

ՕՐԻԳԻՆԱԼ ՀՈՂՎԱԾՆԵՐ \* ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 179—183, 1987

УДК 577.37

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТИОНОВ  
С БИСЛОЯМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ГАНГЛИОЗИДЫ

Н. С. МАТИНЯН, Г. Б. МЕЛІКՅԱՆ, В. Б. АՐԱԿԵԼՅԱՆ, Ը. Մ. ԱՎԱԿՅԱՆ,  
Ս. Ն. ԿՈՇԱՐՈՎ, Օ. Ն. ԱՄԺՋՅԱՆ

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР. Институт тонкой органической химии  
им. А. Л. Минджояка АН Армянской ССР, Ереван

**Аннотация** — Исследовано взаимодействие ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  с бислоями из фосфатидилхолина, содержащими около 6 мольных % ганглиозидов  $G_{M1}$ ,  $G_{D1a}$ ,  $G_{T1b}$  мозга человека. Двухвалентные катионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  адсорбируются одинаково и сильнее, чем одновалентные  $K^+$  и  $Na^+$ . Зависимости  $\Delta\varphi$  (Igc) для каждой пары исследованных катионов практически совпадают. Обнаружено, что, несмотря на различное число зарядов в молекулах разных ганглиозидов, последние взаимодействуют со всеми перечисленными катионами в равной мере.

**Անոտացիա** — Ինտերակցիոնալ Վ  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  աղտորրցքիան Յ մալ-տոկոս զանգլիոզիդ պարունակող  $G_{M1}$ ,  $G_{D1a}$ ,  $G_{T1b}$  լիպիտիկ թաղանթների վրա:  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  աղտորրցքիան ունակությունները նախասար են իրար և ազելի մեծ են, քան  $K^+$ ,  $Na^+$  զեպրում: Տարրեր զանգլիոզիդները, չնայած տարրեր քանակության լիցքերի, զուցազրում են նույնանման փոխազդեցություն վերահիշյալ իոնների նկատ:

**Abstract** — The interaction of inorganic cations  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  with the phosphatidylcholine bilayers containing 6 mol per cent of gangliosides from human brain  $G_{M1}$ ,  $G_{D1a}$ ,  $G_{T1b}$  was investigated. Bivalent cations  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  adsorb on gangliosides identically, but stronger than monovalent  $K^+$  and  $Na^+$  having the same binding constant. It was shown that gangliosides  $G_{D1a}$  and  $G_{T1b}$  interact with all investigated cations likewise the  $G_{M1}$ .

**Ключевые слова:** бислоиные липидные мембраны, ганглиозиды мозга, адсорбция ионов.

Ганглиозиды являются важными липидными компонентами биологических мембран. Одной из основных функций ганглиозидов на поверхности клетки считается рецепторная функция, которая связана с полярной углеводной головкой молекулы ганглиозида. Так, известно, что

они связывают целый ряд физиологически активных веществ: бактериальные токсины, вирусы, гормоны, лектины и др. [6]. В литературе высказывалось также предположение, что взаимодействие ганглиозидов с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к передаче первого импульса по синапсам [12].

Очевидно, что детальное исследование адсорбции даже простых неорганических ионов, обычно присутствующих во внутри- и внеклеточной среде, существенно расширит понимание сложных физиологических процессов, протекающих на поверхности биомембран. Такого рода исследования на биомембранах в настоящее время невозможны. Это диктует необходимость использования модельных систем.

Многие авторы изучали взаимодействие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с ганглиозидами на различных модельных системах: монослоях [9], мицеллах [7], липосомах [10] и плоских липидных бислоях [14]. Однако полной ясности в вопросе связывания ионов кальция ганглиозидами пока нет. Имеется существенный разброс в значениях констант связывания, приводимых различными авторами [7, 9, 10]. Еще хуже изучено взаимодействие ганглиозидов с ионами  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ .

Нами исследовано взаимодействие бислоевых липидных мембран (БЛМ), приготовленных из смеси фосфатидилхолина (ФХ) с индивидуальными ганглиозидами ( $\text{G}_{\text{M1}}$ ,  $\text{G}_{\text{D1a}}$ ,  $\text{G}_{\text{T1b}}$ ) мозга человека, с неорганическими катионами, представляющими биологический интерес ( $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).

