. Але при цьому максимум електропровідності змістився в ділянку рН рівному 4,75–4,85, що відповідає зміні констант дисоціації. Залежність питомої електропровідності ліпідних БЛМ від концентрації кислоти при рН рівному рК також мала лінійний характер, але зміщувалась в ділянку меншої концентрації кислот зі збільшенням довжини вуглеводневого радикала.

При введенні HCN у розчин, який омиває мембрану, електропровідність БЛМ дещо збільшується лише від рН 9,0 до 9,3, після чого – знижується. За здатністю змінювати електропровідність БЛМ при рН рівному рК і виступати як протонатор, ціаністовуглеводнева кислота дещо слабша від оцтової кислоти.

На відміну від розглянутих раніше кислот сірководень є двоосновною кислотою. Дія сірководню та сульфідів на електро-

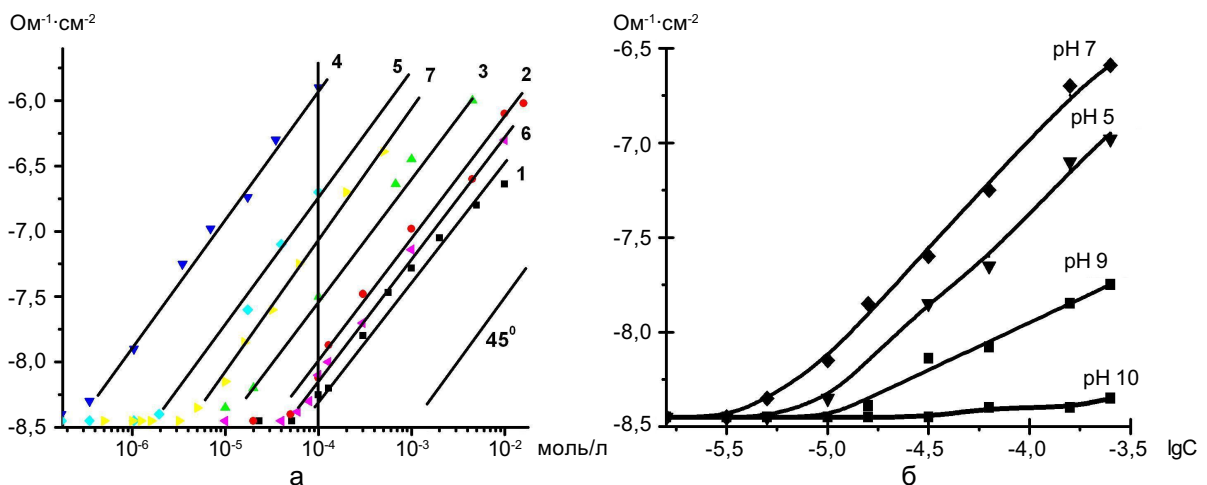


Рис. 2. Залежність питомої електропровідності бішарової ліпідної мембрани від концентрації кислоти в розчині при рН рівному рК (а) та від логарифму молярної концентрації сульфиду при різних значеннях рН (симетричні умови), (б): 1 – HCOOH, 2 – CH₃COOH, 3 – CH₃-CH₂-COOH, 4 – CH₃-(CH₂)₃-COOH, 5 – CH₃-(CH₂)₄-COOH, 6 – HCN, 7 – H₂S

провідність БЛМ залежить від рН розчину; максимальне значення провідності спостерігається при рН, близькому до pK_1 сірководневої кислоти. При подальшому підвищенні рН розчину, зі зменшенням вмісту молекулярної форми, вплив сульфиду знижується, а при $pH \geq 10$, коли в розчині переважають іонні форми, опір БЛМ наближається до значень, які характерні для немодифікованої мембрани.

Підвищення концентрації сульфиду (див. рис. 2,б) призводить до лінійного збільшення провідності залежно від рН.

У несиметричних умовах, коли по різні боки мембрани знаходяться різні форми сірки, виникає мембранний потенціал $\Delta\phi$, який визначали з вольт-амперних кривих за точкою нульового струму або вимірювали безпосередньо електрометром. Значення мембранного потенціалу залежить від ΔpH . Нахил прямої $\Delta\phi$ на одиницю рН становить 58 мВ, що свідчить про протонну провідність мембрани.

Таким чином, усі слабкі кислоти, включаючи неорганічні, змінюють електропровідність БЛМ. Максимальні зміни спостерігаються при значенні рН, рівному значенню pK кислоти (для H_2S при pK_1), коли в роз-

чині наявні як молекулярна, так і іонна форми. Це повністю узгоджується зі змінами електропровідності БЛМ під впливом протонофорів [9]. Електропровідність БЛМ при рН рівному pK лінійно залежить від концентрації слабкої кислоти в розчині (див. рис. 2,а) та визначається здатністю сполуки розчинятись у мембрані.

