

6. Маркович М. И., Ландау М. А., Рудзит Э. А. Хим. фарм. ж., 8, 16, 1976.
7. Розенфельд М. А., Ерзичьян К. Л., Пирюзян Л. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 419, 1975.
8. Розенфельд М. А., Петросян М. Т., Пирюзян Л. А. Тез. докл. II Всесоюзн. конф. по спектроскопии биополимеров 85, Харьков, 1974.
9. Friisk-Holmberg M. Acta physiol. scand., 84, 376, 36, 1972.
10. Gorter E., Vanninga L. Disc. Farad. Soc., 13, 205, 1953.
11. Lindahl U., Roden L. J. Biol. Chem., 240, 2821, 1965.

Поступило 28 VII 1986 г.

Биол. ж. Армении, т. 40, № 3, 200—204, 1987

УДК 577.352.2

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН, Г. Г. МАРИКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский филиальный институт ГКАЭ

Аннотация — Показано, что смешанные липосомы, образованные молекулами яичного лецитина и дезоксихолата натрия, имеют более высокую ионную проницаемость по сравнению с бездетергентными липосомами, в то же время проницаемость для глюкозы у них практически не зависит от концентрации детергента. Дезоксихолат натрия оказывает влияние на проницаемость липосомальной мембраны при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования.

Անոտացիա — Ծույց է տրված, որ մի և՛ լեցիտինի և նատրիումի զեզօքսիխոլատի մոլեկուլներից կազմավորված խառը լիպոսոմների թափանցելիությունը իոնների համար ավելի բարձր է՝ համեմատած առանց զետերգենտի կազմավորված լիպոսոմների հետ: Միևնույն ժամանակ գլյուկոզայի համար թափանցելիությունը կախված չէ զետերգենտի կոնցենտրացիայից: Նատրիումի զեզօքսիխոլատը ազդեցություն է գործում լիպոսոմային թաղանթների թափանցելիության վրա միջէլիակազմավորման կոնցենտրացիայից բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում:

Abstract — It is shown that mixed liposomes egg lecithin and sodium deoxycholate are more permeable to ions than those without detergents, whereas the liposome permeability to glucose practically does not depend on detergent concentration. The sodium deoxycholate influences on the liposome membrane permeability above the critical micellization concentration.

Ключевые слова: липосомальная мембрана, ионная проницаемость, детергент.

Известно, что детергенты в высоких концентрациях используются для солюбилизации биологических мембран. При более низких концентрациях они включаются в белой с образованием смешанных белых [14]. Соотношение детергент:липид, при котором происходит включение детергента в белой с сохранением липидной белой структуры, зависит как от природы детергента и липида, так и от ионной силы и температуры раствора, причем в большинстве случаев это соотношение не

превышает 0,5. При более высоком соотношении (от 0,8 до 3,0) биелон переходят в смешанные мицеллы [6].

Хотя включение детергента в липид не приводит к разрушению структуры [15], однако происходящие в ней нарушения приводят к изменению проницаемости мембран [3, 7].

Ранее нами было показано, что липосомы, образованные с 10 мМ дезоксихолата натрия (ДХНа) при соотношении детергент:липид=0,2, не обнаруживают изменения проницаемости для глюкозы по сравнению с бездетергентными липосомами [1, 13]. В данной работе приводятся результаты исследования ионной проницаемости липосом, образованных с различными количествами детергента.

Материал и методика. Опыты проводили на яичном лецитине Харьковского завода динреактивов. Очистку лецитина от лизолецитина осуществляли с помощью окиси алюминия. Сухую липидную пленку, полученную на роторном испарителе и очищенную от паров хлороформа, эмульгировали вручную в течение 15 мин в 20 мМ триацетатном буфере с 130 мМ КСl и различными концентрациями детергента (от 0,6 до 20 мМ). pH раствора равен 8,2. Соотношение липид:буфер равнялось 50 мг/мл. Полученную суспензию отстаивали в течение часа для образования мультимеллярных липосом. Для получения униламеллярных липосом отстаиванную эмульсию озвучивали в трубчатом озвучивателе с частотой 22 Гц в течение 1,5 мин на УЗДН-2. Препарат просветлялся и хорошо опалесцировал. Если опалесценция была слабой, что бывало при низких концентрациях детергента, то препарат озвучивали несколько раз по 1,5 мин. Затем суспензия отстаивалась в течение часа для получения крупных униламеллярных липосом.

Размер липосом определяли методом светорассеяния [2] на спектрофотометри «Specord M40», (ГДР).

Для определения суммарного объема липосом при их образовании в раствор добавляли глюкозу, концентрация которой равнялась 20 мг%. Глюкозу определяли энзиматическим методом [9] на спектрофотометри «Specord M40». Суммарный объем липосом определяли по выходу глюкозы из липосом, лизированных Тритоном X-100 в концентрации 5 мМ, что заведомо превышало концентрацию этого детергента, используемого с той же целью в работе [8].