*Материал и методика.* Для формирования мембран использовали яичный ФХ и различные ганглиозиды мозга человека —  $\text{G}_{\text{M1}}$ ,  $\text{G}_{\text{D1a}}$ ,  $\text{G}_{\text{T1b}}$  — выделенные по описанному методу [13]. Контроль чистоты фосфолипидов и ганглиозидов проводили методом тонкослойной хроматографии [4]. Все исследованные липиды были хроматографически однородными веществами.

В качестве растворителей для мембранообразующих смесей использовали перегонные хлороформ и декан. Высушенную под вакуумом смесь ФХ с ганглиозидом (около 6 мольных % ганглиозида) сначала растворяли в небольшом количестве хлороформа, а затем добавляли декан при слабом нагревании ( $\sim 40^\circ\text{C}$ ) и течение нескольких минут до полного удаления хлороформа. Концентрация суммарных липидов в мембранообразующей смеси составляла 20 мг/мл. Мембраны формировали в 10–3M растворе KCl нанесением капли мембранообразующего раствора на отверстие ( $\sim 1$  см) в перегородке двухкамерной тefлоновой ячейки (объемом 10 мл).

Удельные проводимость и емкость мембран определяли по методу, описанному в [8]. Изменение граничного потенциала в зависимости от состава среды измеряли двумя методами: потенциодинамическим [1] и методом индуцированной ионактивной калиевой проводимости [11]. При измерениях потенциодинамическим методом pH и концентрации электролитов  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  изменяли на одной стороне мембраны введением в ячейку небольших количеств соответствующих концентрированных растворов. При измерениях методом индуцированной ионактивной калиевой проводимости в оба отделения ячейки добавляли ионактив в концентрации  $1,25 \cdot 10^{-6}$  M. Изменение граничного потенциала рассчитывали по формуле

$$\Delta\varphi = \frac{2,3RT}{F} \lg C_1/C_2,$$

где  $C_2$  — проводимость БЛМ в фоновом электролите, остальные константы имеют свое обычное значение.

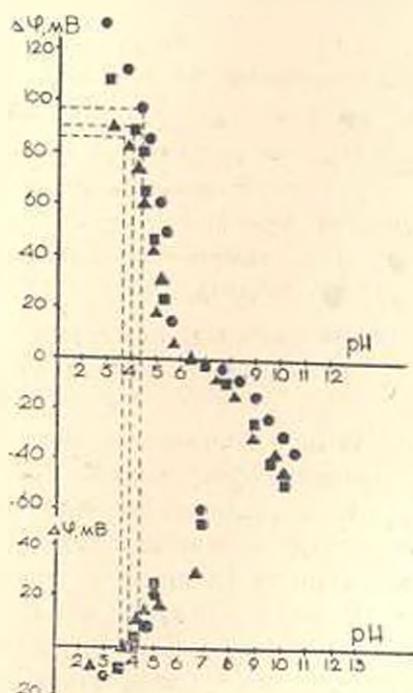
При определении изоэлектрических точек и потенциалов нулевого заряда использовали подход, описанный в [2].

Растворы готовили на дистиллированной (или бидистиллированной) воде из реактивов марки «хч». pH растворов поддерживали около  $6,8 \pm 0,2$  введением небольших количеств КОН. В одинаковых условиях результаты экспериментов, полученные при использовании дистиллированной и бидистиллированной воды, совпадали. Для устранения примесей многозарядных ионов в растворе фонового электролита в ячейку вводили  $10^{-4}$  М ЭДТА. Ячейку термостатировали при  $30^\circ$ .

**Результаты и обсуждение.** Все исследованные ганглиозиды в смеси с ФХ образуют достаточно устойчивые мембраны. Удельное сопротивление таких мембран ниже, чем у бислоев из чистого ФХ, и составляет  $10^7 - 2 \cdot 10^7$  Ом·см<sup>2</sup>, удельная емкость  $0,32$  мкФ/см<sup>2</sup>, натяжение  $0,6$  дин/см. Емкость и проводимость БЛМ практически не меняются при замене  $G_{M1}$  на  $G_{D1}$  или  $G_{T1}$ . Известно, что ганглиозиды в отличие от фосфолипидов достаточно хорошо растворяются в воде. Поэтому были проведены контрольные эксперименты, позволяющие оценить возможность выхода ганглиозидов в водный раствор. Для этого измеряли поверхностный потенциал БЛМ в ячейках разного объема ( $10$  и  $1,5$  мл), так как выход ганглиозидов в раствор должен сопровождаться уменьшением поверхностного потенциала, зависящим от объема водной фазы. Однако поверхностные потенциалы БЛМ в обоих случаях были одинаковы и не изменялись в течение  $1,5$  ч.

