



УДК 547.96 : 541.6

СЕЛЕКТИВНАЯ АДсорбция анионов фосфолипидами

Барсуков Л. И., Волкова В. И., Шапиро Ю. Е.,
Викторов А. В., Быстров В. Ф., Бергельсон Л. Д.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Изучено влияние анионов на индуцируемую валиномицином катионную (K^+ и Na^+) проницаемость фосфолипидных липосом. Показано, что проницаемость возрастает в ряду анионов SO_4^{2-} , Cl^- , $CH_3CH(OH)COO^-$, NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- , причем катионная селективность валиномицина при этом не меняется. Анионы оказывают также существенное влияние на сдвиги, индуцируемые парамагнитными катионами в спектрах 1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР. Этот эффект возрастает в ряду Cl^- , NO_3^- , SCN^- . Сделан вывод, что наблюдаемые эффекты обусловлены селективной адсорбцией анионов липидным бислоем. Это подтверждается измерением электрофоретической подвижности липосом. По изотермам адсорбции получена количественная характеристика процесса адсорбции.

Исследования, проведенные нами ранее, показали, что индуцируемая валиномицином проницаемость липосом для катионов сильно зависит от природы присутствующего аниона [1]. Установлено также, что природа аниона влияет на положение сигналов ЯМР фосфолипидных дисперсий, содержащих парамагнитные ионы лантанидов [2—4]. В данном сообщении показано, что оба эти эффекта имеют общую природу и связаны с селективной адсорбцией анионов на поверхности фосфолипидного бислоя.

Как видно из табл. 1, скорость выхода K^+ и Na^+ из липосом под действием валиномицина существенно зависит от природы анионного компонента соли. При этом катионная проницаемость липосом возрастает в следующем лиотропном ряду анионов: SO_4^{2-} , Cl^- , $CH_3CH(OH)COO^-$, NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- . В соответствии с правилом электронейтральности выход катионов из липосом должен быть сопряжен с выходом анионов. Поэтому можно предполагать, что транспорт катионов под действием валиномицина лимитируется скоростью диффузии анионов через мембрану липосом. Это объяснение могло бы быть справедливым для двух крайних членов полученного ряда анионов: для плохо проникающего через мембраны сульфата [5] и для липофильного тиоцианат-иона [6]. Однако оно не согласуется с известными данными по проницаемости липосом для нитрата и хлорида [7]. Хотя проницаемость для нитрата намного ниже, по нашим данным, этот анион оказывает на валиномициновый транспорт катионов значительно большее влияние, чем хлорид.

Кроме того, если бы диффузия анионов была определяющим фактором скорости процесса, то по крайней мере для некоторых анионов следовало ожидать существенное снижение катионной специфичности действия валиномицина. Однако, как видно из табл. 1, во всех случаях проницаемость липосом для калия была значительно выше их натриевой проницаемости. Таким

Влияние анионов на индуцируемую валиномицином катионную проницаемость липосом

концентрация лецитина 1 мкмоль/мл, валиномицина 0,1 нмоль/мл

Анион	Выход катионов из липосом за 10 мин, % от общего содержания катионов в липосомах		Анион	Выход катионов из липосом за 10 мин, % от общего содержания катионов в липосомах	
	K ⁺	Na ⁺		K ⁺	Na ⁺
SO ₄ ²⁻	6,6	—	NO ₃ ⁻	49,1	14,6
Cl ⁻	11,3	3,0	ClO ₄ ⁻	71,2	28,5
CH ₃ CH(OH)COO ⁻	21,8	5,5	SCN ⁻	67,8	23,3

Таблица 2

Индукцируемая валиномицином катионная проницаемость липосом, приготовленных из смеси лецитина и фосфатидилинозита в 0,15 М растворах солей K⁺ и Na⁺ общая концентрация фосфолипидов в ячейке 1 мкмоль/мл, валиномицина 0,23 нмоль/мл