Потоки ионов из липосом определяли методом диализа. Использование диализных мешков было неудобно из-за большого количества складок целлофановой мембраны. Поэтому опыты проводили в цилиндрической камере с натянутой целлофановой мембраной с диаметром 11 мм. Количество суспензии в камере равнялось 0,1 мл. В качестве отмывающего раствора использовали триацетатный буфер с эквивалентным количеством NH_4Cl . Концентрацию ионов калия в отмывающем растворе определяли на плазменном фотометре ПФМ-У 4. В конце отмывки определяли концентрацию ионов в камере. Соотношение объемов суспензии и отмывающего раствора варьировало от 80 до 5000. Перемешивание раствора проводили на магнитной мешалке.

Результаты и обсуждение. При работе со смешанными липосомами, имеющими высокую мембранную проницаемость, использование диализного метода встречает определенные трудности, связанные с тем, что константа скорости выхода ионов из диализного мешка становится сравнимой с константой скорости выхода через липосомальную мембрану. В системе типа ячейка—целлофановая мембрана—наружный раствор изменение количества ионов в ячейке происходит согласно уравнению:

$$M_t = M_0 \exp(-kt).$$

где M_t —количество ионов в момент времени t , M_0 —количество ионов в

нулевой момент времени, t —время отмывки ионов из ячейки, k —наклон зависимости $\ln M_0/M_1$, называемый константой скорости. Даже если объем наружного раствора достаточно велик, обязательно возникает встречный поток в ячейку, который со временем уравнивает выходящий поток, т. е. измеренный поток ионов является разностным. Так как даже в условиях перемешивания у границы мембраны образуется перемешиваемый слой, то встречный поток будет пропорционален концентрации ионов в этом слое. Это означает, что определяемая константа скорости входа ионов из наружного раствора в ячейку—это эффективная, а не реальная константа. Константа выхода ионов из ячейки в наружный раствор k_{22} определялась из тех соображений, что для формирования перемешиваемого слоя нужно определенное время. При отмывке ячейки в большом объеме раствора в течение короткого времени (~ 10 с) встречный поток ничтожно мал, поэтому найденное отсюда значение k_{21} близко к истинному.

Из системы кинетических уравнений, описывающих скорость изменения количества ионов в ячейке и среде, было найдено уравнение, которое можно решить графически:

$$k_{22} + k_{32} = \frac{\ln \frac{M_0 \left(1 - \frac{k_{22}}{k_{22} + k_{32}} \right)}{M_2 \left(1 - \frac{k_{22}}{k_{22} + k_{32}} \cdot \frac{M_0}{M_2} \right)}}{t},$$

где M_2 —количество ионов в ячейке, k_{22} —константа скорости выхода ионов, M_0 —исходное количество ионов в ячейке.

Рассматривая его относительно k_{22} , по графику пересечения левой и правой частей уравнения, можно найти искомое значение k_{22} , равное $(1,2 \pm 0,15) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Если же внутри целлофанового мешка содержится суспензия с липосомами, содержащими те же ионы, что и в омывающем их растворе, то решение системы кинетических уравнений будет следующим:

$$k_{12} = \frac{\ln \frac{M_1^0 \cdot \left(1 + \frac{k_{12} - k_{22}}{k_{22} - k_{21} - k_{12}} \right)}{M_1 + M_2 - \frac{k_{22}}{k_{22} + k_{32}} \cdot M_0}}{t},$$

где M_1^0 —количество ионов в липосомах в момент времени $t=0$, k_{12} —константа скорости выхода ионов из липосом в окружающий раствор. Полученное трансцендентное уравнение решается методом последовательных приближений. Вычисленные таким способом константы скорости выхода ионов k_{12} через липосомальную мембрану при различных концентрациях детергента представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, увеличение концентрации детергента от 0,8 до 10 мМ не вызывает изменения константы скорости выхода ионов калия, и только начиная с 15 мМ значение константы существенно увеличива-

ется. Возможно, это связано с тем, что ДХНа оказывает действие при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования [11]. Аналогичная картина наблюдалась и для лизолецитина, в то время как Тритон X-100 оказывает влияние в мономерной форме [8].



Зависимость константы скорости выхода ионов калия из липосом от концентрации дезоксихолата натрия в суспензии липосом.

Поскольку истинной характеристикой барьерной функции мембраны липосом при изменении ряда параметров является не константа скорости, а коэффициент проницаемости, то для его вычисления необходимо было определить размер липосом и количество вещества, заключенное в них, которое вычислялось по внутреннему объему липосом.

Измерение размеров липосом проводили методом светорассеяния. Экспериментально определяли оптическую плотность $D = \tau/2,3$ в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм и по тангенсу угла наклона прямолинейной зависимости $\lg \tau$ от $\lg \rho$ определяли n -функцию относительного размера липосом L . В работе Кленина [2] n калибровано по L и m (относительный показатель преломления) в диапазоне $1 < L < 25$, $1,05 < m < 1,30$, откуда берется соответствующее значение n при $m = 1,10$.