Собственный потенциал бислоев, измеренный методом индуцированной проводимости, составил  $70 - 75$  мВ независимо от типа ганглиозида. При определении собственного потенциала мембран по методу точки нулевого заряда [2] значения его получаются выше  $90 - 100$  мВ, но практически не зависят от типа ганглиозида.

Рис. 1а). Экспериментальные зависимости  $\Delta\varphi$  (pH) для мембран, содержащих 6 мольных %  $G_{M1}$  ( $\blacktriangle$ ), 6 мольных %  $G_{D1}$  ( $\blacksquare$ ) и 4,3 мольных %  $G_{T1}$  ( $\bullet$ ). б). Определение изоэлектрических точек указанных БЛМ при нейтрализации протонами. (Значения символов те же, что и на рис. 1а). Разброс значений  $\Delta\varphi$  в различных экспериментах невелик и не превышает  $2 - 3$  мВ.



На рис. 1 приведены экспериментальные зависимости  $\Delta\varphi$  (pH) для исследованных бислоев (рис. 1а) и изоэлектрические точки мембран того же состава при нейтрализации ионами  $H^+$  (рис. 1б). Как видно,

изоэлектрическая точка мембран, содержащих 6 мольных % ганглиозидов, соответствует  $pH \sim 3,2-3,4$ , что достаточно хорошо совпадает со значением, полученным для БЛМ из смеси 95% ФХ+5% фосфатидилсерина, содержащего, как и ганглиозиды, карбоксильную группу [3]. Следовательно, можно считать, что значение  $pK$  карбоксильной группы ганглиозида равно  $\sim 2,2$ , как и значение  $pK$  фосфатидилсерина [5].

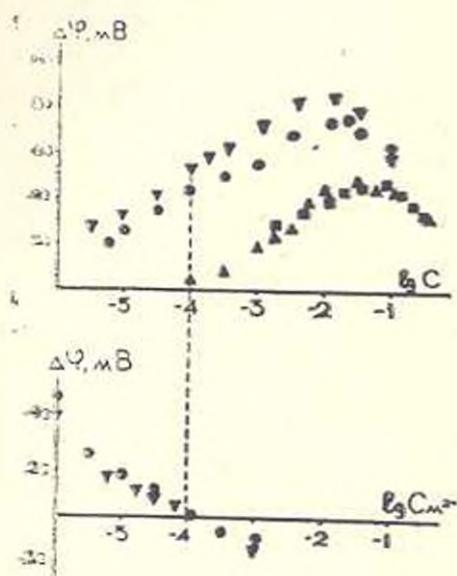


Рис. 2.

Рис. 2 а). Адсорбция на бислоях, содержащих  $G_{M1}$ , ионов  $Ca^{2+}$  ( $\nabla$ ),  $Mg^{2+}$  ( $\bullet$ ),  $K^+$  ( $\blacksquare$ ) и  $Na^+$  ( $\blacktriangle$ ). б). Определение изоэлектрических точек БЛМ, содержащих  $G_{M1}$ , при нейтрализации ионами  $Ca^{2+}$  ( $\nabla$ ) и  $Mg^{2+}$  ( $\bullet$ ). По оси абсцисс отложен десятичный логарифм концентраций соответствующих ионов.

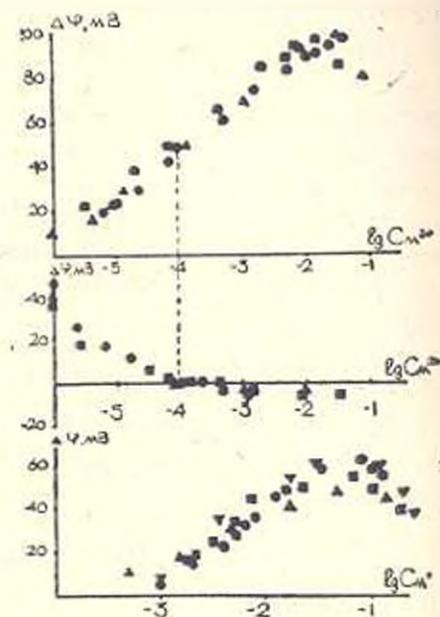


Рис. 3.