Содержание фосфатидилинозита в липосомах, мол. %	Выход катионов из липосом за 5 мин, % от общего содержания катионов		
	KNO ₃	KCl	NaNO ₃
0	64,2	20,0	25,4
20	30,6	8,2	16,3
50	23,1	6,0	1,5

образом, специфичность валиномицина по отношению к калию от природы аниона не зависит. Согласно данным, приведенным на рис. 1, эта специфичность сохраняется в широком диапазоне концентраций валиномицина. Линейный характер полученных зависимостей для K⁺ и Na⁺, а также одинаковый наклон полученных прямых позволяют предположить, что перенос этих катионов через мембрану липосом осуществляется сходным образом и что нет существенных изменений в механизме переноса при изменении концентрации валиномицина в широких пределах.

При введении в липосомы фосфатидилинозита скорость диффузии катионов заметно снижается (табл. 2). Однако появление отрицательного заряда на мембране липосом не влияет на калиевую избирательность валиномицина и на эффект анионов: в присутствии фосфатидилинозита проницаемость «цитратных» липосом опять была выше проницаемости «хлоридных». Дальнейшие исследования показали, что природа аниона влияет не только на катионную проницаемость липосом, но и на их осмотические свойства и электрофоретическую подвижность.

Поскольку липосомы обладают свойствами идеального осмометра [8], изменения концентрации соли внутри липосом должны сопровождаться изменениями их объема. На рис. 2 представлены кривые, показывающие изменение светопропускания липидных дисперсий, приготовленных в растворах различных солей и помещенных затем в раствор сахарозы изотонической концентрации. В отсутствие валиномицина светопропускание липидных дисперсий со временем не меняется, так как обмен растворенными веществами между липосомами и окружающей водной средой не происходит. При добавлении валиномицина оптическая плотность дисперсий начинает возрастать за счет осмотического сжатия липосом, которое свидетельствует о том, что валиномицин стимулирует суммарный поток соли

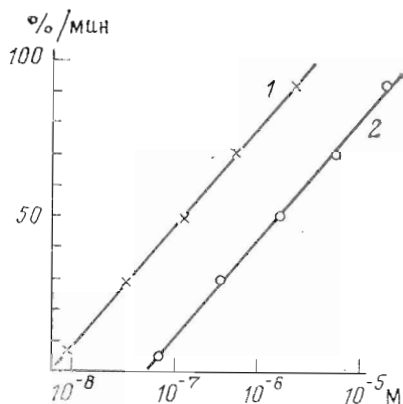


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости выхода K^+ и Na^+ из липосом от концентрации валиномицина. Липосомы приготовлены в 0,15 M растворе: 1 — KNO_3 ; 2 — $NaNO_3$

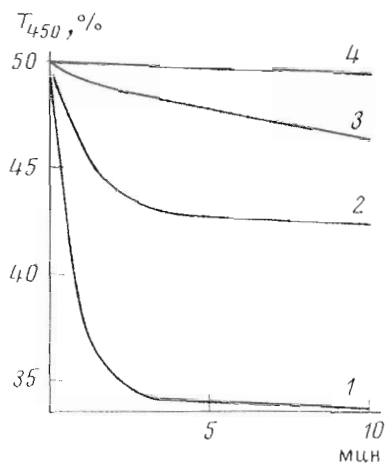


Рис. 2

Рис. 2. Осмотическое сжатие лецитиновых липосом после добавления валиномицина (лецитин — 0,3 мкмоль/мл, валиномицин — 40 нмоль/мл) в присутствии: 1 — $KSCN$; 2 — KNO_3 ; 3 — $NaNO_3$; 4 — KCl