Суммарный внутренний объем липосом, определяемый по количеству глюкозы, выходящей из липосом при лизисе Тритоном X-100, лежит в пределах 9–13%. Это совпадает с величиной, полученной нами при использовании осмотического шока. Количество глюкозы определяли методом ферментного электрода [1].

Лизис липосом, вызываемый добавлением Тритона X-100, можно считать полным, так как количество глюкозы, определяемое после лизиса липосом, равно исходному количеству глюкозы в растворе, используемом для получения липосом.

Расчет коэффициента проницаемости проводили по формуле $P = 1/3 \cdot k_{12} \cdot \bar{r}$, где P — коэффициент проницаемости, \bar{r} — средний радиус липосом, k_{12} — константа скорости выхода ионов.

В таблице приведены коэффициенты проницаемости мембран липосом для ионов калия при различных соотношениях детергент:липид. Размер липосом и суммарный внутренний объем определяли одновременно в каждом опыте. В таблице представлены результаты индивидуальных опытов. В большинстве опытов радиус липосом равнялся 720–840 Å. Крайние значения радиусов липосом, наблюдаемые в отдельных опытах, варьировали от 600 до 1500 Å. Приведенные в таблице значения P на 2–3 порядка выше проницаемости мелких униламеллярных липосом с $\bar{r} = 250$ Å, полученных бездетергентным способом [13]. В то же время проницаемость липосомальной мембраны для глюкозы не зависит от включения в нее ДХНа. По-видимому, нарушения, вно-

Проницаемость липосом для ионов калия при различных отношениях концентраций ДХНа:липид.

R	$k_{12} \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$\bar{r}, \text{ \AA}$	V, %	$P_k \times 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$
0.016	0.15	720	13	0.36
0.075	0.16	840	9	0.46
0.12	0.14	720	6	0.34
0.16	0.13	780	11	0.34
0.20	0.30	720	11	0.72
0.30	2.5	810	10	7.0
0.40	3.5	760	10	9.1

Примечание: R—отношение концентраций дезоксихолата натрия к концентрации липида в суспензии липосом; k_{12} —константа скорости выхода ионов калия из липосом; \bar{r} —средний радиус липосом; V—суммарный внутренний объем липосом в процентах от общего объема суспензии; P_k —коэффициент проницаемости липосомальной мембраны для ионов калия.

симые включением ДХНа, не влияют на проницаемость глюкозы через мембрану.

Известно, что при включении ДХНа его гидроксильные группы встраиваются в гидрофобную область бислоя [11, 12], разрушая ее, что должно существенно облегчить прохождение ионов через бислой. Кроме того, включение анионного детергента, каковым является ДХНа, должно способствовать продвижению положительно заряженного иона. Полученные результаты находятся в соответствии с предположением, что проницаемость для воды и неэлектролитов зависит в основном от прохождения этих веществ через границу липид—раствор [4, 5], а для диффузии ионов основным энергетическим барьером является липидный бислой [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян Ц. М., Адамян С. Я., Ахбарцумян Т. Г., Оганесян Ж. А., Петросян Л. С., Симолян А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э. Биолог. ж. Армения, 38, 83—85, 1985.
2. Клеин В. Н., Щеголева С. Ю., Лаврушин В. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов, 1977.
3. Ксенжек О. С., Гевод В. С., Омельченко И. М. Электрохимия, 11, 1560—1570, 1977.
4. Demel R. A., Bruckdorfer K. R., Van Deenen L. L. M. Biochim et Biophys Acta, 255, 321—352, 1972.
5. Graziani Y., Liere A. I. Membr. Biol., 7, 275—284, 1972.
6. Helenius A., Simons K. Biochim. et Biophys. Acta, 415, 29—79, 1975.
7. Inoue K. J. Jap. Oil Chem. Soc., 26, 588—596, 1977.
8. Inoue K., Kitagawa T. Biochim. et Biophys. Acta, 263, 361—372, 1971.
9. Lamprecht W., Trautschold J. in: Methods of Enzymatic Analysis. H. Bergmeyer (ed.), N. Y., L., 1963.
10. Lee Y., Chan J. Biochemistry, 16, 1303—1309, 1977.
11. Lichtenberg D., Robson R., Dennis E. Biochim. et Biophys. Acta, 737, 235—304, 1983.
12. Mazer N. A., Benedek G. B., Carey M. C. Biochemistry, 19, 601—615, 1980.
13. Papahadjopoulos D., Kimmelberg H. K. Progr. Surface Sci., 4, 111—232, 1973.
14. Ribelro A. A., Dennis E. A. Biochem. et Biophys. Acta, 332, 26—35, 1974.
15. Van Zutphen H., Merola J. A., Brierley G. P., Cornwell D. G. Arch. Biochem. Biophys., 152, 755—766, 1972.

Получено 28.VII 1986 г.