Рис. 3 а). Адсорбция ионов  $Ca^{2+}$  на  $G_{D1}$  ( $\bullet$ ),  $G_{T1b}$  ( $\blacktriangle$ ) и ионов  $Mg^{2+}$  на  $G_{D1}$  ( $\blacksquare$ ). б). Определение изоэлектрических точек БЛМ при нейтрализации ионами  $Ca^{2+}$  ( $\bullet - G_{D1}$ ,  $\blacktriangle - G_{T1b}$ ) и  $Mg^{2+}$  ( $\blacksquare - G_{D1}$ ). в) Адсорбция однозарядных катионов на бислоях, содержащих  $G_{D1}$  ( $\bullet - K^+$ ,  $\blacktriangle - Na^+$ ), и на мембранах, содержащих  $G_{T1b}$  ( $\blacktriangle - K^+$ ,  $\blacksquare - Na^+$ ).

На рис. 2 приведены зависимости разности граничного потенциала от концентрации ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  на бислоях, содержащих  $G_{M1}$ , полученные потенциодинамическим методом. Те же значения получены при измерениях методом индуцированной неактивной калиевой проводимости (данные не приводятся).

На рис. 3 показаны аналогичные зависимости для БЛМ, содержащих 5 мольных %  $G_{D1}$  (рис. 3 а) и 4,3 мольных %  $G_{T2b}$  (рис. 3 б). Очевидно, что адсорбционная активность всех исследованных ганглиозидов практически одинакова.

По точкам пересечения кривой  $\Delta\psi$  ( $lg c$ ) с осью абсцисс на рисунках 2б и 3б можно оценить константы связывания двухвалентных ка-

тионов [2]. Значения этих констант для разных ганглиозидов лежат в интервале  $10^3$ — $10^4$   $M^{-1}$ . Поскольку ионы  $Ca^{2+}$  начинают вытеснять ионы  $K^+$  и  $Na^+$  при концентрациях, на 3 порядка меньших, чем концентрации одновалентных катионов, константы связывания для последних могут быть оценены как  $1$ — $10$   $M^{-1}$ . Полученные значения констант практически совпадают с константами связывания соответствующих ионов с фосфатидилсерином [2].

Отметим, что в работе [10] получены значения константы связывания ионов  $Ca^{2+}$  в интервале  $0$ — $100$   $M^{-1}$ , что заметно ниже приводимых в нашей статье величин. Причину расхождения, вероятно, следует искать в различных модельных системах, на которых получены указанные данные, а также в условиях проведения эксперимента.

Очевидно, что полного понимания механизма взаимодействия ганглиозидов с ионоорганическими ионами можно достичь, лишь продолжив исследования в этом направлении и разработав адекватную теорию адсорбции ионов на ганглиозидах, позволяющую уточнить значения констант связывания и степень удаленности заряда ганглиозидной головки от поверхности бислоя.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абидор И. Г., Айтьян С. А., Черный В. В., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 245, 977—981, 1979.
2. Абидор И. Г., Матинян Н. С. Биолог. мембраны, 2, 1029—1048, 1985.
3. Иakov В. Г., Бгрестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
4. Кейтс М. Техника липидологии, М., 1975.
5. Матинян Н. С., Эрицар Н. А., Абидор И. Г. Биолог. мембраны, 1, 254—267, 1984.
6. Проказова Н. В. Усп. биол. хим., 23, 40—60, 1982.
7. Benz J., Lehn J. FEBS Lett., 31, 197—209, 1973.
8. Chernomordik L. V., Melikyan G. B., Dubrovina N. J., Abdor I. G., Chizmadzhev Yu. A. Bioelectrochem and Bioenerg., 12, 155—156, 1984.
9. Maggio B., Cumar F., Caputto R. BBA, 650, 69—80, 1981.
10. McDaniel R., McLaughlin S. BBA, 819, 153—160, 1985.
11. McLaughlin S. In: Current Topics In Membranes and Transport, Acad Press N.—Y, 9, 70—144, 1977.
12. Rahmann H., Rosner H., Breer H. J. Theor. Biol., 57, 231—237, 1976.
13. Seyfried T. N., Ando F., Yu. R. K. J. of Lipid Res., 19, 538—543, 1978.
14. Usal C., Marchetti C., Gambale F., Robello M., Gorko A. FEBS Lett., 153, 315—319, 1983.

Поступило 28 VII 1986 г.