При збільшенні коефіцієнта розподілення “мембрана–вода”, який лінійно залежить від такого для системи “октанол–вода” [8, 18] і від кількості атомів вуглецю у карбонових одноосновних насичених кислот, вплив на електропровідність БЛМ збільшується. При цьому збільшується ділянка рН, в якій спостерігаються зміни провідності. При рН рівному pK електропровідність БЛМ лінійно залежить від $pK_{ов}$ при однаковій концентрації усіх досліджених слабких кислот. На рис. 3 наведено залежність питомої електропровідності БЛМ від коефіцієнта розподілення “октанол–вода” при рН рівному pK і концентрації 10^{-4} моль/л.

Описані вище ефекти слабких кислот на електропровідність БЛМ повністю аналогічні впливу розповсюджених протонофорів, для функціонування яких необхідна наявність у розчині як іонної, так і молекулярної форм речовин, що і спостерігається при рН рівному pK .

Зміни електропровідності описуються добре вивченим механізмом транспорту протонів через клітинні мембрани. Сукупність даних про вплив рН розчинів і концентрації кислот на електропровідність БЛМ достатньо добре відповідає моделі рухомих переносників [4].

При додаванні слабких кислот у розчин, який омиває мембрану, встановлюється рівновага між іонною та молекулярною формами відповідно до рівняння (1). Крім того, частина молекулярної форми вбудовується в мембрану,

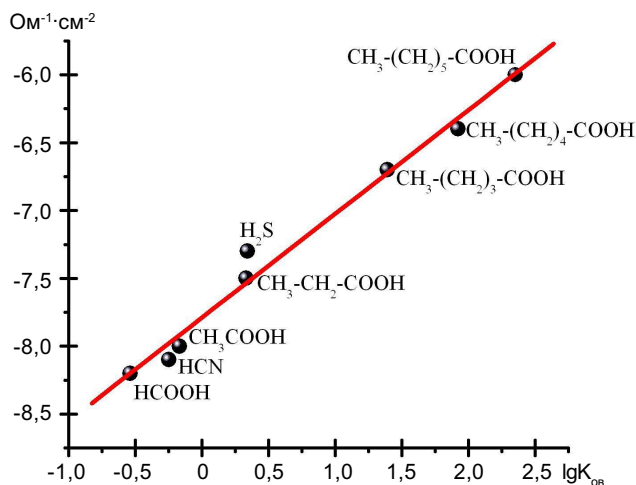


Рис. 3. Залежність питомої електропровідності бішарових ліпідних мембран від коефіцієнта розподілення P „октанол–вода” при концентрації кислот у розчині 10^{-4} моль/л і при рН рівному pK

і її кількість залежить від рН і коефіцієнта розподілення $K_{об}$ (2).

Під дією градієнта концентрації молекули рухаються до протилежного боку мембрани. Якщо при рН рівному рК до мембрани прикласти різницю потенціалів (рис. 4), то з її правого боку молекула (НА) почне віддавати протон, а аніон (A^-), який утворився, буде рухатися за градієнтом потенціалу до лівого боку мембрани та приєднувати протон на протилежній поверхні, замикаючи цикл.

У лужному середовищі, при рН більшому, ніж рК, коли в розчині переважають іони, вбудовування молекулярної форми в мембрану ускладнено, що призводить до зниження загальної концентрації речовини в мембрані і, як наслідок, до малої провідності. У цьому разі, провідність БЛМ визначається здатністю аніонної форми проникати через бішар.

У кислому середовищі при рН меншому від рК, коли в розчині переважає молекулярна форма, утворення аніонів уповільнене й електропровідність невелика, бо транспорт незаряджених молекул кислоти не призводить до зміни провідності мембран.

Тільки в ділянках рН, близьких до константи дисоціації, коли обидві форми наявні в розчині, спостерігається максимальна

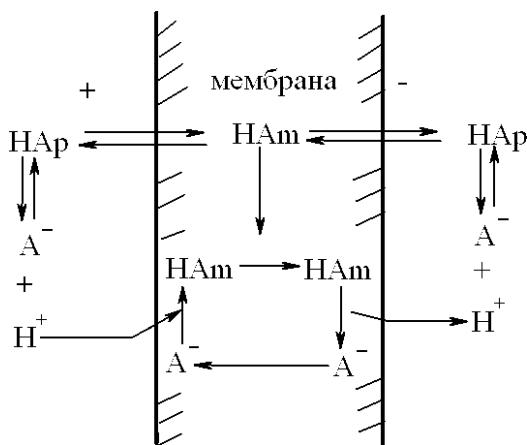


Рис. 4. Механізм зміни електропровідності бішарових ліпідних мембран при наявності слабких кислот. Індеси: р – розчин, m – мембрана

зміна електропровідності бішарових ліпідних мембран внаслідок переносу протона. При цьому зміни електропровідності визначаються концентрацією кислоти та здатністю її вбудовуватись у мембрану.