из межламеллярного водного объема липосом в окружающий водный раствор. Скорость этого процесса возрастает в том же лиотропном ряду анионов: Cl^- , NO_3^- , SCN^- (рис. 2, 4, 2 и 1). Она зависит также и от природы катиона. Так, липосомы, содержащие нитрат калия (рис. 2, 2), уменьшаются в объеме значительно быстрее, чем липосомы, содержащие нитрат натрия (рис. 2, 3). Аналогичные зависимости были получены, когда валиномицин не добавлялся к уже приготовленной дисперсии липосом, а включался в липосомы заранее в процессе приготовления липосом (путем смешивания растворов валиномицина и лецитина в органическом растворителе). Отсюда можно сделать вывод, что при добавлении валиномицина к липидной дисперсии его диффузия внутрь липосом не является самой медленной стадией в процессе переноса катионов из липосом в окружающий водный раствор.

Весьма показательным представляется тот факт, что валиномицин оказывает влияние на осмотическое поведение липосом даже тогда, когда внутри и снаружи липосом находится один и тот же раствор соли, т. е. в условиях отсутствия осмотического градиента. Так, если липосомы оставить в том же растворе, в котором они были приготовлены, и добавить к ним валиномицин, наблюдается постепенное набухание липосом, фиксируемое по увеличению светопропускания липидной дисперсии (рис. 3). Наиболее сильно набухают липосомы, содержащие $NaNO_3$, KNO_3 и $KSCN$ (рис. 3, 2, 3 и 4). В случае KCl и $NaCl$ (рис. 3, 1) изменения объема липосом незначительны. Набухание липосом в отсутствие концентрационного градиента соли наблюдалось ранее в случае липосом, содержащих соли салicyловой кислоты, и было объяснено адсорбцией липофильных органических анионов на поверхности липидных слоев [9]. Мы предположили, что осмотическое поведение липосом в присутствии неорганических анионов также может быть объяснено их адсорбцией на липидном бислое.

Для проверки этого предположения было проведено сравнение электрофоретической подвижности лецитиновых липосом в растворах различных солей калия. Из табл. 3 видно, что в растворах KCl , KNO_3 и $KSCN$ лецитиновые липосомы ведут себя как отрицательно заряженные частицы, при этом подвижность липосом падает в ряду SCN^- , NO_3^- , Cl^- . Таким

Таблица 3

Электрофоретическая подвижность
лецитиновых липосом в растворах
различных солей калия

Раствор (0,15 М)	Подвижность, мм·с ⁻¹ ·В ⁻¹ ·см
KCl	-0,15±0,01
KNO ₃	-1,46±0,03
KSCN	-1,85±0,11

образом, это подтверждает предположение о том, что анионы селективно адсорбируются липидным бислоем. Концентрирование анионов в примембранном пространстве было также подтверждено нами при изучении влияния ряда неорганических солей на спектры ЯМР липидных дисперсий, содержащих гидрофильные парамагнитные зонды.

Впервые такое влияние было обнаружено при изучении спектров ЯМР

фосфолипидных дисперсий, содержащих парамагнитные ионы лантанидов [2—4]. Сравнение величин химических сдвигов, индуцируемых солями европия и празеодима, показало, что нитраты этих металлов вызывают в 2,5 раза большие сдвиги, чем хлориды. Это различие наблюдалось только в гетерогенной системе (озвученная водная дисперсия лецитина), но не в гомогенном растворе (раствор фосфохолина в воде). Это указывало на зависимость эффекта анионов от наличия мембранной структуры. Добавление некоторых диамагнитных солей к липидным дисперсиям, содержащим сдвиговый реагент (Pr^{3+}), приводит к дальнейшему увеличению индуцированных сдвигов (табл. 4 и рис. 4). Как видно из рис. 4, природа катионной компоненты добавляемой соли не имеет существенного значения: ни однозарядные катионы (Li^+ , Na^+ и K^+), ни двухзарядный Ca^{2+} на величину индуцированного сдвига не влияют. Напротив, природа аниона является решающей. По своему влиянию на величину индуцированного сдвига анионы располагаются в ряд ($\text{Cl}^- < \text{NO}_3^- < \text{SCN}^-$), который совпадает с рядом эффективности анионов в стимуляции валиномицинового транспорта.

Дальнейшие исследования показали, что включение в липидный бислой анионных липидов (фосфатидилинозита и фосфатидилсерина) также приводит к возрастанию величин индуцированных сдвигов сигналов групп $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ (табл. 5). Эти липиды, придавая поверхности бислоя отрицательный заряд, влияют на распределение катионов в примембранном прост-

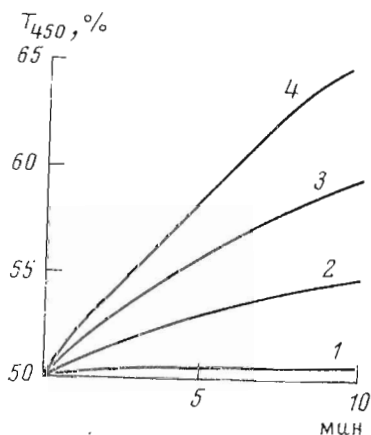


Рис. 3

Рис. 3. Осмотическое набухание липосом после добавления валиномицина (лецитин — 0,3 мкмоль/мл, валиномицин — 40 нмоль/мл) в присутствии: 1 — KCl или NaCl; 2 — NaNO₃; 3 — KNO₃; 4 — KSCN

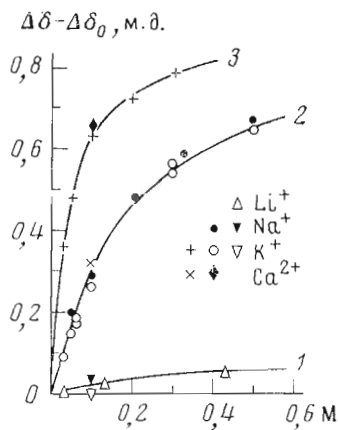


Рис. 4

Рис. 4. Влияние добавок диамагнитных солей на индуцируемые $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ сдвиги сигнала $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ в спектрах ^1H -ЯМР озвученной водной (D_2O) дисперсии лецитина (лецитин — 0,06 М, $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ — 0,01 М): 1 — хлориды Li^+ , Na^+ , K^+ ; 2 — нитраты Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ; 3 — тиоцианаты K^+ , Ca^{2+}

Таблица 4

Влияние диамагнитных солей (KNO_3 и $KSCN$) на индуцируемые Pr^{3+} сдвиги ($\Delta\delta$) сигналов полярных групп в спектрах ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР озвученной водной (D_2O) дисперсии яичного лецитина
концентрация лецитина 0,26 М, $Pr(NO_3)_3$ — 0,01 М, $KSCN$ и KNO_3 — 0,1 М

Группа	$\Delta\delta$, м.д.		
	без добавления солей	в присутствии	
		$KSCN$	KNO_3
$PO^{13}CH_2$ (холлин)	0,73	1,15	—
$^{13}CH_2N^+$	0,55	0,84	—
$(^{13}CH_3)_3N^+$	0,28	0,44	—
^{31}P	10,15	—	17,84

Таблица 5

Индукцируемые Pr^{3+} сдвиги ($\Delta\delta$) сигнала $(CH_3)_3N^+$ в спектрах 1H - и ^{13}C -ЯМР озвученных липидных дисперсий
концентрация лецитина 0,06 М при съемке спектров 1H -ЯМР и 0,26 М при съемке спектров ^{13}C -ЯМР; $Pr(NO_3)_3$ — 0,01 М

Липид	$\Delta\delta$, м.д.	
	1H	^{13}C
Лецитин	0,42	0,28
Лецитин — фосфатидилинозит, 3:1	0,64	0,39
Лецитин — фосфатидилсерин, 3:1	—	0,48

ранстве. В результате увеличивается концентрация Pr^{3+} в диффузном слое и возрастает вероятность его взаимодействия с фосфатными группами молекул лецитина. На основании изложенных фактов можно предположить, что такое же явление лежит в основе влияния неорганических ионов на величины индуцированных сдвигов. Только в этом случае перераспределение катионов происходит в результате селективной адсорбции анионов на поверхности липидного бислоя.