ВИСНОВКИ

1. Насичені карбонові одноосновні кислоти і навіть такі слабкі неорганічні кислоти, як HCN, H_2S , можуть виявляти протонофорні властивості, котрі залежать від здатності слабкої кислоти вбудовуватись у БЛМ.

2. Зміна електропровідності мембрани за наявності таких кислот залежить від рН, концентрації речовин, коефіцієнта розподілення в системі “октанол–вода” і описується аналогічним для протонофорів механізмом рухливих переносників.

3. Максимальні зміни електропровідності мембрани спостерігаються при рН, близьких до рК кислоти.

K. Kylyvnyk, G. Ostrovska, L. Khmars'ka, T. Rybalchenko, O. Ksenzec, V. Rybalchenko

THE WEAK ACIDS AS PROTONS CARRIERS THROUGH BILAYER LIPID MEMBRANES

The ability of the weak inorganic acids (H_2S , HCN) and lower carboxylic acids to interact with bilayer lipid membranes (BLMs), change their conductivity, act as the protonophores were investigated. The mechanism of the BLM conductivity change was studied. The factors affecting the acids interaction with model lipid membranes were determined. Maximum conductivity change observes at pH equal dissociation constant of weak acids and depends on the distribution coefficient “octanol(membrane)-water”.

Ukrainian State Chemical Technological University, Dnipropetrovsk, Ukraine

National University named after Taras Shevchenko, Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Батлер Дж.Н. Ионные равновесия (математическое описание) / Пер. с англ. – Л.: Химия, 1973. – 448 с.
2. Иванов В.Т. Мембраны и ионофоры // Вестник АН СССР. – 1975. – Вып. 6. – С.50–59.

3. Киливник К.Е., Ксенжек О.С. Электрохимические методы исследования модельных липидных мембран // Вопр. химии и хим. технологии. – 2003. №5. – С. 124–130.
4. Маркин В.С., Чизмаджев Ю.А. Индуцированный ионный транспорт. – М.: Наука, 1974. – 252 с.
5. Островська Г.В. Первинні механізми мембраномодулюючої дії біорегуляторів природного і синтетичного походження: Автореф. дис. ...д-ра біол.наук. – К., 2005. – 44 с.
6. Рыбальченко В.К., Островская Г.В. Мембранотропная активность нейрогипофизарных гормонов. – Луганськ, Елтон-2, 1998. – 82 с.
7. Avdeef A. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state. – In: Hardcover Trade Cloth, John Wiley and Sons, Ltd. (UK), 2003. – 287 p.
8. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability, and charge state) // Curr. Top. Med.Chem. – 2001. – 1, № 4. – P.277–351
9. Cohen F.S., Eisenberg M., McLaughlin S. The kinetic mechanism of action of an uncoupler of oxidative phosphorylation // J. Membr.Biol. – 1977. – 37, Dec. – P. 361–396.
10. David R. L. Handbook of chemistry and physics. 84th Edition. – CRC Press, 2004. – 2475 p.
11. Finkelstein A. Weak-acid uncouplers of oxidative phosphorylation. Mechanism of action on thin lipid membranes // Biochim. and Biophys.Acta–Bioenergetics. – 1970. – 205, №1. – P. 1–6.
12. Goodman B. E. Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transporters // Adv. Physiol. Educ. 2002. – 26, Dec. – P.146–157.
13. Hansch C., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. – ACS, Washington, DC, 1995. – 386 p.
14. Leo A., Hansch C., Elkins D. Chemical partition coefficient and their uses // Chem.Rev. – 1971. – 71, №6. – P.526–615.
15. McLaughlin S. Dilger J.P. Transport of protons across membrane by weak acids // Physiol.Rev. – 1980. – 60, №3. – P. 825–863.
16. Mueller P., Rudin D.O., Tien H. T., Wescott W. C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution // J. Physiol. Chem. – 1963. – 67, №6, – P. 534–535.
17. Tien H.T., Ottova-Leitmannova A. Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications. – Elsevier Science Ltd, 2003. – 1034 p.
18. Walter A, Gutknecht J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes // J. Membr. Biol. – 1984. – 77, №3. – P.255–264.

*Укр. хіміко-технол. ун-т, Дніпропетровськ;
Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*

*Матеріал надійшов до
редакції 16.11.2006*