Анализ кривых, приведенных на рис. 4, позволяет сделать количественные выводы о процессе адсорбции анионов на липидном бислое. Эти кривые описываются изотермами адсорбции Лэнгмюра в соответствии с уравнением

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{\max} KC}{1 + KC},$$

где $\Delta\delta$ — индуцированный сдвиг сигнала $(CH_3)_3N^+$ при данной концентрации аниона; C — концентрация аниона; K — константа связывания аниона; $\Delta\delta_{\max}$ — предельный сдвиг при $C \rightarrow \infty$ для данного аниона при 0,01 М концентрации $Pr(NO_3)_3$. Полученные значения постоянных $\Delta\delta_{\max}$ и K приведены в табл. 6. Величина $\Delta\delta_{\max}$ зависит не только от природы аниона, но и от концентрации Pr^{3+} . Можно полагать, что при одной и той же концентрации Pr^{3+} значения $\Delta\delta_{\max}$, полученные для разных анио-

Таблица 6

Постоянные изотерм адсорбции Лэнгмюра для различных анионов

Анион	$\Delta\delta_{\max}$, м.д.	K , л/моль
Cl^-	$0,14 \pm 0,01$	$1,67 \pm 0,45$
NO_3^-	$1,00 \pm 0,02$	$4,03 \pm 0,26$
SCN^-	$0,99 \pm 0,01$	$23,65 \pm 1,09$

нов, характеризуют число их центров адсорбции на липидном бислое. Сравнение данных табл. 6 показывает, что число таких центров, по-видимому, одинаково для нитрат- и тиоцианат-ионов, тогда как для хлорида их должно быть значительно меньше. В то же время по константе равновесия (K) хлорид и нитрат различаются значительно меньше. Большая величина K в случае тиоцианат-иона, свидетельствующая о его более сильной адсорбции на липидном бислое, хорошо согласуется со значительной липофильностью этого аниона. Важно отметить, что отношение найденных величин K для Cl^- , NO_3^- и SCN^- , равное 1 : 2,4 : 14,2, удовлетворительно коррелирует с отношением электрофоретических подвижностей липосом в присутствии этих анионов (1 : 3,1 : 10,9).

Экспериментальная часть

Фосфатидилхолин выделяли из желтков куриных яиц [10], фосфатидилинозит — из пекарских дрожжей [11], фосфатидилсерин — из мозга крупного рогатого скота [12]. Непосредственно перед использованием фосфолипиды были дополнительно хроматографированы на колонках с силикагелем КСК (100—150 меш) и их чистота была проверена с помощью ТСХ на силикагеле.

Липосомы для измерения ионной проницаемости готовили по следующей методике: бензольный раствор лецитина или его смеси с фосфатидилинозитом, содержащий 15 мкмоль липидного фосфора, упаривали досуха в вакууме при температуре не более 40°; к остатку добавляли 1 мл 0,15 М солевого раствора и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре; полученную дисперсию диализовали против 0,3 М раствора глюкозы, содержащего 10^{-4} М K^+ (или Na^+). Объем диализата составлял 100 мл, время диализа 30 мин. Диализ повторяли дважды со свежим раствором глюкозы. По окончании диализа содержание катионов в липидной дисперсии составляло 0,1—0,3 экв/моль липидного фосфора. Непрерывную регистрацию выхода катионов из липосом в присутствии валиномицина проводили с помощью катиончувствительных электродов. Для этого в ячейку помещали 0,3 мл липидной дисперсии, 4,7 мл 0,3 М раствора глюкозы, содержащей 10^{-4} М K^+ или Na^+ , и затем добавляли 0,01 мл спиртового раствора валиномицина. Общее содержание катионов в липосомах определяли после добавления в измерительную ячейку 0,1 мл 10% раствора Тритона X-100. В табл. 1 и 2 приведены средние значения из 5—7 измерений. Ошибка измерений не превышала 10 отн. %.

При приготовлении образцов для съемки спектров ЯМР лецитин диспергировали в 1 мл D_2O в течение 30 мин. Полученную дисперсию обрабатывали 10 мин ультразвуком в атмосфере азота при + 5° (прибор УЗДН-1, мощность 0,5 отн. ед., частота 22 кГц) и затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Спектры ЯМР получены на приборе Varian XL-100.

Осмотические свойства липосом изучали путем регистрации оптической плотности при 450 нм на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР) в дифференциальном режиме записи. В измерительную и сравнительную кюветы помещали по 2 мл разбавленной в 50 раз исходной лецитиновой дисперсии (концентрация лецитина 15 мкмоль/мл), приготовленной в 0,15 М растворе калиевой или натриевой соли, и затем добавляли в измерительную кювету 0,01 мл спиртового раствора валиномицина, а в сравнительную кювету — 0,01 мл спирта. При проведении опытов в условиях осмотического градиента по ионам K^+ или Na^+ исходную дисперсию разбавляли 0,3 М раствором сахарозы. Электрофоретическую подвижность липосом определяли на приборе фирмы Opton (ФРГ) при 25° и рН 5,8—6,0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков Л. И., Шкроб А. М., Бергельсон Л. Д. (1972) Биофизика, **17**, 1032—1036.
2. Барсуков Л. И., Быстров В. Ф., Бергельсон Л. Д. (1972) Тезисы секционных докладов IV Международного биофизического конгресса, 7—14 авг. 1972 г., ЕИХ а/3, с. 24, М.
3. Bystrov V. F., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Barsukov L. I., Bergelson L. D. (1972) FEBS Lett., **25**, 337—338.
4. Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Volkova V. I., Barsukov L. I., Bystrov V. F., Bergelson L. D. (1975) Chem. Phys. Lipids, **14**, 227—232.
5. Wieth J. O. (1970) J. Physiol., **207**, 581—609.
6. Dalmark M., Wieth J. O. (1972) J. Physiol., **224**, 583—610.
7. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965) J. Mol. Biol., **13**, 238—252.
8. Bangham A. D., de Gier J., Greville C. D. (1967) Chem. Phys. Lipids, **1**, 225—234.
9. Singer M. A., Bangham A. D. (1971) Biochim. et biophys. acta, **241**, 687—692.
10. Dawson R. M. (1965) Biochem. J., **88**, 414.
11. Travelyan W. E. (1966) J. Lipid Res., **7**, 445—450.
12. Phospholipids (1964) Ansell G. B., ed., Elsevier Publ. Co., pp. 102—104.

Поступила в редакцию
6. IV. 1977

SELECTIVE ADSORPTION OF ANIONS BY PHOSPHOLIPIDS

BARSUKOV L. I., VOLKOVA V. I., SHAPIRO Yu. E.,
VIKTOROV A. V., BYSTROV V. F., BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Anion effects were studied on the valinomycin — induced cation (K^+ and Na^+) permeability of phospholipid liposomes. The permeability has been shown to increase according to the anion order: SO_4^{2-} , Cl^- , $CH_3CH(OH)COO^-$, NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- , the potassium specificity of valinomycin being retained. Anions had great effects on the chemical shift changes induced by paramagnetic cations in the $^1H^-$, $^{13}C^-$ and $^{31}P^-$ NMR spectra of lecithine liposomes. These effects increased in the order: Cl^- , NO_3^- , SCN^- . The conclusion was drawn that the anion effects were due to the selective adsorption of anions by phospholipid bilayers. This conclusion was confirmed by measuring the electrophoretic mobility of the liposomes. The adsorption parameters were derived from the adsorption isotherms measured.